

Stereokemi og bivirkninger

Formål

Formålet med øvelsen er at syntetisere lægemidlet Ibuprofen, hvorved det fremstilles som en racemisk blanding, der efterfølgende adskilles i to enantiomere former.

Introduktion

Øvelsen består af tre dele:

I den første del skal det medicinske stof 2-(4-isobutylphenyl)propansyre, bedre kendt som ibuprofen, fremstilles som en blanding af stereoisomerer (et såkaldt racemat)

I den anden del, adskilles racematet i sine to enantiomere former ved hjælp af krystallisation med et andet kiralt stof. Der renhedstestes ved brug af smeltepunktsanalyser, massespektrometri (MS), og NMR-analyse (^1H - og ^{13}C -NMR-spektre)

I tredje del arbejdes der med polarimetri, da de to enantiomerer drejer planpolariseret lys i hver sin retning, dette udnyttes til bestemmelse af optisk renhed.

Mange kemiske stoffer fremstilles som blandinger af enantiomerer (spejlbilledeisomerer), og må først derefter adskilles, idet én enantiomer kan være nyttig mens den anden kan være direkte skadelig.

I øvelsen her ønskes det at (*S*)-(+)-enantiomeren, kaldet dexibuprofen og som er biologisk aktiv, isoleres fra blandingen med (*R*)-(–)-enantiomeren, som er biologisk inaktiv.

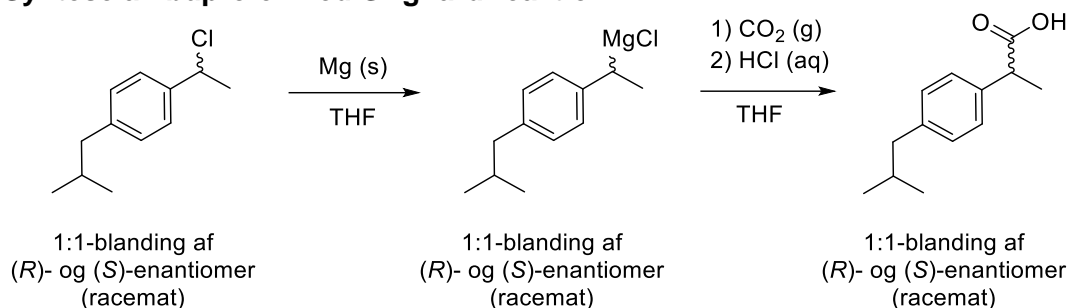
Ibuprofen sælges som racemat idet (*R*)-enantiomeren ikke er påvist skadelig, og fordi invertering (omdannelse af (*R*)- til (*S*)-enantiomer) af ibuprofen sker i kroppen. Studier har dog vist, at der kan være store individuelle forskelle, hvilket betyder at der er usikkerhed i hvilken dosis aktivt lægemiddel en patient får. Det kan også betyde en forskel i bivirkninger fordi inversions-processen påvirker den normale lipid metabolisme. Dexibuprofen (lægemiddel bestående af (*S*)-enantiomeren af ibuprofen) kan gives i en lavere dosis, hvilket giver færre bivirkninger. Det relaterede lægemiddel naproxen sælges også som ren (*S*)-enantiomer; her er (*R*)-enantiomeren sat i forbindelse med sjældne tilfælde af leverskade.

Risiko og sikkerhed

Der bæres kittel, briller og handsker under syntesen, og den organiske syntese udføres i stinkskab. Produkter og splid opsamles til kemikalieaffald. Nærmere instrukser følger på 1. øvelsesdag.

Fremgangsmåde

Del 1: Syntese af ibuprofen ved Grignard-reaktion



Figur 1. Reaktionsskema for del 1. Den bølgede streg betyder at der er en blanding af stereoisomerer.

En rundbundet kolbe med magnet og svalerør flammestørres¹. Magnesiumspåner (2.5 g) tilsættes under nitrogen. Herefter tilføjes tør tetrahydrofuran² (50 mL), 1,2-dibrom-ethan³ (0.2 mL) og racemisk 1-chlor-1-(4-isobutylphenyl)ethan (1.25 mL) (i den nævnte rækkefølge) igennem et gummi-septum⁴. Reaktionsblandingen opvarmes under omrøring til mild kogning. Når reaktionen begynder at koge varmes der i yderligere 45 minutter, hvorefter der slukkes for varmen. Når reaktionsblandingen har nået stuetemperatur tilsættes CO₂-gas⁵ over 20-30 min med god omrøring. Derefter dekanteres reaktionsblandingen over i en skilletragt^{6,7}, og reaktionskolben skylles efter med diethylether, som også hældes med i skilletragten. Herefter tilføjes 10% HCl (40 mL) og der omrystes. Den organiske fase hældes fra og den vandige fase ekstraheres med yderligere 2 x 30 mL diethylether. De tre organiske faser kombineres og vaskes derefter to gange med 5% NaOH opløsning (2 x 25 mL). De to vandige faser kombineres, og der tilsættes derefter 10% HCl opløsning (30 mL), og der kontrolleres med pH-papir om opløsningen er blevet sur. Vandfasen ekstraheres herefter to gange med diethylether (2 x 30 mL), og de kombinerede organiske faser tørres derefter med vandfrit natriumsulfat⁸. Efter filtrering afdampes opløsningen på rotationsfordamper⁹, og udbyttet bestemmes når stoffet er helt tørt (solventfrit). Udbyttet for reaktionen bestemmes som massen af det opnåede produkt i forhold til den maksimalt opnåelige masse af produkt, der teoretisk kan dannes fra de benyttede udgangsstoffer. Prøver udtages til NMR (ca. 5 mg), MS (ca. 1 mg) og til polarimetri (20 mg/mL opløst i ethanol). Alle spektre (NMR og MS) gennemgås efterfølgende og man får spektre med hjem.

¹ Se appendiks 1 for opstilling.

² Tør tetrahydrofuran (THF) er fri (eller næsten fri) for vand (typisk under 50 ppm). Det tørres ved destillation eller med molekylési, som er et porøst materiale med vandbindende egenskaber.

³ Dibrom-ethan hjælper med at fjerne det beskyttende lag af MgO der dannes på overfladen af Mg-spånerne.

⁴ Et gummi-septum er en gas-tæt prop, hvorigennem man med en sprøjtekanyle kan tilsætte væsker.

⁵ CO₂-gas frigives fra tøris i denne øvelse.

⁶ Undgå at der kommer for meget Mg-metal med i skilletragten, men der er okay hvis der kommer en lille smule med.

⁷ Se appendiks 2 om brug af skilletragt.

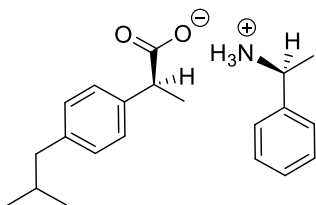
⁸ Vandfrit natriumsulfat bruges til at fjerne resterne af det vand som evt. måtte være i det organiske solvent. Dette gøres ved at tilsætte en skefuld af gangen hvorefter kolben rystes forsigtigt i 30 sekunder. Hvis natriumsulfatet er klumpet sammen på bunden skal der tilsættes mere. Når man tilsætter natriumsulfat uden at det klumper, så er det tørt (tænk på de julekugler, som man kan ryste for at se et snelandskab). Derefter filtreres natriumsulfaten væk med tragt og foldefilter, og der vaskes med en smule friskt solvent, for at få alt produktet med.

⁹ En rotationsfordamper er et instrument, som varmer, roterer, og laver et vakuum samtidig således at vi hurtigt og nemt kan fjerne alt opløsningsmidlet.

Del 2: Adskillelse af ibuprofen stereoisomerer

Krystallisation med kiral modion

I en konisk kolbe tilsættes racemisk ibuprofen (6 g)¹⁰, og stoffet opløses i en 0.24 M opløsning af KOH (90 mL) under omrøring. Opløsningen opvarmes til mellem 75 og 85 °C, hvorved størstedelen af ibuprofen skulle opløses. Herefter tilføjes (*S*)-(-)- α -phenethylamin (1.7 mL) langsomt til blandingen, hvorefter udfældning finder sted. Opløsningen holdes under omrøring og ved samme temperatur i yderligere en time, hvorefter kolben tages af varmen og køles til stuetemperatur. Det udfældede stof isoleres ved sugefiltrering¹¹. Filtratet (væsken i sugekolben) gemmes til senere*. Det faste stof vaskes med en minimal mængde iskoldt vand og presses på filteret indtil det er "tørt". Herefter vejes stoffet og placeres i et bægerglas med 20 mL 2-propanol pr. gram stof. Et urglas placeres over bægeret og det varmes op på magnetomrørerpladen indtil solventet koger¹². Når dette er sket fjernes bægerglasset fra varmen og det henstilles til nedkøling til stuetemperatur, hvorefter bægerglasset placeres i et isbad i 15 minutter. De udfældede krystaller sugefiltreres og vaskes med iskoldt vand, hvorefter de tørres og vejes. En lille prøve udtages til smeltepunktsanalyse¹³.



Figur 2. Kiralt salt af (*S*)-ibuprofen og (*S*)- α -phenethylamin

Fjernelse af kiral modion

De tørrede krystaller overføres til et bægerglas med en stangmagnet i bunden. En vandig opløsning af svovlsyre (2 M, 60 mL) tilføjes og opløsningen omrøres i 5 minutter, hvorved krystallerne opløses og danner olie-dråber i opløsningen¹⁴. Opløsningen og oliedråberne overføres til en skilletragt¹⁵. Der skylles efter med 15 mL *tert*-butyl-methylether. Herefter ekstraheres og den organiske fase skilles fra. Opløsningen ekstraheres yderligere to gange med 15 mL af *tert*-butyl-methylether. De organiske faser kombineres og vaskes først med 15 mL vand og derefter med 15 mL mættet saltvand. Den organiske fase tørres med vandfrit natriumsulfat, filtreres og afdampes på rotationsfordamper. Ved nedkøling efter afdampningen vil stoffet udkrystallisere, og krystallerne henstilles til tørring i luften. De tørrede krystaller vejes og udbyttet bestemmes. En prøve udtages til polarimetri (20 mg/mL opløst i ethanol). Samme proces gentages for filtratet ovenfor, markeret med stjerne (*).

¹⁰ I kan bruge det racemiske ibuprofen i lavede første dag og tilsætte noget kommercielt, racemisk ibuprofen, så I ender på de 6 g.

¹¹ Der benyttes en Büchner-tragt med filterpapir til sugefiltrering.

¹² Hvis alt stoffet ikke kan opløses fjernes bægerglasset fra varmen, og yderligere 5-10 mL af 2-propanol tilføjes og blandingen opvarmes til kogning igen. Dette gentages indtil alt stof er opløst.

¹³ Litteraturværdi: 165-172 °C

¹⁴ Hvis saltet klumper sammen og ikke bliver til en olie, så varmes der på opløsningen.

¹⁵ Hvis noget af olien sidder fast på magneten, kan en smule *tert*-butyl-methylether benyttes til at opløse dette, som derved kan overføres til skilletragten.

Del 3: Polarimetri - bestemmelse af optisk renhed for syntetiseret ibuprofen

Et molekyle der er forskelligt fra sit spejlbillede, er kiralt. Dette betyder, at planpolariseret lys som sendes gennem en opløsning af stoffet, vil få sit polarisationsplan drejet. Drejningsvinklen kan måles ved at anbringe opløsningen i et drejerør mellem to polarisationsfiltre og notere vinklen mellem disse, når lyset passerer. Måling af vinklen sker automatisk.

Den aflæste drejning afhænger af (i) det kirale stof, (ii) koncentrationen af det kirale stof og (iii) længden af drejerøret - samt af opløsningsmiddel og temperatur. Den specifikke drejning $[\alpha]$ fås af:

$$[\alpha]_{\text{obs}} = \frac{\alpha_{\text{obs}}}{c \cdot l}$$

hvor:

α_{obs} = aflæst (observeret) drejning målt i grader ($^{\circ}$). Kan være positiv eller negativ værdi.

c = gram stof pr. mL opløsning (= 0,02 i denne øvelse - fås ved at opløse 2 gram i 100 mL ethanol)

l = længden af drejerøret i dm (= 2 i denne øvelse)

Den specifikke drejning angives typisk ledsaget af oplysninger om lampens bølgelængde, temperatur, opløsningsmiddel og koncentration.

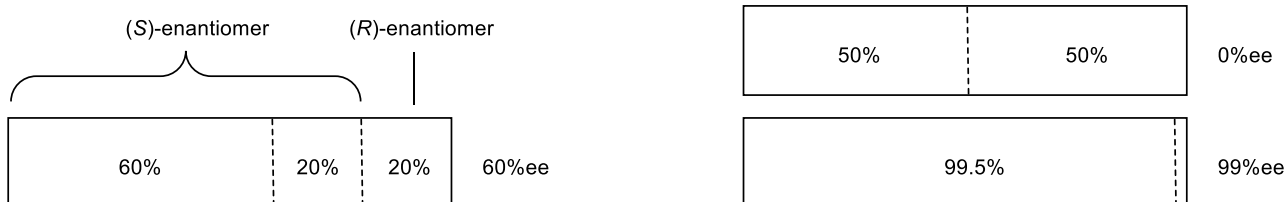
(S)-(+)-ibuprofen har en specifik drejning (litteraturværdi) på $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +59^{\circ}$ (2 g/100 mL ethanol) mens (R)-(-)-ibuprofen har en specifik drejning på $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -59^{\circ}$ (2 g/100 mL ethanol).

"D" angiver, at forsøget er udført med det gule natriumlys, der har en bølgelængde på 589 nm, og 25 angiver temperatur i $^{\circ}\text{C}$.

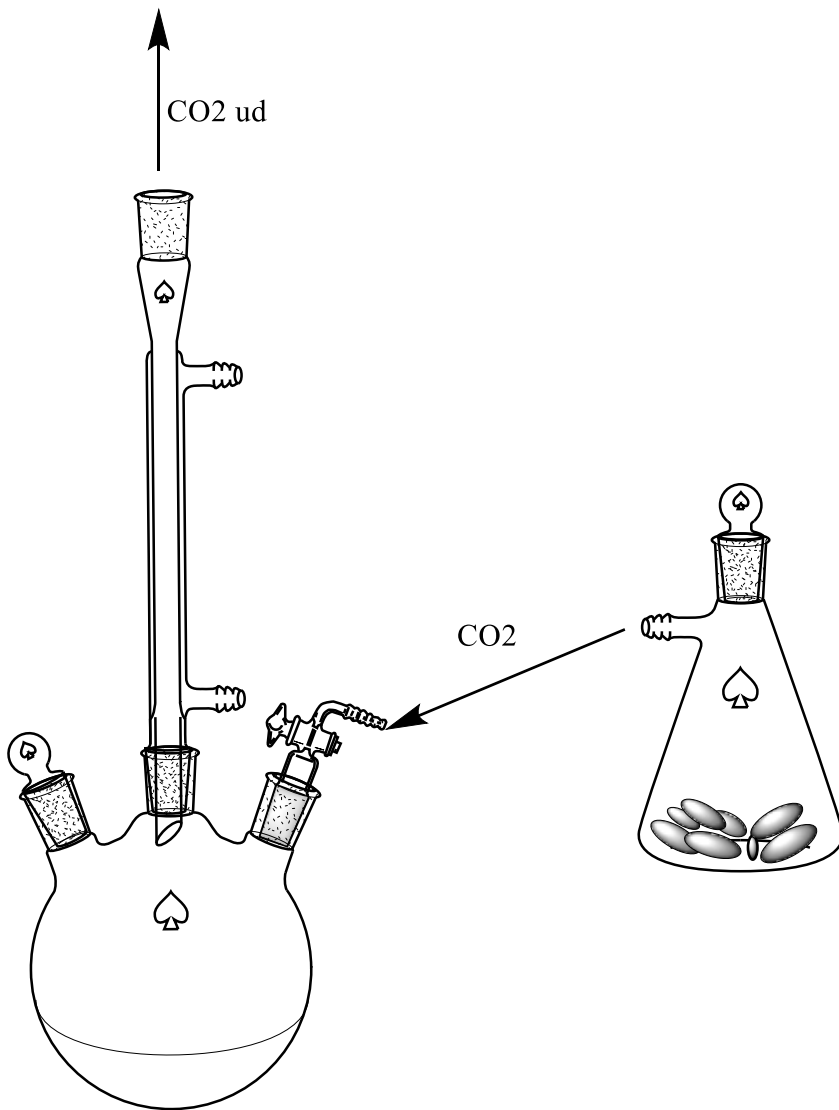
Den optiske renhed er givet ved forholdet mellem den observerede specifikke drejning og den specifikke drejning for ren (S)-(+)-ibuprofen, $[\alpha]_{\text{litteratur}}$:

$$\text{Optisk renhed (\%ee)} = \frac{[\alpha]_{\text{obs}}}{[\alpha]_{\text{litteratur}}} \times 100\%$$

Den optiske renhed kaldes også %ee (*enantiomer excess*), hvilket angiver den procentdel af stof, der er i overskud af den ene enantiomer i forhold til resten af stoffet som racemisk blanding. For eksempel har en blanding af 80% (S)-form og 20% (R)-form en optisk renhed (%ee) på 60%, idet der er 60% (S)-form i overskud i forhold til de 40% af blandingen, som er racemisk (20% (R)-form og 20% (S)-form). Omvendt består en blanding med 99%ee af 99,5% af én enantiomer og 0,5% af den anden enantiomer. Procentdelen af den mest forekommende enantiomer i en blanding kan bestemmes som $50\% + \frac{1}{2} \times \%ee$. Ovenstående eksempler er illustreret i følgende figur:



Appendiks 1



Appendiks 2



Close the stopcock on the separatory funnel and position an Erlenmeyer flask beneath the setup, in case it drips.

Into the separatory funnel pour the liquid to be extracted using a funnel: this prevents liquid from getting on the ground glass joint which can cause it to stick.

Pour the extractive solvent into the funnel.

Hold the separatory funnel so that your fingers firmly cover the stopper.

Invert the funnel and shake gently for **10-20 seconds**.

Periodically "vent" the funnel (open the stopcock while inverted to release pressure). Never point the tip at someone while venting.

Return the separatory funnel to the ring clamp, and allow the layers to separate.

Remove the stopper (it won't drain otherwise).

Drain the majority of the bottom layer into an Erlenmeyer flask.

Stop when roughly 1 cm of the bottom layer is in the funnel, and swirl to dislodge clinging droplets.

Drain the rest of the bottom layer, stopping when the interface is inside the stopcock.

Label the flask (e.g. "bottom aqueous layer").

Pour out the top layer into another Erlenmeyer flask (and label it).

Don't throw away either layer until you are sure you've accomplished the goal of the extraction.

Ekstraktion er en oprensingsmetode, hvor to ikke-blandbare, væskefaser (ofte en organisk og en vandig fase) bruges til at overføre et specifikt produkt fra én fase til en anden, hvilket efterlader urenheder i den oprindelige fase. De to faser overføres til en skilletragt, der derefter lukkes med en prop og rystes forsigtigt. Skilletragten anbringes derefter på et stativ, proppen tages af, og faserne adskilles ved dekantering gennem en hane. Processen gentages om nødvendigt.

Processen kan også benyttes til at ekstrahere (vaske) urenheder fra et produkt i én fase til en anden fase, mens produktet forbliver i den oprindelige fase (ofte den organiske fase).

De vigtige regler for ekstraktion er:

1. Husk altid hvilken fase (organisk/vandig) der er øverst og hvilken der er nederst i skilletragten
2. Ryst den tilproppede skilletragt forsigtigt til at starte med, og peg altid spidsen af den mod bagsiden af stinkskalet
3. Husk at udligne det opbyggede tryk i skilletragten gennem hanen efter hver rystelse
4. Giv de to faser i skilletragten tid til at separere inden dekantering
5. Bortskaf aldrig en fase, før du har isoleret dit produkt!