

**»Mladi za napredek Maribora 2019«
36. srečanje**

LOČEVANJE ENANTIOMEROV S POMOČJO KRISTALIZACIJE

Raziskovalno področje KEMIJA

Raziskovalna naloga

PROSTOR ZA NALEPKO

Avtor: TIMOTEJ ŠUMAN

Mentor: ZDENKA KEUC
Šola: II. GIMNAZIJA MARIBOR

Število točk: 169

Mesto: 1

Priznanje: zlato

Maribor, februar 2019

Kazalo vsebine

POVZETEK	7
ZAHVALA	7
1 UVOD	8
1.1 Namen naloge	10
1.2 Raziskovalno vprašanje	10
1.3 Hipoteze	10
1.3.1 Razlage hipotez	11
1.4 Metode dela	12
2 PREGLED LITERATURE	14
2.1 Kiralni predmeti in kiralne molekule	14
2.1.1 Mezo spojine	16
2.1.2 Racemne zmesi	17
2.1.3 Diastereomeri	17
2.2 Označevanje (nomenklatura) konfiguracijskih izomerov	18
2.2.1 Določitev absolutne konfiguracije	18
2.3 Biološke lastnosti kiralnih molekul	18
2.4 Metode za pripravo čistih enantiomerov	22
2.4.1 Tehnika tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) za ločevanje enantiomer v racemni zmesi	23
2.4.2 Uporaba proteinov in encimov	23
2.4.3 Kristalizacija	24
3 PRAKTIČNI DEL	25
3.1 Ločevanje in izolacija obeh enantiomerov racemne zmesi ibuprofena	25
3.1.1 Načrt ločevanja enantiomerov	25
3.1.2 Opis vzorcev	26
3.1.3 Opis dela	26
3.2 Analiza produktov	33
3.2.1 FTIR spektri delnih in končnih produktov	33
3.2.2 Meritve optične čistosti izoliranih produktov	34
3.2.3 UV spektroskopija	35
4 REZULTATI MERITEV	37
4.1 Masa vmesnih in delnih produktov ter izračun izkoristkov ločevanja	37
4.1.1 Izkoristki ločitve IBU600	37
4.1.2 Izkoristki ločitve IBU400	38

4.1.3 Izkoristki ločitve čistega vzorca ibuprofena	40
4.2 FTIR spektri izoliranih produktov	41
4.2.1 FTIR spketri diastereoizomerov (S,S).....	43
4.2.2 FTIR spektri R-izomerov	44
4.2.3 FTIR spektri S-izomerov.....	45
4.3 Optična čistost izoliranih produktov.....	48
4.4 Določitev koncentracije ibuprofena v ločenih enantiomerih.....	49
5 RAZPRAVA	52
5.1 Ocena stroškov čiščenja racemne zmesi	53
6 ZAKLJUČKI.....	55
7 DRUŽBENA ODGOVORNOST	58
8 UPORABLJENA LITERATURA.....	59
8.1 Članki	59
8.2 Knjige.....	61
8.3 Internetni viri.....	61
PRILOGE.....	63
Priloga 1.....	64
FTIR spektri izoliranih produktov – vsi IR spektri IBU600	64
Priloga 2.....	65
Priprava raztopin	65

Seznam preglednic

PREGLEDNICA 1. Primeri zdravil, ki se prodajajo kot racemne zmesi (Krantz s sod., 2009).....	21
PREGLEDNICA 2. Vzorci ibuprofena	26
PREGLEDNICA 3. Masa IBU600 <i>S,S</i> -diastereoizomerne soli	37
PREGLEDNICA 4. Masa <i>S,S</i> -diastereoizomera po prekristalizaciji	37
PREGLEDNICA 5. Masa <i>R</i> -ibuprofena IBU600	38
PREGLEDNICA 6. Masa <i>S</i> -ibuprofena IBU 600 po odstranitvi (<i>S</i>) – 1- feniletilamina	38
PREGLEDNICA 7: Masa Ibu400 <i>S,S</i> -diastereoizomerne soli.....	39
PREGLEDNICA 8: Masa <i>s,s</i> _Ibu400 diastereoizomerne soli po prekristalizaciji	39
PREGLEDNICA 9: Masa ibu400 <i>s</i> -ibuprofena po odstranitvi <i>S</i> -feniletilamina	39
PREGLEDNICA 10. Masa Ibu400 <i>R</i> -ibuprofena	39
PREGLEDNICA 11: Masa Ibu <i>S,S</i> – diastereoizomerne soli.....	40
PREGLEDNICA 12: Masa Ibu <i>s,s</i> -diastereoizomerne soli po prekristalizaciji.....	40
PREGLEDNICA 13: Masa ibu <i>s</i> -ibuprofena po odstranitvi <i>S</i> - feniletilamina	40
PREGLEDNICA 14: Masa <i>R</i> -ibuprofena	40
PREGLEDNICA 15. Pregled izkoristkov ločevanja enantiomer pri vseh treh vzorcih	41
PREGLEDNICA 16. Optična čistost produktov IBU in IBU600.....	48
PREGLEDNICA 17. Izračunan specifični kot zasuka ravnine linearno polarizirane svetlobe za izolirane produkte	49
PREGLEDNICA 18. Optična čistost izoliranih enantiomerov ibuprofena	49
PREGLEDNICA 19. Podatki za umeritveno premico.....	50
PREGLEDNICA 20. Mase produktov za določitev koncentracije čistega ibuprofena.....	50
PREGLEDNICA 21. Masa čistih enantiomerov iz treh racemnih zmesi ibuprofena.....	51
PREGLEDNICA 22. Ocena stroškov čiščenja racemne zmesi ibuprofena.....	54
PREGLEDNICA 23. Dvig cene zdravil, ki vsebujejo ibuprofen, če bi bil enantiomerno čist.....	54

Seznam grafov

Graf 1. Umeritvena premica za ibuprofen	50
---	----

Seznam slik

Slika 1. Strukturna formula obeh enantiomerov Talidomida (<i>R, S</i>) (Svete, 2018b).....	9
Slika 2. Nastanek diastereoizomerno soli	10
Slika 3. Barvilo E122 (GSFA online data base, 2018)	12
Slika 4. Glavni elementi simetrije (ravnina simetrije, center simetrije, os simetrije in rotacijsko-refleksijska os simetrije) (Svete, 2018)	16
Slika 5. Optično aktivna enantiomera vinske kisline (levo) in optično neaktiven <i>mezo</i> -izomer z ravnino simetrije (desno) (Svete, 2018)	17
Slika 6. Razmerja med enantiomeri in diastereomeri (Svete, 2018).....	17
Slika 7. Določanje absolutne konfiguracije kiralnega centra za (<i>R</i>)-butan-2-ol (Svete, 2018).....	18
Slika 8. Različne lastnosti <i>L</i> -dope in <i>D</i> -dope (Svete, 2018b).....	19
Slika 9. Obe strukturalni formuli enantiomerov metadona (Teo s sod., 2004)	20

Slika 10. Obe strukturni formuli enantiomerov varfarina (McCance-Katz, 2011)	20
Slika 11. (<i>S,S</i>)-(+)-etambutol (McCance-Katz, 2011)	20
Slika 12. (<i>S</i>)-(+)-naproksen (McCance-Katz, 2011)	20
Slika 13. Strukturni formuli amfetaminskih enantiomer (Svete, 2018b)	21
Slika 14. Feromonska enantiomera (Svete, 2018b)	22
Slika 15. Sprememba pristopov v organskih sintezah (Svete, 2018b)	22
Slika 16. Uporaba reduktaz v asimetrični sintezi kiralnih molekul (Svete, 2018b)	24
Slika 17. Aparatura za ločevanje racemne zmesi ibuprofena	27
Slika 18. Ločitev <i>S,S</i> -diastereoizomera od matične raztopine	28
Slika 19. <i>S</i> -ibuprofen pred rekristalizacijo v ledeni kopeli (levo) in oborina <i>R</i> -ibuprofena v matični raztopini znotraj nuče (desno)	29
Slika 20. Nastanek vodotopne soli ibuprofena in <i>S,S</i> diastereoizomera, ki v vodi ni topen	29
Slika 21: Protonacija ibuprofena (prva možna reakcija)	30
Slika 22. Protonacija ibuprofena (druga možna reakcija)	30
Slika 23. Nastanek <i>S,S</i> -diastereoizomera	32
Slika 24. ATR-FTIR šolski spektrometer	33
Slika 25. Delovanje Vernierjevega polarimetra (Vernier, 2018)	34
Slika 26. Določitev kota zasuka linearno polarizirane svetlobe s pomočjo prvega maksimuma (obarvano temno sivo)	35
Slika 27. Racemna zmes ibuprofena (levo); (<i>S</i>)-(+)-ibuprofen (v sredini); (<i>R</i>)-(-)- ibuprofen (desno)	35
Slika 28. UV spektrometer Lambda bio (Perkin Elmer ®)	36
Slika 29. Nastanek oborine <i>S,S</i> -diastereoizomer ibuprofena po reakciji z (<i>S</i>)-1-feniletilaminom.	37
Slika 30. IR spekter racemne zmesi ibuprofena posnet s IR spektrometrom (KBr) (Kumar, 2007)	42
Slika 31. ATR-FTIR spekter racemne zmesi čistega ibuprofena (lasten vir)	42
Slika 32. IR spektra IBU600_ <i>S,S</i> (črna) in IBU400_ <i>S,S</i> diastereoizomer (rdeča) (lasten vir)	43
Slika 33. Primerjava FTIR spektrov IBU400_ <i>S,S</i> (črna) in IBU_ <i>S,S</i> (rdeča) (lasten vir)	44
Slika 34. Primerjava IR spektrov IBU600_ <i>R</i> in IBU400_ <i>R</i> izomerov (lasten vir)	44
Slika 35. FTIR spekter IBU_ <i>R</i> produkta (lasten vir)	45
Slika 36. IR spektri vseh <i>S</i> -izomerov (lasten vir)	46
Slika 37. Primerjava IR spektra <i>S</i> in <i>R</i> enantiomera (IBU_ <i>S</i> in IBU_ <i>R</i>) (lasten vir)	46
Slika 38. Primerjava IR spektra <i>S</i> in <i>R</i> enantiomera ibuprofena (IBU_ <i>S</i> in IBU_ <i>R</i>) (približan posnetek) (lasten vir)	47
Slika 39. IR spekter za IBU_ <i>S,S</i> (lasten vir)	47
Slika 40: (<i>S</i>)-(-)-1-(naftil)etilamin	55
Slika 41. Vsi IR spektri vzorca IBU600 (lasten vir)	64

Seznam organigramov

Organigram 1. Delitev izomerov (povzeto po Svete, 2018)	14
Organigram 2. Načrt ločevanja racemne zmesi ibuprofena	25

Kratice uporabljene v raziskovalni nalogi

IBU600....600 *mg* tableta Ibuprofena

IBU400....400 *mg* tableta Ibuprofena

IBU....čista racemna zmes ibuprofena

V raziskovalni naloge je bil za risanje molekul uporabljen računalniški program ChemSketch.

POVZETEK

V raziskovalni nalogi je predstavljen način ločevanja enantiomerov ibuprofena s pomočjo kristalizacije in tvorbe diastereoizomerov. Raziskavo smo izvedli na treh različnih vzorcih, dveh komercialnih farmacevtskih preparatih in čisti racemni zmesi. Z metodo polarimetrije in IR spektroskopije smo analizirali čistost izoliranih produktov. Ugotovili smo, da sta bili enantiomeri, ki smo jih pridobili iz vzorca čistega ibuprofena optično najčistejši in, da je čistost pogojena z začetnimi deleži primesi. Metoda, ki smo jo uporabili, omogoča, da je *S*-izomer ibuprofena, ki predstavlja tudi aktivno učinkovino v farmacevtskih preparatih optično čistejši od *R*-izomerov. Metoda je primerna za enantiomerno ločevanje tistih racemnih zmesi, kjer obstaja po reakciji z drugo kiralno molekulo razlika v topnosti vmesnih produktov.

Število besed: 110

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici za pomoč, sugestije in vodenje pri izdelavi raziskovalne naloge. Zahvala gre tudi laborantkam, ki so sodelovale pri izvedbi poskusov in pripravi raztopin.

1 UVOD

V vsakdanjem življenju se nenehno srečujemo z organsko kemijo, saj organske molekule sestavljajo naš organizem in »oblikujejo« naš vsakdan. Organska kemija se uporablja na mnogih področjih, kot so petrokemična, živilska in farmacevtska industrija, medicina in ostala področja. Uporaba organskih ali drugih snovi je vedno povezana z njihovo zgradbo. Pri nekaterih molekulah se zdi, da imajo identično zgradbo, torej enako molekulsko in strukturno formulo, pa vendar imajo zaradi različne prostorske razporeditve atomov različne lastnosti. Gre za pojav stereoisomerije, ki jo delimo na konformacijsko in konfiguracijsko stereoisomerijo (Svete, 2018). Našo pozornost so pritegnili konfiguracijski izomeri, kjer je pretvorba enega stereoisomera v drugega pogojena s cepitvijo in ponovnim nastankom kovalentne vezi. To vrsto izomerije bi lahko razdelili na geometrijsko (*cis-trans*, ali *E-Z*) ter optično. Optični izomeri predstavljajo molekule, ki vsebujejo kiralni center in se ne morejo prekrivati s svojimi zrcalnimi slikami (ne moremo jih superponirati na njihove zrcalne slike). Te imenujemo enantiomeri. Enantiomera torej z enostavnim obračanjem v prostoru ne moremo "pretvoriti" v drug enantiomer,¹ kar pripisujemo t.i. centru kiralnosti. Običajno je to v organskih spojinah sp^3 hibridiziran C-atom s štirimi različnimi ligandi². Tak atom imenujemo tudi stereocenter (ali stereogeni center) ali center kiralnosti ali center asimetrije. Enantiomere lahko med seboj ločimo, saj je za kiralne spojine značilno, da pri prehodu linearno polarizirane svetlobe skozi njeno raztopino pride do zasuka ravnine polarizirane svetlobe. Zato za njih pravimo, da so optično aktivni. Enantiomeri imajo torej enake kemijske in fizikalne lastnosti, razlikujejo se le po predznaku kota zasuka ravnine polarizirane svetlobe.

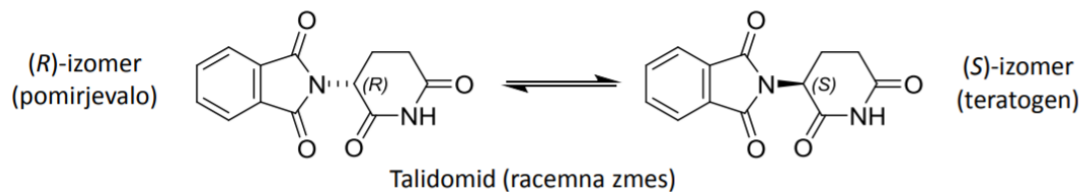
V »*in vitro*« sintezah vedno dobimo enantiomera v razmerju 1:1, torej zmes obeh, ki ji pravimo racemat. Le-ta je optično neaktiven, saj enantiomera svojo, po velikosti enako, po smeri pa nasprotno optično aktivnost, kompenzirata oziroma izničita. Racemat je optično neaktiven kljub temu, da vsebuje snovi s kiralnimi molekulami (Stropnik, 2005). Enantiomera v takšni zmesi pa se v živih organizmih običajno vedeta drugače, kar pomeni, da v interakciji z biološkimi molekulami (ki so prav tako kiralne molekule) nimata enakih lastnosti. Slednje je še posebej problematično, ko gre za zdravila, saj je mogoče, da ima lahko le en enantiomer zdravilne učinke, drugi pa je lahko tudi teratogen, kot je to v primeru Talidomida ($C_{13}H_{10}N_2O_4$)³, zdravila, ki se je v 60. letih 20. stoletja prodajalo kot zdravilo za lajšanje jutranjih slabosti

¹ Spojine, ki so identične svojim zrcalnim slikam, imenujemo akiralne spojine. Značilnost akiralnih spojin je, da nimajo vsaj en element simetrije (opomba avtorja).

² Pogosto je to tudi dušik ali kateri drugi element (opomba avtorja).

³ Drugo ime je Contergan (opomba avtorja).

nosečnici ali kot blago pomirjevalo (Teo s sod., 2004). S-konfiguracija Talidomida je zahtevala žrtve med milijoni otrok po celem svetu, ki so se rojevali z nerazvitimi okončinami.



Slika 1. Strukturna formula obeh enantiomerov Talidomida (*R*, *S*) (Svete, 2018b)

Talidomid pa ni edini primer zdravila, kjer oba izomera nimata enakih učinkov. V poglavju 2.3 so navedeni še drugi primeri. Vsi ti in mnogi drugi primeri optičnih izomerov, ki se pojavljajo v našem vsakdanjem življenju, so bili razlog za našo raziskavo na področju kemije. Med študijem literature smo prišli do spoznanja, da je uporaba le enega koristnega enantiomera, še posebej, ko gre za zdravila, velika prednost za uporabnike. Zato je smiselno in potrebno, da v postopku sinteze pridobimo le en enantiomer ali pa racemat na koncu očistimo in pridobimo le želeni izomer. Poudariti pa je vendar potrebno, da se enantiomera »*in vivo*« lahko tudi izomerizirata, torej pretvorita v drugi izomer, čeprav je bil npr. zaužit le en izomer (Teo s sod., 2004; Smith in Silas, 2016).

Za ločevanje enantiomerov je trenutno na voljo nekaj različnih metod, vendar jih večina (opisane v poglavju 2.4) zahteva uporabo tehnologij, ki končno ceno zdravila bistveno zvišajo in ga s tem naredijo manj dostopnega širšemu krogu potencialnih uporabnikov. Zato smo v nalogi želeli preučiti, kako bi lahko ločil enantiomere, ki sestavljajo racemno zmes, na čim cenejši, vendar učinkovit način. Kot modelno molekulo smo si izbrali ibuprofen. Razlog za izbiro tega zdravila je bil praktične narave. Ibuprofen, nesteroidna protivnetna učinkovina, ki je v prodaji le kot racemna zmes, je v domači lekarni ostala kot »odpadek« po končanem zdravljenju zvina gležnja. Dejstvo je, da ima samo S-enantiomer protibolečinski učinek. R-enantiomer tega učinka nima oziroma ga celo zavira in povzroča akumulacijo škodljivih snovi v telesu (Stropnik, 2005). Zato S-ibuprofen v primerjavi z R-ibuprofenom predstavlja 160-krat učinkovitejši inhibitor sinteze prostaglandinov (Adams s sod., 1976). Na voljo smo imeli 400 mg in 600 mg pakiranje⁴. Za potrebe izvedbe raziskovalne naloge smo kupili še čisto racemno zmes ibuprofena (Merck, p.a.).

⁴ Čeprav naj bi se zdravilo izdajalo le na recept (Mediatelly, 2018), ga je v spletnih lekarnah mogoče naročiti brez težav (opomba avtorja).

1.1 Namen naloge

Namen naloge je bil:

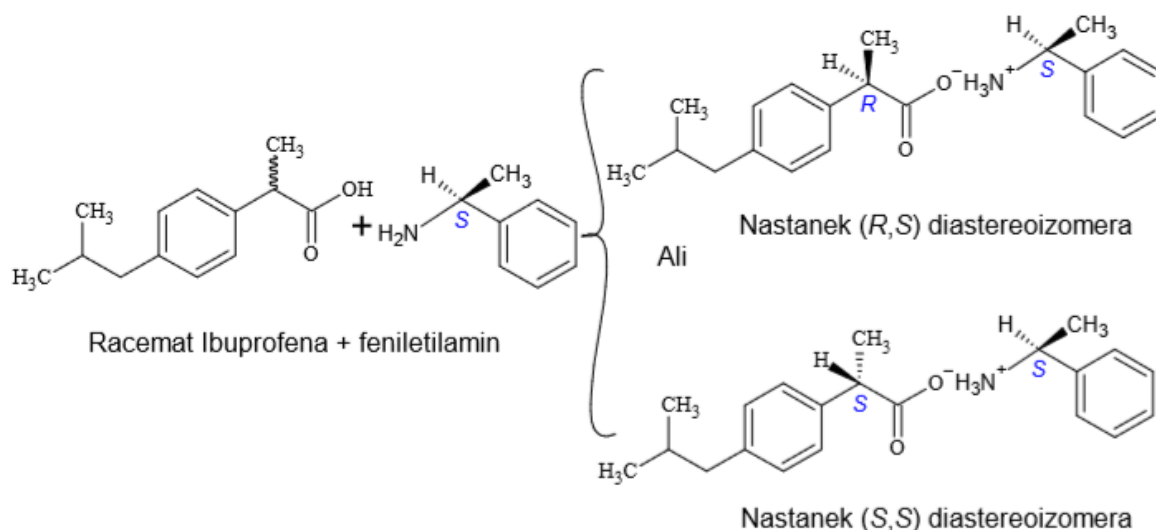
1. Seznaniti se z načini ločevanja enantiomerov, ki so danes v uporabi in trende na tem področju.
2. Preizkusiti laboratorijsko metodo ločevanja enantiomerov, ki bi lahko bila uporabna za delo v šolskem laboratoriju na način, ki bo dostopen tudi ostalim dijakom, ki jih kemija zanima.
3. Izračunati stroške ločevanja enantiomerov ibuprofena, ki bodo v raziskovalni nalogi predstavljeni in njihov vpliv na končno ceno ibuprofena, če bi ga prodajali v enantiomerno čisti obliki.
4. Predlagati možne izboljšave v izolaciji enantiomerov za druge racemne zmesi zdravil.

1.2 Raziskovalno vprašanje

Kakšen je vpliv čistoče ibuprofena na izkoristek ločevanja racemne zmesi v enantiomerno obliko z uporabo diastereoizomerizacije?

1.3 Hipoteze

Hipoteza 1. Ker je ibuprofen karboksilna kislina, bo s kiralnimi amini tvorila diastereoizomerno sol.



SLIKA 2. Nastanek diastereoizomerno soli

(S,S)-diastereoizomer je v vodni slabo topen, zato se bo izločil kot oborina, ki jo bomo lahko s filtracijo ločili od *R*-izomera.

Hipoteza 2. Racemna zmes, ki jo predstavlja čisti ibuprofen, bo dala boljše izkoristke ločevanja, kot tableta ibuprofena, ki vsebuje primesi.

Hipoteza 3. Za ločevanje obeh enantiomerov ibuprofena v komercialnih izdelkih bo bolj primerna IBU600 filmsko obložena tableta, ker ima manj primesi in barvil, kot ibuprofen IBU400 filmsko obložena tableta.

Hipoteza 4. *S*-izomer ibuprofena (ki deluje kot analgetik) bo optično čistejši, saj bo v postopku 2-krat prekristaliziran.

Hipoteza 5. *R*-izomer, ki dejansko predstavlja odpadek, je lahko izhodiščna snov za sinteze drugih uporabnih organskih spojin.

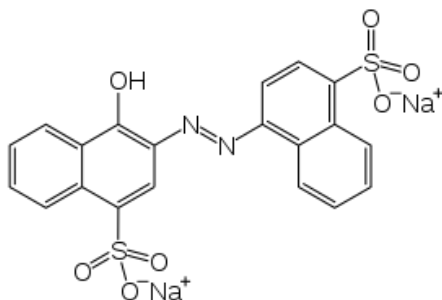
1.3.1 Razlage hipotez

Za ločevanje enantiomerov ibuprofena so trenutno najbolj uveljavljene naslednje metode (Carvalho s sod., 2006): kromatografija, encimska kinetična resolucija in kristalizacija. V tej raziskovalni nalogi bo uporabljena kristalizacija.

Za kristalizacijo ibuprofena so do sedaj razvili različne postopke (Tung s sod., 1995) vendar je klasična ločitev, ki temelji na nastanku diastereoizomernih soli in njihove različne topnosti, največkrat uporabljena. Problem te metode je, da je izjemno težko napovedati idealne kombinacije reagentov za dano racemno zmes. Te kombinacije lahko napovemo le eksperimentalno, kar je zelo zamudno in (cenovno) neugodno (Tung s sod., 1995; Norbert s sod., 2001). Da bi ta problem zadovoljivo rešil smo se odločili, da bomo pri ločevanju upoštevali stehiometrijska razmerja med uporabljenimi reagenti, zaradi možnih ravnotežnih reakcij, pa bomo vedno dodali 10% prebitka reagenta (potiskanje reakcije v desno stran, proti produktom).

Ker čisti ibuprofen (racemna zmes) ne vsebuje nobenih drugih primesi, pričakujemo, da bosta tako optična čistost, kot izkoristek ločitve pri tem vzorcu najvišja. Najslabše rezultate pričakujemo pri 400 mg filmsko obloženi tableti IBU400, ki vsebuje največ primesi, med katerimi je tudi azo barvilo azorubin - karmoizin (E122) (slika 3). Problem tega barvila je, da je vodotopen in vsebuje dve sulfonski skupini, na

kateri bi se lahko vezala (S)-feniletilamin, spojina, ki jo bomo dodali za ustvarjanje drugega kiralnega centra v izomerih ibuprofena. Poleg tega ima zelo visoko molsko maso (502,44 g/mol), kar pomeni, da bodo vse interakcije z ibuprofenom ali (S)-feniletilaminom dale produkte z visoko maso, kar bi lahko vplivalo na izkoristke delnih in končnih izolacij.



SLIKA 3. Barvilo E122 (GSFA online data base, 2018)

Razlog, da ločitev ibuprofena nismo izvajali le na čisti racemni zmesi je njegova cena. V kolikor smo želeli, da bi rezultat raziskovalne naloge bili zanimivi in motivacija za eksperimentalno delo tudi mojim sovrstnikom, je bila izbira »odpadnega ibuprofena« logična. Poleg tega pa bi ponovno prekrizaliran ibuprofen lahko bil uporaben tudi v medicini.

Ker je učinkovit le S-izomer ibuprofena, bo ta dvakrat prekrizaliran in zato posledično čistejši kot R-ibuprofen.

1.4 Metode dela

V raziskovalni nalogi smo uporabili naslednje metode dela:

1. Študij ustrezne literature, z namenom seznaniti se z metodami čiščenja in ločevanja enantiomerov, ki so trenutno v praksi.
2. Izdelati organigram za ločevanje obeh enantiomerov ibuprofena, ki bo temeljil na kislinsko-baznih reakcijah in različni topnosti diastereoizomerov v vodi.
3. Uporaba klasičnih tehnik prekrizalacije za čiščenje S-izomera.

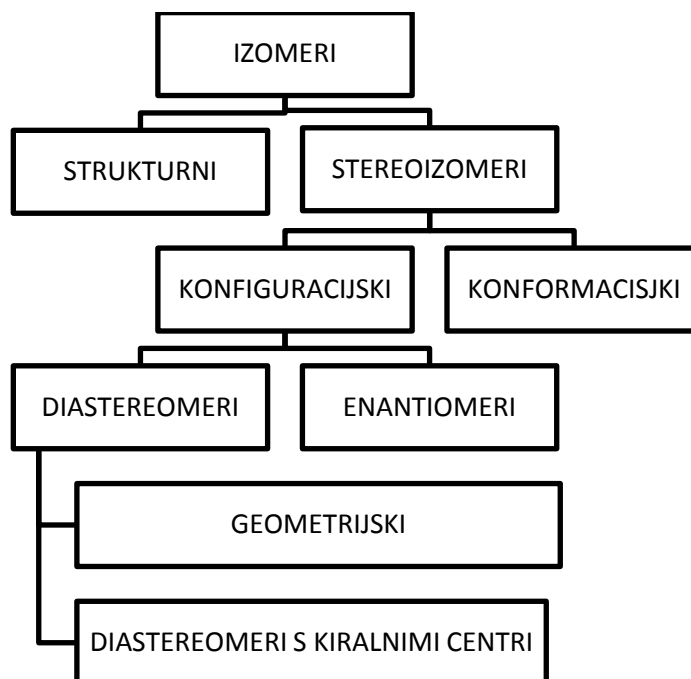
Za analizo čistoče produktov smo uporabili:

- IR analiza spektrov vmesnih in končnih produktov izolacije.

- Polarimetrijo – meritve kota zasuka ravnine linearno polarizirane svetlobe za vse izolirane produkte.
- UV spektroskopijo za določanje koncentracije obeh enantiomerov ibuprofena.

2 PREGLED LITERATURE

Izomeri so spojine, ki imajo enako molekulska formulo in različno strukturno formulo (strukturni ali konstitucijski izomeri) oz. spojine, ki imajo enako molekulska formulo in strukturno formulo, vendar različno razporeditev atomov v prostoru (stereoizomeri) (Svete, 2018). Na organigramu 1 podajamo prikaz delitve izomerov.



Organigram 1. Delitev izomerov (povzeto po Svete, 2018)

2.1 Kiralni predmeti in kiralne molekule

Kiralni predmeti so vsi predmeti, katerih zrcalne slike ne moremo prekriti z originalom (če je to mogoče, so ti predmeti akiralni) (Stropnik, 2005). Kiralnost molekul določamo glede na prostorsko razporeditev atomov oz. skupin okoli centra kiralnosti. Če pri zrcaljenju molekule preko vseh kiralnih centrov, ki jih spojina ima, dobimo spojine, ki se ne dajo prekriti, pravimo, da smo dobili optične izomere neke spojine. Dva optična izomera, ki sta si med seboj zrcalni sliki imenujemo enantiomera (Stropnik, 2005).

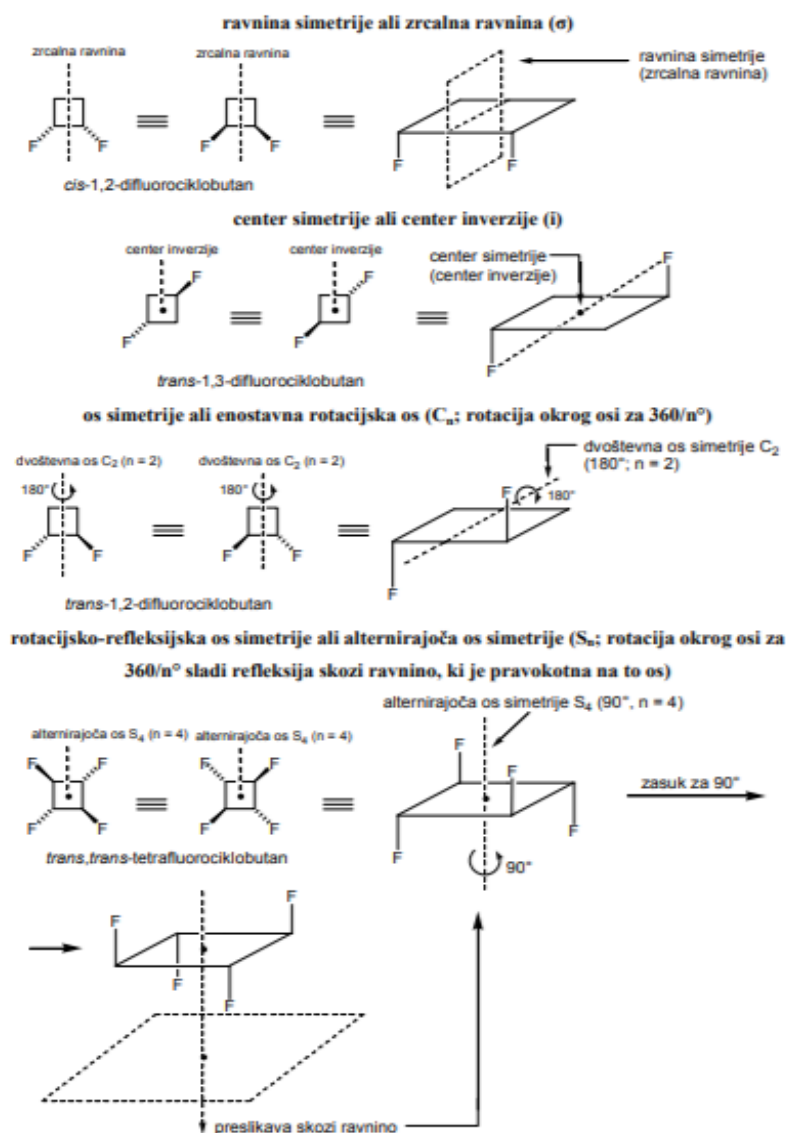
Značilnost akiralnih spojin je, da imajo vsaj en element simetrije. Glavni elementi simetrije in z njimi povezane operacije so prikazani na sliki 4 (Svete, 2018). Spojine, ki nimajo nobenega elementa simetrije, so vedno kiralne. Vendar ne velja obratno – kiralna spojina lahko vsebujejo tudi določene

elemente simetrije (npr. ravnino simetrije pri *mezo* spojinah). Običajno je v organskih spojinah nosilec asimetrije ali kiralnosti sp^3 hibridiziran C-atom s štirimi različnimi ligandi (stereocenter oz. center kiralnosti, oz. center asimetrije). Število optičnih izomerov kiralne molekule izračunamo z enačbo 2^n , kjer n predstavlja število centrov kiralnosti.

Značilnost kiralnih spojin je, da pri prehodu linearno polarizirane svetlobe skozi to spojino ali njeno raztopino pride do zasuka ravnine polarizirane svetlobe. Zato za take spojine pravimo, da so optično aktivne (Svete, 2018). Če npr. en enantiomer povzroči zasuk polarizirane svetlobe za $+56^\circ$, bo drug enantiomer povzročil enak zasuk vendar z nasprotnim predznakom, torej -56° . Optično sučnost podajamo praviloma kot specifičen zasuk, $[\alpha]$, ki ga izračunamo po enačbi (Biotov zakon):

$$[\alpha]_{\lambda}^T = \alpha / l \cdot c$$

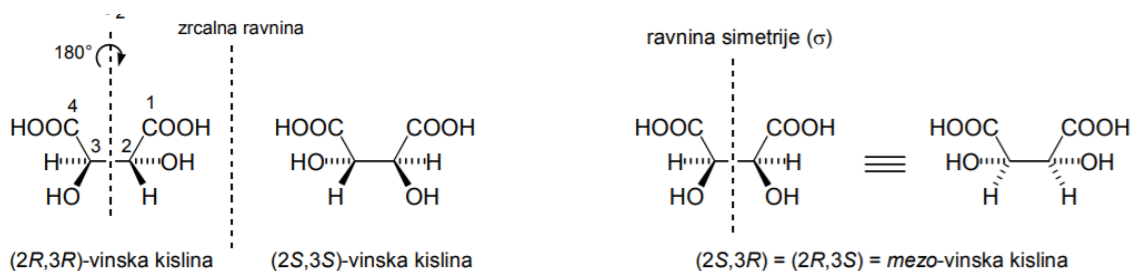
- λ valovna dolžina svetlobe (*nm*)
- T temperatura ($^\circ\text{C}$)
- α odčitek na polarimetru ($^\circ$)
- l dolžina optične poti (*dm*)
- c koncentracija (*g/mL*)



SLIKA 4. Glavni elementi simetrije (ravnina simetrije, center simetrije, os simetrije in rotacijsko-refleksijska os simetrije) (Svete, 2018)

2.1.1 Mezo spojine

V *mezo* spojinah nastopata vsaj dva kiralna centra, torej ima spojina vsaj štiri optične izomere. Posebnost *mezo* spojin je, da imata ta dva kiralna centra nase vezane povsem enake substituentne. Če bi narisali vse možne strukture takšnih spojin in jih zrcalili, bi ugotovili, da sta dva optična izomera enantiomera, dva pa popolnoma enaka. Slednja nista kiralna, saj se da enega prekri z drugim (njegovo zrcalno sliko). Takšen primer spojine, ki ima kiralen center, vendar spojina kot celota ni kiralna in s tem tudi ne optično aktivna, je vinska kislina. Vinska kislina ima par enantiomer ter eno *mezo* obliko, ki je optično neaktivna (slika 5).



SLIKA 5. Optično aktivna enantiomera vinske kisline (levo) in optično neaktiven *mezo*-izomer z ravnino simetrije (desno) (Svete, 2018)

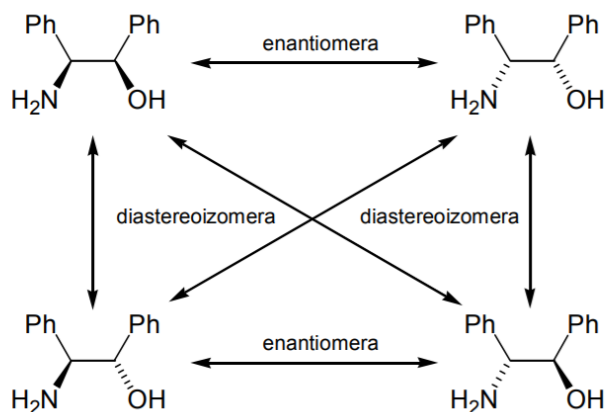
2.1.2 Racemne zmesi

Enantomeri, ki nastopajo v ekvimolarnih zmesih obeh enantiomerov se imenujejo racemne zmesi (ali racemat). Racemne zmesi enantiomerov niso optično aktivne, saj se sučnost ravnine linearno polarizirane svetlobe obeh enantiomerov izniči (Stropnik, 2005).

2.1.3 Diastereoimeri

V kolikor spojina vsebuje dva ali več centrov kiralnosti, je možno večje število stereoizomerov, ki pa si niso vsi v enantiomernem odnosu oz. si niso vsi med seboj zrcalne slike. Kiralni stereoizomeri, ki niso zrcalne slike eden drugega, imenujemo diastereoizomeri.

Diastereoizomerne spojine se med seboj razlikujejo tako po fizikalnih kot po kemijskih lastnostih. Na primer, 2-amino-1,2-difeniletanol je spojina z dvema centroma kiralnosti. Možni so torej štirje ($2^2 = 4$) stereoizomeri, od katerih ima vsak svojo zrcalno sliko, poleg tega pa še dva diastereoizomera (Slika 6).



SLIKA 6. Razmerja med enantiomeri in diastereoimeri (Svete, 2018)

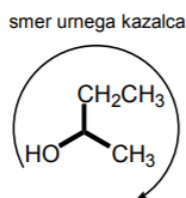
2.2 Označevanje (nomenklatura) konfiguracijskih izomerov

Konfiguracijo okrog centrov kiralnosti označujemo po Cahn-Ingold-Prelogovem (CIP) pravilu prioritet, ki so naslednje:

1. Višje atomsko število ima prednost pred nižjim.
2. Višje masno število ima prednost pred nižjim.
3. Pri skupinah, kjer je več delov enakih, upoštevamo prvo neenakost.
4. Če je atom vezan na drugega z multiplo vezjo, potem ustrezni atom podvojimo ali potrojimo.

2.2.1 Določitev absolutne konfiguracije

Najprej določimo prioritete ligandov na centru kiralnosti. Nato molekulo postavimo v prostoru tako, da je ligand z najnižjo prioriteto obrnjen stran od opazovalca in imamo pred seboj tri glavne ligande, za katere preverimo, v katero smer si sledijo ligandi po padajoči prioriteti. Če je to smer vrtenja urnega kazalca, potem je to konfiguracija *R* (*rectus* – desni), če pa je smer enaka obratni smeri vrtenja urnega kazalca, potem je to konfiguracija *S* (*sinister* – levo). Slika 7 prikazuje primer določanja absolutne konfiguracije kiralnega centra za (*R*)-butan-2-ol.



SLIKA 7. Določanje absolutne konfiguracije kiralnega centra za (*R*)-butan-2-ol (Svete, 2018)

Do leta 1951 je za označevanja konfiguracij kiralnih spojin bila uporabljena metoda relativne konfiguracije, ki je kot osnovo uporabljala konfiguracijo gliceroladehida, *D*- ali *L*- (Stropnik, 2005)⁵

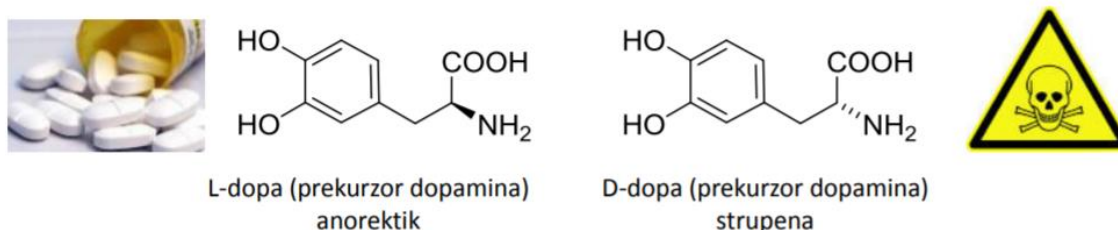
2.3 Biološke lastnosti kiralnih molekul

Čeprav imajo enantiomeri kiralnih molekul popolnoma enake kemijske lastnosti, imajo velikokrat povsem različne lastnosti v reakcijah z drugimi kiralnimi sistemi (molekulami) npr. beljakovinami. Vsak

⁵ *D*-(+)-glicerolaldehid in *L*-(-)-gliceroladehid sta predstavljalta arbitrarno določen standard. Relativno konfiguracijo spojine so določili tako, da so preučevali spojino pretvorili v glicerolaldehid ali pa kako drugo spojino, katere relativna konfiguracija glede na glicerolaldehid je bila že predhodno določena. Iz predznaka optičnega zasuka so potem sklepali na konfiguracijo spojine (Svete, 2018; Stropnik, 2005).

protein je sestavljen iz osnovnega nabora dvajsetih aminokislin, ki so, razen glicina, vse kiralne molekule. (Bukovec s sod., 2004) Vendar, okus *L*-asparagina je sladek, *D*-asparagina pa grenak. Podobno je s hormoni in vitamini in drugimi biološkimi molekulami: *L*-adrenalin ima 12-krat večji učinek na skrčenje žil kot *D*-adrenalin. *L*-askorbinska kislina (vitamin C) je učinkovit antioksidant, *D*-askorbinska kislina ni; (*R*)-limonen ima vonj po pomaranči, (*S*)-limonen ima terpenški vonj; (*S*)-karvon ima vonj mete in (*R*)-karvon vonj kumine (Svete, 2018b). Kinin in kinidin sta učinkoviti spojini proti malariji, epikinin in epikinidin to nista, čeprav se spojini razlikujeta v konfiguraciji na enem ogljikovem atomu (Zmazek, 2012).

Takšne lastnosti enantiomerov, pri katerih je določena lastnost pri enem izmed enantiomerov izrazitejša ali z uporabnega vidika za človeka pomembnejša, najdemo tudi pri mnogih zdravilih. Na tržišču je okoli 50% vseh zdravil sestavljenih iz kiralnih spojin, a le 25% teh je na voljo v enantiomerni čisti obliki (Caner s sod., 2004). Večina se jih torej še vedno prodaja v obliki racemne zmesi (primeri so predstavljeni v preglednici 1), čeprav v večini primerov učinkuje le en enantiomer, drugi pa predstavlja balast ali v nekaterih primerih celo škoduje ali zavira delovanje prvega. To velja za ibuprofen in tudi antidepressiv fluoksetin, bolj znan pod imenom Prozac. *R*-fluoksetin ima veliko boljše antidepressivno delovanje kot *S*-fluoksetin (močnejše zavira ponovno delovanje serotonina, amina ki ima veliko vlogo pri uravnavanju našega razpoloženja). *S*-fluoksetin pa ima zdravilne učinke pri zdravljenju migrene in že zato bi bilo smiselno ta dva enantiomera ločiti (Smrdu, 2010; Faber, 2004; Hutt, 2002; Tucker, 2000; Almansa s sod., 1996). Na sliki 8 prikazujemo ekstremen primer *L*-dopa, ki deluje kot anorektik⁶ in *D*-dopa, ki pa je za človeka strupena snov (Svete, 2018b).

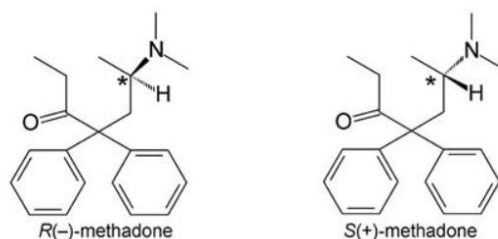


SLIKA 8. Različne lastnosti *L*-dope in *D*-dope (Svete, 2018b).

Naslednji primer je metadon⁷ (slika 9), kjer ima (*R*)-enantiomer bistveno manj negativnih stranskih učinkov kot racemna zmes (McCance-Katz, 2011).

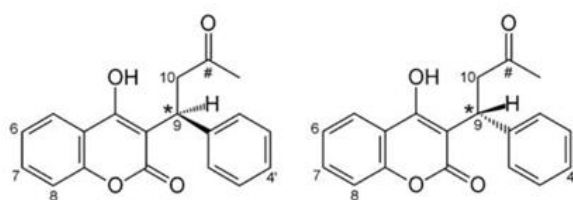
⁶ Zdravilo ali učinkovina, ki zmanjšuje apetit in s tem potrebo po vnosu hrane v organizem (SSKJ, 2018).

⁷ Metadon uporabljamo kot pomožno sredstvo pri zdravljenju znakov in simptomov akutno nastalega abstinencnega sindroma in pri detoksikaciji odvisnih od heroina in drugih opioidnih drog ter pri

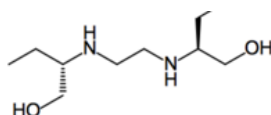


SLIKA 9. Obe strukturni formuli enantiomerov metadona (Teo s sod., 2004)

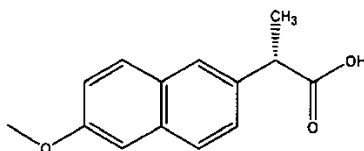
Podobno velja za varfarin⁸ (slika 10), ki je na voljo le kot racemna zmes, čeprav je le *S*-izomer tisti, ki deluje kot aktivna učinkovina. Etambutolov (*S,S*)-(+)-enantiomer se uporablja za zdravljenje tuberkuloze, njegov enantiomer (*R,R*)-(-)-etambutol pa povzroča slepoto (slika 11) (Padmanabhan, 2013). (*S*)-(+)-naproksen, ki se uporablja za lajšanje bolečin pri artritisu ima svoj izomer (*R*)-(-)-naproksen, ki nima nobenega analgetičnega učinka in je zelo nevaren za jetra (slika 12) (Smith in Silas, 2016). Amfetamin in metamfetamin delujeta kot *R*-izomera močno stimulatивно na centralni živčni sistem. Njuna *S*-izomera nimata na centralni živčni sistem nobenega učinka, učinkujeta pa na periferni živčni sistem (slika 13) (Smith in Silas, 2016).



SLIKA 10. Obe strukturni formuli enantiomerov varfarina (McCance-Katz, 2011)



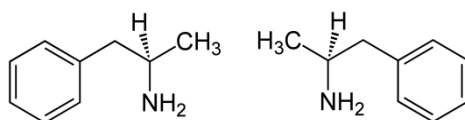
SLIKA 11. (*S,S*)-(+)-Etambutol (McCance-Katz, 2011)



SLIKA 12. (*S*)-(+)-Naproksen (McCance-Katz, 2011)

zdravljenju odvisnih od heroina in drugih opioidnih drog v sklopu vzdrževalnega metadonskega programa (Krka, 2011).

⁸ Zdravilo z varfarinom zdravnik uvede bolniku s povečanim tveganjem za nastanek krvnih strdkov vključujoč tiste z atrijsko fibrilacijo in vstavljenimi umetnimi srčnimi zaklopkami (Madjar, 2016).



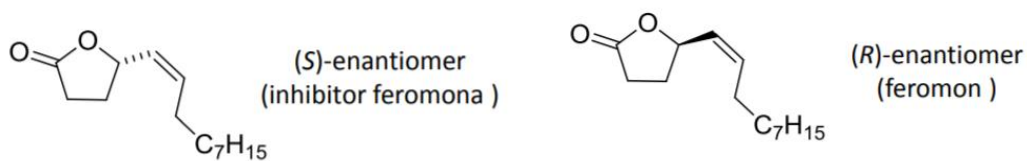
SLIKA 13. Strukturni formuli amfetaminskih enantiomer (Svete, 2018b)

V Preglednici 1 navajamo še nekaj primerov zdravil, ki so pogosto v uporabi tudi na slovenskem trgu in so na voljo le kot racemne zmesi. Za te velja, da je praviloma »zdravilen« le en enantiomer racemne zmesi.

PREGLEDNICA 1. Primeri zdravil, ki se prodajajo kot racemne zmesi (Krantz s sod., 2009)

Amlodipine (Norvasc)
Amphetamine (Benzedrine)
Bupivacaine (Marcain)
Cetirizine (Zyrtec / Reactine)
Chlorphenamine (INN)
Chlorpheniramine (USAN) (Chlor-Trimeton)
Citalopram (Celexa / Cipramil)
Fenfluramine (Pondimin)
Formoterol (Foradil)
Ibuprofen (Advil / Motrin)
Ketamine (Ketalar)
Ketoprofen (Actron)
Methylphenidate (Ritalin)
Milnacipran (Ixel / Savella)
Modafinil (Provigil)
Ofloxacin (Floxin)
Omeprazole (Prilosec)
Salbutamol (Ventolin)
Zopiclone (Imovane / Zimovane)

Kako nevarna je lahko že majhna prisotnost drugega enantiomera priča primer iz živalskega sveta. Japonski hrošč (*Popilia japonica*) je hrošč, ki se sporazumeva preko feromona, ki nastopa v dveh enantiomernih oblikah (slika 14) (Svete, 2018b). Že 1% (*S*)-enantiomera popolnoma blokira feromonsko aktivnost (*R*)-enantiomera.

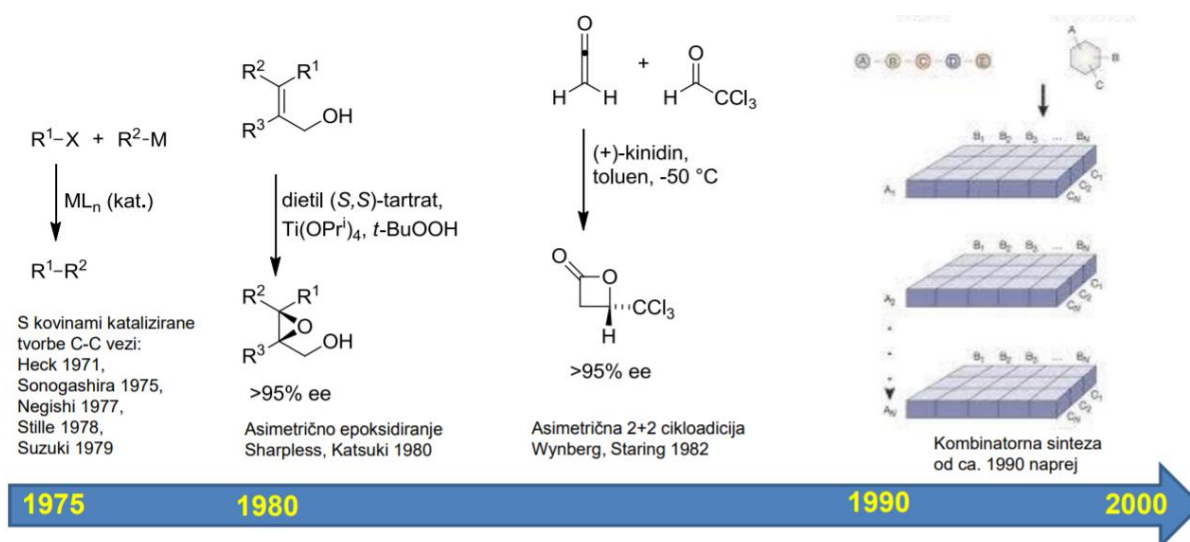


SLIKA 14. Feromonska enantiomera (Svete, 2018b)

2.4 Metode za pripravo čistih enantiomerov

Za pripravo čistih enantiomerov poznamo različne metode. Ena od teh je asimetrična sinteza s pretvorbo kiralne izhodne spojine (*chiral pool strategy*). Tako imenovani "chiral pool" je nabor komercialno dostopnih izhodnih spojin, ki so večinoma naravnega izvora (npr. aminokisljine, sladkorji, terpeni, alkaloidi, itd.) s primerno konfiguracijo. Slaba stran te metode je, da je pogosto lahko dostopen le en enantiomer, ki ni nujno tisti, ki ga potrebujemo. Problem predstavljajo sinteze, ki vključujejo nastanek novega stereogenega centra (Svete, 2018).

Druga metoda je diastereoselektivna sinteza z uporabo kiralnega pomagala (*chiral auxiliary*) (Svete, 2018b). Tretja metoda je t.i. kombinaturna sinteza, kjer pomembno vlogo igra tudi 3-D modeliranje (Svete, 2018b). Na sliki 15 podajamo prikaz pristopov v organskih sintezah v različnih obdobjih.



SLIKA 15. Sprememba pristopov v organskih sintezah (Svete, 2018b)

Trenutno so najbolj uveljavljene metode za ločevanje racemnih zmesi naslednje: kromatografija, fizikalne metode ločitve (kristalizacija) ter ločevanje z uporabo encimov (Carvalho s sod., 2006). Med kromatografskimi tehnikami je potrebno najprej omeniti visokozmogljivo tekočinsko kromatografijo (HPLC).

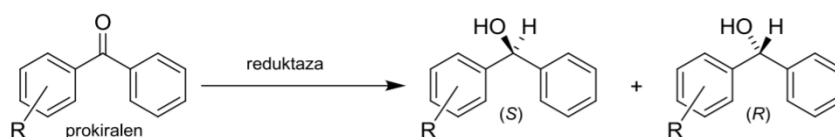
2.4.1 Tehnika tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (HPLC) za ločevanje enantiomer v racemni zmesi

Na osnovi različnih porazdelitvenih faktorjev oz. afinitete do stacionarne in mobilne faze lahko pričakujemo različne hitrosti potovanja komponent v zmesi. Pri racemnih zmesih je potrebno skrbno izbrati najustreznejše topilo (mobilno fazo) s katerima kiralni molekuli tvorita dva različna diastereoizomera. Pri potovanju preko stacionarne faze pride do tvorbe različno močnih intermolekularnih vezi med enantiomeri v topilu in molekulami trdnega absorbentnega materiala stacionarne faze. Posledica je različna hitrost potovanja vseh komponent in zato možnost izolacije posameznih komponent (Ahn s sod., 1994).

Kljub uspešni (visoki) ločljivosti, je problem HPLC ta, da je potrebno zelo natančno odmerjenje med množino topila (mobilne faze) in množino racemne zmesi ter poraba velikih količin topila, ki ga moramo na koncu tudi izpariti, če želimo pridobiti čist enantiomer. Tvorba diastereoizomerov v racemni zmesi lahko privede do hitrejšega tvorjenja enega izmed diastereoizomerov, kar ima za posledico nepravilno razmerje obeh enantiomerov v končni zmesi. Vse skupaj dodatno otežijo še različne nečistoče v zmesi, ki lahko pripeljejo do tega, da se tvori več diastereoizomerov, ki jih je na koncu postopka spet potrebno ločiti. Vendar kljub vsem naštetim težavam HPLC še vedno ostaja najbolj razširjena metoda za ločevanje enantiomerov (Oi s sod., 1995; Haginaka s sod., 1993; Haikala s sod., 1991; Farkas s sod., 1993; Castellani s sod., 1994; Carvalho s sod., 2006; Maier s sod., 2001).

2.4.2 Uporaba proteinov in encimov

Uporaba encimov in proteinov pri ločevanju enantiomerov je metoda, pri kateri (običajno) lahko dobimo enantiomerno čist produkt. Ta metoda temelji na enantioselektivnosti encimov in proteinov in se je ob koncu 20. stoletja začela uporabljati tudi pri sintezi enantiomerno čistih produktov. Kot primer uporabe encimov v asimetrični sintezi enantiomerov navajam primer reduktaz (slika 16).



SLIKA 16. Uporaba reduktaz v asimetrični sintezi kiralnih molekul (Svete, 2018b).

Encimi iz te skupine katalizirajo prehod elektronov iz reducenta na oksidant. Vendar tega prehoda encimi sami ne katalizirajo dovolj dobro, zato običajno nastopajo ob pomoči kofaktorjev. To so pomožne nebeljakovinske spojine, ki so vezane na encim. Kofaktorji so pomembni še iz biološkega vidika, saj so potrebni za biološko aktivnost proteina. Največkrat v organski kemiji kot kofaktor uporabimo NADP (nikotinamid adenin dinukleotid fosfat), saj lahko v reakcijah deluje bodisi kot donor bodisi kot akceptor elektronskega para (Kawai s sod., 1998; Prelog, 1964).

Druga možnost biopretvorbe so oksidacijske reakcije. Pri oksidacijskih biopretvorbah prav tako s pomočjo encimov (oksidgenaz) in proteinov pretvorimo prokiralen atom v kiralnega, kjer encimi in kofaktorji oksidirajo substrat tako, da nanj veže kisik iz zraka. Kisik v tem primeru deluje kot oksidant, saj se sam reducira, substrat pa oksidira. Oksidgenaze delujejo na naslednje funkcionalne skupine: hidroksilne, alkilne, alkenilne, arilne in karboksilne skupine ter na atom žvepla. Enako kot v primeru redukcijskih biopretvorb pride do nastanka kiralnega centra iz predhodno prokiralnega centra. Pri tem je spet zelo pomembna izbira encimov, ki jih uporabimo v reakciji, saj z izbiro različnih encimov dobimo različne enantiomere, kar je pa pri ločevanju oz. izoliranju enega izmed enantiomerov nadvse koristno (Rosche s sod., 2003)

2.4.3 Kristalizacija

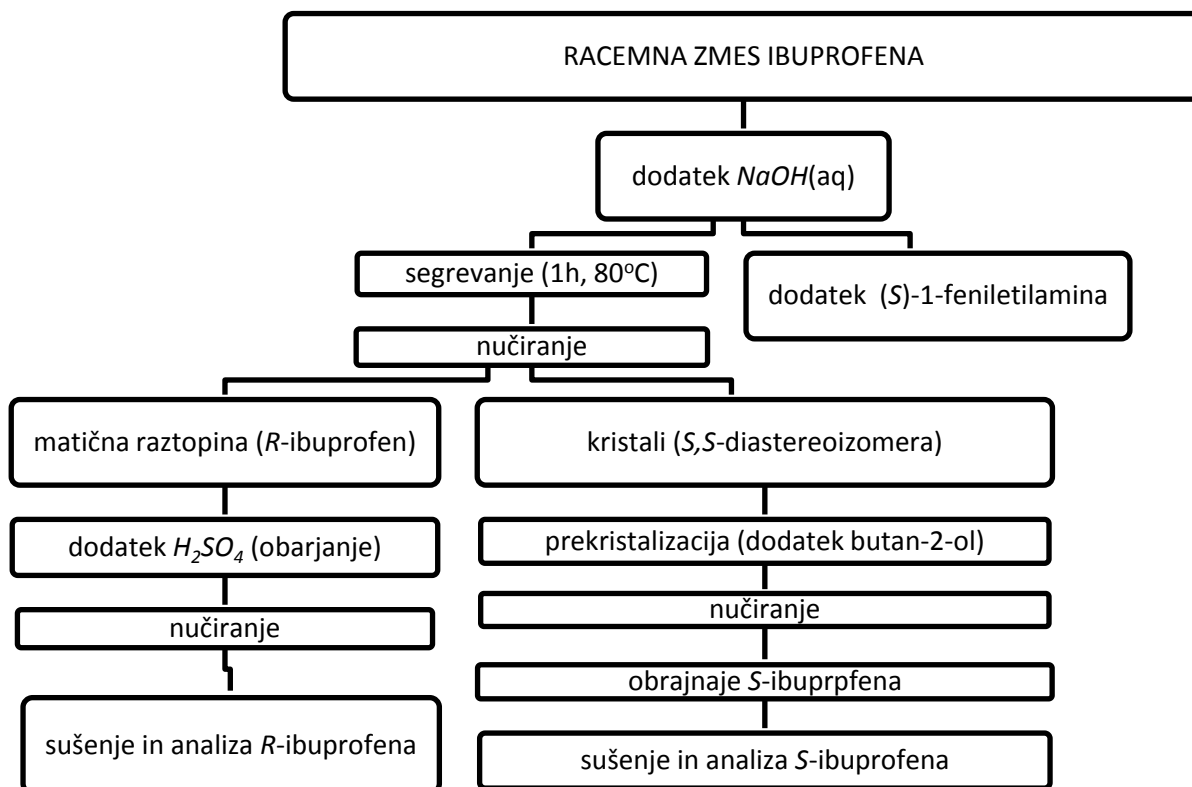
Kristalizacija je tehnika ločevanja dveh enantiomerov, ki temelji na pretvorbi obeh enantiomerov v diastereoizomere. Ker imajo diastereoizomeri različne fizikalne lastnosti, jih lahko tudi med seboj ločimo. Enantiomera do diastereoizomerov pretvorimo s pomočjo kemijske reakcije z drugo kiralno molekulo. To je metoda, ki smo jo tudi uporabili v raziskovalni nalogi in je podrobneje opisana v poglavju 3.2.

3 PRAKTIČNI DEL

3.1 Ločevanje in izolacija obeh enantiomerov racemne zmesi ibuprofena

3.1.1 Načrt ločevanja enantiomerov

Princip ločevanja smo osnovali na nizu reakcij, kjer smo racemno zmes najprej s pomočjo nevtralizacijske reakcije z NaOH pretvorili v vodotopno natrijevo sol in ob dodatku druge kiralne molekule (*S*)-etilfenilamin pridobili diastereoizomerni produkt - (*S,S*)-diastereoizomer. Ta produkt lahko ločimo od matične raztopine na osnovi različne topnosti v vodi. *S,S*-stereoizomer je najslabše topen, zato se izločili kot oborina; drugi enantiomer pa ostane v matični raztopini. Ločitev obeh je mogoča s filtracijo (uporabili smo filtracijo pod znižanim tlakom t.i. nučiranje). Po ločitvi (*S,S*)-diastereoizomera od matičnice ga lahko z dodatkom H_2SO_4 pretvorimo nazaj v enantiomer in tako tudi izoliramo *S*-ibuprofen. Iz matičnice pa lahko na isti način izoliramo tudi *R*-ibuprofen. Prvo ločitev enantiomerov smo zasnovali, kot je prikazano na organigramu 2.



Organigram 2. Načrt ločevanja racemne zmesi ibuprofena

Ibuprofen je praktično netopen v vodi, se pa dobro topi v večini organskih topil, kot so etanol, metanol, aceton in diklorometan (Brayfield s sod., 2014).

3.1.2 Opis vzorcev

V poskusu so bili uporabljeni trije (dostopni) vzorci ibuprofena (racemne zmesi):

- Ibuprofen Belupo 400 mg tablete (oznaka IBU400) (Belupo, 2011)
- Ibuprofen Belupo 600 mg tablete (oznaka IBU600) (Belupo, 2011)
- Čista racemna zmes ibuprofena (Merck, p.a); (oznaka IBU)

PREGLEDNICA 2. Vzorci ibuprofena



Ibuprofen Belupo 400 mg predstavljajo okrogle, bikonveksne filmsko obložene tablete, temno roza barve. Ibuprofen Belupo 600 mg predstavljajo bikonveksne in filmsko obložena tablete bele barve. V obeh primerih farmacevtskih izdelkov jedro tablete sestavljajo: povidon⁹, mikrokristalna celuloza (E460) in smukec (E553b). V 400 mg tableti so pomožne snovi še predgeliran škrob, laktoza monohidrat, premrežen natrijev karmelozat (E468), brezvodni koloidni silicijev dioksid in magnezijev stearat (E572) (Belupo, 2011).

V filmski oblogi obeh tablet se nahajajo še: smukec (E553b), makrogol 6000, titanov dioksid (E171), hipromeloza (E464), poliakrilat 30 odstotna disperzija in v primeru 400 mg tablete barvilo azorubin - karmoizin (E122) (Belupo, 2011).

3.1.3 Opis dela

Pred začetkom eksperimenta se je potrebno najprej ustrezno zaščititi (zaščitna laboratorijska halja, rokavice in očala). Nato smo pripravili vse reagente: 0,25 M NaOH in 2,00 M H₂SO₄ ter vzorce ibuprofena. Štiri tablete 600 mg ibuprofena in štiri tablete 400 mg ibuprofena smo v terilnici uprašili ter v

⁹ Polimer (opomba avtorja).

trogrlo bučko (slika 17) natehtali $\approx 2,4$ g vzorca. Glede na maso vzorca smo nato preračunali kolikšna je množina enantiomera in temu ustrezno dodali prostornino $0,25$ M NaOH ter magnetek. Nato smo sestavili aparaturo na sliki 17, ki je na trogrlo bučko imela pripet povratni vodni hladnilnik. V eno odprtino te bučke smo vstavili termoemter in drugo prekrili z opno (balonončkom), skozi katerega smo kasneje injicirali (S)-1-feniletilamin.



Slika 17. Aparatura za ločevanje racemne zmesi ibuprofena

Trogrla bučka je bila potopljena v vodno kopel in postavljena na magnetno mešalo, ki omogoča regulacijo temperature ter hitrosti mešanja (130°C in 240 rpm).

3.1.3.1 Poskus s 600 mg tabletami IBUPROFENA (Belupo®)

Masa ene tablete: $(0,7626 \pm 0,0001)$ g.

Masa ibuprofena 4 tablet IBU600, ki smo jo dodali v trogrlo bučko: $(2,4431 \pm 0,0001)$ g.

Ob predpostavki, da je v eni tableti 600 mg ibuprofena, to predstavlja $(78,60 \pm 0,01)$ % mase celotne tablete. Kar pomeni, da smo v začetni masi $2,4431$ g imeli $1,9203$ g ibuprofena ali (upoštevajoč molsko maso ibuprofena, $M = 206,3$ g/mol) **0,00930 mol** ibuprofena. Ob predpostavki, da je razmerje obeh enantiomerov 1:1, to pomeni **0,00467 mol vsakega enantiomera**.

Opis dela

Prvi dodatek baze smo izračunali glede na točno množino uporabljene IBU600 zmesi:

$$V(\text{NaOH}) = \frac{n}{c} = \frac{0,00467 \text{ mol} \times L}{0,25 \text{ mol}} = 0,0190 L = 19,0 \text{ mL}$$

Z dodatkom NaOH smo nevtralizirali $\frac{1}{2}$ množine IBU600 in dobili vodno raztopino celotne zmesi. Sledil je dodatek (S)-1-feniletilamina (Merck, p.a.). Prostornino dodanega (S)-1-feniletilamina smo izračunali kot:

$$V((S)\text{-1-feniletilamin}) = \frac{n \times M}{\rho} = \frac{0,00467 \text{ mol} \times 121,2 \text{ g} \times \text{mL}}{0,94 \text{ g}} = 0,61 \text{ mL}$$

Po eni uri segrevanja in mešanja zmesi pri $\approx 80^\circ\text{C}$ smo celotno zmes ohladili na sobno temperaturo in dodal nekaj mililitrov ledene deionizirane vode, da bi čim bolje ločili vodotopne in netopne komponente v zmesi. Sledilo je nučiranje in sušenje kristalov. Upoštevajoč stehiometrijska razmerja bi moral dobiti:

$$\text{S,S-diastereoizomer} = 0,00467 \text{ mol} \times 327,5 \text{ g/mol} = 1,540 \text{ g.}$$



SLIKA 18. Ločitev S,S-diastereoizomera od matične raztopine

Produkt smo čez noč pustili v digestoriju in naslednji dan stehali maso. Ko smo se prepričali, da so kristali res suhi (masa se ni več spreminjala) smo kristale raztopil v segretem butan-2-ol (Riedel de Hahn, 100%). S tem smo želeli odstraniti vse komponente, ki so bile adsorbirane na površino kristalov S,S-diastereoizomera. Čisti filtrat smo nato prenesli v ledeno kopel in čez nekaj minut opazili nastanek belih kristalov S,S-diastereoizomera. Teoretično, bi kristali morali imeti maso 1,540 g. Sledila je odstranitev (S)-1-feniletilamina. Le-to smo naredil s prebitkom $2\text{M H}_2\text{SO}_4$, na način, da smo kristale raztopili v $20 \text{ mL } 2\text{M H}_2\text{SO}_4$. Dobili smo lepljivo, na površini oljnato raztopino, ki se je ob eni minuti mešanja s stekleno palčko popolnoma raztopila. Čašo z raztopljenimi kristali smo ponovno položili v ledeno kopel, kjer so se kristali čistega S-ibuprofena ponovno izkristalizirali. Sledilo je nučiranje in sušenje produkta ter ponovno tehtanje in izračun izkoristka.

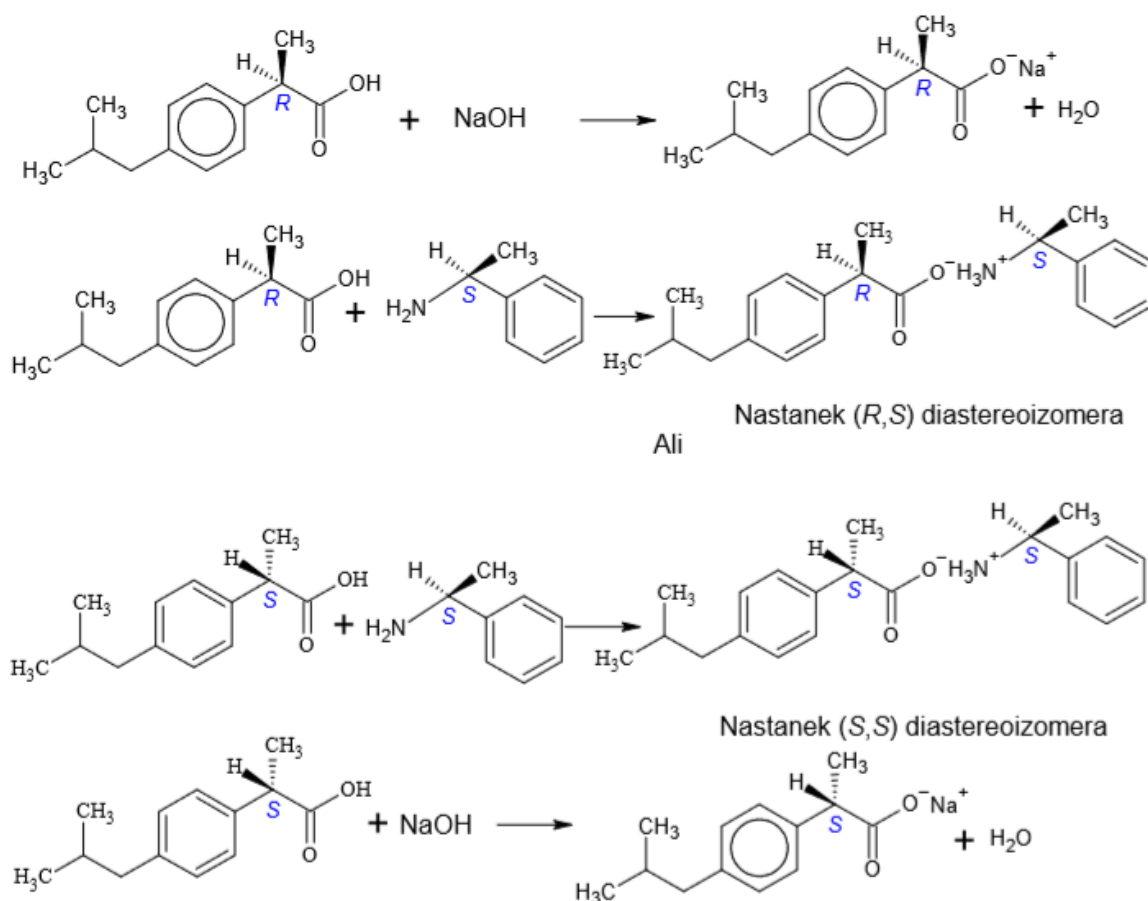
$$\text{Pričakovana masa čistega S-ibuprofena} = n \times M = 0,00467 \text{ mol} \times 206,3 \text{ g/mol} = 0,9696 \text{ g.}$$

Natrijeva sol *R*-ibuprofena, ki je ostala v matični raztopini po prvem nučiranju, je bila izolirana na podoben način. Najprej smo dodali 20 mL 2M H₂SO₄ in dobili belo oborino, ki smo jo postavili v ledeno kopel. Po petih minutah smo kristale odnučirali ter jih posušili in stehtali.



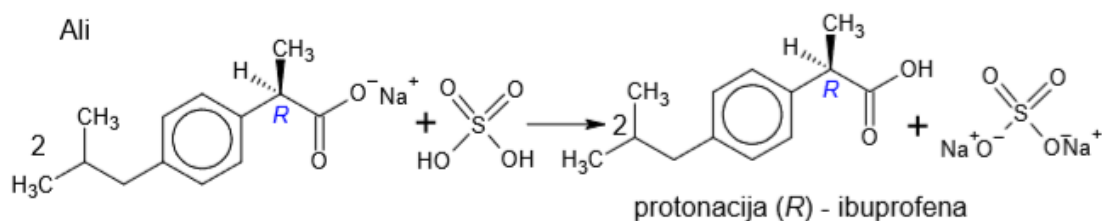
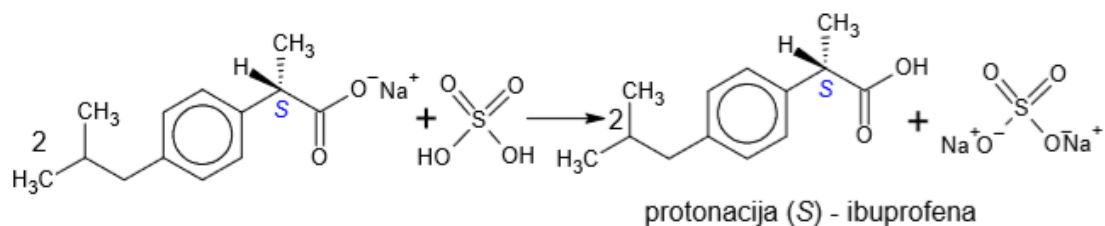
SLIKA 19. *S*-ibuprofen pred rekristalizacijo v ledeni kopeli (levo) in oborina *R*-ibuprofena v matični raztopini znotraj nuče (desno)

Rezultati vseh meritev za IBU600 so podani v poglavju 4.1.1. Reakcijska shema za pretvorbo v diastereoizomere, ki velja za vse tri vzorce je prikazana na sliki 20.

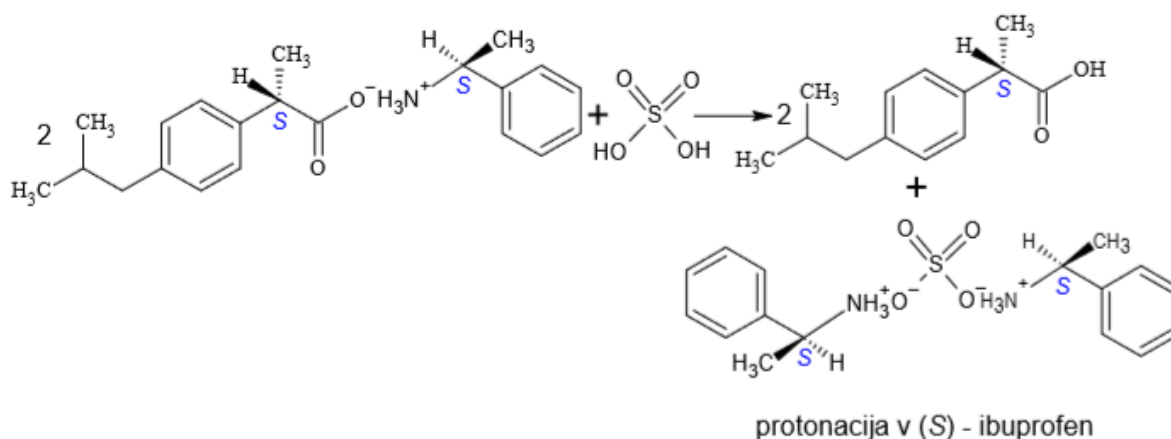
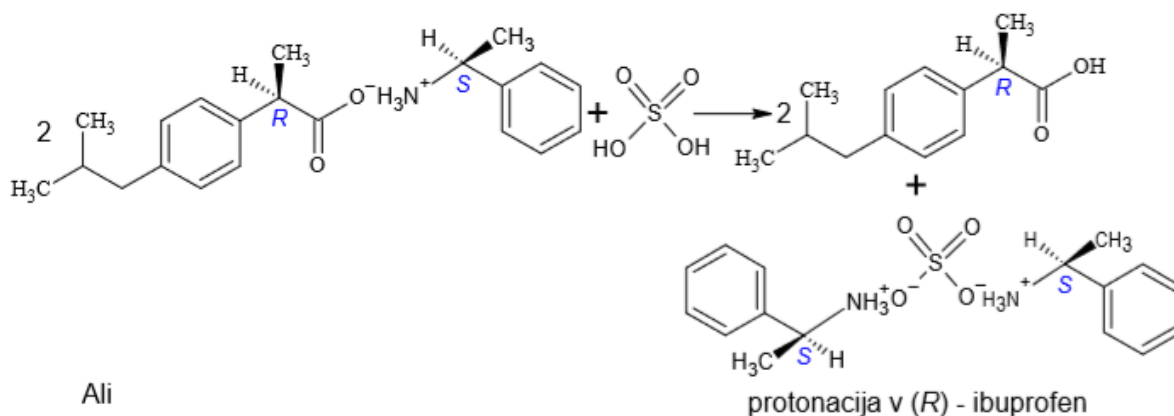


SLIKA 20. Nastanek vodotopne soli ibuprofena in *S,S* diastereoizomera, ki v vodi ni topen

Slika 21 prikazuje protonacija ibuprofena pri prvi možni reakciji, slika 22 pa pri drugi možni reakciji.



SLIKA 21: Protonacija ibuprofena (prva možna reakcija)



SLIKA 22. Protonacija ibuprofena (druga možna reakcija)

3.1.3.2 Poskus s 400 mg tabletami IBUPROFENA (Belupo®)

Masa ene tablete IBU400: $(0,7207 \pm 0,0001) \text{ g}$.

Masa štirih tablet (IBU400), ki smo jo dodali v troglo bučko: $(2,8801 \pm 0,0001) \text{ g}$.

Ob predpostavki, da je v eni tableti $(0,4000 \pm 0,0001) \text{ g}$ racemata ibuprofena lahko izračunamo, da je v eni tableti 55,5 % čistega ibuprofena, to pomeni, da je v 2,8801 g racemne zmesi ibuprofena $1,5985 \pm 0,0001 \text{ g}$ ali **0,00775 mol** ibuprofena, oziroma **0,00387 mol vsakega izmed enantiomerov**.

Opis dela

Prvi dodatek baze smo izračunal glede na točno množino uporabljene IBU400 zmesi:

$$V(\text{NaOH}) = \frac{n}{c} = \frac{0,00387 \text{ mol} \times L}{0,25 \text{ mol}} = 0,0160 \text{ L} = 16,0 \text{ mL}$$

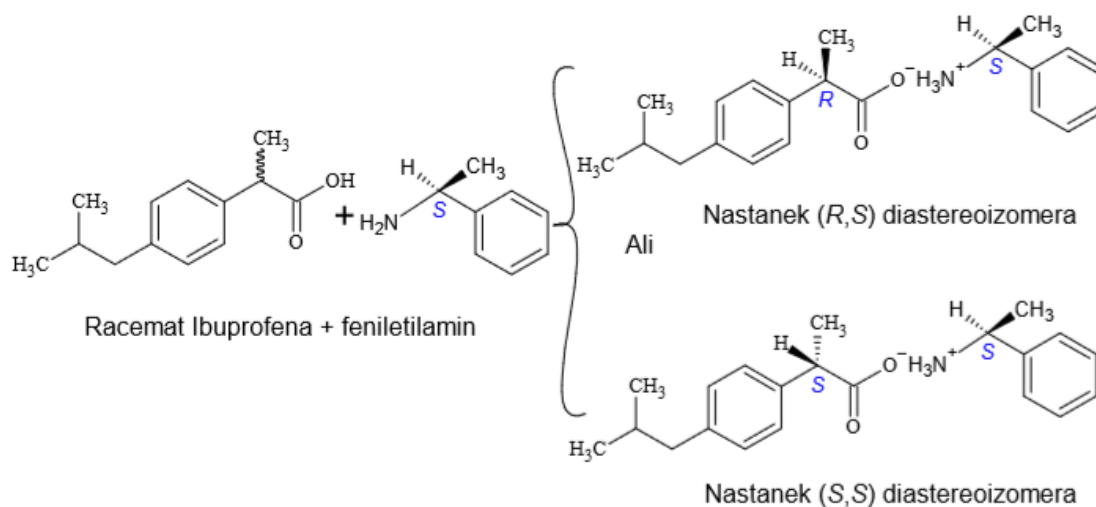
Z dodatkom NaOH smo nevtralizirali $\frac{1}{2}$ množine IBU400 in dobili vodno raztopino celotne zmesi. Sledil je dodatek (S)-1-feniletilamina (Merck, p.a.) Prostornino dodanega (S)-1-feniletilamina smo izračunali kot:

$$V((\text{S})\text{-1-feniletilamin}) = \frac{n \times M}{\rho} = \frac{0,00387 \text{ mol} \times 121,2 \text{ g} \times \text{mL}}{0,94 \text{ g}} = 0,50 \text{ mL}$$

Postopek pretvorbe v diastereoizomer v pripravi na sliki 17 je bil popolnoma enak, kot pri prvem vzorcu. Sledilo je dodajanje ledene deionizirane vode, nučiranje in sušenje kristalov. Upoštevajoč stehiometrijska razmerja bi morali dobiti:

$$m(\text{S,S-diastereoizomer}) = 0,0039 \text{ mol} \times 327,5 \text{ g/mol} = 1,277 \text{ g}.$$

Slika 23 prikazuje nastanek S,S-diastereoizomera.



SLIKA 23. Nastanek *S,S*-diastereoizomera

Postopek prečiščevanja *S,S*-diastereoizomera v vročem butan-2-olu je bil enak kot pri prvem vzorcu IBU600, le da smo pri upoštevali maksimalno teoretično maso *S,S*-diastereoizomera 1,277 g. Postopek odstranitve (*S*)-1-feniletilamina in protonacije *S,S*-diastereoizomera je bil prav tako enak, kot v prvem primeru. Po sušenju produkta ter ponovnem tehtanju je sledil izračun izkoristka.

Pričakovana masa čistega *S*-ibuprofena = $n \times M = 0,0039 \text{ mol} \times 206,3 \text{ g/mol} = 0,8046 \text{ g}$.

Natrijeva sol *R*-ibuprofena, ki je ostala v matični raztopini po prvem nučiranju, je bila izolirana na podoben način, kot je opisano pri vzorcu IBU600. Najprej smo dodali 20 mL 2M H_2SO_4 , dobil belo oborino, ki smo jo postavili v ledeno kopel. Po petih minutah smo kristale odnučirali ter jih posušili in stehali. Rezultati vseh meritev za IBU400 so zbrani v poglavju 4.1.2.

3.1.3.2 Poskus s čistim ibuprofenom (Merck®)

Zaradi visoke cene¹⁰, smo imeli na razpolago le 1,0000 g čiste racemne zmesi ibuprofena (oznaka IBU). Zato je bila začetna množina IBU manjša, kot v primeru uporabe tablet. Temu primerno smo preračunali tudi prostornine ostalih dodanih reagentov.

$$m(\text{IBU}) = (0,6200 \pm 0,0001) \text{ g} \rightarrow n(\text{IBU}) = 0,00300 \text{ mol}$$

→ množina posamezne enantiomere: 0,00150 mol

$$V(\text{NaOH}) = \frac{n}{c} = \frac{0,00150 \text{ mol} \times L}{0,25 \text{ mol}} = 0,0060L = 6,00 \text{ mL}$$

¹⁰ 76,80 EUR/g (opomba avtorja).

$$V((S)\text{-1-feniletilamin}) = \frac{n \times M}{\rho} = \frac{0,00150 \text{ mol} \times 121,2 \text{ g} \times \text{mL}}{0,94 \text{ g}} = 0,20 \text{ mL}$$

Pričakovana masa S,S-dia stereoisomera = $0,0015 \text{ mol} \times 327,5 \text{ g/mol} = 0,500 \text{ g}$.

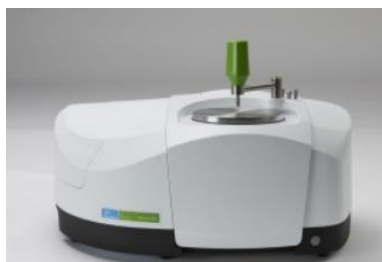
Pričakovana masa čistega S-ibuprofena = $n \times M = 0,00015 \text{ mol} \times 206,3 \text{ g/mol} = 0,310 \text{ g}$.

Rezultati vseh meritev čistega vzorca ibuprofena so podani v poglavju 4.1.3

3.2 Analiza produktov

3.2.1 FTIR spektri delnih in končnih produktov

Vse IR spektre smo posneli v šoli z aparaturo Perkin Elmer ATR¹¹ FTIR (*attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy* (ATR-FTIR) (slika 24) s spektrometrom z $0,5 \text{ cm}^{-1}$ resolucijo, ki omogoča natančne meritve v območju od $8500 - 350 \text{ cm}^{-1}$.



SLIKA 24. ATR-FTIR šolski spektrometer

Postopek ATR-FTIR meritve:

1. Čiščenja kristala (umetni diamant) s papirnato brisačo in propan-2-olom.
2. Snemanje ozadja.
3. Majhno količino vzorca položimo direktno na kristal diamanta in z ročico zagotovimo dober stik s površino merilnega instrumenta ($\approx 42 \text{ ATR}$ enot).
4. Snemanje spektra (kot poprečje štirih snemanj)¹².

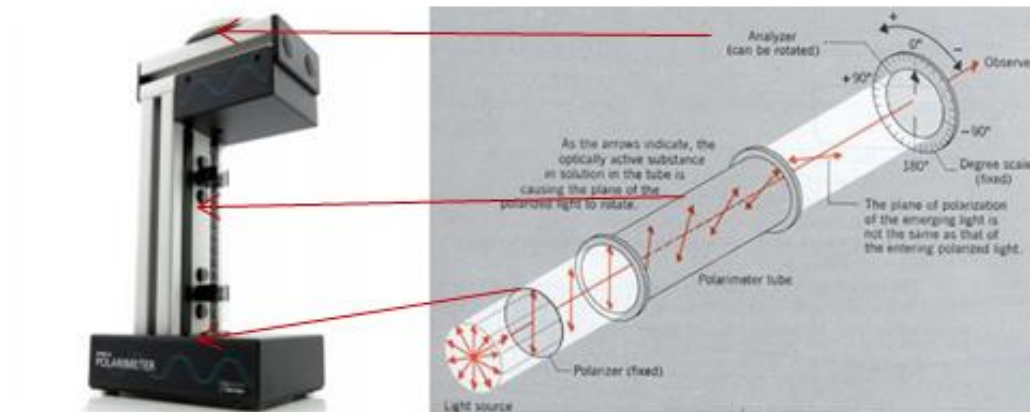
Rezultati meritev s postopkom ATR-FTIR so zbrani v poglavju 4.2.

¹¹ Oslabljen popoln odboj (ATR) je tehnika vzorčenja, ki se uporablja v povezavi z infrardečo spektroskopijo in omogoča, da se vzorci pregledajo neposredno v trdnem ali tekočem stanju brez predhodne priprave vzorca (Perkin Elmer, 2005).

¹² Elmer Perkin® spektroskopija s svojo programsko opremo ponuja "predogled" posnetega spektra in v realnem času spreminjanje "spektralne kakovosti". Ko se doseže zadovoljiva kakovost, posnamemo spekter še enkrat. Pri meritvah ATR debelina vzorca ne vpliva na intenzivnost absorbanca (Perkin Elmer, 2005).

3.2.2 Meritve optične čistosti izoliranih produktov

Meritev optične čistosti izoliranih produktov smo izvedli na naslednji način: najprej smo v 10 mL etanola raztopili $\approx 0,0250$ (+/- 0,0001) g vsakega izoliranega produkta. Polarimeter (Vernier)¹³ (Slika 25) smo najprej umerili na etanol in nato izmerili kot zasuka ravnine linearno polarizirane svetlobe za vseh šest izkristaliziranih produktov.



SLIKA 25. Delovanje Vernierjevega polarimetra (Vernier, 2018)

Ob upoštevanju Biotovega zakona:

$$\alpha = [\alpha] l c$$

kjer je:

- α kot zasuka, ki ga opazujemo ($^{\circ}$)
- $[\alpha]$ specifični kot zasuka ($^{\circ}$)
- l dolžina poti, ki jo prepotuje svetloba v kiveti (dm)
- c koncentracija optično aktivne snovi (g/mL)

je zelo pomembno, da res natančno izmerimo višino raztopine v kiveti (l) in poznamo koncentracijo snovi (c), ki jo preučujemo. Optično čistost se izračuna kot:

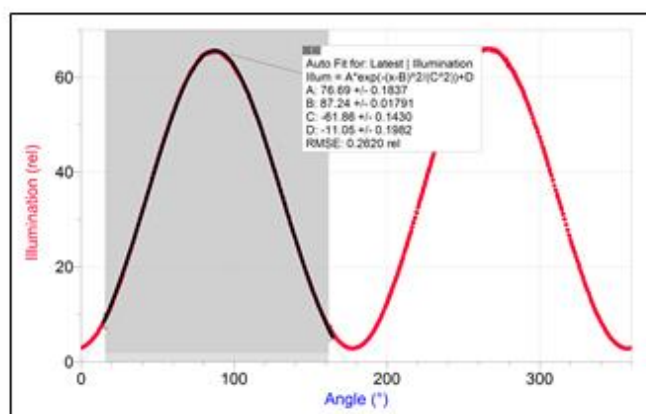
$$\% \text{ optična čistost} = \frac{\alpha}{[\alpha]} \times 100$$

Rezultati o meritvah optične čistosti izoliranih produktov so zbrani v poglavju 4.3.

¹³ Vertikalni polarimeter, kot je prikazan na sliki 25, ki kot vir svetlobe uporablja 589 nm LED. Polarizator je fiksni, analizator rotiramo ročno.

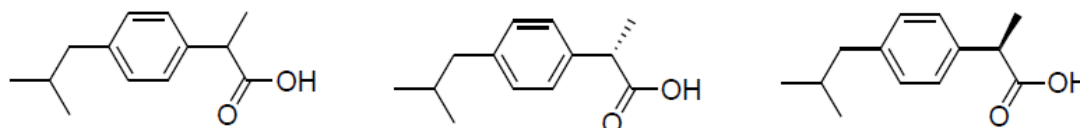
Opis postopka

Kalibrirano stekleno kiveto (slika 25) smo napolnili do višine 10,00 ($\pm 0,05$) cm z 96% etanolom in sprožil meritev. Po petnajstih sekundah smo zabeležili prvi maksimalni kot zasuka (slika 26) pri čemer smo zaradi večje natančnosti uporabil Gaussovo enačbo, ki omogoča določitev opazovanega kota ravnine linearno polarizirane svetlobe z natančnostjo $\pm 0,3^\circ$. Meritev smo shranili in nato postopek ponovili z raztopino optično aktivne snovi – izoliranimi enantiomeri ibuprofena.



SLIKA 26. Določitev kota zasuka linearno polarizirane svetlobe s pomočjo prvega maksimuma (obarvano temno sivo)

Specifični kot zasuka smo izračunali kot razliko med kotom zasuka ravnine linearno polarizirane svetlobe za etanol in preučevano raztopino ibuprofena. Slika 27 prikazuje ibuprofen v različnih oblikah.



SLIKA 27. Racemna zmes ibuprofena (levo); (*S*)-(+)-ibuprofen (v sredini); (*R*)-(-)- Ibuprofen (desno)

3.2.3 UV spektroskopija

Analiza UV spektrov je bila opravljena s šolskim UV spektrometrom Perkin Elemer Lambda Bio ® s kvarčnimi kivetami (slika 28).



SLIKA 28. UV spektrometer Lambda Bio (PERKIN ELMER ®)

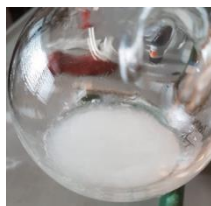
Da bi uspešno določili koncentracijo ibuprofena v obeh ločenih izomerih smo najprej pripravil raztopino z znano koncentracijo, to je: $0,0229 \text{ mol/L}$.

Najprej smo $0,1180 (\pm 0,0001) \text{ g}$ ibuprofena raztopili v 10 mL etanola in nato 25 mL merilno bučko dopolnili do oznake. Prve meritve absorbance so pokazale, da je ta koncentracija previsoka. Zato smo to raztopino redčili na polovico začetne vrednosti, to je na $0,01145 \text{ mol/L}$. Slednjo smo potem še 4-krat redčili, da smo dobili standardne raztopine naslednjih koncentracij: $0,00573 \text{ mol/L}$, $0,00290 \text{ mol/L}$, $0,00143 \text{ mol/L}$ in $0,00072 \text{ mol/L}$. Matkovičeva s sod. (2005) poroča, da je absorpcijski maksimum za ibuprofen pri 273 nm . Vsem raztopinam smo zato pri tej valovni dolžini izmerili absorbanco, narisali umeritveno premico in na tej osnovi izračunali še koncentracijo ibuprofena v vseh ločenih enantiomerih. Rezultati UV spektroskopiranja so zbrani v poglavju 4.4.

4 REZULTATI MERITEV

4.1 Masa vmesnih in delnih produktov ter izračun izkoristkov ločevanja

Na sliki 29 podajamo prikaz nastale oborine *S,S*-diastereoizomera ibuprofena po reakciji z (*S*)-1-feniletilaminom.



SLIKA 29. Nastanek oborine *S,S*-diastereoizomer ibuprofena po reakciji z (*S*)-1-feniletilaminom.

V naslednjih podpoglavjih prikazujemo preglednice z zbranimi izračunanimi in eksperimentalno dobljenimi podatki za vse tri vzorce.

4.1.1 Izkoristki ločitve IBU600

PREGLEDNICA 3. Masa IBU600_*S,S*-diastereoizomerne soli

meritev	vrednost	<i>S,S</i> -diastereoizomer
masa začetne zmesi (g), $\pm 0,0001$ g	2,4431	
masa racemata ibuprofena, (g), $\pm 0,0001$ g	1,9203	
množina enantiomera ibuprofena (mol)	0,00467	
pričakovana masa <i>S,S</i> -diastereoizomera (g), $\pm 0,001$ g (M= 327,46 g/mol)		1,5400
eksperimentalno dobljena masa <i>S,S</i> -diastereoizomera (g), $\pm 0,0001$ g		3,2830
eksperimentalno dobljena masa <i>S,S</i> -diastereoizomera (g), $\pm 0,0001$ g po dodatnem sušenju (7 dni)		3,0434

PREGLEDNICA 4. Masa *S,S*-diastereoizomera po prekrizalaciji

meritev	vrednost
masa zmesi (g), $\pm 0,0001$ g	3,0434
pričakovana masa <i>S,S</i> -diastereoizomera v zmesi (g) $\pm 0,0001$ g	1,5400
eksperimentalno pridobljena masa očiščenega <i>S,S</i> -diastereoizomera, (g), $\pm 0,0001$ g	0,4452
izkoristek (%)	28,9

Pri prvem nučiranju smo opazili nastanek penaste raztopine natrijeve soli *R*-ibuprofena, ki je ostala v nuči. Iz rezultatov podanih v spodnjih preglednicah 5 in 6 lahko zaključimo, da so produkti, ki smo jih dobili pri prvem nučiranju vsebovali še veliko nečistoč.

PREGLEDNICA 5. Masa *R*-ibuprofena IBU600

meritev	vrednost	<i>R</i> -ibuprofen
masa začetne zmesi (g), $\pm 0,0001$ g	2,4431	
masa racemata ibuprofena, (g), $\pm 0,0001$ g	1,9203	
množina enantiomera ibuprofena (mol)	0,00467	
pričakovana masa <i>R</i> -enantiomera (g), $\pm 0,0001$ g (M= 206,3 g/mol)		0,9696
eksperimentalno dobljena masa <i>R</i> -ibuprofena soli (g), $\pm 0,0001$ g		0,4368
izkoristek <i>R</i>-ibuprofena v zmesi (%)		45,0

PREGLEDNICA 6. Masa *S*-ibuprofena IBU 600 po odstranitvi (*S*) – 1- feniletilamina

meritev	<i>S,S</i> -diastereoizomer	<i>S</i> -ibuprofen
masa (g), $\pm 0,0001$ g	0,4452	
množina, mol	0,00136	
pričakovana masa, (g), $\pm 0,0001$ g		0,2804
eksperimentalno pridobljena masa, (g), $\pm 0,0001$ g		0,1494
izkoristek <i>S</i>-ibuprofena v zmesi (%)		53,3

4.1.2 Izkoristki ločitve IBU400

Pri ločevanju enantiomerov tega vzorca so bili vsi vmesni produkti rahlo rožnato obarvani, iz česar sklepamo, da barvila azorubina nismo uspeli povsem odstraniti, oz. je potekla stranska reakcija tudi z barvilom.

PREGLEDNICA 7: Masa IBU400 S,S–diastereoizomerne soli

meritev	vrednost	S,S- diastereoizomer
masa začetne zmesi (g), ± 0,0001 g	2,8801	
masa racemata ibuprofena, (g), ± 0,0001 g	1,5985	
½ množina racemata ibuprofena (mol)	0,00387	
pričakovana masa S,S-diastereoizomera (g), ± 0,001g (M= 327,46 g/mol)		1,2770
eksperimentalno dobljena masa S,S-diastereoizomera (g), ± 0,0001 g		2,7913
eksperimentalno dobljena masa S,S-diastereoizomera (g), ± 0,0001 g po dodatnem sušenju (7 dni)		1,9361

PREGLEDNICA 8: Masa S,S_IBU400 diastereoizomerne soli po prekristalizaciji

meritev	S,S-diastereoizomer
masa zmesi (g), ± 0,0001 g	1,9361
pričakovana masa S,S-diastereoizomera v zmesi (g) ± 0,0001g	0,8046
eksperimentalno pridobljena masa očiščenega S,S-diastereoizomera (g), ± 0,0001 g	0,1392
izkoristek (%)	17,3%

PREGLEDNICA 9: Masa IBU400 S-ibuprofena po odstranitvi S-feniletilamina

meritev	S,S-diastereoizomer	S-ibuprofen
masa (g), ± 0,0001 g	0,1392	
množina, mol	0,00039	
pričakovana masa, (g), ± 0,0001 g		0,1120
eksperimentalno pridobljena masa, (g), ± 0,0001 g		0,0923
izkoristek (%)		82,4

PREGLEDNICA 10. Masa IBU400 R-ibuprofena

meritev	vrednost	R-ibuprofen
masa začetne zmesi (g), ± 0,0001 g	2,8083	
masa racemata ibuprofena, (g), ± 0,0001 g	1,5985	
½ množina racemata ibuprofena (mol)	0,0039	
pričakovana masa R – enantiomera, (g), ± 0,0001 g (M = 206,3 g/mol)		0,8046
eksperimentalno dobljena masa R-enantiomerne soli (g), ± 0,0001 g		0,0449
izkoristek za izolacijo R-ibuprofena , (%)		5,6%

4.1.3 Izkoristki ločitve čistega vzorca ibuprofena

PREGLEDNICA 11: Masa IBU S,S – diastereoizomerne soli

meritev	vrednost	S,S- distereoizomer
masa racemata ibuprofena, (g), $\pm 0,0001$ g	0,6200	
$\frac{1}{2}$ množina racemata ibuprofena (mol)	0,00150	
pričakovana masa S,S-diastereoizomera (g), $\pm 0,0001$ g ($M = 327,46$ g/mol)		0,500
eksperimentalno dobljena masa S,S-diastereoizomera (g), $\pm 0,0001$ g		0,427
izkoristek (%)		86,9

PREGLEDNICA 12: Masa IBU S,S-diastereoizomerne soli po prekrizalaciji

meritev	S,S-diastereoizomer
začetna masa S,S-diastereoizomera, (g), $\pm 0,0001$ g	0,4007
eksperimentalno pridobljena masa, (g), $\pm 0,0001$ g	0,1924
izkoristek (%)	48,0

PREGLEDNICA 13: Masa IBU S-ibuprofena po odstranitvi S- feniletilamina

meritev	S,S-diastereoizomer	S-ibuprofen
masa (g), $\pm 0,0001$ g	0,1372	
množina, mol	0,0015	
pričakovana masa, (g), $\pm 0,0001$ g		0,3095
eksperimentalno pridobljena masa, (g), $\pm 0,0001$ g		0,2098
izkoristek izolacije S-ibuprofena v zmesi (%)		67,8

PREGLEDNICA 14: Masa R-ibuprofena

meritev	vrednost	R-enantiomer
masa racemata ibuprofena, (g), $\pm 0,0001$ g	0,6200	
$\frac{1}{2}$ množina racemata ibuprofena, (mol)	0,00150	
pričakovana masa R-enantiomera (g), $\pm 0,0001$ g ($M = 206,3$ g/mol)		0,3095
eksperimentalno dobljena masa R-enantiomerne soli (g), $\pm 0,0001$ g		0,2074
izkoristek izolacije R-ibuprofena v zmesi (%)		66,9

Vsi izkoristki izolacije enantiomerov so združeni v preglednici 15.

PREGLEDNICA 15. Pregled izkoristkov ločevanja enantiomer pri vseh treh vzorcih

vzorec	izkoristki sintez (izolacij), (%)		
	S,S- diastereoizomera (prečiščena)	S-izomer	R-izomer
IBU600	28,9 (± 0,1)	53,3 (± 1,7)	45,0 (± 1,4)
IBU400	17,3 (± 0,5)	82,4 (± 2,6)	5,6 (± 0,2)
IBU (čisti)	48,0 (± 1,5)	67,9 (± 2,1)	66,9 (± 2,1)

Ocena napake meritev

Primer izračuna za vzorec IBU, kjer so bile napake meritev zaradi majhne mase največje:

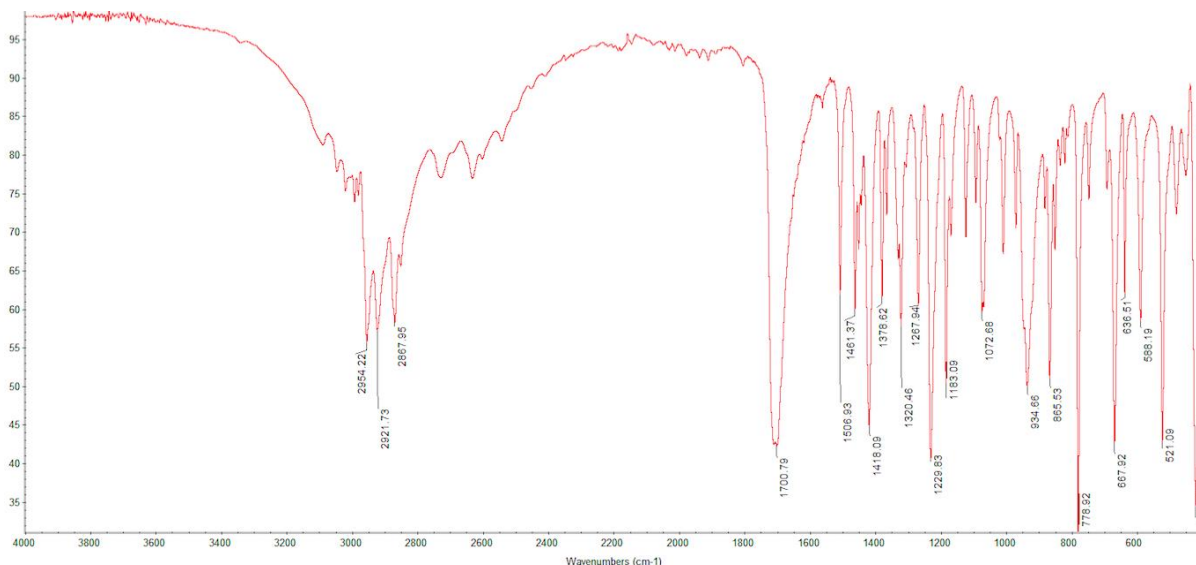
$$\frac{0,0001 \text{ g}}{0,6200 \text{ g}} \times 100 + \frac{0,0001 \text{ g}}{0,2098 \text{ g}} \times 100 + \frac{0,0001 \text{ g}}{0,1924 \text{ g}} \times 100 + \frac{0,0001 \text{ g}}{0,2074 \text{ g}} + \frac{0,03 \text{ ml}}{6,00 \text{ mL}} \times 100 + \frac{0,0050}{0,2000 \text{ mL}} \times 100 =$$

$$0,02\% + 0,03\% + 0,05\% + 0,05\% + 0,5\% + 2,5\% = \mathbf{3,15\%}$$

4.2 FTIR spektri izoliranih produktov

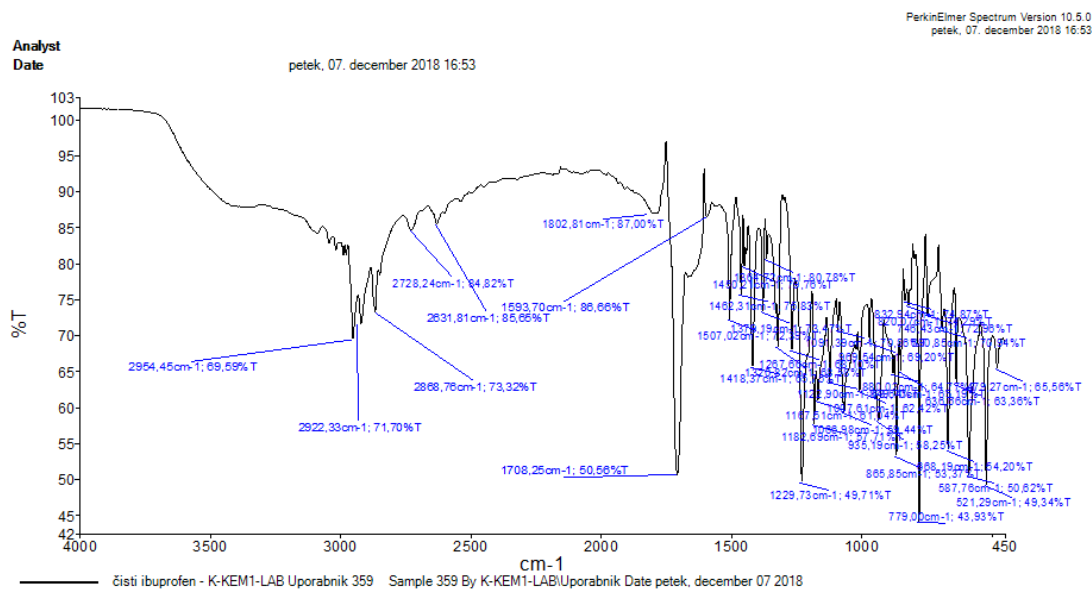
Spektri posneti z aparaturo Perkin Elmer Spectrum Two so nam omogočili, da ocenimo primerjalno stopnjo čistosti. To smo naredili kot dodatek k raziskovalni nalogi in predstavlja dodatno preveritveno metodo čistosti produktov. Stopnjo čistoče smo ocenili na vseh treh vzorcih IBU400, IBU600 in IBU.

IR spektri ibuprofena so že bili predmet številnih študij (Antonov s sod., 2013), zato so posamezni vrhovi v spektru dobro opisani in je identifikacija zato olajšana (Vueba s sod., 2008). Najpomembnejši vrhovi pripadajo vibracijam C-H (-CH₃) vezi (2700 - 3000 cm⁻¹); pri ≈1720 cm⁻¹ opazimo vibracijo karbonilne skupine (=CO), ki se tudi največkrat uporablja v analitične namene (Antonov s sod., 2013). Ker imamo opravka z enantiomeri (in diastereoizomeri) ta vrh v analitične namene ne pride v poštev, saj se pojavlja v vseh produktih. Naša pozornost je bila zato usmerjena v območje med 1520 – 600 cm⁻¹, kjer so prisotne posamezne vibracije C-C vezi ter vibracije vezi, kjer je na ogljik z enojno vezjo vezana -CH₃ skupina (kiralni center molekule). Na sliki 30 vidimo IR spekter racemne zmesi čistega ibuprofena, ki ga je posnel Kumar (2007).



SLIKA 30. IR spekter racemne zmesi ibuprofena posnet s IR spektrometrom (KBr) (Kumar, 2007)

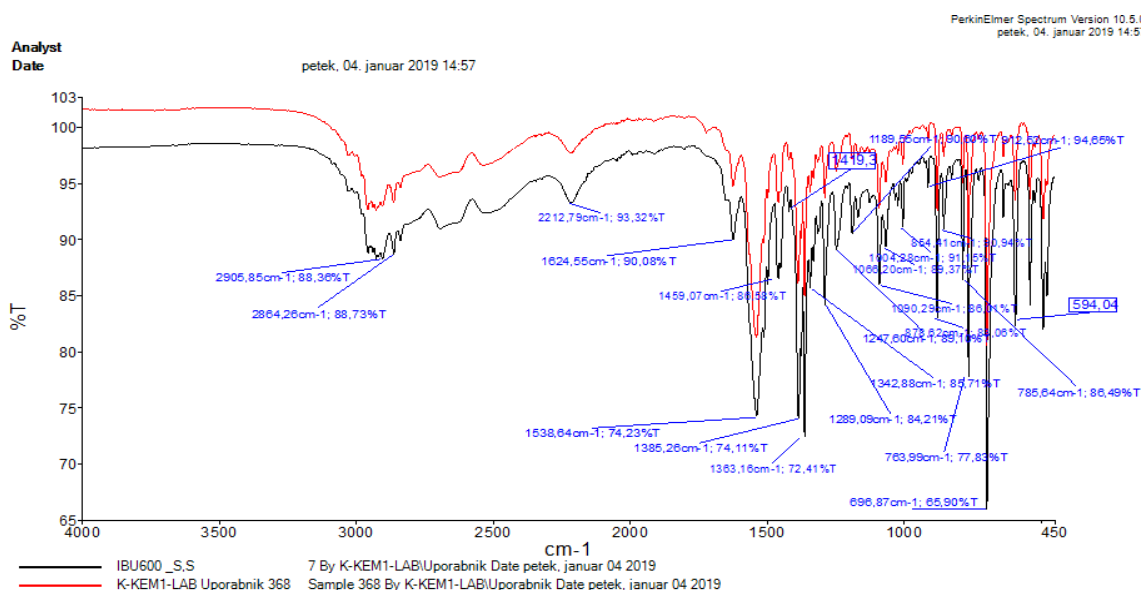
Tudi sami smo posneli spekter čiste racemne zmesi ibuprofena (slika 31) ter obeh vzorcev, ki imata dodane pomožne snovi. Primerjava pokaže, da se vsi karakteristični vrhovi ujemajo in so razlike manj kot $0,5\text{ cm}^{-1}$, kar je v območju eksperimentalne napake merilnega instrumenta. Na tej osnovi smo sklepali, da so interpretacije razlik v spektrih izoliranih produktov smiselne in veljavne.



SLIKA 31. ATR-FTIR spekter racemne zmesi čistega ibuprofena (lasten vir)

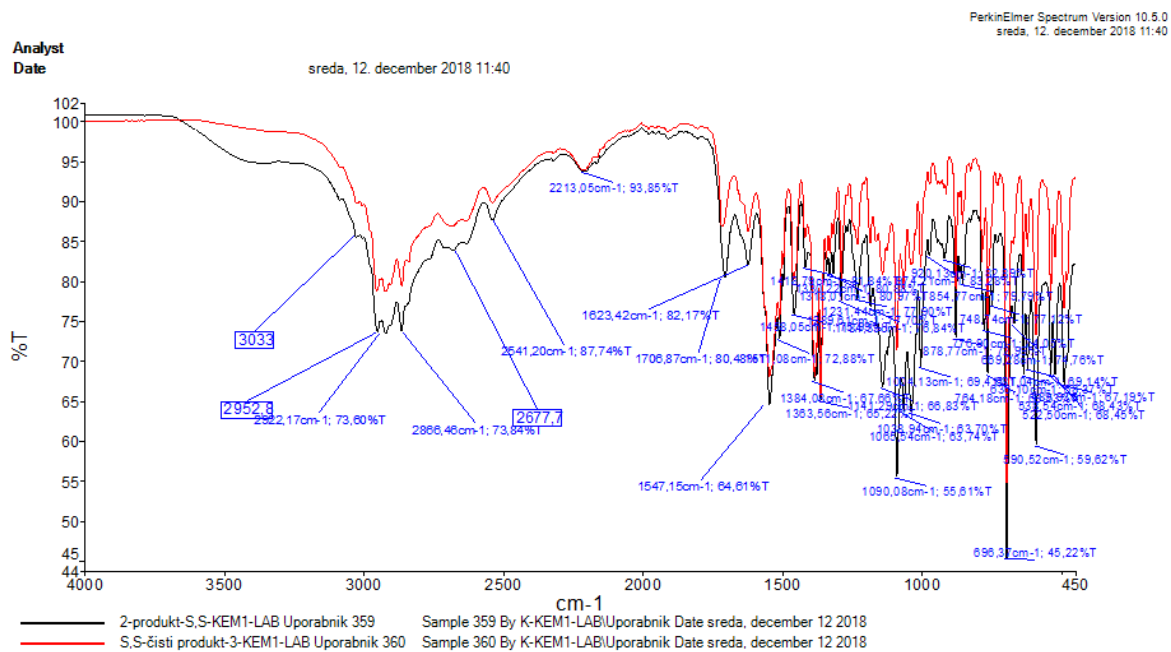
4.2.1 FTIR spektri diastereoizomerov (S,S)

Ob predpostavki, da pri reakciji racemne zmesi ibuprofena z (S)-etilfenilaminom nastane (S,S)-diastereoizomer, mora ta v IR spektru pokazati nove karakteristične vrhove za vez N-H ($3300\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$), vibracije N-H okoli 1500 cm^{-1} ; in C-N (alkil amin) ($1020\text{--}1220\text{ cm}^{-1}$) ter ojačen vrh za aromatski del ($1650\text{--}2000\text{ cm}^{-1}$)¹⁴. Ker vse primesi lahko zakrijejo signal (vrh) okoli 3200 cm^{-1} , smo se v analizi bolj osredotočili na značilne vrhove med $600\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$. Kot vidimo na slikah 32 in 33 so se naša predvidevanja uresničila, pri čemer je spekter S,S produkta IBU odstopal v predelu, $\approx 3300\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$; valovna števila so primerljiva, vendar intenziteta vrhov ni ista.



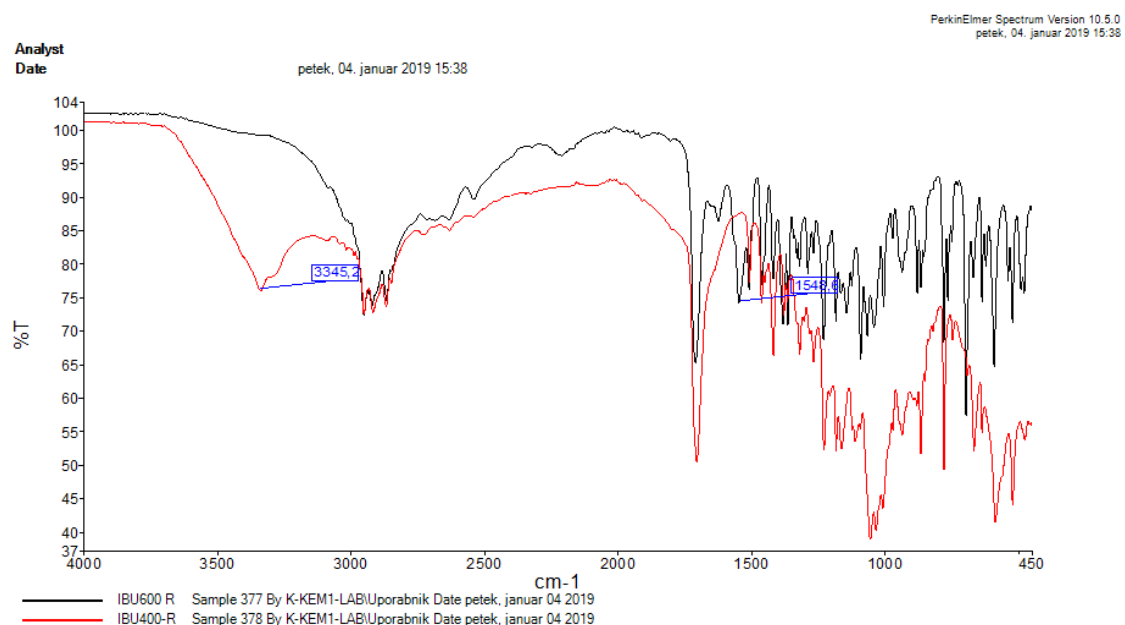
SLIKA 32. IR spektra IBU600_S,S (črna) in IBU400_S,S diastereoizomer (rdeča) (lasten vir)

¹⁴ Vir: <https://www.globalspec.com/reference/58109/203279/section-19-determination-of-functional-groups-in-organic-compounds> (citirano 26.12. 2018)

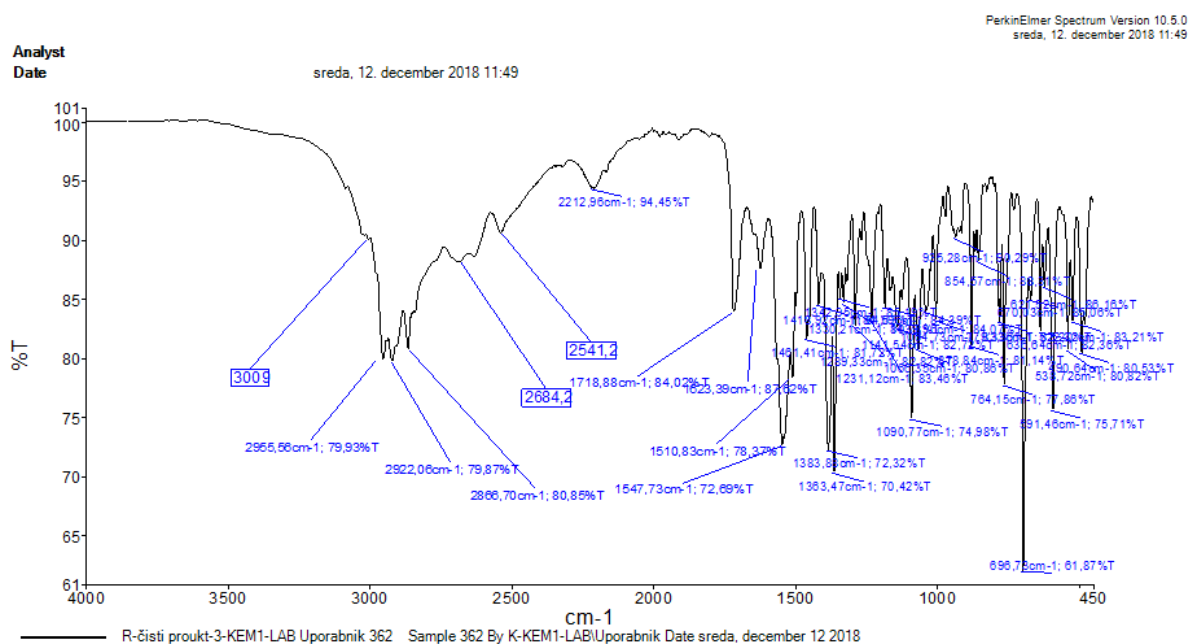


SLIKA 33. Primerjava FTIR spektrov IBU400_S,S (črna) in IBU_S,S (rdeča) (lasten vir)

4.2.2 FTIR spektri R-izomerov



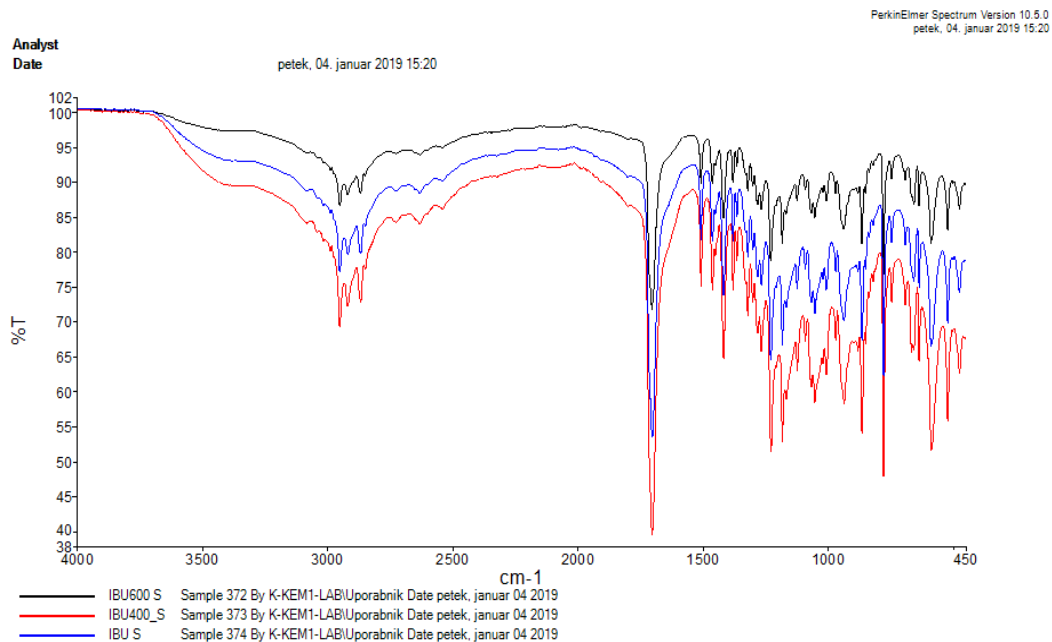
SLIKA 34. Primerjava IR spektrov IBU600_R in IBU400_R izomerov (lasten vir)



SLIKA 35. FTIR spekter IBU_R produkta (lasten vir)

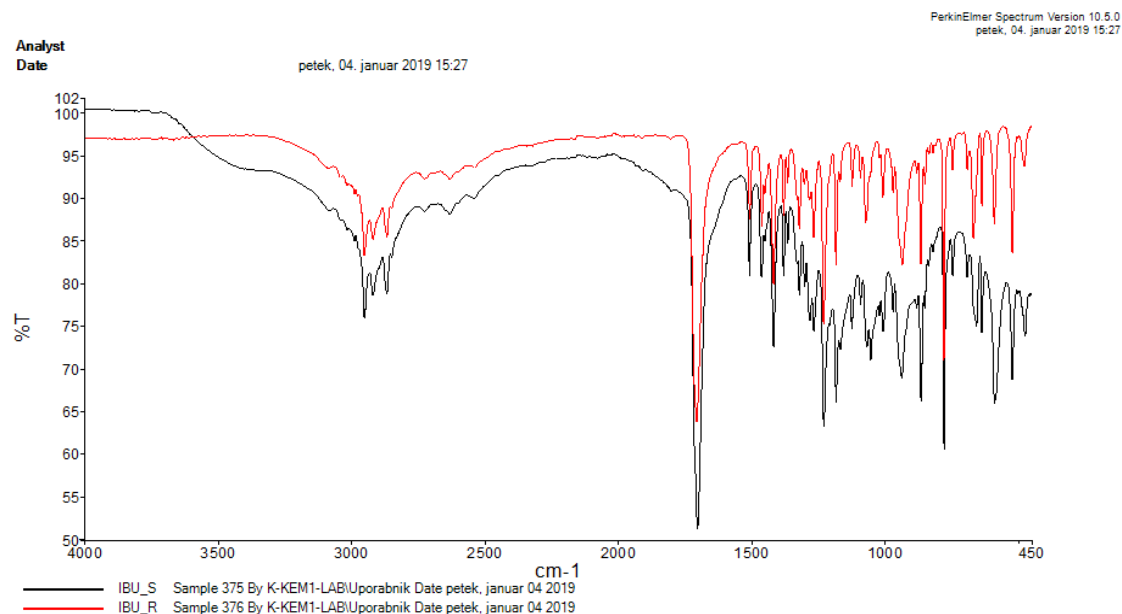
4.2.3 FTIR spektri S-izomerov

Med 1520 – 600 cm^{-1} smo zaradi vibracij $-CH_3$ skupine, vezane na kiralni center, pričakovali razlike. Vendar je bilo v spektrih razlik mnogo več (slika 31), iz česar smo sklepali, da produkti ločitve niso bili čisti. Primerjava izoliranih S-izomer kaže na produkte, ki so si precej bolj sorodni kot z R konformacijo. Tudi v področju »prstnega odtisa« molekule (pod 1200 cm^{-1}) opazimo na sliki 36 da so si vsi trije izolirani produkti zelo podobni. Ujemanje med njimi je bilo kar 96%.



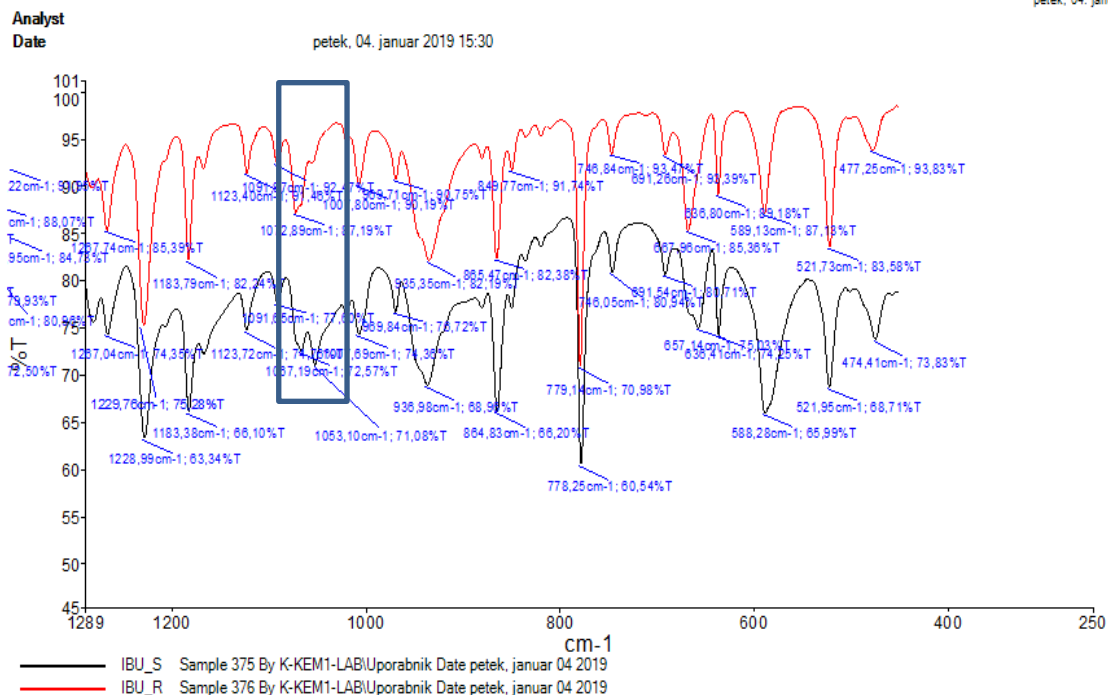
SLIKA 36. IR spektri vseh *S*-izomerov (lasten vir)

Na osnovi primerjave *R* in *S* izomerov izoliranih produktov smo pozornost usmerili na vrhove, kjer smo opazili signale le pri enem enantiomeru.



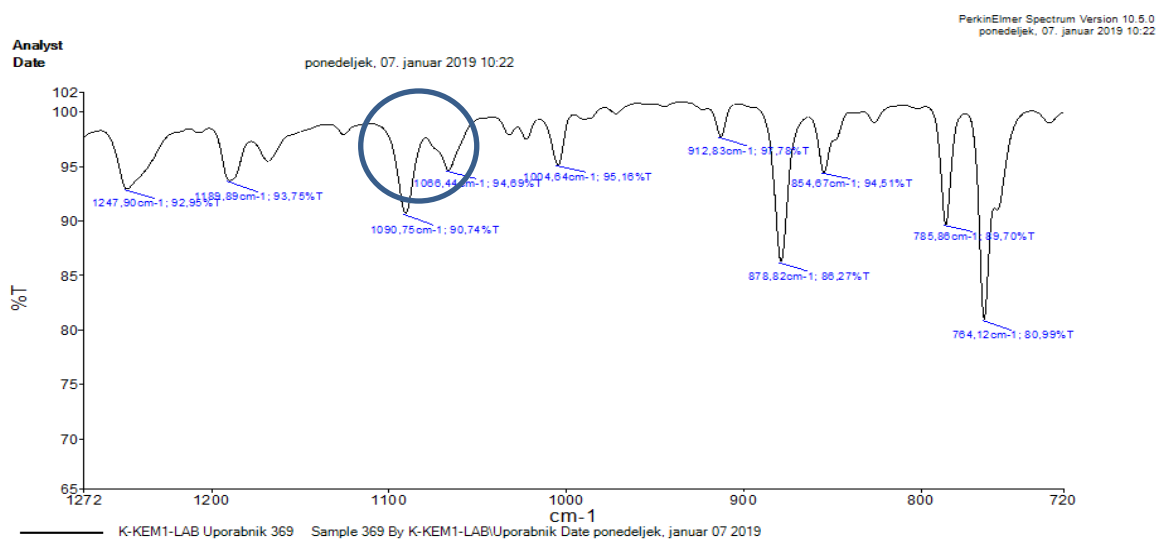
SLIKA 37. Primerjava IR spektra *S* in *R* enantiomera (IBU_S in IBU_R) (lasten vir)

Povečan (približen) spekter v območju med 1200 in 800 cm^{-1} je pokazal razlike pri vseh treh vzorcih (slika 38).



SLIKA 38. Primerjava IR spektra *S* in *R* enantiomera ibuprofena (IBU_S in IBU_R) (približan posnetek) (lasten vir)

Razlike opazimo pri treh valovnih številih: **1072 cm^{-1}** (pojavi se le pri *R*-izomeru) in **1053 cm^{-1}** , ki se pojavi le pri *S*-izomeru. Zamenjava z *S,S*-diastereoizomerom ni mogoča, ker natančen pregled IR spektra pokaže, da ta dva vrhova manjkata (slika 39)!



SLIKA 39. IR spekter za IBU_S,S (lasten vir)

Na tej osnovi zaključujemo, da bi lahko tudi s pomočjo IR spektrov produktov ločili med obema izomeroma. Vibracija C-C vezi pri valovnem številu 1072 cm^{-1} je značilna za **R-izomer** in pri 1053 cm^{-1} za **S-izomer**. Prikaz primerjave IR spektra IBU600 začetne racemne zmesi, IBU600_S,S, IBU600_R in IBU600_S podajamo v Prilogi 1 (slika 41).

4.3 Optična čistost izoliranih produktov

Najprej smo optično čistost izoliranih produktov poskušali določati s pomočjo raztopin, ki smo jih pripravili za določitev koncentracije ibuprofena v produktih (UV spektroskopija). Izkazalo se je, da so koncentracije prenizke in zato napake pri delu s šolskim polarimetrom previsoke. Zato smo za vse produkte, kjer se je izkazalo, da so produkti čisti (vzorcu IBU_S, IBU_R in IBU600_R ter IBU600_S), pripravili $0,10\text{ g/mL}$ raztopine¹⁵. Pri IBU400 smo preko UV spektroskopskih meritev (preglednica 20) ugotovili, da so izolirani produkti zelo nečisti, zato jih v ta del raziskave nismo vključili. Težava Vernierjev polarimetra je tudi ta, da ne moremo direktno odčitati kota zasuka ravnine polarizirane svetlobe, ampak ga moramo preračunati iz podatkov, ki jih dobimo. Dodatna težava je bila zelo majhna masa vzorca IBU600_R, ki je še ostala, zato smo uporabili identično raztopino kot pri meritvah koncentracije ibuprofena z UV spektroskopijo. To je razlog, da ta meritev odstopa od drugih. Vse meritve so bile opravljene pri temperaturi $T \approx 23^\circ\text{C}$.

PREGLEDNICA 16. Optična čistost produktov IBU in IBU600

	koncentracija (IBU_R), g/mL	višina (dm)	B vrednost za vzorec (Gaussova enačba)	izmerjen kot zasuka α ($^\circ$) (=B vrednost za vzorec - B vrednost za etanol)	B vrednost za etanol (Gaussova enačba)
IBU_R	0,10	1,00	52,70	- 60,50	113,20
IBU_S	0,10	1,00	130,53	+ 54,30	76,23
	koncentracija (IBU_R), g/mL	višina (dm)	B vrednost za vzorec (Gaussova enačba)	izmerjen kot zasuka α ($^\circ$)	B vrednost za etanol
IBU600_R	0,20	0,15	75,66	- 1,74	77,39
IBU600_S	0,10	1,00	101,07	+51,20	39,63

¹⁵ Optimalno bi bilo, če bi lahko pripravili koncentracije, ki so vsaj $0,20\text{ g/mL}$, vendar nismo imeli na voljo dovolj velike mase produktov (opomba avtorja).

PREGLEDNICA 17. Izračunan specifični kot zasuka ravnine linearno polarizirane svetlobe za izolirane produkte

vzorec	specifični kot zasuka, $[\alpha]$
IBU_R	-60,5
IBU_S	+54,3
IBU600_R	-58,0
IBU600_S	+51,2

Literatura (Sigma Aldrich, 2018) navaja, da je specifični kot zasuka za (S)-(+)-ibuprofen $[\alpha]_{26} = +54.46^\circ$ in (R)-(-)-ibuprofen $[\alpha]_{26} = -54.46^\circ$. Obe meritvi sta bili izvajani pri 26°C in koncentraciji z $0,6 \text{ g/mL}$; topilo metanol^{16,17}, kar pomeni, da so odstopanja od teh vrednosti za pogoje v katerih smo izvajali meritve mi, pričakovane. Za izračun optične čistosti izoliranih produktov smo uporabili enačbo:

$$\% \text{ optična čistost} = \alpha / ([\alpha]) \times 100$$

PREGLEDNICA 18. Optična čistost izoliranih enantiomerov ibuprofena

	IBU600_R	IBU600_S	IBU400_R	IBU400_S	IBU_R	IBU_S
% optična čistost produktov	93,5 %	94,0%	ni podatka	ni podatka	89,0%	99,7%

4.4 Določitev koncentracije ibuprofena v ločenih enantiomerih

Koncentracijo ibuprofena v ločenih enantiomerih smo določili na podlagi podatkov absorbance in enačbe umeritvene premice (preglednici 19).

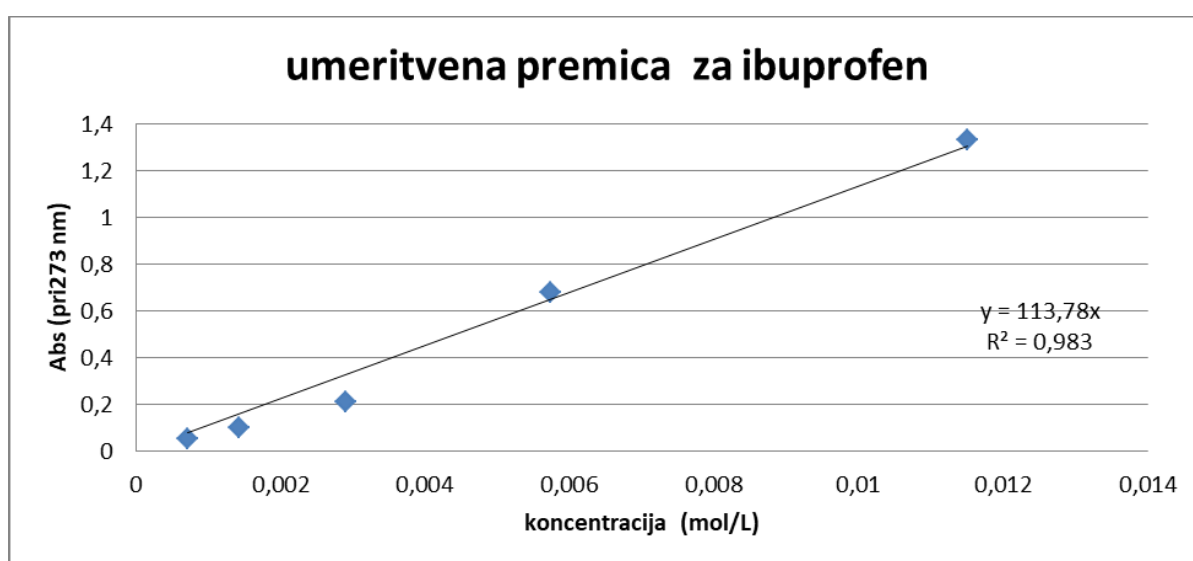
¹⁶ Pri 20°C in topili etanolu je optična aktivnost nekoliko višja: 59° . (koncentracija 2 g/mL) – opomba avtorja (vir: Sigma Aldrich podatkovna baza, 2018)

¹⁷ Omeniti je potrebno, da viri pri istih temperaturah in koncentracijah navajajo različne podatke. Absolutna vrednost kota zasuka ravnine linearno polarizirane svetlobe se pri 26°C giblje med $52 - 55^\circ$.

PREGLEDNICA 19. Podatki za umeritveno premico

c (mol/L)	A (273 nm)
0,0229	2,021
0,0115	1,333
0,0057	0,681
0,0029	0,213
0,0014	0,101
0,0007	0,052

Sledil je izris umeritvene premice. Enačba premice: **Absorbanca = 113,78 x koncentracija**



GRAF 2. Umeritvena premica za ibuprofen

Da bi lahko izmerile absorbance izoliranim vzorcem ibuprofena, smo zatehtali mase produktov, kot je prikazano v Preglednici 20. Vse vzorce smo raztopili v etanolu (merilna bučka 25,00 mL).

PREGLEDNICA 20. Mase produktov za določitev koncentracije čistega ibuprofena

vzorec	masa, g ($\pm 0,0001$)
BU_R	0,0026
IBU_S	0,0022
IBU400_R	0,0038
IBU400_S	0,0343
IBU600_R	0,0049
IBU600_S	0,0025

Sledila je meritev absorbance pri 273 nm. S pomočjo enačbe premice, smo absorbance preračunali v ustrezne koncentracije ter s pomočjo prostornine raztopin in molske mase ibuprofena (206,3 g/mol) izračunali maso čistega ibuprofena v vzorcu. Rezultati so zbrani v preglednici 21.

PREGLEDNICA 21. Masa čistih enantiomerov iz treh racemnih zmesi ibuprofena

Vzorec	Abs (pri 273 nm)	koncentracija (mol/L)	<i>n</i> (ibuprofena), mol	<i>m</i> (IBU), g	<i>m</i> (vzorca), g	<i>m</i> (nečistoč), g
IBU_R	0,063	0,000554	0,0000138	0,0028	0,0026	0,0002
IBU_S	0,051	0,000430	0,0000106	0,0022	0,0022	0,0000
IBU400_R	0,174	0,001530	0,0000382	0,0078	0,0038	0,0040*
IBU400_S	0,714	0,006270	0,0001570	0,0324	0,0243	0,0081*
IBU600_R	0,110	0,000970	0,0000242	0,0050	0,0049	0,0001
IBU600_S	0,058	0,000051	0,0000013	0,0026	0,0025	0,0001

* rezultati s prevelikim deležem nečistoč

Kot vidimo iz Preglednice 21, smo dobili, razen v primeru Ibuprofena IBU400_S in IBU400_R, mase, ki so minimalno odstopale od začetnih mas vzorca, ki smo ga raztopili za pripravo raztopine. Razlike so v mejah eksperimentalnih napak (3,15%), zato smo pričakovali, da bo optična čistost produktov prav tako visoka. Pri IBU400 smo napake pričakovali, saj so imeli enantiomeri tudi po ločitvi rožnato barvo, kar je pomenilo, da barvila nismo uspeli odstraniti.

5 RAZPRAVA

Izkoristke ločbe obeh enantiomerov pri vzorcu IBU600 ocenjujemo kot zadovoljive, saj se gibljejo okoli 50%. Pri vzorcu IBU400 smo imeli več težav, saj se ločeni izomeri nikakor niso »hoteli« posušiti. Primesi, ki so pri tem vzorcu predstavljale kar 45,5% celotne mase, s predstavljenim postopkom ločbe nismo uspeli odstraniti, kar se je videlo tudi iz barve produktov, ki so bili kljub prekristalizaciji še vedno rahlo rožnato obarvani in pastozne teksture. Postopek sušenja smo podaljšali na 7 dni in dobili najnižji izmerjeni izkoristek za *S,S*-diastereoizomer (17,3%), vendar presenetljivo visok izkoristek za kasneje izoliran *S*-enantiomer (82,4%). Ker je bil tudi IR spekter IBU400_*S* enantiomera zelo primerljiv s preostalima dvema, sklepamo, da smo uspeli izolirati precej čist izomer, vendar žal v zelo majhni masi, zato optične čistoče tega enantiomera nismo (mogli) izmerili. Enako velja za *R*-enantiomer IBU400.

Pričakovano smo najvišje izkoristke dobili pri vzorcu IBU, ki ni vseboval nobenih primesi (nečistoč) (Merck, p.a.). Izkoristki so bili visoki tako za *S,S*-diastereoizomer (86,9%), kot za ločena enantiomera; IBU_*S* (67,8%) in IBU_*R* (66,9%). Pri delu smo uporabljali najbolj natančno laboratorijsko opremo, ki jo imamo na šoli: KERN analitsko tehtnico z natančnostjo $\pm 0,0001$ g in merilne pipete z natančnostjo $\pm 0,03$ mL oz. $0,05$ mL. Zato je bila eksperimentalna napaka ocenjena na 3,15%, kar pomeni, da so nižji izkoristki izolacij bili posledica drugih dejavnikov. Problem te metode so opisali že Tung s sod. (1995) in Norbert s sod. (2001), in to je, da je izjemno težko napovedati prave kombinacije reagentov. V raziskovalni nalogi smo pri ločevanju dodali reagente v prebitku. Za vzorca IBU600 in IBU se je to izkazalo kot dobra strategija, za vzorec IBU400 pa ne. Pri 400 mg filmsko obloženi tableti, ki je vsebovala največ primesi, med drugim tudi azo barvilo azorubin - karmoizin (E122), ki je vodotopen in ima tudi zelo visoko molsko maso (502,44 g/mol), bi bilo potrebno predhodno odstraniti vse nečistoče na drugačen način.

FTIR spektri *S,S* produktov vseh treh vzorcev so bili zelo primerljivi (slika 32 in 33), kar pa ne moremo trditi za IR spektre *R*-enantiomerov. Odstopanja za IBU600_*R* in IBU400_*R* so bila velika (slika 34) in primerjava z IBU_*R* je nakazovala, da imamo v IBU400_*R* še vedno precej nečistoč.

S-enantiomeri vseh treh vzorcev so bili veliko bolj enotni (slika 36). Da bi ugotovili ali je med *R* in *S* enantiomerom razlika v IR spektru smo natančno pregledali del spektra med 1520 – 600 cm^{-1} , kjer so prisotne posamezne vibracije C-C vezi ter vibracije vezi, kjer je na ogljik z enojno vezjo vezana $-CH_3$ skupina (kiralni center molekule). Izkazalo se je, da se samo pri *R*-enantiomerih pojavi vrh pri 1072 cm^{-1} . Medtem, ko vrha, ki je značilen le za *S*-enantiomer pri 1053 cm^{-1} pri *R*-enantiomeru ni.

Ponovni natančen pregled IR spektrov S;S-diastereoizomerov je pokazal odsotnost obeh omenjenih vrhov, kar pomeni, da zamenjajva ni mogoča. Sklepali smo, da bi lahko tudi s pomočjo IR spektrov uspešno ločili med obema izomeroma, kar je bilo novo spoznanje.

Zaradi težav z vzorcem IBU400 smo optično čistočo ter UV spektroskopijo izvajali le z IBU600 in IBU vzorcema. Meritve so pokazale, da so ti vzorci optično čisti med 89,0% (IBU_R) in 99,7% (IBU_S), kar ocenjujemo kot izjemno dober rezultat. Ker na meritve zelo vpliva koncentracija, količina vzorca ter temperatura, pri uporabi šolskem polarimetru pa še predhodno umerjanje polarimetra s topilom, te odlične rezultate navajamo z zadržkom. Literatura za enantiomere ibuprofena navaja vrednosti od 52° do 59°. Če podatke optične čistosti primerjamo s podatki UV spektroskopije, s pomočjo katere smo želeli ugotoviti koliko imamo dejansko ibuprofena v vzorcu (kontrola polarimetrije), lahko z večjo verjetnostjo zaključimo, da je izolacija obeh enantiomerov dejansko uspela v enantiomerno čistih oblikah. Zato je osnovni problem, kako povečati izkoristke izolacij.

R-enantiomer je ostal v matični raztopini skupaj z vsemi ostali primesmi, ki jih najdemo v tabletah in seveda reagenti, ki smo jih dodali (NaOH in 1-feniletilamin). Ena od možnosti za prečiščenje R-enantiomera je ta, da bi R-ibuprofen ekstrahirali z uporabili nizko polarnega topila (etri z višjo molsko maso, kloroforma, itd.). Zmes bi centrifugirali in v supernatantu pridobili ibuprofen, nečistoče pa bi ostale v vodni fazi ali bi se usedle na dno centrifugirke. Organsko fazo bi lahko dodatno očistili še z uporabo dehidracijskih sredstev, kot so brezvodni kalcijev klorid ali brezvodni magnezijev sulfat (VI). Temu bi sledila odstranitev topila, najboljše z uporabo rotavaporja. Izkoristke vseh produktov bi lahko povečali tudi, če bi produkte po vakuumski filtraciji pustili dlje časa sušiti v eksikatorju ali jih prepihovali z dušikom ter z večkratno rekristalizacijo, kot smo to storili v primeru S-enantiomera.

5. 1 Ocena stroškov čiščenja racemne zmesi

Pri oceni stroškov čiščenja racemne smo upoštevali naslednje predpostavke:

Cene kemikalij NaOH (aq), H₂SO₄ in 1-feniletilamina smo ocenili na podlagi dostopnih podatkov ponudnikov (tudi v tujini). Stroške električne energije in ceno destilirane vode smo ocenili pavšalno.

Stroški so ocenjeni za ločevanje IBU (brez primesi). K 0,6200 g IBU smo dodali 6,00 mL 0,25 M NaOH in 0,20 mL 1-feniletilamina ter 20 mL 2M H₂SO₄.

PREGLEDNICA 22. Ocena stroškov čiščenja racemne zmesi ibuprofena

strošek	cena (EUR)
6,00 mL 0,25 M NaOH	0,075
0,20 mL (S)(-)-1-feniletilamina	4,60
20 mL 2M H ₂ SO ₄	0,050
električna energija	0,001
destilirana voda	0,001
propan-2-ol	0,001
Skupaj (brez DDV)	4,73
DDV(22%)	0,95
Skupaj	5,68

Cena 0,6200 g ibuprofena¹⁸ je 39,712 EUR.

$$\% \text{ stroška ločevanja zmesi} = \frac{5,68}{39,712} \times 100 = 14,3 \%$$

Cena kemikalij¹⁹, elektrike in vode seveda ne predstavljajo vseh stroškov (oprema, delavci, prostor). Pri večji količinah se cena zniža, saj je dobavna cena kemikalij za večjo količino nižja. Vendar, če privzamemo, da je naša ocena povečanja stroškov proizvodne čistih enantiomer ibuprofena dobra, bi to na trgu zdravil pomenilo naslednje (preglednica 23):

PREGLEDNICA 23. Dvig cene zdravil, ki vsebujejo ibuprofen, če bi bil enantiomerno čist

artikel	poprečna trenutna cena (20 tablet v pretisnem omotu) (EUR)	samo S-izomer (EUR)
Ibuprofen 600 mg	12,32	14,08
Ibuprofen 400 mg	10,10	11,54

¹⁸ Upoštevali smo ceno, ki smo jo plačali za artikel (I4883- 1G) IBUPROFEN (Merck, p.a.) (opomb avtorja).

¹⁹ Cene so preračunane iz tujih valut dne 24.01.2019 na 1g iz podatkov, iz sledečih virov:

cena NaOH (izbrano 500g pakiranje):

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigald/221465?lang=en®ion=GB>

Cena (S)- (-)-feniletilamina (izbrana 10 mL steklenička):

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/807047?lang=en®ion=GB>

Cena žveplave kisline (izbrana količina 1L): <https://www.fishersci.co.uk/shop/products/sulfuric-acid-solution-2m-4n-pure-bench-reagent-3/10558620>

Cena butan-2-ola (izbrano 250 mL pakiranje pod številko produkta: 041871)

<https://www.chemicalbook.com/Price/2-Butanol.htm>

Cena filtrirnega papirja (ob uporabi 4 filtrirnih papirjev, kupiti pa se da le pakiranje 100 pod šifro izdelka:

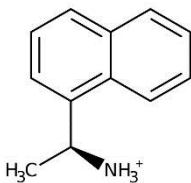
MN- 434005): <https://market.mikro-polo.si/vsi-izdelki/izdelek.aspx/i784269>

Cena ibuprofena Belupo 600 mg (kot izhodiščna snov): 4,61€ (Mariborske lekarne 25.01. 2019)

6 ZAKLJUČKI

Sinteza racemnih zmesi in nato ločba racemne zmesi na enantiomere je dejansko potraten proces, saj zahteva dve dodatni sintezni stopnji (uvedba in odstranitev kiralnega pomagala), izkoristek optično čistega produkta pa je običajno manjši kot 50%. Vendar je sinteza čistega enantiomera lahko še dražja, saj lahko vključuje tudi kiralna pomagala ali dodatne stopnje v procesu. V primeru ibuprofena *R*-enantiomer ne predstavlja odpadnega produkta saj obstaja možnost encimske izomerizacije (alfa-metilacil-CoA racemaza (Reichel s sod., 1997)), kar pomeni, da je tudi čiščenje racemne zmesi lahko ekonomsko upravičeno in ne zgolj zdravstveno. Ker desnosučni izomer ibuprofena (*S*-ibuprofen) izkazuje večjo aktivnost tako »*in vitro*« kot »*in vivo*« je smiselno, da bi uporabili le učinkovino z biološko aktivnejšim enantiomerom.

V nalogi smo za ločevanje racemata v enantiomerno čisti obliki uporabili (*S*)-(-)-1-feniletilamin. Pretvorba v diastereoizomere s pomočjo te molekule se je pokazala kot uspešna. Kot alternativno opcijo bi lahko namesto (*S*)-feniletilamina uporabil tudi (*S*)-(-)-1-(1-naftil)etilamin (slika 40), saj ima podobne lastnosti, razlikuje se le v dodatnem benzenovem obroču. Vendar je ta alternativna dražja kot 1-feniletilamin.



SLIKA 40: (*S*)-(-)-1-(NAFTIL)ETILAMIN²⁰

V raziskovalni nalogi smo preizkusili laboratorijsko metodo ločevanja enantiomerov, ki temelji na tvorbi diastereoizomera, ki v vodi ni dobro topen in ga lahko zato z metodo filtracije uspešno ločimo od drugega enantiomera. Po odstranitvi kiralnega pomagala, oba enantiomera na osnovi kislinsko baznih reakcij ponovno pretvorimo v vodo netopne oblike. Celoten postopek ločevanja je v šolskem laboratoriju trajal štiri ure (brez časa, ki je potreben za sušenje in analizo produktov). Časovno (ob upoštevanju, da je potrebno delati več ponovitev) ocenjujemo, da je postopek zahteven in primeren le za tiste dijake, ki

²⁰ Vir slike: <https://www.fishersci.se/shop/products/s-1-1-naphthyl-ethylamine-chipros-99-ee-99/p-7047478>

Cena (*S*)-(-)-1-(naftil)etilamin:

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/237450?lang=en®ion=GB>

jih kemija zanima, so vztrajni in pri delu natančni. Celoten postopek vključuje različne laboratorijske tehnike in je zato tudi zanimiv.

Pred izvedbo raziskave smo se vprašali kakšen je vpliv čistoče ibuprofena na izkoristek ločevanja racemne zmesi v enantiomerno obliko z uporabo diastereoizomerizacije. Postavili smo pet hipotez. Ob zaključki naloge lahko potrdim prvo hipotezo, ki pravi, da bo ibuprofen, kot kiralna karboksilna kislina s kiralnimi amini tvorila diastereoizomerno sol. Eksperimentalno smo potrdili, da je (S,S)-diastereoizomer v vodni slabo topen, zato se izloči kot bela oborina, ki lahko s filtracijo ločimo od *R*-izomera, ki ostane v matični raztopini kot vodotopna natrijeva sol.

Potrjena je bila tudi druga hipoteza, ki pravi, da bomo racemna zmes, ki jo predstavlja čisti ibuprofen, lažje ločili v posamezne enantiomere in s tem dobili boljše izkoristke ločevanja, kot komercialne tablete ibuprofena, ki vsebujejo primesi. Vendar so za šolsko uporabo slednje, zaradi nizke cene, veliko primernejši vzorci. Na trgu so dostopne tudi 800 mg tablete ibuprofena, ki bi dale še boljše rezultate, kot v našem primeru 600 mg tablete, kjer se je izkoristek ločevanja gibal med 45% (*R*-enantiomer) in 53,4% (*S*-enantiomer). Najboljše rezultate smo dobili pri uporabi čiste racemne zmesi ibuprofena, kjer so bili izkoristki cca. 67%. S tem smo potrdili tudi tretjo hipotezo, kjer so predvidevali, da bo ločba enantiomerov ibuprofena v komercialnih izdelkih uspešnejša pri 600 mg filmsko obložene tablete, v primerjavi s 400 mg, ker vsebuje manj primesi in barvil, najboljša pa pri uporabi čistega racemata.

Tudi četrta hipoteza je bila potrjena; *S*-izomer ibuprofena (ki deluje kot analgetik) je bil v predstavljenem postopku ločevanja praviloma optično čistejši, tudi zato, ker smo ga dvakrat prekristalizirali. Ob branju strokovne literature pa smo prišli tudi do spoznanja, da tudi *R*-enantiomer ibuprofena ni nekoristen odpadek sinteze »*in vitro*«, saj ga je mogoče encimsko izomerizirati v *S*-izomer in tako uporabiti kot aktivno učinkovino v številnih zdravilih, kjer se ibuprofen pojavlja. S tem je potrjena tudi peta hipoteza.

Predstavljen postopek ločbe racemne zmesi ima še veliko možnosti izboljšav. Za šolsko uporabo, kjer zaradi visokih cen čistega ibuprofena, pridejo kot vzorci v poštev le farmacevtski pripravki (tablete) ibuprofena, so izboljšave mogoče v predpripravi vzorcev. Najprej je potrebno odstraniti vse primesi (pomožne snovi v tabletah) in šele nato izvajati postopek ločevanja. Največjo težavo predstavljajo dodana barvila. Predlagamo uporabo nizko polarnih organskih topil npr. estrov ali etrov (ali halogeniranih organskih topil, ki pa so okoljsko manj sprejemljiva). Večina barvil, ki se uporabljajo v farmaciji je v vodi dobro topnih. Bolj skrbna izbira filter papirjev bi lahko izboljšala fazo filtriranja

(nučiranja). Za sušenje produktov digestorij ni najbolj optimalna rešitev. Eksikatorji primernih dimenzij so vsekakor bolj primerni.

Kljub vsemu menimo, da je ločitev enantiomerov dobro uspela. Tehnika ločevanja enantiomerov s pomočjo prekristalizacije, se je pokazala kot uporabna in cenovno sprejemljiva, saj h končni ceni enantiomernih produktov prispeva cca 14%. Pri tem je potrebno omeniti, da bi vsi pripravki, ki so zdaj pripravljene na osnovi racemni zmesi lahko v primeru enantiomerno čistih učinkovin vsebovali le $\frac{1}{2}$ trenutne mase, kar bi pomenilo tudi bistven prihranek pri ostalih surovinah. Z uporabo cenejših reagentov ocenjujem, da je tehnika ločevanja enantiomerov s pomočjo kristalizacije zelo uporabna tehnika tudi v industrijskem merilu.

7 DRUŽBENA ODGOVORNOST

Naš poskus je z vidika družbene odgovornosti predstavljal izziv predvsem zaradi odnosa do okolja. Po ločevanju enantiomerov je namreč potrebno vse snovi, ki jih več ne potrebujemo zavreči. S tem se poveča ekološki odtis človeka. S ciljem zmanjšanja ekološkega odtisa smo si kot eno izmed hipotez zastavili, da bomo pregledali literaturo in poskušali najti način, kako bi lahko neuporaben *R*-izomer lahko nadaljnje uporabili in ne zavrgli v okolje. Z raziskovanjem smo prišli do zaključka, da bi ga lahko uporabili na podoben način kot smo v našem poskusu uporabili *S*-feniletilamin, torej v kislinsko-bazni reakciji. Tako bi lahko s pomočjo *R*-izomera ibuprofena, ki v našem primeru predstavlja odpadek, ločili tudi enantiomere nekaterih drugih kiralnih molekul, ki se obnašajo kot Lewisove baze.

Z vidika vpliva naše raziskave na družbo pa menimo, da bi lahko naši raziskovalni rezultati oz. odkritje prispevali k hitrejši industrializaciji pretvorbe racemnih zmesi v enantiomere. Na ta način bi se zmanjšalo število primesi, ki jih je potrebno dodati k učinkovini v tableti, da lahko pravilno deluje. Z industrializirano proizvodnjo zdravil in z uporabo samo koristnih enantiomerov, bi se v lekarnah lahko prodajale manjše doze zdravil, ki bi jih uporabniki lahko, zaradi zmanjšanja negativnih učinkov, jemali tudi dalj časa.

V našem poskusu smo spoštovali osnovna načela družbene odgovornosti. Vhodne podatke in pridobljene rezultate smo zapisati čimbolj razumljivo in transparentno ter podali jasne zaključke izvedene raziskave.

8 UPORABLJENA LITERATURA

8.1 Članki

Adams, S.S., Bresloff, P., and Mason, G.C. (1976). Pharmacological Difference between the Optical Isomers of Ibuprofen: Evidence for Metabolic Inversion of the (-) Isomer, *J. Pharmac. Pharmacol.*, 28, 156-157.

Ahn, H.Y., Shiu, G.K., Trafton, W.F., and Doyle, T.D. (1994). Resolution of the Enantiomers of Ibuprofen: Comparison Study of Diastereomeric Method and Chiral Stationary Phase Method, *J. Chromat. B*, 653, 163-169.

Almansa, C., Gomez, LA., Cavalcanti, FL., de Arriba, AF., Rodriguez, R., Carceller, E., García-Rafanell, J., Forn J. (1996). Diphenylpropionic acids as new AT1 selective angiotensin II antagonists. *J Med Chem*; 39:21972206.

Antonov, E., Mineaeva, S., popov, V.K. (2013). Study of Ibuprofen Solubility in Supercritical Carbon Dioxide by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. *Russian Journal of Physical Chemistry B* 7(7).

Brayfield, A, ur. (2014). "Ibuprofen". *Martindale: The Complete Drug Reference*. London, UK: Pharmaceutical Press. Pridobljeno dne 26 June 2014.

Caner, H., Groner, E., Levy, L. (2004). Trends in the Development of Chiral Drugs. *Drug Discovery Today*, Vol. 3 No. 3.

Carvalho, P.O., Cass Q. B., Calafatti S. A., Contesini F. J., Bizaco R. (2006) Review – alternatives for the separation of drug enantiomers: ibuprofen as a model compound. Dostopno na: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-66322006000300003.

Castellani, L., Flieger, M., and Sinibaldi, M. (1994). Enantiomer Separation of Arylpropionic Acids on an Ergot Alkaloid-Based Stationary Phase Microbore Column Application, *J. Liq. Chromatogr.*, 17, 3695-3703.

Farkas, G., Irgens, L.I., Quintero, G., Beeson, M.D., Al-Saeed, A., and Vigh, G. (1993). Displacement, Chromatography on Cyclodextrin Silicas, *J. Chromatogr.*, 645, 67-74.

Haginaka, J., Murashima, T., and Seyama, C. (1993). Retention and Enantioselective Properties of Racemic Compounds on Ovomuroid Columns, *J. Chromatogr.*, 631, 183-190.

Haikala, V.E., Heimonen, I.K., and Vuorela, H.J. (1991). Determination of Ibuprofen in Ointments by Reversed-phase Liquid Chromatography. *J Pharm Sci.*, 80(5), 456-458.

Hutt, A.J. (2002). The development of single-isomer molecules: why and how. *CNS Spectrums*;7 supl 1:14–22.

- Kawai, Y., Hida, K., Dao, D.H., Ohno, A. (1998) Asymmetric synthesis of β -hydroxy esters having three consecutive chiral centers with a reductase from bakers' yeast. *Tetrahedron Lett*; 39:9219-22.
- Krantz, M.J., Martin, J., Stimmel, B., Mehta, D., Haigney, M.C. (2009). QTc interval screening in methadone treatment, *Ann. Intern. Med.*, vol. 150, 387-95.
- Kumar, M.S.A. (2007). Synthesis and evaluation of anti-inflammatory, analgesic, ulcerogenic and lipid peroxidation properties of ibuprofen derivatives. *Acta Pharm.* 57 (2007) 31–45.
- Maier, N.M., Franco, P., Lindner, W. (2001). Separation of Enantiomers: Needs, Challenges, Perspectives, *J. Chromatogr A*, 906 (1-2), 3-33.
- Matkovic, S.R., Valle, G.M., Briand, L.E. (2005). Quantitative analysis of ibuprofen in pharmaceuticals formulations through FTIR spectroscopy. *Latin American Applied research.* 35:189-195.
- McCance-Katz, E. F. (2011). (R)-methadone versus racemic methadone: what is best for patient care?. *Addiction* (Abingdon, England), 106(4), 687-8.
- Norbert, M.M., Franco, P., Lindner, W. (2001). Separation of Enantiomers: Needs, Challenges, Perspectives, *J. Chromatogr.*, 906, 03-33.
- Oi, N., Kitahara, H., Aoki, F., and Kisu, N. (1995). Direct Separation of Carboxylic Acid Enantiomers by High Performance Liquid Chromatography with Amide and Urea Derivatives Bonded to Silica Gel as Chiral Stationary Phase, *J. Chromat. A*, 689, 195-201.
- Padmanabhan, D. (2013). A review of drug isomerism and its significance". *Int J Appl Basic Med Res.* 3 (1): 16–18. doi:10.4103/2229-516X.112233.
- Prelog, V. (1964). Specification of the stereospecificity of some oxidoreductases by diamond lattice sections. *Pure Appl Chem*; 9:119-30.
- Reichel, C; Brugger, R; Bang, H; Geisslinger, G; Brune, K (April 1997). "Molecular cloning and expression of a 2-arylpropionyl-coenzyme A epimerase: a key enzyme in the inversion metabolism of ibuprofen.". *Molecular Pharmacology* 51 (4): 576–582. PMID 9106621.
- Rosche, B., Sandford, V., Leksawasdi, N., Chen, A., Satianegara, G., Gunawan, C., Breuer, M., Hauer, B., Rogers, P. (2003). Bioprocess development for ephedrine production [sažetak]. *Chem Listy*; 97:506.
- Smith S., Silas W. (2016). "Chiral Toxicology: It's the Same Thing... Only Different". *Toxicology Sciences.* pp. 4–30. doi:10.1093/toxsci/kfp09.

Stropnik, Č. Biokemija organski del. Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2005. Dostopno na: <https://www.fkkt.um.si/egradiva/fajli/Biokemija-Stropnik.pdf> (Citirano 26:10.2018)

Svete, J. Gradivo za pripravo predavanj iz Organske kemije (NTF-TT-UNI-1. Letnik). Univerza v Ljubljani, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2018. Dostopno na: <http://www.yukaii.com/data/ntf05/1letnik-tgt-zapiski/kem2/kemija-skripta.pdf> (citirano 17.12. 2018).

Teo, S.K, Colburn, W.A, Tracewell, W.G, Kook, K.A., Stirling, D.I., Jaworsky, M.S, Scheffler, M.A., Thomas S.D., Laskin, O.L. (2004). "Clinical pharmacokinetics of thalidomide". *Clinical Pharmacokinetics*. 43 (5): 311–27. [doi:10.2165/00003088-200443050-00004](https://doi.org/10.2165/00003088-200443050-00004). PMID 15080764.

Tung, H.H., Waterson, S., Reynolds, S., Paul, E. (1995). Resolution of Ibuprofen Via Stereospecific Crystallization, *AIChE Symposium Series*, 91, 64-68.

Vueba, M. L., Pina, M. E., Batista de Car- Valho, L. A. E. , (2008) IR identification of Ibuprofen. *J. Pharm. Sci.*, No. 97, 845.

8.2 Knjige

Bukovec, N., Dolenc, B., Šket, B. *Kemija za gimnazije 2. Učbenik*. 1. izd., 3. natis. Ljubljana: DZS, 2004. ISBN: 86-341-2803-2

Faber, K. (2004). *Biotransformations in organic chemistry: a textbook*. 5. izdaja. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

Smrdu, A. *Kemija in spremembe 3: učbenik za kemijo v 3. letniku gimnazije/Andrej Smrdu*. – 2. izd. Po učnem načrtu iz leta 2008. Ljubljana: Jutro, 2010. (Svet kemije) ISBN: 978-961-6433-94-5

Tucker, G.T. (2000). Chiral switches. *Lancet*; 355:10857.

8.3 Internetni viri

Advanced Chemistry Development, Inc., ACD/ChemSketch. Dostopno na: <https://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/> (citirano 7.12. 2018)

Belupo Slovenija, Ibuprofen Belupo (ibuprofen) 2011. Dostopno na: <http://www.belupo.si/Default.aspx?sid=14434&p=1&salt=0549> (citirano 3.12. 2018)

Codex General Standard for Food Additives (GSFA). GSFA Online Database. Dostopno na: <http://www.fao.org/gsfaonline/index.html> (citirano 17.12. 2018)

"FT-IR Spectroscopy—Attenuated Total Reflectance (ATR)" (PDF). Perkin Elmer Life and Analytical Sciences. 2005. Dostopno na: https://shop.perkinelmer.com/content/TechnicalInfo/TCH_FTIRATR.pdf (citirano 30.1. 2019)

Krka d.d. Novo Mesto, Metadon (10 mg/ml peroralna raztopina), podatki o zdravilu. Dostopno na: https://www.krka.biz/media/prk/exp_pdf/5213_metadon-oral_sol_smpc.pdf (citirano 17.12. 2018)

Madjar, B. (2016). Pri zdravljenju z varfarinom je potrebna zmernost. Pomurske lekarnе. Dostopno na: <http://www.pomurske-lekarnе.si/tocka-zdravja/pri-zdravljenju-z-varfarinom-je-potrebna-zmernost> (citirano 17.12. 2018)

Merck KGaA, Darmstadt, Germany. Dostopno na: <https://www.merckmillipore.com/INTL/en> (citirano 17.12. 2018)

Inštitut za slovenski jezik Frana Ramovša ZRC SAZU, Slovar slovenskega knjižnega jezika (SSKJ). Dostopno na: <http://bos.zrc-sazu.si/sskj.html> (citirano 18.12. 2018)

Svete, J. Moderne metode organske sinteze. Predstavitve za predavanja študentom magistrskega študija na UL FKKT. Dostopno na: http://stari.fkkt.uni-lj.si/attachments/dsk12658/moderne_metode_organske_sinteze_2017-2018.pdf (citirano 28.12. 2018)

Zmazek, B. (2012). Stereoizomerija. Dostopno na: <https://wordbz.gimptuj.si/?tag=stereoizomerija> (citirano 27.12. 2018)

Veriner: kemijski polarimeter. Navodila za uporabo. Dostopno na: <https://www.vernier.com/files/manuals/chem-pol.pdf>. (citirano: 30.12. 2018).

Sigma Aldrich podatkovna baza. Dostopno na: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/i106?lang=en®ion=SI> (citirano 26.12. 2018)

PRILOGE

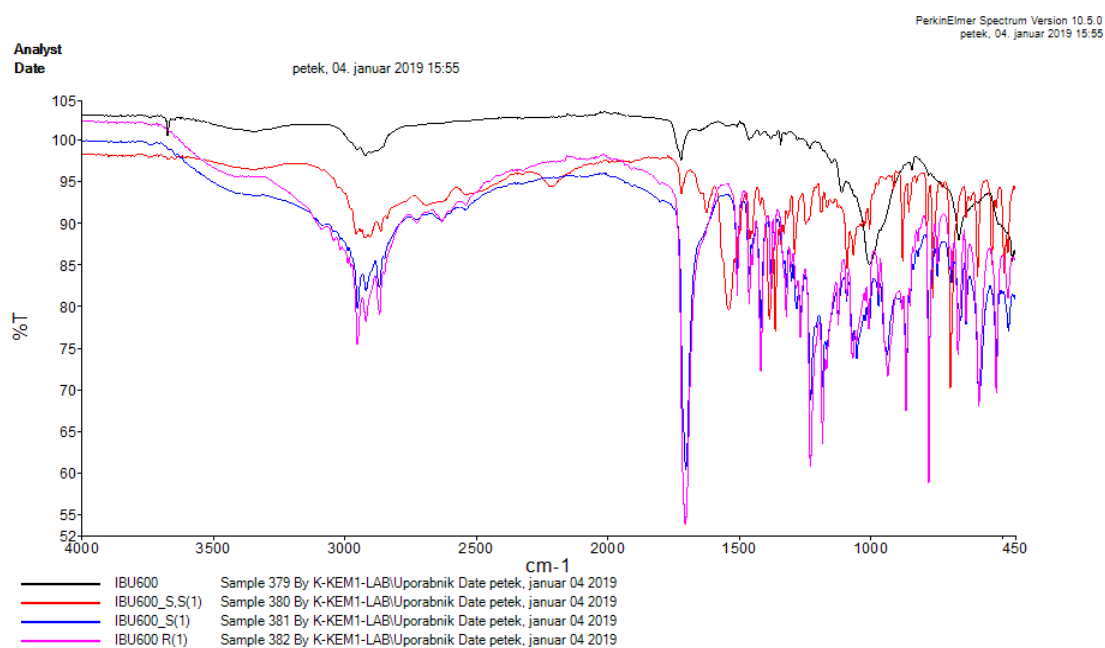
Priloga 1: FTIR spektri izoliranih produktov – vsi IR spektri IBU600

Priloga 2: Priprava raztopin

PRILOGA 1

FTIR spektri izoliranih produktov – vsi IR spektri IBU600

Na sliki 41 podajamo prikaz primerjave IR spektra IBU600 začetne racemne zmesi, IBU600_S,S, IBU600_R in IBU600_S.



SLIKA 41. Vsi IR spektri vzorca IBU600 (lasten vir)

PRILOGA 2

Priprava raztopin

0,25 M raztopino natrijevega hidroksida smo pripravili na način, da smo najprej 100 mL bučko do četrte napolnili z deionizirano vodo (prevodnost manj kot 5 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Nato smo z merilno pipeto (napaka pipete $25 \pm 0,3$ mL) odmerili 25 mL 1 M NaOH in do oznake dodali deionizirano vodo. Zadnje kapljice do oznake smo dodajali s kapalko.

Raztopino 2 M H_2SO_4 nam je pripravila laborantka, saj je koncentrirana H_2SO_4 nevarna snov za delo.