

## Praktikum z QSAR – zjištění závislosti účinnosti nebo toxicity lokálních anestetik na hydrofobním či sterickém strukturním parametru

Hledáme závislost

$A = f(\text{ parametr })$  ve tvaru  $A = a_1x + b$ , nebo  $A = a_1x^2 + a_2x + b$

kde  $A$  ... relativní infiltrační anestetická aktivita vztažená na prokain ( $A(\text{prokain}) = 1$ ); rel. povrchová anest. aktivita vztažená na kokain, anestetický index (*Carassius carassius* nebo *C. auratus*), akutní toxicita jako  $LD_{50}$

$x$  ... hydrofobní parametr ( $\log P$ ,  $\log D$ ,  $\log k'$ ) nebo sterický parametr ( $E_s$ )

$\log k'$  z rozdělovací HPLC: např.: stac. fáze: kolona s  $-(\text{CH}_2)_3\text{C}\equiv\text{N}$ ; mobil. fáze: methanol :  $0,01 \text{ mol/l}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1 : 1, průtok  $0,6 \text{ ml/min.}$ , nastříkujeme  $20 \mu\text{l}$  roztoku směsi anestetik o koncentraci jednotlivých látek kolem  $0,02 \text{ mg/ml}$ , obsahující látku pro stanovení mrtvého retenčního času  $t_0$  (např.  $\text{NaNO}_2$ ), detekce při  $230 \text{ nm}$

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

## Výpočet, výsledky, protokoly ...

- s hodnotami  $\log P$  nebo  $\log k'$  provedeme lineární regresi v programu MS Excel, nebo QCExpert či jiném statistickém programu (aktivita – závislá veličina,  $\log P$ ,  $\log k'$  - nezávislá)
- pokud rel. infiltr. aktivita nebude korelovat ( $r < 0,6$ ), zkusíme její logaritmus
- z vypočtených hodnot sestavíme rovnici, uvedeme i lineární korelační koeficient  $R$  a hodnotu Fisher-Snedecorova testu  $F$
- struktury studovaných anestetik, vstupní data v tabulce a výsledky do protokolu
- protokoly uploadujeme na Moodle
- struktury možno dohledat např. na ChemId: [chem.nlm.nih.gov](http://chem.nlm.nih.gov); do ChemSketchu nebo Marvinu je pak možno je přenášet ve formě SMILES kódů nebo souborů \*.mol

## Individuální zadání úloh

DLUGOŠOVÁ Zuzana: Korelace toxicity vyjádřené jako  $LD_{50}$  *i.p.* pro myš s experimentálně stanovenou hodnotou  $\log P(\text{oktanol/voda})$  pro soubor methyl-4-aminobenzoát, benzokain, propyl-4-aminobenzoát, butyl-4-aminobenzoát, *iso*-butyl-4-aminobenzoát, pentyl-4-aminobenzoát, bupivakain, cinchokain, lidokain, prokainamid, prokain, tetrakain a trapeknain. Pokud se korelace potvrdí ( $r \geq 0,6$ ), vypočtete předpokládanou  $LD_{50}$  *i.p.* prilokainu. *Pokud  $LD_{50}$  nebude korelovat, zkuste  $\log(1/LD_{50})$ .*

CHMÚRIKOVÁ Miriama: Korelace toxicity vyjádřené jako  $LD_{50}$  *i.v.* pro myš s experimentálně stanovenou hodnotou  $\log P(\text{oktanol/voda})$  pro soubor artikain, bupivakain, ropivakain, cinchokain, kokain, lidokain, trimekain, prilokain, prokainamid, prokain, tetrakain, trapeknain. Pokud se korelace potvrdí ( $r \geq 0,6$ ), vypočtete předpokládanou  $LD_{50}$  *i.v.* propyl-4-aminobenzoátu. *Pokud  $LD_{50}$  nebude korelovat, zkuste  $\log(1/LD_{50})$ .*

JOBUSOVÁ Lenka: Korelace **převrácené hodnoty relativní infiltrační anestetické aktivity** s experimentálně stanovenou hodnotou  $\log P(\text{oktanol/voda})$  pro soubor artikain, benzokain, butyl-4-aminobenzoát, pentyl-4-aminobenzoát, bupivakain, kokain, lidokain, trimekain, prilokain, prokain, tetrakain. Pokud se korelace potvrdí ( $r \geq 0,6$ ), vypočtete předpokládanou aktivitu mepivakainu.

KALLALA Kim: Korelace **logaritmu relativní povrchové anestetické aktivity** s experimentálně stanovenou hodnotou  $\log P(\text{oktanol/voda})$  pro soubor cinchokain, kokain, lidokain, trimekain, oxybuprokain, prokain, tetrakain, trapeknain. Pokud se korelace potvrdí ( $r \geq 0,6$ ), vypočtete předpokládanou aktivitu ropivakainu.

KAŇKOVSKÁ Marie: Korelace anestetického indexu *Carassius carassius* s experimentálně stanovenou hodnotou log P(oktanol/voda) pro soubor methyl-4-aminobenzoát, benzokain, propyl-4-aminobenzoát, 2-propyl-4-aminobenzoát, butyl-4-aminobenzoát, *iso*-butyl-4-aminobenzoát, pentyl-4-aminobenzoát. Pokud se korelace potvrdí ( $r \geq 0,6$ ), vypočtete předpokládanou aktivitu prokainu.

KAŠPÁRKOVÁ Zuzana: Korelace anestetického indexu *Carassius auratus* s experimentálně stanovenou hodnotou log P(oktanol/voda) pro soubor methyl-4-aminobenzoát, benzokain, propyl-4-aminobenzoát, butyl-4-aminobenzoát, pentyl-4-aminobenzoát, hexyl-4-aminobenzoát, heptyl-4-aminobenzoát. Pokud se korelace potvrdí ( $r \geq 0,6$ ), vypočtete předpokládanou aktivitu lidokainu.

KOŘÍNEK Radomír: RP-HPLC: Korelace **logaritmu relativní infiltrační aktivity** s log  $k'$  pro „koktejl“ lokálních anestetik K1 o složení benzokain(2), trimekain(4), artikain (3), tetrakain(6), cinchokain(7), karbizokain(8), trapekain(9),  $\text{NaNO}_2$  (1) Čísla v závorkách jsou čísla píků na chromatogramu. Pokud se korelace potvrdí ( $r \geq 0,6$ ), vypočtete předpokládanou aktivitu pentyl-4-aminobenzoátu(5).

KRÁLOVÁ Michaela: RP-HPLC: Zjistěte, zda existuje korelace **logaritmu převrácené hodnoty relativní infiltrační aktivity**, tj.  $\log(1/A)$ , s log  $k'$  pro „koktejl“ lokálních anestetik K2 o složení benzokain(2), artikain(3), lidokain(4), prokain(6), tetrakain(7), cinchokain(8),  $\text{NaNO}_2$ (1). Čísla v závorkách jsou čísla píků na chromatogramu. Pokud se korelace potvrdí ( $r \geq 0,6$ ), vypočtete předpokládanou aktivitu pentyl-4-aminobenzoátu(5).

LEDEROVÁ Kateřina: Korelace toxicity vyjádřené jako  $LD_{50}$  *i.p.* pro myš s hodnotou  $\log P$ (oktanol/voda) vypočítanou v programu ACD ChemSketch pro soubor methyl-4-aminobenzoát, benzokain, propyl-4-aminobenzoát, butyl-4-aminobenzoát, *iso*-butyl-4-aminobenzoát, pentyl-4-aminobenzoát, bupivakain, cinchokain, lidokain, prokainamid, prokain, tetrakain a trapeknain. Pokud se korelace potvrdí ( $r \geq 0,6$ ), vypočtete vypočtete předpokládanou  $LD_{50}$  *i.p.* prilokainu. *Pokud  $LD_{50}$  nebude korelovat, zkuste  $\log(1/LD_{50})$ .*

MIZEROVÁ Michaela: Korelace toxicity vyjádřené jako  $LD_{50}$  *i.v.* pro myš s hodnotou  $\log P$ (oktanol/voda) vypočítanou v programu ACD ChemSketch pro soubor artikain, bupivakain, ropivakain, cinchokain, kokain, lidokain, trimekain, prilokain, prokainamid, prokain, tetrakain, trapeknain. Pokud se korelace potvrdí ( $r \geq 0,6$ ), vypočtete předpokládanou  $LD_{50}$  *i.v.* propyl-4-aminobenzoátu. *Pokud  $LD_{50}$  nebude korelovat, zkuste  $\log(1/LD_{50})$ .*

MLADENOVÁ Veronika: Korelace **převrácené hodnoty relativní infiltrační anestetické aktivity** s hodnotou  $\log P$ (oktanol/voda) vypočítanou v programu ACD ChemSketch pro soubor artikain, benzokain, butyl-4-aminobenzoát, pentyl-4-aminobenzoát, bupivakain, kokain, lidokain, trimekain, prilokain, prokain, tetrakain. Pokud se korelace potvrdí ( $r \geq 0,6$ ), vypočtete předpokládanou aktivitu mepivakainu.

MRÁZKOVÁ Anita: Korelace **logaritmu relativní povrchové anestetické aktivity** s hodnotou  $\log P$ (oktanol/voda) vypočítanou v programu ACD ChemSketch pro soubor cinchokain, kokain, lidokain, trimekain, oxybuprokain, prokain, tetrakain, trapeknain. Pokud se korelace potvrdí ( $r \geq 0,6$ ), vypočtete předpokládanou aktivitu ropivakainu.

POULOVÁ Monika: Korelace anestetického indexu *Carassius carassius* hodnotou  $\log P$ (oktanol/voda) vypočítanou v programu ACD ChemSketch pro soubor methyl-4-aminobenzoát, benzokain, propyl-4-aminobenzoát, 2-propyl-4-aminobenzoát, butyl-4-aminobenzoát, *iso*-butyl-4-aminobenzoát, pentyl-4-aminobenzoát. Pokud se korelace potvrdí ( $r \geq 0,6$ ), vypočtete předpokládanou aktivitu prokainu.

PŘIBYLOVÁ Monika: Korelace anestetického indexu *Carassius auratus* s hodnotou log P(oktanol/voda) vypočítanou v programu ACD ChemSketch pro soubor methyl-4-aminobenzoát, benzokain, propyl-4-aminobenzoát, butyl-4-aminobenzoát, pentyl-4-aminobenzoát, hexyl-4-aminobenzoát, heptyl-4-aminobenzoát. Pokud se korelace potvrdí ( $r \geq 0,6$ ), vypočtete předpokládanou aktivitu lidokainu.

SANTORIS Adrián: Korelace **logaritmu relativní infiltrační aktivity** s hodnotou log P (oktanol/voda) vypočítanou v programu ACD ChemSketch pro „koktejl“ lokálních anestetik o složení benzokain, trimekain, artikain, tetrakain, cinchokain, karbizokain a trapeknain. Pokud se korelace potvrdí ( $r \geq 0,6$ ), vypočtete předpokládanou aktivitu pentyl-4-aminobenzoátu.

SMIŠTÍK Ondřej: Zjistěte, zda existuje korelace **logaritmu převrácené hodnoty relativní infiltrační aktivity**, tj.  $\log(1/A)$ , s log D při pH = 7,4 vypočteným v Marvin Beans pro „koktejl“ lokálních anestetik o složení benzokain, artikain, lidokain, prokain, tetrakain a cinchokain. Pokud se korelace potvrdí ( $r \geq 0,6$ ), vypočtete předpokládanou aktivitu pentyl-4-aminobenzoátu.

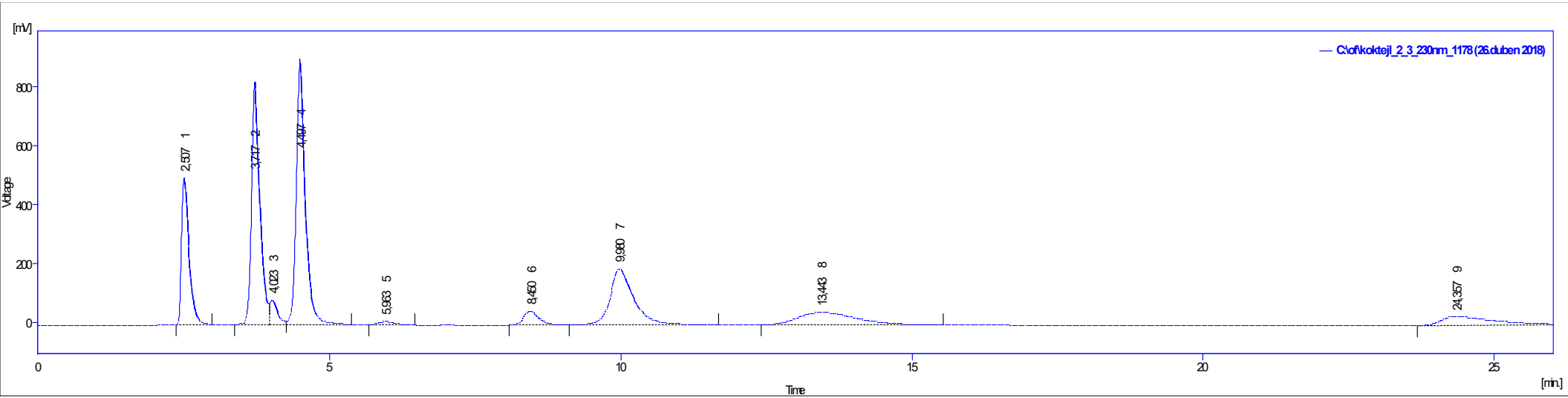
ŠINDLER Jaroslav: Korelace toxicity vyjádřené jako LD<sub>50</sub> *i.v.* pro myš s hodnotou log D při pH = 7,4 vypočteným v Marvin Beans pro soubor artikain, bupivakain, ropivakain, cinchokain, kokain, lidokain, trimekain, prilokain, prokainamid, prokain, tetrakain, trapeknain. Pokud se korelace potvrdí ( $r \geq 0,6$ ), vypočtete předpokládanou LD<sub>50</sub> *i.v.* propyl-4-aminobenzoátu. (Při výpočtu log D použijte defaultní nastavení). *Pokud LD<sub>50</sub> nebude korelovat, zkuste  $\log(1/LD_{50})$ .*

TOBOLOVÁ Nikola: Korelace anestetického indexu *Carassius auratus* s hodnotou logP vypočtenou v Marvin Beans algoritmem VG (dle Viswanadhana, Ghose et al.) pro soubor methyl-4-aminobenzoát, benzokain, propyl-4-aminobenzoát, butyl-4-aminobenzoát, pentyl-4-aminobenzoát, hexyl-4-aminobenzoát, heptyl-4-aminobenzoát. Pokud se korelace potvrdí ( $r \geq 0,6$ ), vypočtete předpokládanou aktivitu lidokainu.

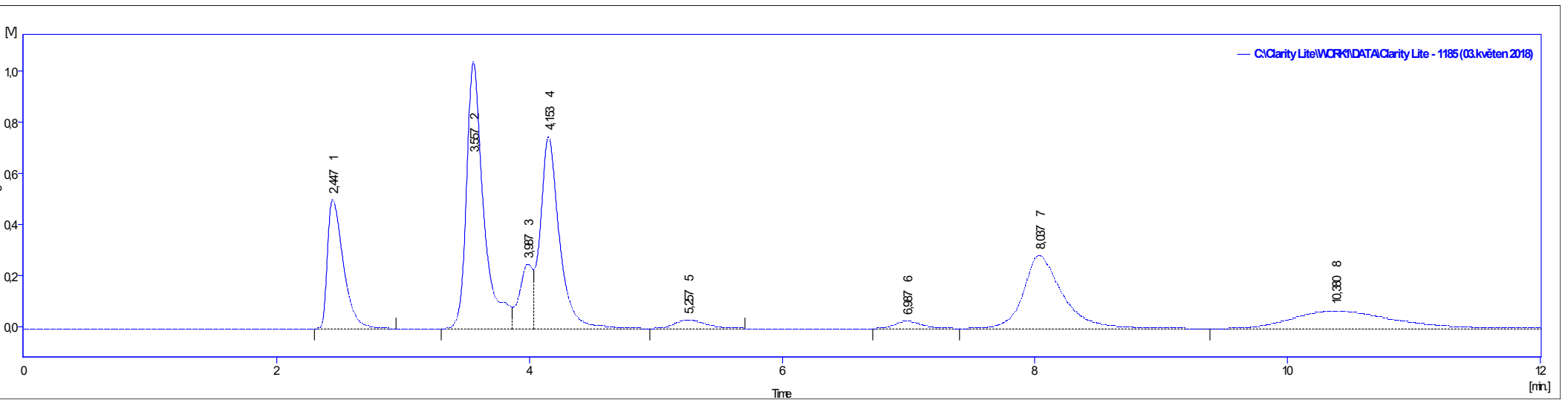
TRBUŠEK Filip: Korelace toxicity vyjádřené jako  $LD_{50}$  *i.p.* pro myš s  $\log D$  při  $pH = 5,5$  vypočteným v Marvin Beans pro soubor methyl-4-aminobenzoát, benzokain, propyl-4-aminobenzoát, butyl-4-aminobenzoát, iso-butyl-4-aminobenzoát, pentyl-4-aminobenzoát, bupivakain, cinchokain, lidokain, prokainamid, prokain, tetrakain a trapenkain. (Při výpočtu  $\log D$  použijte defaultní nastavení). Pokud se korelace potvrdí ( $r \geq 0,6$ ), vypočtete vypočtete předpokládanou  $LD_{50}$  *i.p.* prilokainu. Pokud  $LD_{50}$  nebude korelovat, zkuste  $\log(1/LD_{50})$ .

TVARŮŽKOVÁ Barbora: Korelace anestetického indexu *Carassius carassius* s hodnotami Taftovy sterické konstanty pro příslušné alkyly pro sadu esterů 4-aminobenzoové kyseliny obsahující methyl-4-aminobenzoát, benzokain, propyl-4-aminobenzoát, 2-propyl-4-aminobenzoát, butyl-4-aminobenzoát, *iso*-butyl-4-aminobenzoát, pentyl-4-aminobenzoát. Pokud se korelace potvrdí ( $r \geq 0,6$ ), vypočtete předpokládanou aktivitu cyklohexyl-4-aminobenzoátu.

## Chromatogram pro Radomíra Kořínka



## Chromatogram pro Michaelu Královou





# Výpočty v ChemSketchi

- log P: nakreslit strukturu, vlevo na horní liště zvolit Log P
- další parametry: nakreslit strukturu, zvolit na horní liště Tools – Calculate – (příslušný parametr)

ChemSketch je freeware. Je ke stažení na [www.acdlabs.com](http://www.acdlabs.com) .

## Výpočty v Marvinu

- nakreslit strukturu
  - 2D optimalizace (Structure-Clean 2D)
  - Calculations
  - Partitioning-logP-VG/KLOP-OK-OK(-logD-OK-OK)
  - Charge-Polarizability
  - Geometry-Geometrical Descriptors-OK-OK
  - Other-Refractivity-OK-OK
- Marvin Beans je (převážně) freeware, je ke stažení na [www.chemaxon.com](http://www.chemaxon.com).  
Nenechte se případně odradit vyskakovacím oknem tvrdícím, že nemáte licenci. Po odkliknutí OK Vám program hodnotu vypočítá v evaluačním módu.

## Postup při výpočtu lineární regrese v Excelu

- data aktivit a strukturního parametru vedle sebe do dvou sloupců tabulky
- vybrat obdélník 2 x 4 buňky jinde, než jsou vstupní data
- zvolit funkci LINREGRESE (lineární regrese)
- vybrat sloupec strukturního parametru jako data x
- sloupec aktivit jako data y
- zadat B = pravda, Stat = pravda
- “provést výpočet”(OK)
- v levé horní rohové buňce vybraného obdélníku se objeví hodnota a; stisk F2 a následně CTRL+ SHIFT + ENTER
- objeví se požadovaná data:  $y = ax + b$ ;  $r^2$  ... druhá mocnina lineárního korelačního koeficientu;  $s_y$  ... směrodatná odchylka odhadu, F ... hodnota Fischer-Snedecorova testu

<b>a</b>	<b>b</b>
$s_a$	$s_b$
$r^2$	$s_y$
<b>F</b>	$d_f$

Excel ale neumožňuje lineární regresi v kvadratickém tvaru, tedy proložení paraboly. K tomu účelu lze použít např. **QCExpert**

- 30 denní plně funkční trial verze ke stažení na stránkách [trilobyte.cz](http://trilobyte.cz),  
manuál rovněž

Protokol nahrajte do příslušné položky na Moodle v kurzu  
Molekulární základy vývoje léčiv do 5. 5. 2020