

# Syntese af penicillinvarianter

Formålet med forsøget er at fremstille forskellige varianter af penicillin og herefter teste dem på bakterier.

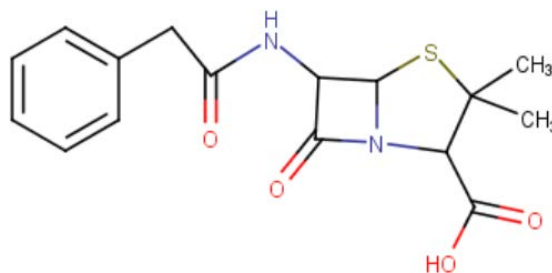
## Teori:

Den skotske bakteriolog Alexander Fleming opdagede i 1928, at en svamp udviklede et bakteriedræbende stof. Stoffet blev kaldt penicillin og i løbet af 2. verdenskrig lykkedes det forskere at få svampe til at producere store mængder af stoffet. Siden da er penicillin blevet det mest anvendte medikament mod bakteriesygdomme.

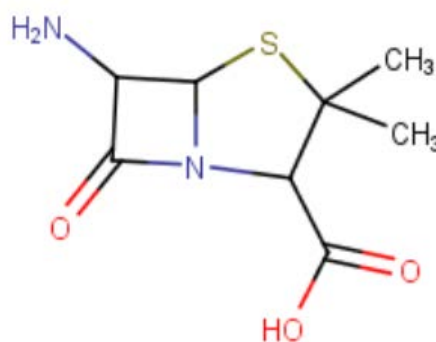
Penicillin er bakteriedræbende fordi stoffet forhindrer bakterier i at danne tværbroer i deres cellevægge, hvorved cellevægsstrukturen bliver så svag, at bakterien "går i stykker". Den først opdagede penicillin virkede kun mod gram-positive bakterier, idet gram-negative bakterier har en beskyttende cellemembran yderst. Derfor har man forsket meget i at finde varianter af penicillin, der kan trænge gennem cellemembranen, så de også kan dræbe gram-negative bakterier. Et andet problem ved penicillin er, at bakterier efterhånden udvikler resistens mod stoffet, hvorfor det også af denne grund er interessant at udvikle nye varianter.

Traditionelt har man forsøgt at finde nye penicillinformer ved at undersøge forskellige svampearter. I den senere tid er man imidlertid overgået til at udvikle semisyntetiske penicillinformer ved kemisk syntese. Man lader svampe producere penicillingrundstrukturen 6-aminopenicillinsyre og påsætter derefter kemiske grupper for at se effekten. De fleste former for penicillin er dannet ved at binde penicillinsyrens aminogruppe til et andet organisk stof ved en kondensationsreaktion ved en amidbinding. Forsøg har bl.a. vist, at ved at påsætte den rigtige gruppe, kan man "lokke" gram-negative bakterier til at optage stoffet. Man kan også hindre mange penicillinnedbrydende enzymer i at ødelægge medikamentet ved at ændre på sidekæden.

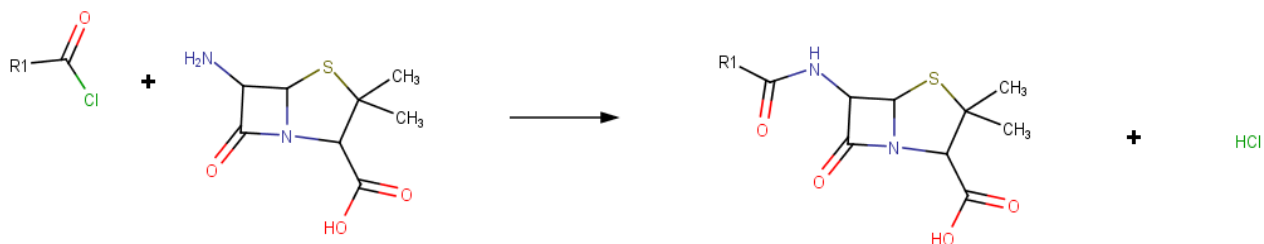
I denne øvelse skal vi prøve at syntetisere forskellige penicilliner og herefter afprøve dem på bakterier. Målet er at undersøge, hvilken variant der virker bedst overfor forskellige bakterier. Alle grupper tager udgangspunkt i 6-aminopenicillinsyre. Hver gruppe får udleveret et organisk stof (en syrechlorid), som de får til at reagere med aminogruppen på 6-aminopenicillinsyren hvorved grupperne får lavet forskellige penicillintyper. For alle grupper gennemføres samme syntese:



Figur 1. Benzylpenicillin. Flemings oprindelige penicillintype.



Figur 2. 6-aminopenicillinsyre



Gruppen R1 er forskellig fra gruppe til gruppe.

## Kemikalier:

6-aminopenicillinsyre

Syrechlorid:

- Hydrocinnamoylchlorid
- Phenylacetylchlorid

Butylacetat (butylethanoat)

## Advarsel:

Mange af stofferne er giftige og ildelugtende, så sørg for at arbejde i stinkskebe og iført handsker.

## Udførelse:

Time 1:

1. Afvej 1,0 g 6-aminopenicillinsyre og opløs det i 3 mL acetone i en 100 mL konisk kolbe på magnetomrører. Tilsæt (mens der røres) 20 mL 1 M NaHCO<sub>3</sub> og fortsæt omrøringen til alt er opløst (natriumhydrogencarbonat vil reagere med syregruppen i 6-aminopenicillinsyre og gøre stoffet mere vandopløseligt ved at det bliver elektrisk ladet. Natriumhydrogencarbonat vil også reagere med den ved reaktionen dannede saltsyre).
2. Afvej 0,01 mol af den valgte syrechlorid i et centrifugerør og tilsæt 1 mL acetone. Bland grundigt ved at omryste. Tilsæt mere acetone, hvis ikke alt syrechlorid er opløst.
3. Tilsæt langsomt og dråbevist syrechloridopløsningen til blandingen med 6-aminopenicillinsyre (det skal tage ca. 5 minutter at tilsætte det hele).
4. Lad blandingen stå under omrøring til næste time.

Time 2:

1. Overfør reaktionsblanding til en skilletragt.
2. Tilsæt 6 mL butylacetat og omryst 1. gang (dette fjerner ureageret syrechlorid).

3. Hæld vandfasen (med penicillinet) fra skilletragten til bægerglasset. Hæld den organiske fase fra skilletragten til et fælles glas med organisk affald.
4. Hæld vandfasen (med penicillinet) tilbage i skilletragten. Tilsæt igen 6 mL butylacetat til skilletragten. Sæt prop på og omryst 2. gang.
5. Hæld vandfasen (med penicillinet) fra skilletragten til bægerglasset. Hæld den organiske fase fra skilletragten til et fælles glas med organisk affald.
6. Hæld vandfasen (med penicillinet) tilbage i skilletragten. Tilsæt igen 6 mL butylacetat til skilletragten. Sæt prop på og omryst 3. gang.
7. Hæld vandfasen (med penicillinet) fra skilletragten til bægerglasset. Hæld den organiske fase fra skilletragten til et fælles glas med organisk affald.
8. Hæld vandfasen (med penicillinet) tilbage i skilletragten. Tilsæt igen 6 mL butylacetat til skilletragten.
9. Tilsæt ca. 2 mL 5 M svovlsyre til blandingen (pas på – der udvikles gas) ryst forsigtigt og tilsæt mere svovlsyre til der ikke længere dannes bobler og pH i vandfasen er 2-3 (udtag prøver med en spatel og test på pH-papir). Nu vil I opdage af penicillinet vil lægge sig i den organiske fase eller på grænsen mellem de 2 faser.
10. Tap vandfasen af skilletragten (til kemikalieaffald). Den organiske fase overføres til et 100 mL bægerglas (evt. ovenud af skilletragten, hvis bundfaldet er for tyktflydende. Skyl evt. det sidste ud med mere butylacetat).
11. Aflæs volumen af den organiske fase. Tilsæt en lige så stor mængde butan-1-ol, der er mættet med KOH.
12. Lad blandingen stå på magnetomrøreren til næste time.

### Time 3

1. Tag et tomt eppendorfrør og skriv jeres initialer på det.
2. Afvej eppendorfrøret.
3. Overfør det dannede produkt til røret og lad det stå åbent til næste time (så det kan tørre helt ud).

### Time 4

1. Vej det tørrede produkt og afprøv det på bakterier af typen *Serratia Marcescens* (en gram positiv bakterie).
2. Tag en petriskål med agar I og overfør 0,1 mL bakterieopløsning efter lærerens anvisning.
3. På bunden skriver I jeres navne samt et P i den ene side og et S i den anden side.
4. Smør bakterierne ud over hele pladen med en drigalskispatel.
5. Udklip et stykke filterpapir med en hulmaskine. Dyp papiret i vand med en pincet og derefter i jeres produkt. Sørg for at der kommer noget produkt på papiret. Læg papiret ovenpå agarpladen, hvor I har skrevet P.
6. Udklip et nyt stykke filterpapir og dyp det atter i vand med en pincet. Denne gang påfører I papiret sulfanilamid udleveret af læreren. Læg papiret på agarpladen, hvor I har skrevet S.
7. Læg låg på agarpladerne og sæt dem i vindueskarmen til næste time.

## For- og efterbehandling:

1. Opskriv reaktionsskemaet mellem natriumhydrogencarbonat og 6-aminopenicillinsyre.
2. Opskriv reaktionsskemaet mellem natriumhydrogencarbonat og saltsyre.
3. Opskriv reaktionsskemaet mellem jeres udleverede syrechlorid og 6-aminopenicillinsyre.
4. Beregn hvor mange mol 6-aminopenicillinsyre, I har afvejet.
5. Beregn det teoretiske udbytte.
6. Opskriv strukturformlen for butylacetat.
7. Opskriv reaktionen mellem svovlsyre og natriumhydrogencarbonat. Hvorfor bobler det?
8. Hvorfor bliver penicillin mere uopløselig i vand, når pH falder?
9. Opskriv reaktionsskemaet mellem jeres produkt og KOH.
10. Beregn jeres udbytteprocent.
11. Kommenter resultaterne på petriskålene.

## Ekstraopgaver:

1. Hvilke funktionelle grupper indeholder 6-aminopenicillinsyre?
2. Hvilke funktionelle grupper indeholder jeres fremstillede penicillin udover de allerede nævnte?
3. Kan penicillin affarve bromvand?
4. Herunder ses et NMR-spektrum for en syrechlorid. Giv et forslag til syrechloridmolekylets struktur.

