

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Lucie Stuchlíková

SYNTÉZA IZOTOPOVĚ ZNAČENÉHO KETAMINU

Synthesis of isotopically labeled ketamine

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Ladislav Lešetický, CSc.

Praha 2011

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857 a pro účely výzkumu v Psychiatrickém centru Praha, (Prof. MUDr. Jiří Horáček, CSc).

.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne

Poděkování

Na prvním místě bych ráda poděkovala svému školiteli panu Doc. RNDr. Ladislavu Lešetickému, CSc. za jeho trpělivost a ochotu se mnou pracovat. Neméně mé poděkování patří paní RNDr. Simoně Hybelbauerové, PhD. a panu RNDr. Martinu Štíchovi za naměření NMR a MS spekter. Dále panu Doc. RNDr. Petru Štěpničkovi, PhD. a panu Mgr. Jiřímu Tauchmanovi za pomoc při syntéze. A v neposlední řadě bych chtěla poděkovat mé rodině a příteli za jejich podporu a financování studií.

OBSAH

Abstrakt a klíčová slova	6
Abstract and key words	7
Cíl práce	8
Seznam zkratk	9
1 Teoretická část	11
1.1 Charakteristika ketaminu	11
1.2 Struktura ketaminu	11
1.3 Farmakologické vlastnosti	13
1.4 Vazebná místa na receptorech	14
1.5 Využití ketaminu v lékařské praxi	15
1.5.1 Ketamin jako anestetikum	15
1.5.2 Ketamin jako analgetikum	16
1.5.3 Ketamin jako antidepresivum	17
1.5.4 Jiné využití ketaminu v lékařské praxi	17
1.6 Zneužívání ketaminu	18
1.7 Syntéza ketaminu	18
1.8 Syntéza <i>N</i> -desmethylketaminu	21
2 Experimentální část	23
2.1 Použité chemikálie a rozpouštědla	23
2.2 Použité metody a přístroje	24
2.3 Syntéza <i>N</i> -desmethylketaminu	25
2.4 Příprava standardu ketaminu	26
2.5 Příprava methylačních činidel	26
2.5.1 Příprava [methyl- ² H]- <i>p</i> -toluensulfonátu	26
2.5.2 Příprava [methyl- ¹⁴ C]- <i>p</i> -toluensulfonátu	26

2.6 Příprava značeného ketaminu	27
2.6.1 Příprava [methyl- ² H]ketaminu	27
2.6.2 Příprava [methyl- ³ H]ketaminu	27
3 Výsledky a diskuse	29
4 Závěr	32
Literatura	33

ABSTRAKT

V této diplomové práci byl syntetizován izotopově značený ketamin. Používá se v humánní medicíně i ve veterinární sféře. Má velmi široké spektrum farmakologických účinků: anestetický, analgetický, halucinogenní, bronchodilatační, kardiovaskulární a antidepressivní, který je v současné době ve výzkumu. Nejdříve byl syntetizován prekurzor ketaminu, *N*-desmethylketamin, který byl následně označen deuteriem, tritiem a uhlíkem 14. Pro zjištění identity byly použity metody hmotnostní spektrometrie a nukleární magnetická rezonance.

KLÍČOVÁ SLOVA

syntéza ketaminu, ketamin, *N*-desmethylketamin, *nor*-ketamin, izotopově značený ketamin

ABSTRACT

In this work were synthesized ketamine isotopomers. Ketamine is used in human medicine and veterinary sectors. It has very broad spectrum of pharmacological effects: anesthetic, analgesic, hallucinogenic, bronchodilator, cardiovascular and antidepressive, which is currently in the research. At first was synthesized precursor of ketamine, *N*-desmethylketamine which was subsequently labeled the deuterium, tritium and carbon-14. For the determination of purity and identity mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy were used.

KEY WORDS

synthesis of ketamine, ketamine, *N*-desmethylketamine, *nor*-ketamine, isotopically labeled ketamine, deuterium, tritium, carbon-14.

CÍL PRÁCE

Cílem předkládané diplomové práce byla syntéza izotopově značeného ketaminu. Úkolem bylo připravit *N*-desmethylketamin (*nor*-ketamin), prekurzor ketaminu, a jeho následná methylace pomocí značeného methyljodidu, methylbromidu nebo methyl *p*-toluensulfonátu izotopy vodíku (deuteriem a tritiem) a izotopem uhlíku (^{14}C). A nakonec potvrzení správnosti syntézy metodami ^1H a ^{13}C nukleární magnetické rezonance a hmotnostní spektrometrií s elektrosprejovou ionizací v pozitivním nebo negativním modu.

SEZNAM ZKRATEK

CNS	centrální nervový systém
d	dublet
DMF	dimethylformamid
EEG	elektroencelograf
ESI	elektrosprejová ionizace
Et ₃ N	triethylamin
GABA	kyselina γ -aminomáselná
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
i.m.	intramuskulární podání
IR	infračervená spektroskopie
i.v.	intravenózní podání
LSD	diethylamid kyseliny lysergové
m	multiplet
mAChRs	muskarinové acetylcholinové receptory
MeCN	acetonitril
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie
<i>m/z</i>	efektivní hmotnost iontu
nAChRs	nikotinové acetylcholinové receptory
NMDA	<i>N</i> -methyl- <i>D</i> -aspartát
NMR	nukleární magnetická rezonance
p.a.	pro analýzu
PCP	phencyklidin
RP	reverzní fáze
s	singlet
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie

TsCl	<i>p</i> -toluensulfonyl chlorid
TsOC ² H ₃	[methyl- ² H]- <i>p</i> -toluensulfonát
TsO ¹⁴ CH ₃	[methyl- ¹⁴ C]- <i>p</i> -toluensulfonát
UV	ultrafialové
ÚJV Řež	Ústav jaderného výzkumu Řež

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Charakteristika ketaminu

Ketamin byl poprvé na trh přiveden roku 1962 americkou firmou Park Davis za účelem připravit bezpečnější alternativu anestetika phencyklidinu (PCP). Látku nasyntetizoval Calvin Stevens v Michiganu [1, 2]. Do klinické praxe byl uveden roku 1970. V tomto období proběhla válka ve Vietnamu, kde byl hodně využíván [2]. V současné době se uvádí několik komerčně vyráběných přípravků pod obchodními názvy Calypsol®, Ketalar®, Ketamin Parpharma®, Klorketamin®, Imalgin®, Inoketam® atd. [3]. Komerčně dostupné přípravky obsahují pomocné látky např. benzethonium-chlorid [1].

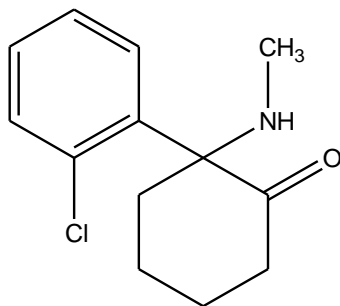
Ketamin se používá v humánní medicíně i ve veterinární sféře [3, 4]. Více je však tato látka známa jako rekreační droga vyvolávající halucinace. Má velmi široké spektrum účinku: anestetický, analgetický, halucinogenní, bronchodilatační, kardiovaskulární (zvyšuje krevní tlak) [1] a antidepressivní [5], který je v současné době ve výzkumu.

Účinky se mění s dávkou a způsobem podání [3]. Vyskytuje se ve formě práškové (bílé krystalky), roztoku nebo jako tableta. Ve formě hydrochloridu je rozpustný ve vodě a jako volná báze v tucích, proto může být podáván prostřednictvím mnoha cest a může poskytovat různé distribuce v těle. Rychle prostupuje bariérou krev-mozek [2]. Můžeme ho aplikovat intravenózně, intramuskulárně, intranazálně, rektálně, perorálně [3, 5], epidurálně [2] a bukálně [6].

1.2 Struktura ketaminu

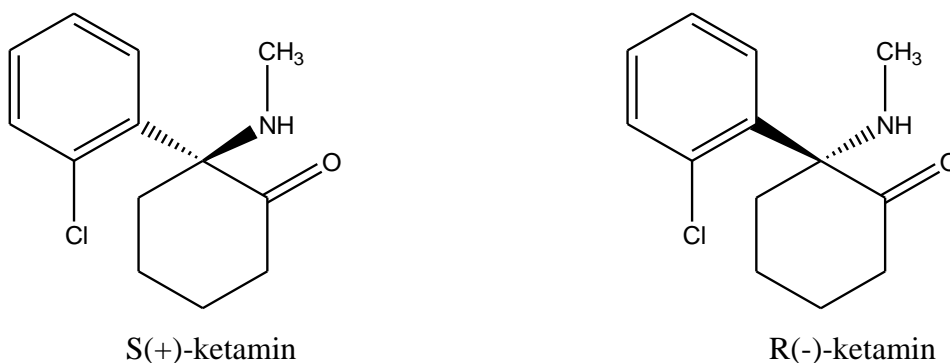
Chemický název ketaminu je 2-(o-chlorfenyl)-2-(methylamino)cyklohexanon. Jeho struktura je zobrazena na obr. 1.1. Obsahuje jeden aromatický a jeden cyklohexanový kruh. Strukturně je podobný phencyklidinu, se kterým má některé vlastnosti shodné [3]. V infračerveném spektru (IR) vykazuje výrazná maxima v oblasti 1665 cm^{-1} odpovídající valenční vibraci karbonylové skupiny. A v oblasti 3340 cm^{-1}

valenční vibrace N-H [7].



Obr. 1.1 : Struktura ketaminu: 2-(o-chlorfenyl)-2-(methylamino)cyklohexanon

Ketamin je chirální sloučenina. Jedná se o bodovou chiralitu zobrazenou na obr. 1.2. Umožňuje výskyt dvou optických isomerů se stejným empirickým vzorcem, ale s odlišným prostorovým uspořádáním. Oba isomery mají stejné chemické i fyzikální vlastnosti s výjimkou směru otáčení polarizovaného světla [2, 8]. Komerčně dostupné přípravky jsou racemické směsi se stejnou koncentrací obou enantiomerů. Některé studie uvádějí, že účinnější forma je S(+)-isomer ketaminu, především v anestetickém účinku, který je přibližně třikrát až čtyřikrát větší než u R(-)-isomeru [9]. Fyziologické vlastnosti enantiomerů se dále liší v odpovědích na elektroenceleograf (EEG) a v účinku vychytávání katecholaminů [5]. Čistý S(+)-isomer ketaminu je charakterizován vyšší afinitou ke specifickým receptorům, proto se mohou podávat až o polovinu nižší dávky tohoto isomeru [2].



Obr. 1.2 : S(+)- a R(-)- isomery

1.3 Farmakologické vlastnosti

Bod tání ketaminu je 92-93 °C a ve formě hydrochloridu 262-263 °C. Biologická dostupnost po intramuskulární aplikaci je 93 %, po intravenózním podání je 25-50 % a po perorálním pouze 17 %. Je rychle distribuován do mozku a vysoce prokrvených tkání [2].

Nejčastější aplikace ketaminu je intravenózní a intramuskulární. Účinky začínají při i.v. podání po 30 sekundách a doba trvání je 5-10 minut při dávce 2,0 mg/kg tělesné hmotnosti u dospělého jedince. Při i.m. podání se účinky objevují po 2-4 minutách a doba trvání je 12-25 minut při 10 mg/kg tělesné hmotnosti u dospělého jedince. Po perorálním podání se účinky objeví po 10-30 minutách na lačno. Další alternativní cestou je bukální a intranazální aplikace, při které začínají účinky po 5-10 minutách. Doba trvání v obou případech je srovnatelná s i.m. podáním a dávka je dvojnásobná oproti i.v. podání [1, 6].

Při anestetickém účinku se koncentrace ketaminu v krvi pohybuje v rozmezí 2000-3000 ng/ml. Pacient se z anestezie probouzí, až když koncentrace klesne na 500-1000 ng/ml [2]. Koncentrace ketaminu po i.v. aplikaci klesá zpočátku (alfa-fáze) po 45 minutách s poločasem 10-15 minut. Koncentrace v plazmě, poločas druhé fáze (beta-fáze) je přibližně 2,5 hodiny [6].

Ketamin je látka s krátkým eliminačním časem [4] 2 až 3 hodiny [2, 10]. Podléhá rozsáhlému jaternímu metabolismu [5, 11]. Ten je zprostředkováván jaterními mikrosomálními enzymy – cytochromy P450 (3A4, 2B6, 2C9) [2, 5, 11]. Při biotransformaci dochází k *N*-demethylaci na *N*-desmethylketamin, někdy nazývaný *nor*-ketamin, jeho účinnost je o třetinu menší než u ketaminu. Dále dochází k hydroxylaci na cyklohexanovém jádře, ke konjugaci s kyselinou glukuronovou a k dehydrataci hydroxylovaného metabolitu s tvorbou cyklohexenového derivátu mezi 2. a 3. uhlíkem [6]. Konečné produkty jsou rozpustné ve vodě, a proto mohou být vylučovány ledvinami 91 %, rektálně 4 % a 5 % beze změny [5, 11].

Požítí ketaminu lze zjistit z moči ještě po dobu tří dnů, což je využíváno např. v soudním lékařství [2].

Mezi nežádoucí účinky patří srdeční poruchy, kdy může dojít k přechodnému

zvýšení tlaku a tepové frekvence, a v některých případech např. v kombinaci s halothanem se může objevit bradykardie, hypertenze a arytmie. Dále respirační a hrudní poruchy, které se projeví stimulací dýchání, kdy se může vyvinout dechová deprese, apnoe, vzácně pak laryngospasmus (vyskytující se v jednom případě z pěti tisíc) nebo jiná obstrukce dýchacích cest. Mezi méně závažné řadíme psychiatrické poruchy jako změny nálad, neklid, úzkost nebo výrazně živé sny, poruchy nervového systému, oka (zvýšení nitroočního tlaku) a gastrointestinálního traktu (hypersalivace). Nežádoucím účinkům ketaminu můžeme předejít podáním společně s benzodiazepiny. Diazepam se doporučuje jako premedikace před vlastním podáním, protože výrazně snižuje frekvenci i jejich intenzitu [2, 6, 12].

1.4 Vazebná místa na receptorech

NMDA (*N*-methyl-*D*-aspartát) receptor je heterodimer složený z podjednotky NR1 a jedné podjednotky z NR2 (NR2A-D). Isomery ketaminu mají různou afinitu k různým podjednotkám, což vede k odlišným klinickým účinkům. Receptor obsahuje vazebná místa pro glutamát, NMDA, a v míše a mozku pro glycin. Jedná se o transmembránový protein, který tvoří kanál pro Na⁺, Ca²⁺ a K⁺ ionty. Vazebná místa pro ketamin jsou v iontovém kanálu. Působí jako antagonist k těmto receptorům. Blokáda iontového kanálu tohoto receptoru má za následek celkový anestetický účinek. Blokáda NMDA receptorů působí ochranně u neurodegenerativních onemocnění způsobených ischemií, hypoxií, hypoglykemií a křečemi [2].

Opioidní receptory jsou spřažené s receptory s G-proteinem, které se nachází na synaptických membránách neuronů. Existují čtyři odlišné typy: μ , σ , δ , κ . Při experimentech na zvířatech se ukázalo, že ketamin působí na všechny opioidní receptory s různou afinitou ($\mu > \kappa > \delta$) [13, 14]. S(+)-isomer je asi 2-4 krát silnější u μ - a κ -receptoru než je tomu u R(-)-isomeru. V účinku na δ -receptory se ve stereoselektivě neukázal žádný rozdíl [15]. Úloha σ -receptorů není doposud známa [2].

Acetylcholinové receptory jsou umístěny na postsynaptické membráně neuronů. Máme dva typy: nikotinové (nAChRs), které patří do skupiny ionotropních receptorů a jsou složeny z α - a β -podjednotek a muskarinové (mAChRs), které patří k receptorům spřažených s G-proteiny, které jsou složeny z pěti podskupin M₁-M₅. Ketamin je

nekompetitivní antagonistu nACh receptorů. Receptory s β -podjednotkami jsou citlivější než s α -podjednotkami [16]. Dále ovlivňuje M_1 , M_2 a M_3 muskarinové receptory [2].

GABA (kyselina γ -aminomáselná) receptory typu A patří do skupiny ionotropních receptorů a jsou složeny z pěti podjednotek. Ketamin k nim má nízkou afinitu a jeho působení významně nepřispívá k fyziologickým účinkům [2].

Na^+ kanály mohou být blokovány pomocí určitých chemických látek. Ketamin, podobně jako jiná anestetika, snižuje propustnost sodíku v neuronech ve fyziologicky významných koncentracích [17].

Ve velkých koncentracích ketamin blokuje T-typ Ca^{2+} kanálu v neuronech u potkanů [18]. Ve svalech a v srdečním svalu ovlivňuje Ca^{2+} tok tím, že blokuje L-typ Ca^{2+} kanálu. Tím se vysvětluje jeho vazodilatační, bronchodilatační a negativní ionotropní účinek [19, 20].

1.5 Využití ketaminu v lékařské praxi

Ketamin se řadí mezi bezpečnější látky se zklidňujícím účinkem používaných v klinických a preklinických nouzových situacích. K terapeutickým indikacím v lékařské praxi řadíme celkovou anestezii, analgezii, dále terapii dýchacího ústrojí a použití přípravku jako antidepresiva, který je v současné době ve výzkumu. Při různé aplikaci dochází k odlišným a také k užitečným účinkům ketaminu [2].

1.5.1 Ketamin jako anestetikum

Ketamin se používá jako disociativní anestetikum s krátkodobým účinkem: u bolestivých terapeutických a diagnostických výkonů, při převozu zraněných a u ambulantních chirurgických výkonů do 15 minut s výjimkou výkonů v hltanu, na dýchacích cestách, oční tenzometrie a výkonů vyžadující svalovou relaxaci [5, 6].

Disociativní anestezie je výsledkem snížené aktivity v thalamokortikální struktuře, v limbickém systému a hypokampu [2, 21]. Je používán zejména u dětí a u dospělých s výrazně oslabeným imunitním systémem [22]. Používá se jako úvod do celkové anestezie [6].

V kombinaci s některými léčivy jako např. barbituráty a anestetiky typu

halogenovaných uhlovodíků (enfluran, halothan, isofluran, methoxyfluran) se může prodloužit účinek anestezie. Současné podání droperidolu a benzodiazepinů snižuje výskyt halucinací a riziko psychomotorického neklidu [6].

Všeobecně používaná dávka pro navození anestetického účinku je 1-2 mg/kg a pro udržení dlouhodobé anestezie je nezbytné podávat 1-6 mg/kg za hodinu [2]. Vyvolaný stav pacienta se popisuje jako kataleptický stav s nystagmem, inaktivní rohovkou a s reflexy na světlo. Může dojít ke zvýšení svalového tonu a záměrným pohybům bez vztahu k bolestivým stimulům [5].

1.5.2 Ketamin jako analgetikum

Ketamin je vhodný pro použití analgeticko-sedativního účinku při diagnostických a chirurgických zákrocích [23]. Může poskytnout přiměřenou pooperační analgezií [24] s dřívějším nástupem účinku [25] a s méně nežádoucími účinky např. snížení pooperační nevolnosti a zvracení [2, 26]. Běžně používaná narkotika pro pooperační analgezií můžou uvolňovat histamin a způsobovat bronchospasmus u citlivých jedinců [25], např. u pacientů s akutní lymfatickou leukémií, u kterých se většinou vyvine bilaterální třaskavá pneumonie s výraznou hypotenzí a bronchospasmem. Ketamin zachovává respirační aktivitu, zvyšuje krevní tlak a tepovou frekvenci a nemá negativní vliv na střevní motilitu.

Kombinace tohoto přípravku s midazolem nebo propofolem je bezpečná pro zklidnění a úlevu od bolesti, zejména při sepsi, kardiovaskulární nestabilitě [23, 27, 28] a u pacientů s astmatem [25]. Je účinný i u chronické bolesti, kde běžná opioidní analgetika a antiepileptika jsou nedostačující [2, 29]. Dále u akutní somatické bolesti traumatického původu, popálenin, při bolestivých převazech a vyšetřeních [6], snížení hyperpatie a alodynies u nádorové bolesti [29] a využití v paliativní léčbě [8]. Ketamin také snižuje hyperalgezií, zvýšenou vnímavost na bolest, blokací NMDA receptorů [29]. Běžně používaná dávka pro navození analgetického účinku je 0,25-0,5 mg/kg [2].

1.5.3 Ketamin jako antidepresivum

Mechanismus účinku antidepresiv není doposud zcela vysvětlen. Je známo, že dochází k ovlivnění metabolismu transmiterů v CNS [30]. Současná generace antidepresiv funguje celkem spolehlivě, ale problémem těchto léků je rychlost, s níž zabírají. Řádově se jedná o 4 až 5 týdnů. Ketamin má však nástup účinku už po několika hodinách. Odstraňuje depresivní chování a obnovuje spoje mezi neurony, které byly porušeny v důsledku dlouhodobého stresu. Ukázalo se, že často pomáhá pacientům, na něž nepůsobí látky ovlivňující vychytávání serotoninu [22]. Farmakologicky se jedná o nekompetitivního antagonistu NMDA receptoru. Ketaminová infuze vyvolává okamžité změny podobné těm, která monoaminově založená antidepresiva vyvolávají postupně [31] a má antidepresivní vliv na farmakorezistentní pacienty do jednoho týdne [32, 33]. Atypickými antipsychotiky byla výrazně posílena léčba schizofrenie. Mechanismus účinku a nežádoucí účinky však nejsou zcela objasněny [34].

1.5.4 Jiné využití ketaminu v lékařské praxi

Bronchodilatační účinky byly evidentní od počátku klinických studií. Ketamin je stejně účinný jako halothan nebo enfluran při prevenci bronchokonstrikce [35]. Používá se k léčbě u náhlého případu u pacientů s astmatem [36, 37, 38]. Ketamin obecně chrání průchodnost a funkci dýchacích cest [5]. Dále se používá u pacientů s bronchospazmem rezistentních na běžnou terapii, adjuvantní léčby u astmatického stavu, úporné škytavky a priapismu [6].

Ketamin podporuje nárůst kosterního svalového tonu, což zlepšuje činnost nervosvalových blokátorů, jako jsou sukcinylcholin a *d*-tubokurarin [5].

Bylo prokázáno, že u pavíánů *i.m.* aplikovaný ketamin nevratně inhibuje agregaci krevních destiček [39]. U lidí však nebyly nalezeny žádné významné hemostatické změny [40].

Je také používán v dětské radioterapii jako zklidňující agens [41, 42]. Orálního nebo rektálního způsobu podání je hodně využíváno u pacientů s popáleninami, kdy je

omezena intravenózní aplikace [5].

Subanestetický účinek ketaminu byl předpokládáný léčebný mechanismus u asistované psychoterapie pro alkoholismus. Pomáhal, protože působí na monoaminergní a opiodní neurotransmitery, tedy na takové neurochemické systémy, které jsou zapojeny do patogeneze závislosti na alkoholu [43].

1.6 Zneužívání ketaminu

Kvůli svým psychedelickým účinkům je tato látka od roku 1965 užívána jako droga. Je známa pod názvy: K, Ket, Special K, Lady K, KitKat, Keller, Jet atd. Uživatelé přirovnávají fyzické účinky k PCP a vizuální efekty k LSD. Stav uživatele lze popsat jako nepozornost, pocit nezranitelnosti, intenzivní halucinace, dezorientace, poruchy myšlení atd. [2].

Pokud by došlo k předávkování, může se vyvinout dechová deprese, při které se doporučuje mechanická podpora dýchání [6].

1.7 Syntéza ketaminu

Syntéza ketaminu podle patentu C. L. Stevense [44] je znázorněna na schématu 1. Vychází se z 2-chlorbenzonitrilu. První reakcí je Grignardova syntéza, při které reaguje 2-chlorbenzonitril s cyklopentylmagnesiumbromidem v prostředí THF za vzniku cyklopentyl-(o-chlorfenyl)ketonu.

Následuje bromace za vzniku 1-bromcyklopentyl-(o-chlorfenyl)ketonu. Ta může být provedena několika různými způsoby. Jedním z nich je bromace v tetrachlormethanu. K roztoku cyklopentyl-(o-chlorfenyl)ketonu se přikapává roztok bromu za míchání asi 30 minut při laboratorní teplotě. Následně se přidá destilovaná voda. Nezareagovaný brom se odstraní přidávkem malého množství pyrosiřičitanu sodného a tetrachlormethanový roztok se oddělí. Vysuší se bezvodým síranem sodným a tetrachlormethan se oddestiluje za sníženého tlaku. Tato metoda má však hodně nevýhod. Pracuje se s karcinogenním rozpouštědlem, odpaření tetrachlormethanu trvá poměrně dlouho a v bromované látce vždy zůstává zbytek rozpouštědla, ve kterém se zadržuje vedlejší produkt bromace bromovodík [45]. Další způsob bromace je možný

bez rozpouštědla, protože obě reagující látky jsou kapaliny. Po skončení reakce se po zvýšení teploty reakční směsi na 50 °C vakuově oddestilují zbytky bromovodíku. Metoda má několik výhod. Nepracuje se s karcinogenní látkou a pracovní čas postupu se zkrátí [46]. Bromace podle amerického patentu se provádí rozpuštěním bromidu měďnatého v ethylacetátu a přidání k cyklopentyl-(o-chlorfenyl)ketonu za současného míchání po dobu 2,5 hodiny při teplotě 80 °C [47].

Pro vznik 1-hydroxycyklopentyl-(o-chlorfenyl)-*N*-methylketimin je třeba k 1-bromcyklopentyl-(o-chlorfenyl)ketonu přikapat kapalný methylamin, který se vychladí v lázni obsahující ethanol a kysličník uhličitý na -20 až -30 °C. Směs se míchá hodinu při stálém chlazení pod -10 °C. Po odstranění chladicí lázně dojde k odpaření přebytečného methylaminu. Z roztoku lze izolovat methylimin krystalizací z pentanu, což ale vede k nízkým výtěžkům. Výhodnější je odparek rozmíchat s vhodným rozpouštědlem (benzen, toluen). Nerozpuštěné soli se odfiltrují a filtrát se zahustí odpařením za sníženého tlaku. Odparek se rozpustí v chloroformu a okyselený roztok se zahustí [46].

Konečnou reakcí je termický přesmyk na 2-(o-chlorfenyl)-2-methylaminocyklohexanon. Olejovitý odparek se vloží do vyhřáté lázně na 180-190 °C, kde se zahřívá po dobu 30 minut. Některé studie uvádějí, že je výhodnější pro termický přesmyk přidat dekalín jako rozpouštědlo. Po ochlazení se směs rozmíchá s destilovanou vodou a s organickým rozpouštědlem nemísitelným s vodou (chloroform). Vodná vrstva se po filtraci zalkalizuje a vytřepe do chloroformu. Roztok se zahustí a následně se izoluje hydrochlorid ketaminu rozpuštěním v ethanolu a okyselením roztoku. Rekrystalizace je možná ze směsi methanol/ether [44, 46].

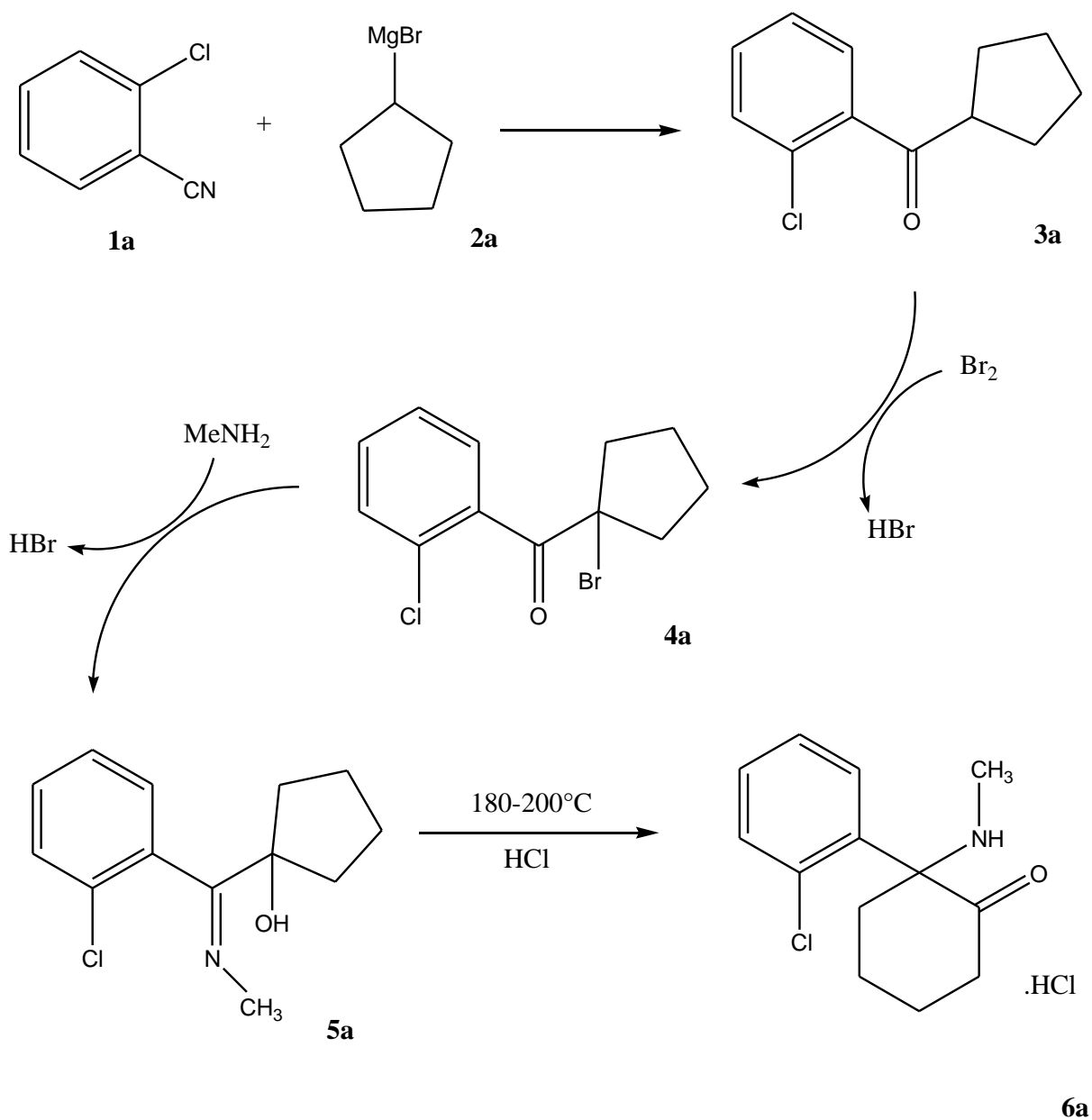


Schéma 1: Vznik hydrochloridu 2-(o-chlorfenyl)-2-methylaminocyklohexanonu (ketamin hydrochlorid, **6a**). **1a** 2-chlorbenzonitril, **2a** cyklopentylmagnesiumbromid, **3a** cyklopentyl-(o-chlorfenyl)keton, **4a** 1-bromcyklopentyl-(o-chlorfenyl)keton, **5a** 1-hydroxycyklopentyl-(o-chlorfenyl)-N-methylketimin

1.8 Syntéza *N*-desmethylketaminu

Stejně jako u syntézy ketaminu se i u syntézy *N*-desmethylketaminu vychází z chlorbenzotrilitu, kdy první reakcí je Grignardova syntéza. Druhá reakce, bromace, je také shodná [44, 45]. Vznik *N*-desmethylketaminu je znázorněn na schématu 2.

K bromované sloučenině 1-bromcyklopentyl-(*o*-chlorfenyl)ketonu se přidá za chlazení suchým ledem a za míchání kapalný amoniak. Roztok se nechá míchat po dobu čtyř hodin v ledové lázni, kdy se nezreagovaný amoniak vypaří. Vzniklá sraženina se rozpustí v THF a zahustí se za sníženého tlaku [7].

Konečnou reakcí stejně jako tomu bylo u syntézy ketaminu je termický přesmyk. Vzniklý 1-hydroxycyklopentyl-(*o*-chlorfenyl)imin se rozpustí v isopropylalkoholu. Nasytí se bezvodou kyselinou chlorovodíkovou a naředí se diethyletherem. Vzniklé krystaly se přefiltrují a rozpustí v Dowtherm®A (směs 26,5 % bifenyly + 73,5 % difenyletheru). Vzniklý roztok se nechá vařit při teplotě 180 °C po dobu sedmi minut. Reakční směs se zchladí na 10 °C a přefiltruje. Pevná látka se rozpustí v destilované vodě. Filtrát se zředí diethyletherem a extrahuje vodou. Zalkalizuje se 50 % roztokem hydroxidu sodného a extrahuje diethyletherem. Spojené etherové roztoky se promyjou vodou a zahustí se za sníženého tlaku [7].

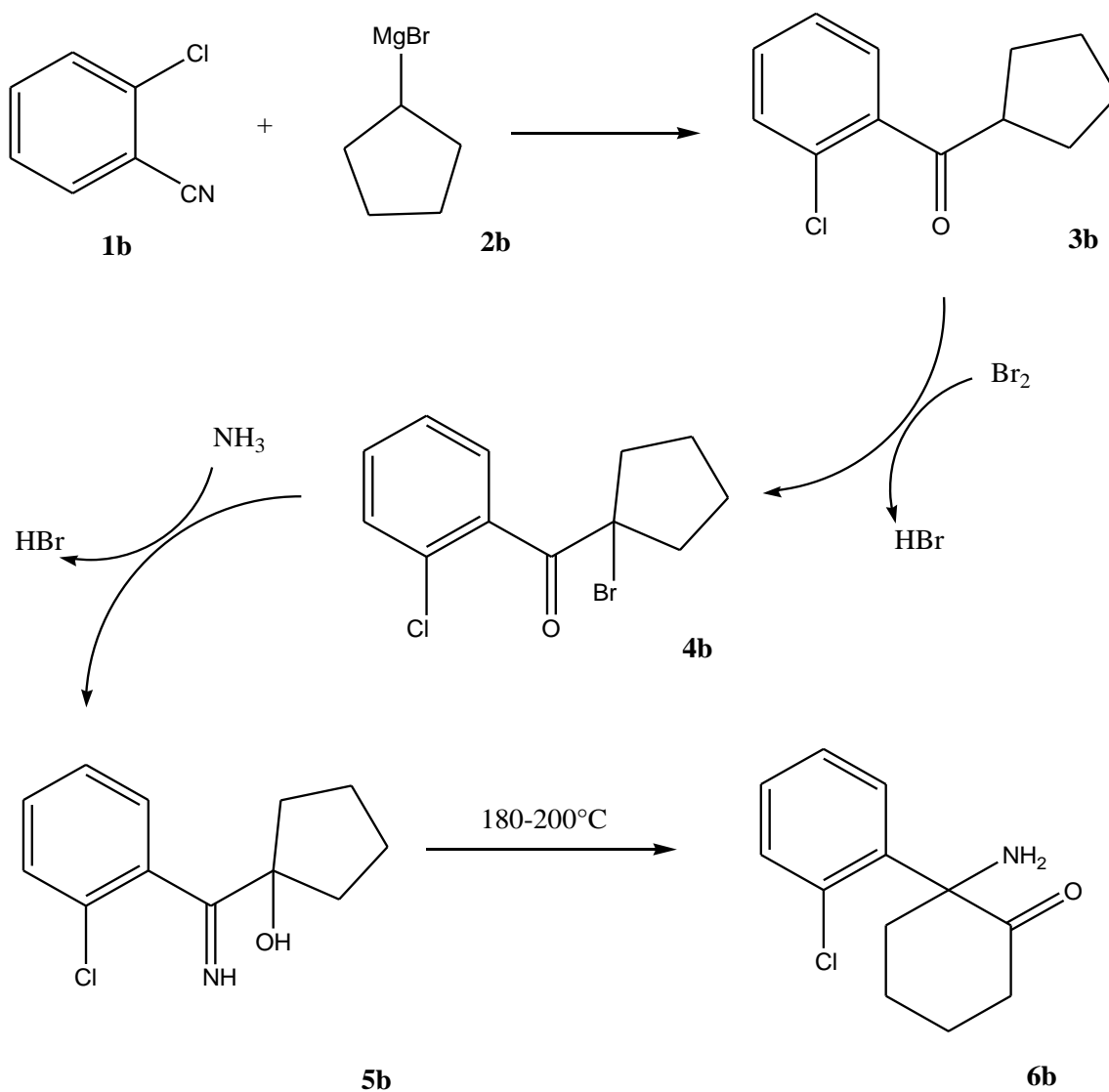


Schéma 2: Vznik *N*-desmethylketaminu (*nor*-ketaminu, **6b**), **1b** 2-chlorbenzonitril, **2b** cyklopentylmagnesiumbromid, **3b** cyklopentyl-(*o*-chlorfenyl)keton, **4b** 1-bromcyklopentyl-(*o*-chlorfenyl)keton, **5b** 1-hydroxycyklopentyl-(*o*-chlorfenyl)imin

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Použité chemikálie a rozpouštědla

Všechny použité chemikálie a rozpouštědla byly zakoupeny od dodavatelů nebo nám byly darovány. V tabulce 1 jsou uvedeny chemikálie a v tabulce 2 rozpouštědla.

chemikálie	čistota	Dodavatel
Calypsol® ketaminum	podle SÚKL	dar z Psychiatrického centra Praha
cyklopentyl-(o-chlorfenyl)keton	97 %	Alfa Aesar
amoniak	neuveďeno	Linde
brom	p.a.	Lach-Ner
NaOH	p.a.	Penta
$C^2H_3O^2H$	99 %	EuroRad
$NaHCO_3$	p.a.	Lach-Ner
$(COOH)_2 \cdot 2H_2O$	p.a.	Lach-Ner
$MgSO_4$	p.a.	Lach-Ner
TsCl	p.a.	Sigma-Aldrich
triethylamin	99 %	Sigma-Aldrich
HCOOH	p.a.	Lach-Ner
C^3H_3Br	neuveďeno	ÚJV Řež
C^2HCl_3	99 %	EuroRad
benzylbromid	98 %	Sigma-Aldrich
$LiAlH_4$	95 %	Sigma-Aldrich
$H^{14}COONa$	neuveďeno	Amersham
DMF	99,8 %	Sigma-Aldrich

Tabulka 1: použité chemikálie

rozpouštědlo	čistota	dodavatel
aceton	čistý	Lach-Ner
acetonitril	99,9 %	Lab-Scan
ethylacetát	čistý	Brenntag
diethylether	čistý	Lach-Ner
hexan	čistý	Brenntag
isopropylalkohol	p.a.	Lachema
methanol	p.a.	Lach-Ner
tetrahydrofuran	99,9 %	Aldrich
tetrachlormethan	p.a.	Lachema
toluen	čistý	Lach-Ner

Tabulka 2: použitá rozpouštědla

2.2 Použité metody a přístroje

Pro tenkovrstvou chromatografii (TLC) byly použity silikagelové desky MERCK 150 F₂₅₄ (Německo). Detekce látek byla prováděna pod UV zářením. Pro zjištění identity produktů byla použita nukleární magnetická rezonance a hmotnostní spektrometrie. NMR spektra byla měřena na přístroji BRUKER AVANCE III při frekvenci ¹H 600,17 MHz a ¹³C 150,04 MHz za použití rozpouštědla C²HCl₃. Chemické posuny jsou uváděny v jednotkách ppm. Měření provedla RNDr. Simona Hybelbauerová, PhD. MS spektra byla měřena na hmotnostním spektrometru s iontovou pastí a elektrosprejovou ionizací od výrobce BRUKER DALTONICS (Německo), model ESQUIRE 3000. Průtok byl nastaven na 20 µl/min. Jako zmlžovací plyn byl použit dusík. Měření provedl RNDr. Martin Štícha na Katedře organické a jaderné chemie. Kalibrační řada standardu ketaminu byla naměřena na přístroji HPLC Chrom SDS 150, kolona RP C18 od výrobce WATREX, o délce 250 mm, průměru 4 mm a velikostí zrn 5 µm. Jako mobilní fáze byla použita MeOH/H₂O v poměru 8:2. Detekce byla provedena spektrometrickým detektorem při vlnové délce 235 nm. Nástřik vzorku byl 2, 4, 6, 8, 10, 12 a 14 µl. Průtok byl nastaven na 0,4 ml/min. a rozsah měření byl 1,5. Měření aktivity značených vzorků bylo provedeno na kapalinovém scintilačním spektrometru Beckman (USA) LS6000SE.

2.3 Syntéza *N*-desmethylketaminu

1-Bromcyklopentyl-(*o*-chlorfenyl)keton (4b)

K 2,5 g cyklopentyl-(*o*-chlorfenyl)ketonu (12 mmol) (3b) v 6 ml tetrachlormethanu bylo při 0 °C za míchání po dobu 30 minut přikapáno 1,9 g bromu (11,9 mmol) v 6 ml CCl₄. Potom bylo přidáno 10 ml destilované vody a hydrogenuhličitan sodný do zneutralizování roztoku. Organická fáze byla usušena přidáním síranu hořečnatého a za sníženého tlaku byl odpařen tetrachlormethan. Protože bromovaná látka byla nestálá, byla provedena co nejrychleji druhá reakce.

1-Hydroxycyklopentyl-(*o*-chlorfenyl)imin (5b)

Do Schlenkovy baňky za chlazení suchým ledem byl jímán plynný amoniak, který byl za snížené teploty zkapalňován. K 1-bromcyklopentyl-(*o*-chlorfenyl)ketonu (cca 12 mmol) (4b) při 0 °C bylo přidáno 10 ml kapalného amoniaku. Vzniklý roztok byl míchán 1 hodinu při 0 °C a 3 hodiny při laboratorní teplotě. Do směsi byl přidán THF a byla provedena filtrace. Filtrát byl zahuštěn za sníženého tlaku. Odparek byl rozpuštěn v hexanu, který byl odpařen za vzniku bílých krystalů. Vzorek byl uschován při laboratorní teplotě v uzavřené baňce. Výtěžek byl 200 mg (8 %).

N-desmethylketamin (6b)

Ke 150 mg 1-hydroxycyklopentyl-(*o*-chlorfenyl)iminu (0,7 mmol) (5b) bylo přidáno 5 ml isopropylalkoholu. Roztok byl vařen při teplotě 90 °C po dobu pěti dnů. Následně byl roztok zahuštěn za sníženého tlaku a vysrážen přidávkem roztoku 100 mg kyseliny šťavelové v 5 ml diethyletheru, který byl poté odpařen. Rekrystalizace byla provedena z acetonu. Výtěžek 130 mg (87 %). Teplota tání 82 °C. ESI/MS spektrum v pozitivním modu: m/z 207.2 [M – NH₃ + 1]⁺ (eliminace v MS přístroji), m/z 224.1 [M + 1]⁺, m/z 246.1 [M + Na]⁺. ¹H NMR spektrum (600,17 MHz, C²HCl₃, 25 °C): δ = 7.88 (d, 1H), 7.57 – 7.43 (m, 3H), 2.9 – 1.6 (m, 8H) ppm. ¹³C NMR spektrum (150,04 MHz, C²HCl₃, 25 °C): δ = 207.7 (C = O), 134.8 – 127.8 (benzen), 66.1 (C-NH₂), 39.7; 39.1; 28.0; 21.0 (CH₂) ppm.

2.4 Příprava standardu ketaminu

Jako standard ketaminu byl použit vzorek léku Calypsol® ketaminium, který byl darem Psychiatrického centra Praha. Vzorek byl zahuštěn za sníženého tlaku a zneutralizován NaOH. Výsledný roztok byl extrahován hexanem a odpařen. Z 10 ml vzorku bylo získáno 450 mg ketaminu (90 %). Teplota tání 90,4 °C (lit. 92-93 °C [2]). ESI/MS spektrum v pozitivním modu: m/z 238.2 $[M + 1]^+$, m/z 260.2 $[M + Na]^+$, m/z 481.2 $[2M - NH_3 + 1]^+$. 1H NMR spektrum (600,17 MHz, C^2HCl_3 , 25 °C): $\delta = 7.60 - 7.24$ (m, 4H), 2.54 – 2.44 (m, 3H), 2.00 (s, 1H), 2.15 – 1.70 (m, 4H) ppm. ^{13}C NMR spektrum (150,04 MHz, C^2HCl_3 , 25 °C): $\delta = 208.72$ (C = O), 133.97 – 126.86 (benzen), 77.00 (C – NH₂), 39.61; 29.1; 21.8; 17.22 (CH₂), 30.87 (C-N) ppm.

2.5 Příprava methylačních činidel

2.5.1 Příprava [methyl- 2H]-*p*-toluensulfonátu

K 200 mg *p*-toluensulfonylchloridu (1,0 mmol) bylo přidáno 200 μ l triethylaminu a 10 ml THF. Za míchání bylo přikapáno 500 μ l [2H]methanolu. Roztok byl 1 hodinu míchán za laboratorní teploty a zahuštěn za sníženého tlaku. K roztoku byla přidána voda a byla provedena extrakce do diethyletheru, který byl odpařen. Výsledný produkt [methyl- 2H]-*p*-toluensulfonát byl olej. Výtěžek byl 150 mg (75 %). ESI/MS spektrum v negativním modu: m/z 170.9 $[M - ^2H]^-$.

2.5.2 Příprava [methyl- ^{14}C]-*p*-toluensulfonátu

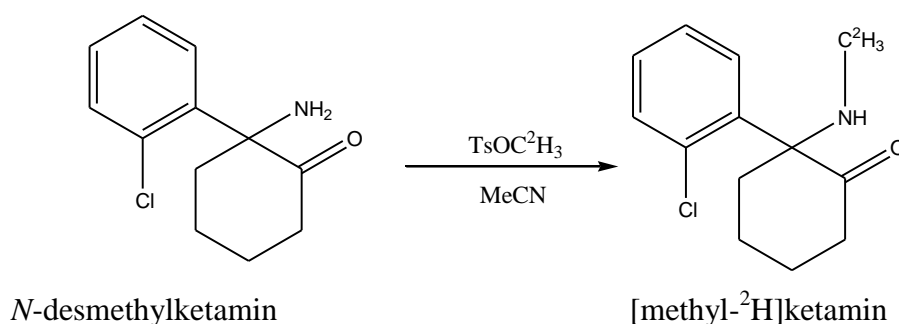
K $H^{14}COONa$ (37 MBq, 1,54 mg) byl přidán 1 ml benzylbromidu a 1 ml DMF. Vše bylo mícháno 5 dní při laboratorní teplotě a následně 1 den při 50 °C. Bez izolace byla provedena redukce $LiAlH_4$ v THF a po okyselení 0,1 M HCl byl v proudu argonu vydestilován [^{14}C]methanol spolu s THF. K získanému roztoku bylo přidáno 5 mg *p*-toluensulfonylchloridu, roztok byl míchán přes noc a pak ještě 2 h při 60°C. Poté byla provedena HPLC separace alikvotu. Náš výsledný produkt byl jímán do scintilační baňky. K němu byl přidán scintilační roztok a směs byla proměřena na kapalínovém

scintilačním spektrometru. Aktivita [methyl-¹⁴C]- *p*-toluensulfonátu byla vypočítána na 22,6 kBq.

2.6 Příprava značeného ketaminu

2.6.1 Příprava [methyl-²H]ketaminu

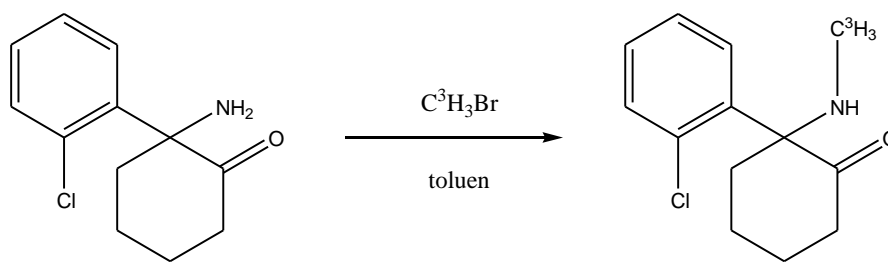
10 mg *N*-desmethylketaminu (0,05 mmol) bylo převedeno z oxalátu na volnou bázi přidáním roztoku NaOH a extrakcí do hexanu. Následně bylo přidáno 20 μl [methyl-²H]-*p*-toluensulfonátu a 2 ml acetonitrilu. Roztok byl zahříván na 90 °C 1 hodinu. Vznik [methyl-²H]ketaminu je zobrazen na obr. 2.1. Výtěžek byl 5 mg (50 %). ESI/MS spektrum v pozitivním modu: *m/z* 207.3 [*M* - C²H₃-NH₂ + 1]⁺, *m/z* 224.3 [*M*_{NK} + 1]⁺, *m/z* 241.3 [*M* + 1]⁺.



Obr. 2.1 : Vznik [methyl-²H]ketaminu

2.6.2 Příprava [methyl-³H]ketaminu

10 mg *N*-desmethylketaminu (0,05 mmol) bylo převedeno z oxalátu na volnou bázi přidáním roztoku NaOH a extrakcí do hexanu. Následně bylo přidáno 0,5 ml toluenového roztoku [methyl-³H]methylbromidu (21,5 MBq) a 1 ml toluenu. Roztok byl zahříván v zatavené ampuli na 90 °C po dobu jednoho dne. Následovala izolace [methyl-³H]ketaminu pomocí preparativní TLC za použití mobilní fáze hexanu. Poté byla provedena HPLC separace alikvotu. Náš výsledný produkt byl jímán do scintilační baňky. K němu byl přidán scintilační roztok a směs byla proměřena na kapalinovém scintilačním spektrometru. Aktivita [methyl-³H]ketaminu byla vypočítána na 20,7 MBq, 96 % radiochemického výtěžku. Vznik [methyl-³H]ketaminu je zobrazen na obr. 2.2.



N-desmethylketamin

[methyl-³H]ketamin

Obr. 2.2 : Vznik [methyl-³H]ketaminu

3 VÝSLEDKY A DISKUSE

Cílem této diplomové práce byla syntéza izotopově značeného ketaminu. Nejdříve byl syntetizován *N*-desmethylketamin, prekurzor ketaminu, který byl následně označen izotopy vodíku, deuteriem a tritiem. Jako standard byl použit ketamin izolovaný ze vzorku léku Calypsol®ketaminium.

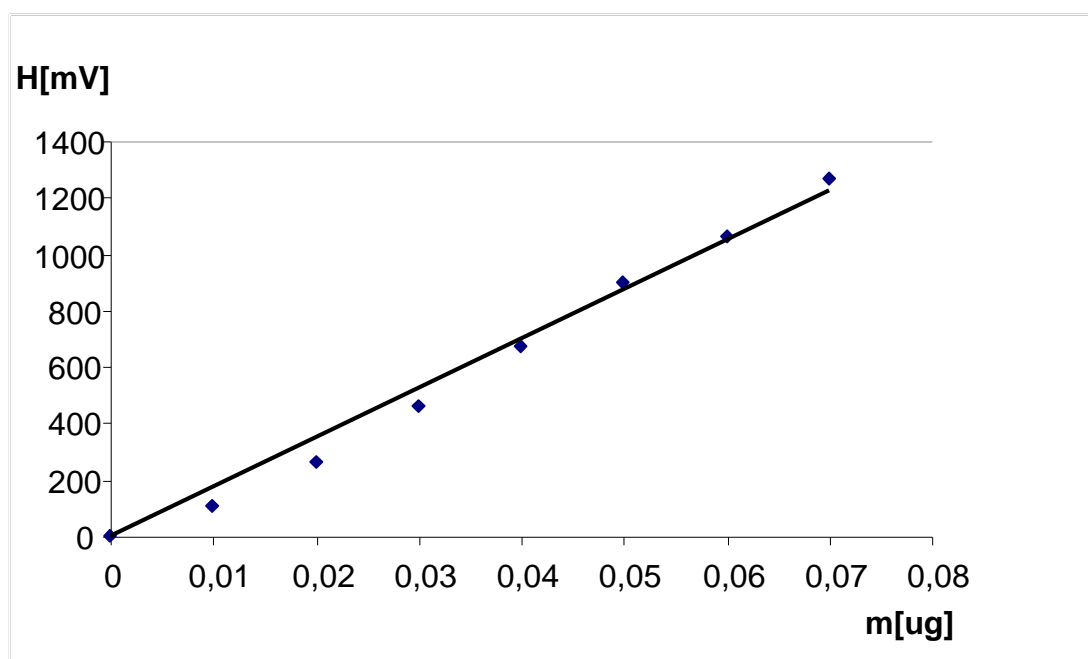
Syntéza *N*-desmethylketaminu byla provedena na základě známých dat publikovaných v patentu podle C.L. Stevense z roku 1967 (viz. kapitola 1.7). Bylo vycházeno z komerčního cyklopentyl-(*o*-chlorfenyl)ketonu.

První reakce, bromace, byla provedena podle českého patentu za použití tetrachlormethanu z roku 1992 podle Mitinka a Menharta (viz. kapitola 1.7). Tato metoda měla však hodně nevýhod. Rozpouštědlo je karcinogenní a jeho odpařování za sníženého tlaku po bromaci trvá delší dobu. Reakce probíhala 30 minut za laboratorní teploty. Výsledným produktem byl 1-bromcyklopentyl-(*o*-chlorfenyl)keton. Tato látka je velmi nestálá, a proto musela být co nejrychleji provedena druhá reakce. Látku je také možné skladovat 24 hodin při -32 °C.

Pro další krok byl použit kapalným amoniak, který byl přidáván za chlazení k již připravenému 1-bromcyklopentyl-(*o*-chlorfenyl)ketonu za vzniku 1-hydroxycyklopentyl-(*o*-chlorfenyl)iminu. Při této reakci bylo postupováno podle publikované literatury z roku 1981 (viz. kapitola 1.8). Nevýhodou této reakce byla skutečnost, že tetrachlormethan má teplotu tání -22,9 °C a teplota varu amoniaku je -33 °C, takže nastal problém při smíchání obou komponent. Alternativní postupy (reakce s koncentrovaným vodným amoniakem) vedly k ještě nižším výtěžkům. Tuto látku se nám podařilo získat ve formě krystalů.

Konečnou reakcí byl termický přesmyk. Doba termického přesmyku byla zvolena delší pro získání většího výtěžku. Produkt byl získán ve formě krystalů. Identifikace byla provedena pomocí metod ESI/MS v pozitivním modu a NMR. Těmito metodami se nám podařilo potvrdit správnost naší syntézy a strukturu výsledného produktu.

Z Psychiatrického centra v Praze nám byl darován vzorek léku Calypsol®ketaminum, ze kterého se nám podařilo izolovat čistý ketamin. Identifikace výsledné sloučeniny byla provedena pomocí metod ESI/MS v pozitivním modu a NMR. U standardu ketaminu byla změřena teplota tání na 90,4 °C (lit. 92-93 °C [2]). Z izolovaného ketaminu byla pomocí získaných hodnot z HPLC metody vytvořena kalibrační křivka. Byla vynesena závislost výšky píku na množství nastříknutého vzorku. Graf znázorňující kalibrační řadu je zobrazen v grafu 3.1. Odchylky vzorků od kalibrační křivky mohly vzniknout nepřesností při nanesení množství vzorku.



Graf 3.1 : Kalibrační křivka závislosti výšky píku na množství vzorku

Pro syntézu [methyl-²H]ketaminu byl nejprve připraven [methyl-²H]-*p*-toluensulfonát. Reakce byla provedena za přítomnosti triethylaminu v prostředí THF za laboratorní teploty. Identifikace výsledného produktu byla zjištěna pomocí hmotnostní spektrometrie s elektrosprejovou ionizací v negativním modu.

[methyl-²H]ketamin byl připraven v uzavřené zkumavce v prostředí acetonitrilu. Identifikace konečného produktu byla zjištěna pomocí ESI/MS v pozitivním modu.

Pro přípravu [methyl-³H]ketaminu byl použit [³H]methylbromid. Při přípravě značeného ketaminu bylo postupováno podle publikované literatury, kdy se podařilo označit ketamin uhlíkem ¹¹C a to reakcí s [¹¹C]methyljodidem [48]. Pro přípravu [methyl-¹⁴C]ketaminu byl připraven [methyl-¹⁴C]-*p*-toluensulfonát. Ten byl připravován ze značeného mravenčanu sodného. Alikvoty byly separovány na HPLC, výsledné produkty [methyl-³H]ketaminu a [methyl-¹⁴C]-*p*-toluensulfonátu byly jímány do scintilační baňky a jejich aktivita byla změřena na kapalinovém scintilačním spektrometru.

Pro přípravu značeného ketaminu byl vždy použit nadbytek *N*-desmethylketaminu, aby nedošlo k přemethylování ketaminu a vzniku tak dimethylovaných nebo trimethylovaných produktů.

4 ZÁVĚR

V této diplomové práci se nám podařilo syntetizovat izotopově značený ketamin. Nejdříve byl připraven *N*-desmethylketamin. Vycházelo se z komerční sloučeniny cyklopentyl-(*o*-chlorfenyl)ketonu, kdy se postupovalo podle publikované literatury z roku 1967 podle pana C.L. Stevense a dále podle publikované literatury z roku 1992 podle pánů Minharta a Mitinko. Jako standard ketaminu byl použit vzorek léku Calypsol®ketaminium, ze kterého byl izolován ketamin. Struktury konečných produktů *N*-desmethylketaminu a standardu ketaminu byly identifikovány metodami ^1H a ^{13}C NMR a ESI/MS v pozitivním modu. Reakcí *N*-desmethylketaminu s [methyl- ^2H]-*p*-toluensulfonátem byl připraven [methyl- ^2H]ketamin. Jeho identifikace byla provedena pomocí ESI/MS v pozitivním modu. Příprava [methyl- ^3H]ketaminu byla provedena reakcí *N*-desmethylketaminu s [methyl- ^3H]methylbromidem. Jeho aktivita byla změřena na kapalinovém scintilačním spektrometru. A nakonec byl připraven [methyl- ^{14}C]-*p*-toluensulfonát a jeho aktivita byla změřena na kapalinovém scintilačním spektrometru.

LITERATURA

- [1] Jansen K.L.R.: A review of the nonmedical use of ketamine: use, users and consequences, *Journal of Psychoactive Drugs* **32** (2000), 419-433.
- [2] Sinner B., Graf B.M.: Ketamine, *Handbook of Experimental Pharmacology* **182** (2008), 313-333.
- [3] Arditti J., Spadari M., de Haro L., Brun A., Bourdon J.H., Valli M.: Ketamine—dreams and realities, *Acta Clinica Belgica, Supplement* (2002), 31-33.
- [4] Pal H.R., Berry N., Kumar R., Ray R.: Ketamine dependence, *Anaesthesia and Intensive Care* **30** (2002), 382-384.
- [5] Reich D.L., Silvay G.: Ketamine: an update on the first twenty-five years of clinical experience, *Canadian Journal of Anaesthesia* **36** (1989), 186-197.
- [6] Státní ústav pro kontrolu léčiv: Databáze léků
<[http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data\[search_for\]=calypsol&data\[code\]=&data\[atc_group\]=&data\[material\]=&data\[path\]=&data\[reg\]=&data\[radiio\]=none&data\[rc\]=&data\[with_adv\]=0&search=Vyhledat&data\[listing\]=20](http://www.sukl.cz/modules/medication/search.php?data[search_for]=calypsol&data[code]=&data[atc_group]=&data[material]=&data[path]=&data[reg]=&data[radiio]=none&data[rc]=&data[with_adv]=0&search=Vyhledat&data[listing]=20)> [cit. 1.4.2011]
- [7] Parcell R.F., Sanchez J.P.: Synthesis of ketamine metabolites I and II and some anomalous reactions of 6-bromoketamine, *The Journal of Organic Chemistry* **46** (1981), 5055-5060.
- [8] Smith H.S.: Ketamine-induced urologic insult, *Pain Physician* **13** (2010), E343-346.
- [9] White P., Ham J., Way W.L., Trevor A.J.: Pharmacological properties of ketamine, *Anesthesiology* **83** (1996), 231-239.
- [10] Domino E.F., Domino S.E., Smith R.E., Domino L.E., Goulet J.R., Domino K.E., Zsigmond E.K.: Ketamine kinetics in unmedicated and diazepam-premedicated subjects, *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **36** (1984), 645-653.
- [11] Gocmen S., Buyukkocak U., Caglayan O.: In vitro investigation of the antibacterial effect of ketamine, *Journal of Medicinal Sciences* **113** (2008), 39-46.
- [12] Green S.M., Krauss B.: Ketamine is a safe, effective, and appropriate technique for emergency department paediatric procedural sedation, *Emergency Medicine Journal* **21** (2004), 271-272.

-
- [13] Sarton E., Teppema L.J., Olivier C., Nieuwenhuijs D., Matthes H.W., Kieffer B.L., Dahan A.: The involvement of the μ -opioid receptor in ketamine-induced respiratory depression and antinociception, *Anesthesia & Analgesia* **93** (2001), 1495-1500.
- [14] Smith D.J., Bouchal R.L., DeSanctis C.A., Monroe P.J., Amedro J.B., Perrotti J.M., Crisp T.: Properties of the interaction between ketamine and opiate binding sites in vivo and in vitro, *Neuropharmacology* **26** (1987), 1253-1260.
- [15] Hustveit O., Maurset A., Oeye I.: Interaction of the chiral forms of ketamine with opioid, phencyclidine, sigma and muscarinic receptors, *Pharmacology & Toxicology* **77** (1995), 355-359.
- [16] Yamakura T., Chavez-Noriega L.E., Harris R.A.: Subunit-dependent inhibition of human neuronal nicotinic acetylcholine receptors and other ligand-gated ion channels by dissociative anesthetics ketamine and dizocilpine, *Anesthesiology* **92** (2000), 1144-1153.
- [17] Dowdy E.G., Kaya K., Gocho Y.: Pharmacologic similarities of ketamine, lidocaine, and procaine, *Anesthesia & Analgesia* **52** (1973), 839-842.
- [18] Todorovic S., Lingle Ch.J.: Pharmacological properties of T-type Ca^{2+} current in adult rat sensory neurons: effects of anticonvulsant and anesthetic agents, *Journal of Neurophysiology* **79** (1998), 240-252.
- [19] Baum V.C., Tecson M.E.: Ketamine inhibits transsarcolemmal calcium entry in guinea pig myocardium: direct evidence by single cell voltage clamp, *Anesthesia & Analgesia* **73** (1991), 804-807.
- [20] Yamakage M., Hirshman C.A., Croxton T.L.: Inhibitory effects of thiopental, ketamine, and propofol on voltage-dependent Ca^{2+} channels in porcine tracheal smooth muscle cells, *Anesthesiology* **83** (1995), 1274-1282.
- [21] Domino E., Chodoff P., Corssen G.: Pharmacologic effects of CI-581, a new dissociative anesthetic, in man, *Clinical Pharmacology and Therapeutics* **6** (1965), 279-291.
- [22] Price R.B., Nock M.K., Charney D.S., Mathew S.J.: Effects of Intravenous Ketamine on Explicit and Implicit Measures of Suicidality in Treatment-Resistant Depression, *Biological Psychiatry* **66** (2009), 522-526.
- [23] Adams H.A., Brausch M., Schmitz C.S., Meyer M.C., Hecker H.: Analgesic dosage with (S)-ketamine/propofol vs. (S)-ketamine/midazolam: sedation, stress response and hemodynamics--a controlled study of surgical intensive care patients, *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie* **36** (2001), 417-424.

-
- [24] Jahangir S.M., Islam F., Chowdhury S.N., Aziz L., Ghani M.A.: Ketamine infusion for postoperative analgesia: a prospective cohort study in asthmatics, *Bangladesh Medical Research Council Bulletin* **19** (1993), 21-27.
- [25] Jahangir S.M., Islam F., Aziz A.: Ketamine infusion for postoperative analgesia in asthmatics: a comparison with intermittent meperidine, *Anesthesia & Analgesia* **76** (1993), 45-49.
- [26] Bell R.F., Dahl J.B., Moore R.A., Kalso E: Perioperative ketamine for acute postoperative pain, *Cochrane Database of Systematic Reviews* (2006), **CD004603**.
- [27] Park G.R., Manara A.R., Mendel L., Bateman P.E.: Ketamine infusion. Its use as a sedative, inotrope and bronchodilator in a critically ill patient, *Anaesthesia* **42** (1987), 980-983.
- [28] Yli-Hankala A., Kirvela M., Randell T., Lindgren L.: Ketamine anaesthesia in a patient with septic shock, *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* **36** (1992), 483-485.
- [29] Hocking G., Cousins M.: Ketamine in chronic pain management: an evidence-based review, *Anesthesia & Analgesia* **97** (2003), 1730-1739.
- [30] Lüllmann H., Mohr K., Wehling M.: Celková anestetika In: Farmakologie a toxikologie. Reimanová A. (editor). Praha Grada Publishing a.s. 2004, 370-379.
- [31] Horáček J., Brunovský M., Novák T., Tislerová B., Páleníček T., Bubeníková-Valešová V., Spaniel F., Kopřivová J., Mohr P., Balíková M., Höschl C.: Subanesthetic dose of ketamine decreases prefrontal theta cordance in healthy volunteers: implications for antidepressant effect, *Psychological Medicine* **40** (2010), 1443-1451.
- [32] Berman R.M., Cappiello A., Anand A., Oren D.A., Heninger G.R., Charney D.S., Krystal J.H.: Antidepressant effects of ketamine in depressed patients, *Biological Psychiatry* **47** (2000), 351-354.
- [33] Zarate Jr. C.A., Singh J.B., Carlson P.J., Brutsche N.E., Ameli R., Luckenbaugh D.A., Charney D.S., Manji H.K.: A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression, *Archives of General Psychiatry* **63** (2006), 856-864.
- [34] Horáček J., Bubeníková-Valešová V., Kopeček M., Páleníček T., Dockery C., Mohr P., Höschl C.: Mechanism of action of atypical antipsychotic drugs and the neurobiology of schizophrenia, *CNS Drugs* **20** (2006), 389-409.
- [35] Hirshman C.A., Downes H., Farbood A., Bergman N.A.: Ketamine block of bronchospasm in experimental canine asthma, *British Journal of Anaesthesia* **59** (1979), 713-718.

-
- [36] Strube P.J., Hallam P.L.: Ketamine by continuous infusion in status asthmaticus, *Anaesthesia* **41** (1986), 1017-1019.
- [37] Rock M.J., Reyes de la Rocha S., L'Hommedieu C.S., Truemper E.: Use of ketamine in asthmatic children to treat respiratory failure refractory to conventional therapy, *Critical Care Medicine* **14** (1986), 514-516.
- [38] L'Hommedieu C.S., Arens J.J.: The use of ketamine for the emergency intubation of patients with status asthmaticus, *Annals of Emergency Medicine* **16** (1987), 568-571.
- [39] Atkinson P.M, Taylor D.I., Chetty N.: Inhibition of platelet aggregation by ketamine hydrochloride, *Thrombosis research* **40** (1985), 227-234.
- [40] Heller W., Fuhrer G., Kuhner M., Seiffer U., Vontin H.: Hemostaseologic study in the use of midazolam-ketamine, *Der Anaesthesist* **35** (1986), 419-422.
- [41] Cronin M.M., Bousfield J.D., Hewett E.B., McLellan I., Boulton T.B.: Ketamine anaesthesia for radiotherapy in small children, *Anaesthesia* **27** (1972), 135-142.
- [42] Bennett J.A., Bullimore J.A.: The use of ketamine hydrochloride anaesthesia for radiotherapy in young children, *British Journal of Anaesthesia* **45** (1973), 197-201.
- [43] Krupitsky E.M., Grinenko A.Y.: Ketamine psychedelic therapy (KPT): a review of the results of ten years of research, *Journal of Psychoactive Drugs* **29** (1997), 165-183.
- [44] US Patent **3,254,124** (31.5.1966). Stevens C.L.: *Aminoketones and Methods for Their Production*.
- [45] ČR Patent **277268** (16.12.1992). Menhart V., Mitinko V.: *Process for Preparing 1-Bromocyclopentyl-2-chlorophenylketon, a Ketamine Intermediate*.
- [46] ČR Patent **226457** (19.3.1984). Rajsner M., Mikšik F.: *2-(2-chlorophenyl)-2-methylaminocyclohexanone*.
- [47] US Patent **20080268071** (30.10.2008). Gant T.G., Sarshar S.: *Substituted Cyclohexanones as NMDA Receptor Modulators and Their Preparation, Pharmaceutical Compositions and Use in the Treatment of NMDA-mediated Diseases*.
- [48] Shiue Ch., Vallabhahosula S., Wolf A.P.; Deset S.L., Fowler J.S., Schlyer D.J., Arnett C.D., Zhou Y.: Carbon-11 labeled ketamine-synthesis, distribution in mice and PET studies in baboons, *Nuclear Medicine & Biology* **24** (1997), 145-150.