

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ
ÚSTAV ORGANICKÉ CHEMIE A TECHNOLOGIE

STUDIUM AMINOLÝZY EZETIMIBU

DIPLOMOVÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Bc. Jana Baťová

VEDOUCÍ PRÁCE: Doc. Ing. Jiří Hanusek, Ph.D.

2013

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FAKULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
INSTITUTE OF ORGANIC CHEMISTRY AND TECHNOLOGY

STUDY OF AMINOLYSIS OF EZETIMIBE

MASTER THESIS

AUTHOR: Bc. Jana Baťová

SUPERVISOR: Doc. Ing. Jiří Hanusek, Ph.D.

2013

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 22.5.2013

Jana Baťová

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému vedoucímu Doc. Ing. Jiřímu Hanuskovi, Ph.D. za odborné vedení, předané vědomosti, cenné rady, obětavost a připomínky při realizaci mé diplomové práce.

Dále děkuji své rodině, drahému příteli a přátelům, kteří mi vždy byli oporou nejen při studiu, za podporu a trpělivost. V neposlední řadě děkuji i svým kolegům a celému kolektivu Ústavu organické chemie a technologie za vytvoření přátelského prostředí.

Souhrn

V první části se tato diplomová práce zabývá určením produktů hydrolyzy vznikajících v silně bazickém prostředí z Ezetimibu a strukturně podobných β -laktamů, které nemohou podléhat intramolekulárnímu přesmyku, ale pouze hydrolyze na odpovídající β -aminokyselinu. S využitím ^1H NMR, ^{13}C NMR spektroskopie, MALDI-MS a LC-MS spektrometrie byla jako produkt rozpadu Ezetimibu v koncentrovaném roztoku NaOH jednoznačně potvrzena (2*R*,3*R*,6*S*)-6-(4-fluorfenyl)-2-(4-hydroxyfenyl)-3,4,5,6-tetrahydro-2*H*-pyran-3-karboxylová kyselina. Na základě kinetických měření v těžké vodě byl určen rozpouštědlový kinetický izotopový efekt, který potvrzuje odlišný mechanismus hydrolyzy u obou substrátů. Zatímco u Ezetimibu se na rozpadu záporně nabitého intermediátu přímo podílí alkoholická OH (OD) skupina, anebo reakční cesta spočívá v rychlost určující laktonizaci laktamu, tak v případě 1-(4-fluorfenyl)-4-(4-hydroxyfenyl)-3-methylazetidín-2-onu a 1-(4-fluorfenyl)-4-(4-methoxyfenyl)-3-methylazetidín-2-onu je rychlost určujícím krokem atak hydroxidového aniontu na karbonylovou skupinu. Dále byly podrobně studovány produkty aminolýzy vznikající reakcí Ezetimibu a strukturně podobného 1-(4-fluorfenyl)-4-(4-hydroxyfenyl)-3-methylazetidín-2-onu s primárními aminy. Struktura jednotlivých β -aminoamidů byla opět potvrzena pomocí ^1H NMR, ^{13}C NMR spektroskopie a MALDI-MS spektrometrie. Studium kinetiky ve vodných roztocích primárních aminů bylo zjištěno, že molekula aminu se při aminolýze Ezetimibu i strukturně podobného β -laktamu uplatňuje pouze jako nukleofil a nikoliv jako báze a na rozpadu tetraedrálního intermediátu se nepodílí ani hydroxidový aniont. Z korelace Brønstedova typu bylo zjištěno, že reakce probíhá přes ranný tranzitní stav, v němž je vznikající vazba C–N vytvořena jen v malé míře, zatímco zanikající vazba C–N v laktamovém kruhu je prakticky nedotčena.

Klíčová slova

Ezetimib, β -laktamy, bazická hydrolyza, intramolekulární přesmyk, rozpouštědlový kinetický izotopový efekt, aminolýza β -laktamového kruhu, Brønstedova korelace.

Summary

The first part of the master thesis deals with products of hydrolysis formed in strongly basic medium from Ezetimibe and structurally related β -lactams. These β -lactams can not undergo intramolecular rearrangement but the corresponding β -amino acids are formed. The only product of Ezetimibe decomposition was (2*R*,3*R*,6*S*)-6-(4-fluorophenyl)-2-(4-hydroxyphenyl)-3,4,5,6-tetrahydro-2*H*-pyrane-3-carboxylic acid which was confirmed with the help of ^1H NMR, ^{13}C NMR spectroscopy, MALDI-MS and LC-MS spectrometry. The solvent kinetic isotope effect was measured in deuteriumoxide which showed different mechanisms of hydrolysis of all studied β -lactams. While with Ezetimibe the rate limiting decomposition of negatively charged intermediate catalyzed by OH (OD) group or lactonization of β -lactam ring occurs both 1-(4-fluorophenyl)-4-(4-hydroxyphenyl)-3-methylazetididin-2-one and 1-(4-fluorophenyl)-4-(4-methoxyphenyl)-3-methylazetididin-2-one are directly attacked by the hydroxide anion. In the next part of the thesis the products of aminolysis were prepared and characterized by ^1H NMR, ^{13}C NMR spectroscopy and MALDI-MS spectrometry. The kinetic study in aqueous solutions of primary amines shows that the rate limiting step of aminolysis involves addition of a single amine molecule to β -lactam carbonyl group. The reaction takes place through the early transition state with respect to amide bond forming and β -lactam bond breaking process.

Keywords

Ezetimibe, β -lactams, basic hydrolysis, intramolecular rearrangement, solvent kinetic isotope effect, aminolysis of β -lactams ring, Brønsted correlation.

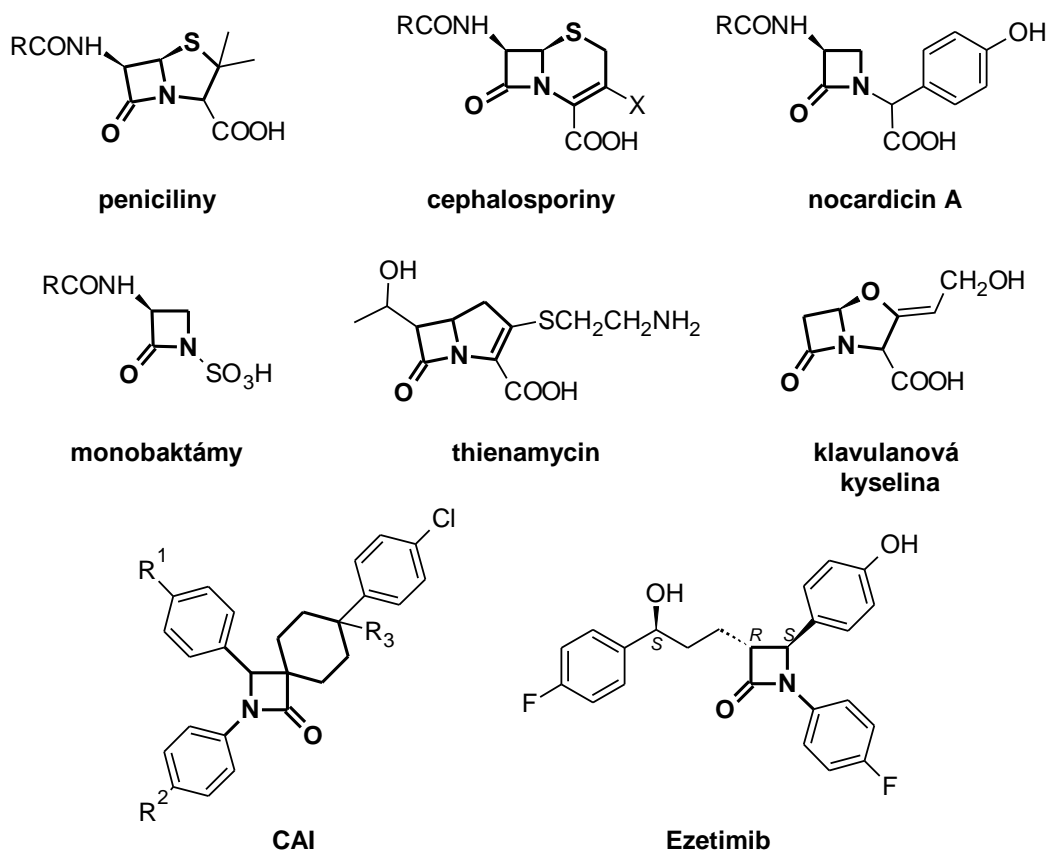
Obsah

1	Úvod	9
2	Teoretická část.....	11
2.1	Mechanismy aminolýzy β -laktamu.....	11
2.1.1	Spřažený vs. postupný mechanismus	12
2.1.2	Aminem a vodou asistovaná aminolýza	14
2.1.3	Intramolekulárně obecně bazicky katalyzovaná aminolýza	18
2.1.4	Intramolekulárně obecně kyselě katalyzovaná aminolýza	18
2.1.5	Aminolýza za přítomnosti kovových iontů	19
2.1.6	Aminolýza β -laktamů pomocí polyelektrolytů	20
2.1.7	Micelárně katalyzovaná intramolekulární aminolýza	21
2.1.8	Transamidační reakce β -laktamů	22
2.1.9	Určení mechanismu aminolýzy pomocí Brønstedových hodnot β_{Nuc}	23
3	Experimentální část.....	24
3.1	Substráty a činidla	24
3.2	NMR spektroskopie	24
3.3	Hmotnostní spektrometrie MALDI.....	24
3.4	Syntéza substituovaných β -laktamů	25
3.4.1	Příprava <i>Schiffových</i> bází	25
3.4.2	Příprava substituovaných β -laktamů	26
3.4.3	Odstranění chránicí benzylové skupiny	27
3.5	Alkalická hydrolýza Ezetimibu a β -laktamu	28
3.5.1	Hydrolýza Ezetimibu v methanolickém roztoku NaOH	28
3.5.2	Hydrolýza β -laktamů IV, V ve vodném roztoku NaOH	30
3.6	Aminolýza Ezetimibu a β -laktamů	32

3.6.1	Aminolýza Ezetimibu reakcí s primárními aminy	32
3.6.2	Aminolýza β -laktamů IV, V reakcí s primárními aminy	35
3.7	Kinetická měření.....	37
4	Výsledky a diskuse	38
4.1	Zhodnocení syntézy připravených sloučenin	38
4.2	Hydrolyza	39
4.3	Aminolýza.....	44
5	Literatura:	50

1 Úvod

Před více než 80 lety Sir Alexander Fleming pozoroval antibakteriální aktivitu penicilinu.¹ Od té doby dosáhly penicillin a ostatní antibiotika s antibakteriálním účinkem rozsáhlého využití v medicíně. Dnes již existuje široká skupina antibiotik, jejichž hlavním strukturním rysem je přítomnost β -laktamového kruhu (viz obr. 1). Do této skupiny tedy patří již zmíněné peniciliny (penamy), dále například cephalosporiny (cephemy), monobaktámy, mezi které patří nocardicin A a β -laktam kyseliny sulfaminové, karbapenemy např. thienamycin, oxapenamy, kterým je např. klavulanová kyselina a další třídy antibiotik jako inhibitory β -laktamázy.² Kromě antibiotik se β -laktamový kruh objevuje i u léčiv sloužících k redukcí hladiny cholesterolu kde působí jako inhibitor intestinální absorpce cholesterolu (CAI). Do této skupiny léčiv patří například azaspirosloučenina obsahující β -laktamový kruh a Ezetimib^{3,4} jehož reaktivitou – jmenovitě hydrolýzou a aminolýzou – se zabývá tato diplomová práce.



Obr. 1 Léčiva s β -laktamovým kruhem.

Je známo, že aminolýza i hydrolýza patří mezi běžné reakce probíhající v živých organismech a je součástí řady metabolických pochodů. I při alergické reakci na penicilin je hlavním

antigenním ukazatelem tvorba amidické vazby mezi původním penicilovým karbonylem a ϵ -amino skupinou lysinového zbytku v plasmovém proteinu HSA (human serum albumin) jako výsledek aminolytické reakce β -laktamového kruhu.⁵

Z těchto důvodů jsem se v rámci řešení tématu této diplomové práce podrobně zabývala detailním studiem vznikajících produktů aminolýzy a hydrolýzy Ezetimibu a dvou strukturně příbuzných β -laktamů s pomocí kinetických metod. Reaktivita těchto látek je dána přítomností laktamového uskupení, na které lze pohlížet jako na cyklické amidy. Amidy jako takové jsou obecně méně reaktivní vůči ataku nukleofilu než ketony a to díky rezonanční stabilizaci volného elektronového páru na dusíku.² V případě, že je delokalizaci volného elektronového páru zabráněno, a nemůže tedy docházet v průběhu reakce k rezonanční stabilizaci, vzrůstá jejich reaktivita až 10^{13} -krát.⁶ Deformační energie u čtyřčlenných kruhů způsobuje, že reakce zahrnující jejich otevření je až 10^{20} -krát rychlejší než u analogických acyklických systémů.⁷ Z těchto důvodů je β -laktamový kruh více reaktivní vůči nukleofilům než jsou klasické amidy. Zvýšení rychlosti ovšem také závisí na substituci karbonylového uhlíku a amidického dusíku.²

2 Teoretická část

2.1 Mechanismy aminolýzy β -laktamu

Aminolýza β -laktamového kruhu patří mezi nukleofilní substituční reakce, kde na karbonylu β -laktamu dochází k tvorbě nové kovalentní vazby mezi uhlíkem karbonylu a atakujícím nukleofilem a zároveň ke štěpení původní C–N vazby β -laktamu.⁸ V rámci tohoto procesu dochází k proton transferu z dusíku atakujícího aminu na dusík odstupující amino skupiny.⁹ Vzhledem k malé změně volné energie dochází u necyklických amidů k transamidačnímu procesu za standardních podmínek obtížně, ovšem v případě β -laktamu je tomu naopak. Otevření β -laktamového kruhu je doprovázeno rozsáhlým uvolněním deformační energie, což činí reakci proveditelnou za podmínek termodynamické kontroly.¹⁰

Aminolýza β -laktamových sloučenin byla experimentálně studována pro lepší pochopení dalších biochemických pochodů. K degradaci β -laktamových sloučenin ve vodném roztoku aminů dochází různými reakčními cestami v závislosti na jejich pK_a , koncentraci a pH použitých vodných roztoků primárních monoaminů. Experimentálně sledovaná pozorovaná rychlostní konstanta pseudoprvního řádu k_{poz} sestává ze čtyř členů korespondujících souběžně probíhajícím reakčním procesům v průběhu aminolýzy dle rovnice (1):¹¹

$$k_{poz} = k_0 + k_1[RNH_2] + k_2[RNH_2]^2 + k_3[RNH_2] \cdot [OH^-] \quad (1)$$

kde k_0 je rychlostní konstanta prvního řádu pro hydrolytickou reakci, která často tvoří méně než 15 % celkové hodnoty k_{poz} . Výjimkou jsou reakce probíhající při vysokých hodnotách pH, kde je bazická hydrolýza hlavním probíhajícím procesem. Rychlostní konstanty, které korespondují nekatalyzovaným (k_1) a aminem katalyzovaným (k_2) aminolýzám, převládají v případě, kdy je reakce prováděna za biologicky relevantních, slabě bazických podmínek v rozmezí pH 6-8. Silně bazické aminy nejvíce přispívají k aminolytické reakci katalyzované aminem (k_2) a hydroxidem (k_3), přičemž člen k_2 je významnější v případě vzrůstající koncentrace aminu.^{5,11}

2.1.1 Spřažený vs. postupný mechanismus

Otevření β -laktamového kruhu v průběhu ammonolytického či aminolytického procesu bylo studováno prostřednictvím různých kvantově chemických metod jako vstupní informace pro pochopení aminolytické reakce. Průzkum potenciálové hyperplochy (PES) koresponduje s nekatalyzovanou ammonolýzou a aminolýzou a poskytl dvě možné reakční cesty pro oba procesy (viz schéma 1).¹⁰

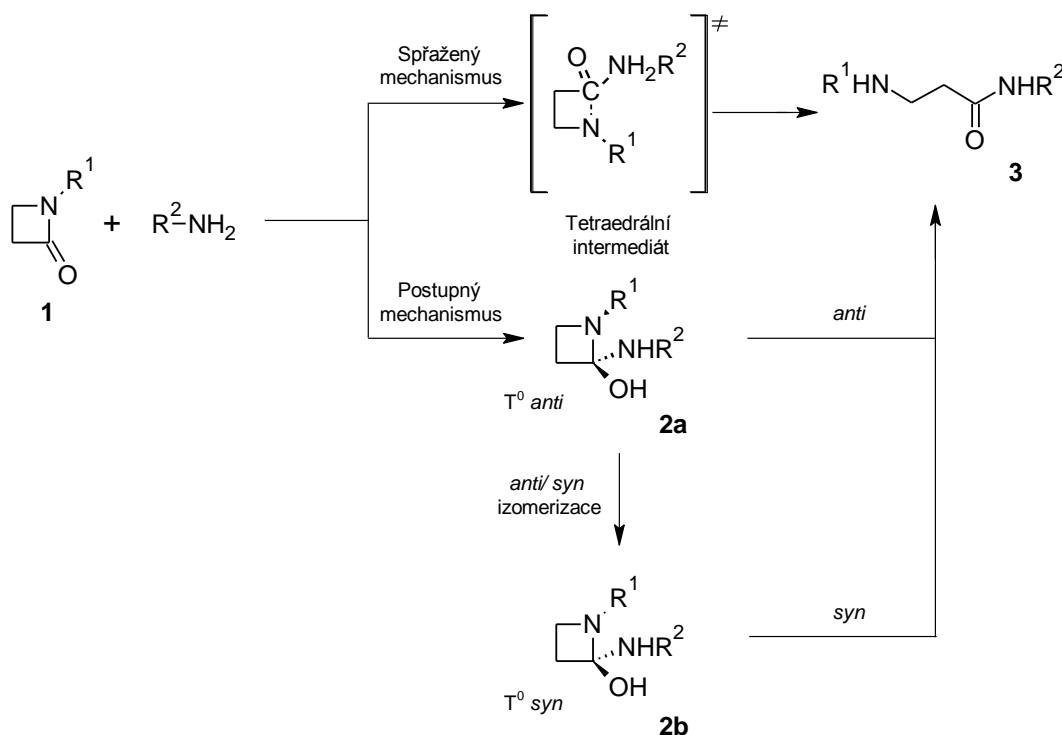


Schéma 1 Mechanismy aminolýzy.

To, jakým mechanismem bude reakce probíhat, závisí především na stabilizaci tranzitního stavu a tedy na nukleofilitě atakujícího a nukleofugalitě odstupujícího aminu. První mechanismus odpovídá spřažené 1,2-adici $R-NH_2$ na amidickou C–N vazbu v *syn*-periplanárním uspořádání s ohledem na volný elektronový pár na dusíku β -laktamu 1. Mechanismus probíhá za současného štěpení β -laktamového kruhu a přenosu protonu na odstupující amino skupinu.¹⁰ Tímto mechanismem reagují například substituované *N*-aroyl β -laktamy, bicyklické β -laktamy jako jsou cephalosporiny, penemy, karbapenemy a jim podobné látky.^{5,8}

V průběhu spřaženého mechanismu dochází současně k tvorbě vazby mezi atakujícím nukleofilem a karbonylovým uhlíkem a ke štěpení endocyklické C–N vazby. Tento mechanismus nezahrnuje reakční intermediát, ale pouze tranzitní stav, jehož náboj je delokalizován na atakujícím nukleofilu i na odstupující aminové skupině.⁸

Ovšem nejvíce preferovaná reakční cesta probíhá skrze postupný mechanismus zahrnující neutrální *syn* tetraedrální intermediát \mathbf{T}^0 *syn* **2a**, který je tvořen po adici aminu na karbonylovou funkci amidu s přenosem protonu na karbonylový kyslík. Ze *syn* intermediátu **2a**, případně *anti* intermediátu **2b**, poté vzniká přenosem protonu mezi hydroxy skupinou a vznikající amino skupinou za současného štěpení endocyklické C–N vazby produkt 3-aminopropanamid (β -aminoamid) **3**.⁹

Tento mechanismus aminolýzy je upřednostňován penicilinovými antibiotiky, monocyklickými β -laktamy jako jsou *N*-aryl β -laktamy, karboxypenemy, ale i jiné funkční deriváty karboxylových kyselin, aldehydů a ketonů.^{12,13}

U postupného mechanismu nejprve dochází k tvorbě vazby mezi atakujícím nukleofilem a karbonylovým uhlíkem před štěpením původní endocyklické C–N vazby za vzniku zwitterionového tetraedrálního intermediátu (\mathbf{T}^\pm). Aminolytická reakce poskytující korespondující β -aminoamid **3** tedy vyžaduje alespoň dva proton transfery, tj. odštěpení protonu z atakujícího aminu a adici protonu na odstupující amino skupinu.⁸

Předpokládá se, že atom dusíku atakujícího aminu nese v tranzitním stavu rychlost určujícího stupně jednotkový pozitivní náboj. To je v souladu s postupným mechanismem probíhajícím skrze zwitterionový tetraedrální intermediát $\mathbf{2c} \equiv \mathbf{T}^\pm$ (viz schéma 2) navržený jak pro nekatalyzovanou aminolýzu, tak i pro specificky a obecně bazicky katalyzovanou aminolýzu všech typů β -laktamových sloučenin.⁵ Jedná se o velmi nestabilní intermediát s krátkou dobou životnosti před fragmentací na reaktanty a to dokonce i v silně polárním prostředí. Proto je tvorba komplexu mezi zwitterionem a bazickým katalyzátorem a jeho následné rozložení na produkty velmi nepravděpodobný reakční sled.¹¹

Na probíhající mechanismus má také vliv nukleofilita použitého aminu či nukleofugalita odstupující skupiny. To se může projevit změnami v Brønstedových β_{Nuc} a β_{lg} hodnotách reakce a tento efekt může být ilustrován prostřednictvím Jencks-More O'Ferrallova diagramu. Ten v podstatě popisuje jakým mechanismem může být odštěpen záporně nabitý dusík odstupující amino skupiny, zda asociativním postupným mechanismem, disociativním postupným mechanismem či spřaženým mechanismem (viz schéma 2).⁸

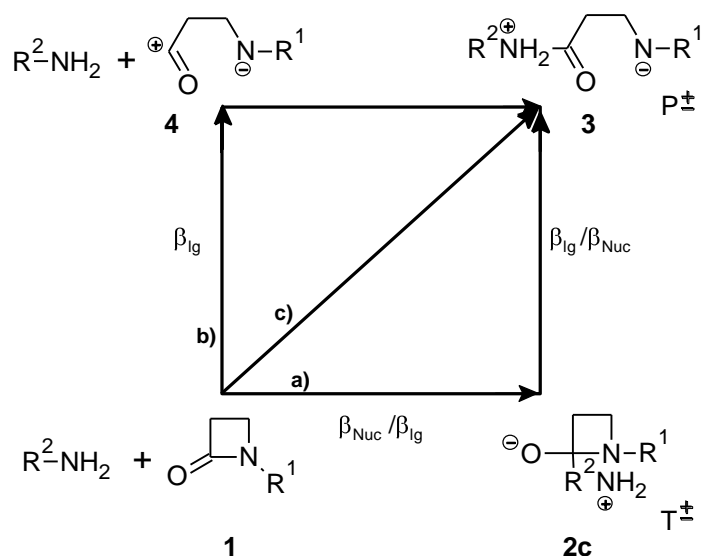


Schéma 2 Jencks-More O'Ferrallův diagram

Při asociativním mechanismu (a) reakce zahrnuje tvorbu tetraedrálního zwitteriontového intermediátu **2c** mezi aminovým nukleofilem a β -laktamem **1**, který následně odštěpí konjugovanou bázi aminu **3** $\equiv P^\ddagger$. V případě disociativní cesty (b) vzniká současně konjugovaná báze aminu a acyliový kation **4**, který je až po té podroben ataku nukleofilu. V případě, že je na dusíku odstupující amino skupiny elektronakceptorní substituent, dochází ke stabilizaci intermediátu **4**, naopak tetraedrální intermediát **2c** tento typ substituce destabilizuje.⁸ V obou případech se tranzitní stav spíše přibližuje intermediátu **4**, tento jev se nazývá Thorntonův efekt.¹⁴ Dochází tak ke snížení hodnoty β_{Nuc} v důsledku zvyšující se acidity odstupující skupiny. Reakční cesta po diagonále (c) nezahrnuje žádný intermediát, dochází ke vzniku a zániku vazby současně a jedná se proto o spřažený mechanismus. Tento mechanismus podporuje zvyšující se bazicita nukleofilu, která může stabilizovat zwitteriontový produkt **3**. Vyšší bazicita aminu také může stabilizovat tetraedrální intermediát **2c**, tudíž bude upřednostněna reakční cesta (a). V důsledku toho bude docházet ke snížení hodnoty β_{lg} .⁸

2.1.2 Aminem a vodou asistovaná aminolýza

Již dříve bylo předpokládáno, že aminolýza β -laktamu probíhá mechanismem, ve kterém buď molekula vody či molekula druhého aminu může vystupovat jako bifunkční katalyzátor, který asistuje proton transferu z atakujícího aminu na odstupující amino skupinu.⁵

a) Spřažený mechanismus

Tranzitní stav v rychlost určujícím stupni je charakterizován téměř dotvořenou N(amin)–C(β-laktam) vazbou, zatímco čtyřčlenný kruh je již z velké části rozštěpený. Tento tranzitní stav má pozitivní náboj na nukleofilní částici (specifická bazická katalýza) nebo na katalyzujícím aminu (obecná bazická katalýza), což koreluje s kladnými hodnotami Brønstedových β (viz schéma 3).⁵

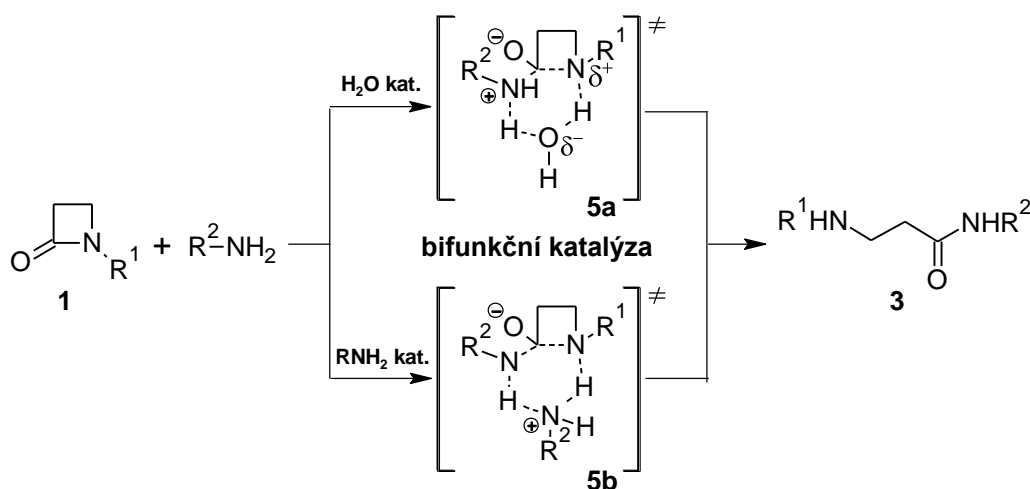


Schéma 3 Vodou či druhou molekulou aminu katalyzovaná aminolýza při spřaženém mechanismu.

Při aminolýze katalyzované molekulou vody dochází nejprve ke vzniku prereaktivního komplexu **C**, který je více stabilní než separované reaktanty. Komplex představuje vazbu aminu k β-laktamu **1** prostřednictvím slabé $CH\cdots O$ a $CH\cdots N$ vodíkové vazby, zatímco katalyzující molekula vody spojuje amino skupinu atakujícího aminu s amidickým atomem dusíku β-laktamu **1** skrze $NH\cdots O$ a $H\cdots N$ vodíkové vazby. Spřažený mechanismus probíhá přes tranzitní stav **5a**, který je charakterizován tvorbou C(β-laktam)–N(amin) kratší než je samotná endocyklická C–N vazba, která se poté štěpí a vzniká tak produkt aminolýzy **3**. Z vazebné vzdálenosti a atomového náboje je patrné, že katalyzující molekula vody má v tranzitním stavu značný hydroxidový charakter.¹²

V případě aminolýzy katalyzované druhou molekulou aminu je průběh reakce velmi podobný. I zde nejprve intermolekulárně vzniká prereaktivní komplex **C**, který je tvořen slabou vodíkovou vazbou mezi dusíkem katalyzujícího aminu a amidickým dusíkem β-laktamu **1** ($NH\cdots N$), dále mezi dusíkem atakujícího nukleofilu a uhlíkem methylenové skupiny β-laktamu **1** ($CH\cdots N$) a navíc vzniká slabá vazebná interakce mezi methylenovou skupinou atakujícího aminu a karbonylovým kyslíkem β-laktamu **1** ($CH\cdots O$). Tento komplex dále přechází na tranzitní stav **5b**. V případě ammonolytické reakce lze tranzitní stav znázornit

jako velmi napjatou strukturu s částečně vytvořenou jednoduchou C–N vazbou, zatímco endocyklická C–N vazba je stěží rozštěpena. Po dokončení přenosu protonu a otevření β -laktamového kruhu prodloužením štěpené C–N vazby dojde ke vzniku produktu **3**.¹⁵

b) Postupný mechanismus

Jak již bylo zmíněno, tento mechanismus zahrnuje tvorbu tetraedrálního intermediátu **2c**, který je v případě katalýzy molekulou vody následován difúzí hydroxidového aniontu k intermediátu. Následně dochází k rychlému proton transferu z tetraedrálního intermediátu na hydroxidový aniont a k následnému rozpadu na produkty dle schématu 4. Toto reakční schéma bylo potvrzeno u penicilinů a cephalosporinů. Analogický mechanismus můžeme pozorovat i u aminolýzy katalyzované druhou molekulou aminu. Rozdílem je, že jako akceptor protonu zde nevystupuje hydroxidový aniont, nýbrž obecná báze B (amin).^{13, 16}

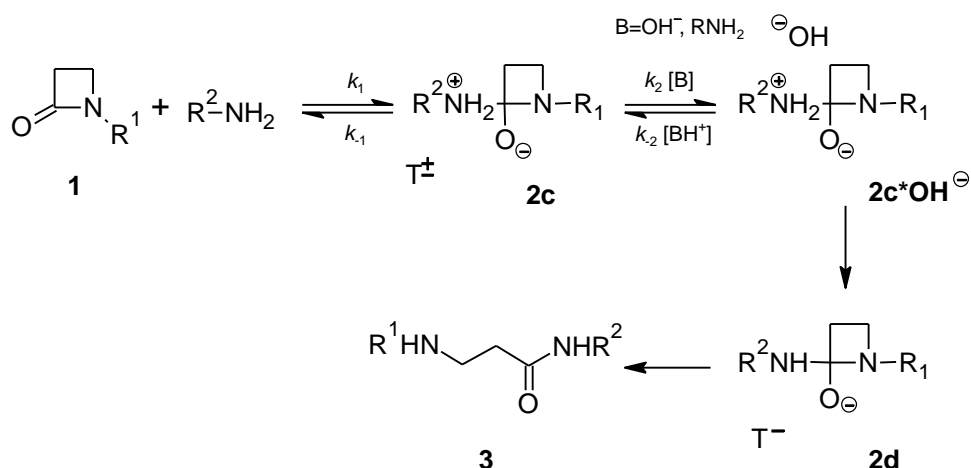


Schéma 4 Vodou či druhou molekulou aminu katalyzovaná aminolýza při postupném mechanismu.

Mechanismus aminolýzy katalyzované vodou či druhou molekulou aminu může probíhat dvěma reakčními cestami *anti* a *syn*, začínajícími ze stejného prereaktivního komplexu **C**. Ten je charakterizován slabou vodíkovou vazbou mezi aminem a methylenovou skupinou β -laktamu $CH\cdots N$, zatímco molekula katalyzující vody (aminu) tvoří vodíkovou vazbu s karbonylovým atomem kyslíku $OH\cdots O$ ($NH\cdots O$). Následuje tvorba tranzitního stavu **T[‡]** adicí N–H vazby aminu na karbonylový uhlík β -laktamu asistovaný vodou (aminem), kde je atakující amin v *syn*-periplanárním uspořádání vzhledem k volnému elektronovému páru endocyklického dusíku. V tomto tranzitním stavu je C–N vazba téměř vytvořena, zatímco přesun vodíku z atakujícího aminu na hydroxy (amino) skupinu je v méně pokročilém stadiu. Tranzitní stav **T[‡]** vzniká tak, aby neutrální tetraedrální intermediát **2a** (viz schéma 1),

ve kterém hydroxy skupina a volný elektronový pár endocyklického dusíku zaujímaly *anti*-periplanární uspořádání. K tomuto intermediátu **2a** je katalyzující molekula vody (aminu) vázána dvěma typickými OH...O (OH...N) a OH...N (NH...N) vodíkovými vazbami. Tento první krok je společný pro oba postupné mechanismy (*syn* i *anti*).^{12,15}

V postupném *anti*-mechanismu se **2a** intermediát přeměňuje v další tranzitní stav T^\ddagger přenosem vodíku z hydroxy skupiny na endocyklický dusík prostřednictvím molekuly vody (aminu). Vzhledem k tomu, že v tomto tranzitním stavu zůstává orientace hydroxy skupiny *anti*-periplanární vůči volnému elektronovému páru endocyklického dusíku, přesun vodíku probíhá mezi dvěma stranami kruhu. Na závěr je endocyklická C–N vazba rozštěpena a vzniká tak finální produkt aminolýzy **3**. Rychlost určující stupeň tohoto mechanismu je tvorba druhého tranzitního stavu T^\ddagger .^{12,15}

Alternativou je postupný *syn*-mechanismus, kde intermediát **2a** podléhá inverzi volného elektronového páru endocyklického dusíku za tvorby dalšího tranzitního stavu T_i^\ddagger , ze kterého dále vzniká druhý konformer **2b**. Následné intermolekulární přeskupení vodíkové vazby mezi katalyzující vodou (aminem) a intermediátem **2b** přes tranzitní stav T_H^\ddagger vzniká třetí konformer. Následuje finální otevření β -laktamového kruhu přes *syn*-periplanární tranzitní stav T^\ddagger . Jako výsledek *anti/syn* izomerizace přes T_i^\ddagger probíhá přesun vodíku na jedné straně kruhu.^{12,15}

Z profilu Gibbsových energií^{12,15} je patrné, že mechanismus, kterým přednostně probíhá aminolýza β -laktamu katalyzovaná vodou či druhou molekulou aminu je *syn*-postupný mechanismus, kde je rychlost limitujícím stupněm tvorba T^\ddagger při přeměně prereaktivního komplexu v intermediát **2a**.^{12,15}

Katalytická úloha molekuly vody a druhého aminu

Katalyzující částice má ve všech tranzitních stavech obecně bazicky katalyzované aminolýzy zjevně kationický charakter RNH_3^+ v souladu s bazicitou daného aminu.^{11,12} Naproti tomu molekula vody u specificky bazicky katalyzované aminolýzy má různý charakter v závislosti na uvažovaném tranzitním stavu. Určení katalyzující částice u molekuly vody je složitější v tom smyslu, že molekula vody je vždy přítomna v kombinaci dvou různě nabitých částic a může tedy vzhledem k jejímu amfoternímu charakteru vystupovat jako OH^- , H_2O či H_3O^+ . V případě TS_1 má katalyzující částice charakter mezi OH^- a H_2O , u TS_2 -*anti* spíše mezi H_2O a H_3O^+ a v případě TS_2 -*syn* se její charakter blíží OH^- .^{11,12}

2.1.3 Intramolekulárně obecně bazicky katalyzovaná aminolýza

Tento typ katalýzy byl pozorován u reakce β -laktamu jako je penicilin a benzylpenicilin s ethylendiaminem, jehož hodnota pK_a je 10,07. Hodnoty β ukazují, že i v tomto případě reakce probíhá spíše mechanismem postupným než spráženým a reakce tudíž reprezentuje další příklad reakční cesty zahrnující proton transfer. Jako důkaz pro intramolekulárně obecně bazicky katalyzovanou aminolýzu druhým dusíkem v ethylendiaminu je urychlení reakce. Rychlostní konstanta k_1 pro tuto reakci je alespoň 30-krát vyšší než pro reakci β -laktamu s primárními monoaminy se stejnou bazicitou.¹⁷

2.1.4 Intramolekulárně obecně kyselě katalyzovaná aminolýza

Reakcí jednonásobně protonovaného ethylendiaminu s benzylpenicilinem dochází k urychlení aminolytické reakce. Vyplyvá to z hodnot rychlostních konstant k_1 získaných při měření v roztoku pufru jednonásobně protonovaného ethylendiaminu, které jsou zhruba 100-násobně vyšší ve srovnání s hodnotami k_1 monoaminů stejné bazicity. Toto urychlení je připisováno intramolekulárně obecně kyselě katalyzované aminolýze protonovaným aminem.¹⁸ Tento mechanismus též zahrnuje proton transfer na dusík β -laktamu, ovšem nemá detekovatelný podíl na rychlosti reakce ve srovnání s primárními monoaminy. Aplikace principu mikroskopické reversibility navíc ukazuje, že směr nukleofilního ataku na karbonylový uhlík probíhá z méně bráněné strany (*anti*-periplanární) vůči volnému elektronovému páru na endocyklickém dusíku, což je v rozporu s původní teorií stereoelektronické kontroly. Stejný typ katalýzy byl potvrzen i u reakce benzylpenicilinu a cephaloridinu s hydroxylaminem.¹⁹ Zde bylo prokázáno zvýšení rychlosti 10^4 - 10^6 -krát ve srovnání s rychlostí reakce primárních monoaminů. Tento fakt je v souladu s rychlost určující tvorbou tetraedráního intermediátu **2e** a náhlým obecně kyselě katalyzovaným rozštěpením intermediátu.^{18,19}

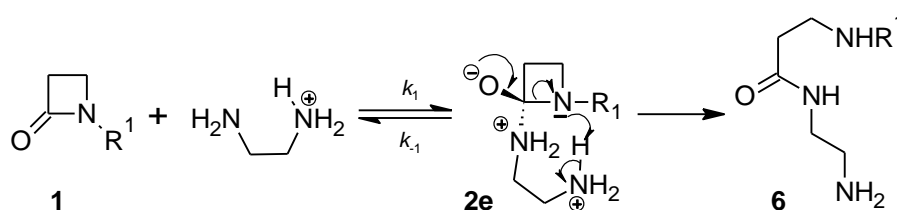


Schéma 5 Mechanismus obecně kyselě katalyzované aminolýzy.

Aminolýza probíhá skrze tvorbu tetraedráního intermediátu **2e**, ve kterém je vazba atakujícího nukleofilu ke karbonylovému uhlíku dotvořena dříve než je rozštěpena endocyklická C–N vazba. Rozštěpení intermediátu **2e** na β -aminoamid **6** je značně usnadněno donací protonu z terminální protonované amino skupiny ethylendiaminu na β -laktamový dusík. Tento proton transfer určuje geometrii intermediátu **2e**.¹⁸

2.1.5 Aminolýza za přítomnosti kovových iontů

Existuje několik teorií, jak jsou tvořeny peniciloyl amidy **8**, zda řízenou aminolýzou penicilinů nebo reakcí amino sloučeniny s penicilanovou kyselinou (**7**) vznikající přeskupením penicilinu. Alternativní cesta zasluhující pozornost zahrnuje tvorbu ketenového intermediátu **9**, který poté rychle reaguje s aminem (viz schéma 6). K potvrzení jednoznačného mechanismu aminolýzy bylo nutné provést kinetická měření. Ta byla prováděna v přítomnosti Cu^{2+} iontů jako katalyzátoru.²⁰

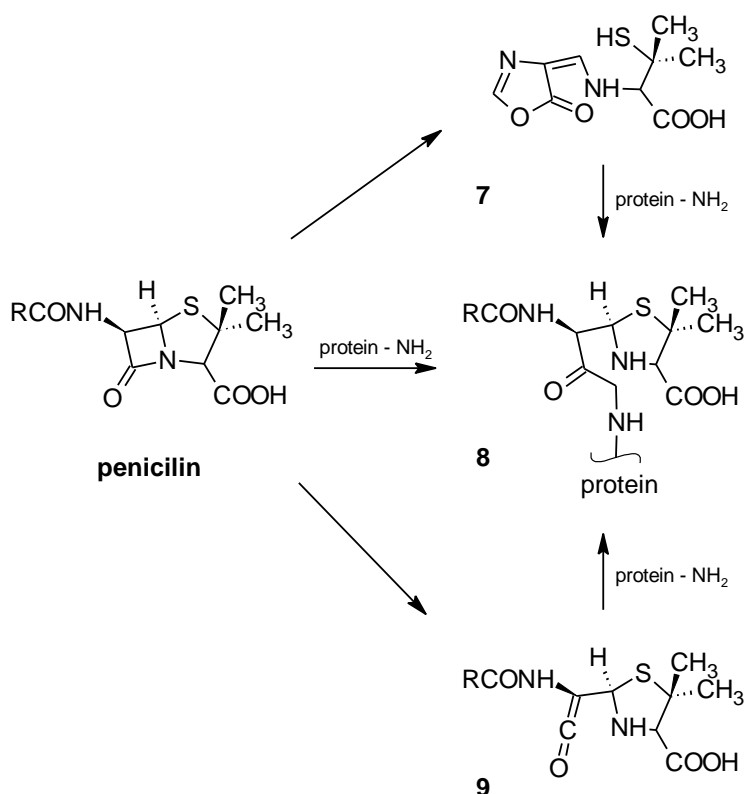


Schéma 6 Mechanismy aminolýzy penicilinu.

Neplanarita penicilinu může způsobovat snadnější dostupnost volného elektronového páru endocyklického dusíku pro koordinaci kovovým iontem. Penicillin tak může vystupovat jako bidentátní chelatující ligand prostřednictvím β -laktamového dusíku a sousední karbonylové

skupiny k iontu kovu.²⁰ Po vytvoření komplexu **10** mezi penicilinem a Cu^{2+} ionty je po ataku aminového nukleofilu (viz schéma 7) reakce $3\text{-}9 \times 10^7$ -krát rychlejší než reakce s nekoordinovaným penicillinem.²¹ Koordinace antibiotika je navíc možná i prostřednictvím ionizace karboxy skupiny. V případě jejího zablokování metylací za vzniku methyl esteru se rychlost reakce sníží, přesto je ale ve srovnání s nekatalyzovanou reakcí 10^3 -krát rychlejší.²⁰

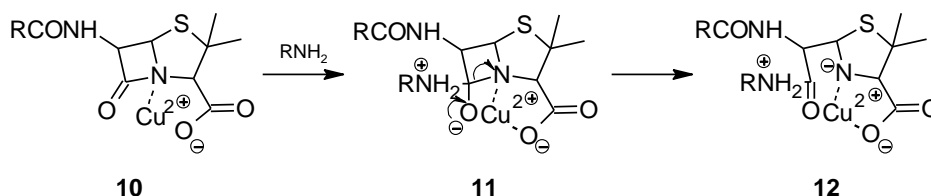
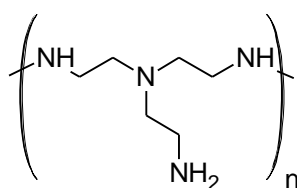


Schéma 7 Mechanismus aminolýzy za katalýzy Cu^{2+} iontů.

Koordinace kovového iontu usnadňuje atak karbonylové funkce nukleofilem zvýšením elektrofilyty karbonylového uhlíku a také usnadňuje štěpení C–N endocyklické vazby β -laktamu **11**. Koordinované Cu^{2+} ionty tak stabilizují odstupující amido skupinu komplexu **12**, tudíž zvyšují rychlost štěpení β -laktamové C–N vazby. Rychlost limitujícím krokem při měďnatým iontem katalyzované aminolýze je tedy štěpení intermediátu **11**. Koordinace kovového iontu ukazuje, že již není nezbytná jiná běžná katalýza u aminolýz, tedy obecně či specificky bazická.²⁰

2.1.6 Aminolýza β -laktamů pomocí polyelektrolytů

Doposud byly studie zaměřené na efekt polyelektrolytů při rozkladu β -laktamového kruhu nedostačující. Vzhledem k významnosti aminolýzy β -laktamů při pochopení alergických reakcí, které mohou být vyvolány léčivy, byly prováděny kinetické studie za cílem objasnit mechanismus zahrnující acyl transfer v přítomnosti poly(ethyleniminu) (PEI). Jedná se o vysoce rozvětvený polyelektrolyt **13** obsahující z 25 % primární, 50 % sekundární a 25 % terciární amino skupinu.²²



13

Obr. 2 Molekula poly(ethyleniminu) (PEI).

Studie byla prováděna na aminolýze benzyloxybenzylpenicilinu (BP) v přítomnosti PEI, kde dochází k velkému zvýšení rychlosti reakce, která probíhá postupným mechanismem bez obecné kyselé či bazické katalýzy. Rychlost určujícím stupněm je tedy rozklad tetraedráního intermediátu (T^\ddagger). Jednoduchý mechanismus vysvětluje chování zahrnující tvorbu reaktivního komplexu [BP-PEI]* mezi substrátem a PEI. Tento komplex se poté přeměňuje v produkt **P**, neboli poly(ethylenimin)peniciloylamid, nebo se aduje na další molekulou PEI a vytváří nereaktivní komplex [BP-PEI], jak je naznačeno ve schématu 8. Avšak pouze reaktivní komplex je možné rozložit na finální produkt.²²

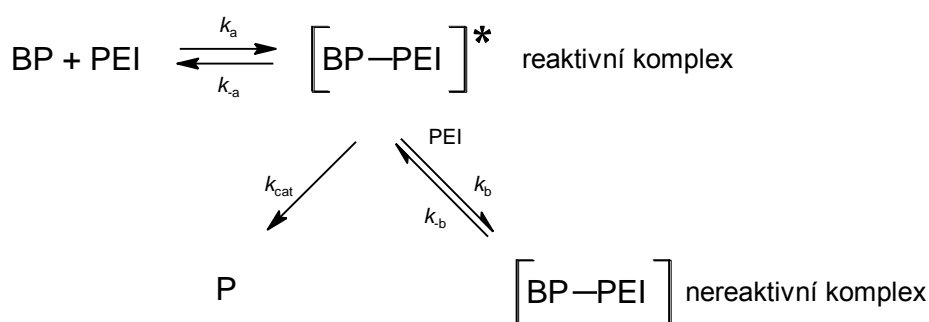


Schéma 8 Aminolýza BP pomocí polyelektrolytu PEI.

Katalytická schopnost polyelektrolytu spočívá jednak v navázání substrátu k polymeru, a dále ve zvýšení reaktivity vzniklého komplexu. Nejpravděpodobněji je substrát více přitahován k polyelektrolytu v méně polárním prostředí. Vznikající tetraedrání intermediát je zde stabilizován elektrostatickými interakcemi a/nebo vodíkovou vazbou, která brání rozpadu intermediátu na výchozí látky. V přítomnosti KCl, kde chloridový aniont svou vysokou hustotou náboje neslouží pouze k ochraně pozitivního náboje makroiontu, ale také způsobuje silné elektrostatické uspořádání molekul vody v blízkosti polyelektrolytu. V důsledku toho je vodíková vazba rozštěpena a stabilizující interakce jsou redukovány. PEI se poté chová jako jednoduchý amin.²²

2.1.7 Micelárně katalyzovaná intramolekulární aminolýza

Detergenty, široce používané při přípravě farmak, mohou postihovat stabilitu léčiv a mít kontrolu nad rychlostí a mechanismem jejich rozkladu. A právě intramolekulární degradace cephalosporinových léčiv může být katalyzována pozitivně nabitými hexadecyltrimethylammonium bromidovými (CTAB) micelami.²³

Mechanismus intramolekulární aminolýzy zahrnuje proton transfer, který může být rychlost limitujícím stupněm. Rychlost intramolekulární aminolýzy zahrnující atak aminového nukleofilu na karbonylový uhlík byla zvýšena více než 50-krát i s pomocí neutrálních (polyoxyethylen-23 lauryl ether; Brij) a zwitteriontových [3-(*N*-dodecyl-*N,N*-dimethylammonium)propan-1-sulfonát; SDP] micel, které zároveň snižují energii proton transferu.

Micelární efekt při intramolekulární degradaci cephalosporinů spočívá především ve stabilizaci reaktivní konformace antibiotika na povrchu micel.²³

2.1.8 Transamidační reakce β -laktamů

Rozšíření β -laktamových kruhů za účelem získání středně velkých kruhů probíhá z *N*-halogenalkyl derivátu **15** prostřednictvím intramolekulární transamidace (viz schéma 9), která je řízena deformační energií čtyřčlenného kruhu. Byly prováděny i pokusy k získání větších kruhů, což usnadnilo pochopení stability β -laktamů vůči aminolytickým reakcím.²⁴

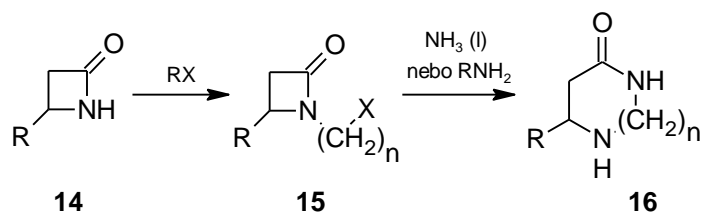


Schéma 9 Mechanismus expanze kruhu.

Dříve popsané reakce ukazují, že reakcí *N*-halogenalkyl- β -laktamu **15** s kapalným amoniakem či jiným alkylaminem poskytují sedmi-, osmi- a devítičlenné laktamy **16**, avšak inzercí aminopentylové jednotky k získání desetičlenného kruhu nebylo úspěšné. Překvapivě lze stabilitu β -laktamů vůči aminolýze zvýšit zavedením elektronakceptorní skupiny na endocyklický dusík.²⁴

2.1.9 Určení mechanismu aminolýzy pomocí Brønstedových hodnot β_{Nuc}

Shrnutí výše uvedených experimentálních poznatků je uvedeno v tabulce 1.

Tab. 1 Shrnutí Brønstedových hodnot β_{Nuc}

Mechanismus	β_{Nuc}	Látky
<i>Spřažený:</i>	Beze změny RUS	
a) nekatalyzovaný	0,85 - 0,90 (v závislosti na nukleofilitě aminu)	<i>N</i> -aroyl β -laktamy
b) katalyzovaný	0 – 1,0	bicyklické β -laktamy – cephalosporiny, penemy, karbapenemy, 3 α -karboxypenamy
<i>Postupný:</i>	Se změnou RUS	
a) nekatalyzovaný		–
b) katalyzovaný	Hodnoty blízké 1,0	6- β -aminopenicilánová kyselina, benzylpenicilin, cephalosporiny, <i>N</i> -4-nitrofenylazetidín-2-on
<i>Intramolekulárně katalyz. postupný:</i>	Se změnou RUS	
a) obecně bazicky	0,97; 1,0	<i>N</i> -aryl β -laktam; benzylpenicilin
b) specificky bazicky	0,75; 1,1	
Cu ²⁺ katalyzovaný postupný:		
	0,87	penicilin

3 Experimentální část

3.1 Substráty a činidla

Čistý (>99.9%) Ezetimib (VI) byl získán od společnosti Zentiva (součást skupiny Sanofi-Aventis). Všechna rozpouštědla byla zakoupena od společnosti Merck či Sigma-Aldrich a byla v HPLC resp. spektroskopické kvalitě. Všechna ostatní činidla a chemikálie použité při výzkumu byly analytické kvality.

3.2 NMR spektroskopie

^1H a ^{13}C -NMR spektra byla měřena za pomoci spektrometru Bruker Avance 3 při frekvencích 400,13 MHz (^1H) a 100,62 MHz (^{13}C). Pro měření byly použity roztoky látek v hexadeuterio-dimethylsulfoxidu (DMSO- d_6), deuteriochloroformu (CDCl_3 - d_1) a tetradeuteriomethanolu (CD_3OD - d_4). Chemické posuny δ jsou vztahovány k píku reziduálního rozpouštědla $\delta(\text{DMSO-}d_6) = 2,50$ (^1H) a 39,6 (^{13}C) ppm, $\delta(\text{CDCl}_3$ - $d_1) = 7,25$ (^1H) a 77,0 (^{13}C) ppm a $\delta(\text{CD}_3\text{OD-}d_4) = 3,31$ (^1H) a 49,15 (^{13}C) ppm. Interakční konstanty J jsou uvedeny v Hz. Proton-protonové ($^1\text{H-}^1\text{H}$) interakce byly měřeny pomocí gs-COSY. ^{13}C NMR spektra byla měřena buď standardním způsobem, nebo za pomoci APT (Attached Proton Test) pulzní sekvence k rozlišení CH, CH_3 and CH_2 , C_{quart} . Všechny NMR experimenty byly provedeny s pomocí softwaru dodaného výrobcem spektrometru.

3.3 Hmotnostní spektrometrie MALDI

Hmotnostní spektra byla měřena pomocí hmotnostního spektrometru s vysokým rozlišením MALDI LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Německo) opatřeného dusíkovým UV laserem (337 nm, 60 Hz). Přístroj LTQ Orbitrap byl provozován v režimu pozitivních iontů ve standardním hmotnostním rozsahu (m/z 50–2000) s následným nastavením ladících parametrů: rozlišení 100 000 při $m/z = 400$, energie laseru 8–20 μJ , 2 laserové snímání. Průzkum polohy v krystalovém systému (CPS) byl automaticky stanoven náhodným výběrem polohy. Pro experiment s chemickou ionizací (CID) v lineární iontové pasti (LTQ) bylo použito helium jako kolizní plyn, aktivační čas byl nastaven na 30 ms, hodnoty aktivační Q na 0,250, normalizovaná kolizní energie v rozmezí 20–70 % a izolovaná

šířka $\Delta m/z$ nastavena na 1. Matrice použité pro experiment byly 2,5-dihydroxybenzoová kyselina (DHB), nebo *trans*-2-[3-(4-*tert*-butylfenyl)-2-methylprop-2-en-1-yliden]malonnitril (DCTB). Samotná hmotnostní spektra pro měřené vzorky byla vytvořena jako průměr ze všech záznamů hmotnostních spekter a vyhodnocena v programu dodaným výrobcem přístroje.

3.4 Syntéza substituovaných β -laktamů

3.4.1 Příprava *Schiffových* bází

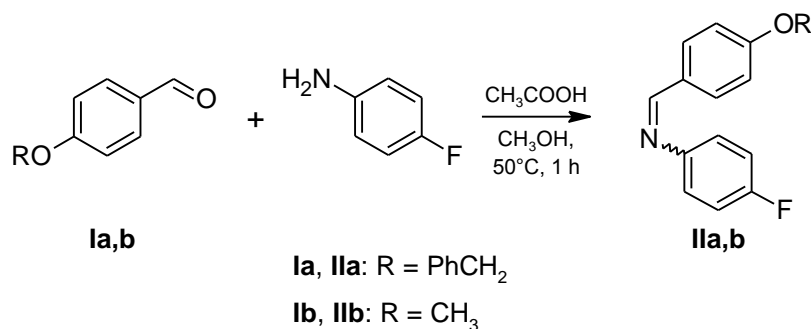


Schéma 10 Příprava *Schiffových* bází ze 4-alkoxybenzaldehydu.

4-Benzyloxybenzyliden-*N*-(4-fluorfenyl)imin (**IIa**)

Do 100 ml baňky byly pod inertní atmosférou rozpuštěny 4 g (18,9 mmol) 4-benzyloxybenzaldehydu (**Ia**) ve 35 ml sušeného methanolu a reakční směs byla 15 min zahřívána při 50 °C.²⁵ Následně byla k roztoku přidána kapka kyseliny octové jako katalyzátoru a poté bylo přikapáváno 1,81 ml (18,9 mmol) 4-fluoranilinu. Vzniklá suspenze byla míchána při 50 °C další hodinu, poté ochlazena na laboratorní teplotu a nakonec zfiltrována. Filtrační koláč byl promyt studeným methanolem a vysušen v exsikátoru. Bylo získáno 5,2 g (90,3 %) béžové krystalické látky **IIa** (b. t. 131–132 °C, lit.²⁶ uvádí 131 °C). ¹H a ¹³C NMR spektra jsou v souladu s lit.²⁷

¹H NMR (CDCl₃-*d*₁): δ = 5,13 (s, 2H, OCH₂); 7,05 (m, 2H, ArOR-H_{3,5}); 7,07 (m, 2H, ArF-H_{2,6}); 7,15–7,19 (m, 2H, ArF-H_{3,5}); 7,33–7,46 (m, 5H, ArH); 7,83 (m, 2H, ArOR-H_{2,6}); 8,36 (s, 1H, NCH); ¹³C NMR (CDCl₃-*d*₁): δ = 77,1 (OCH₂); 115,1 (ArOR, C_{3,5}); 115,7 a 115,9 (d; *J* 22,1; ArF-C_{3,5}); 122,2 (d; *J* 8,0; ArF-C_{2,6}); 127,5 (2×CH; ArH); 128,2 (2×CH; ArH); 128,7 (ArH-C₄); 129,3 (ArOR-C₁); 130,5 (ArOR-C_{2,6}); 136,4 (ArH-C₁); 148,3 (d; *J* 3,0; ArF-C₁); 159,4 (d; *J* 3,0; C=N); 159,8 a 162,2 (d; *J* 241,5; ArF-C₄); 161,4 (ArOR-C₄).

^1H NMR (CDCl_3-d_1): $\delta = 1,46$ (d; 3H; J 8,0; CH_3); 3,12 (qd, 1H, CH); 4,51 (d; 1H; J 4,0; CH); 5,05 (s, 2H, OCH_2); 6,90-6,99 (m, 4H); 7,23-7,27 (m, 4H); 7,33-7,43 (m, 5H); ^{13}C NMR (CDCl_3-d_1): $\delta = 13,0$ (CH_3); 55,5 (CH); 62,5 (NCH); 70,1 (OCH_2); 115,4 (ArOR, $\text{C}_{3,5}$); 115,6 a 115,9 (d; J 22,5; ArF- $\text{C}_{3,5}$); 118,3 a 118,4 (d; J 7,9; ArF- $\text{C}_{2,6}$); 127,2 ($2\times\text{CH}$; ArH); 127,5 ($2\times\text{CH}$; ArH); 128,1 (ArH- C_4); 128,6 (ArOR- $\text{C}_{2,6}$); 129,7 (ArOR- C_1); 134,0 a 134,1 (d; J 3,0; ArF- C_1); 136,6 (ArH- C_1); 157,7 a 160,1 (d; J 243,0; ArF- C_4); 159,0 (ArOR- C_4); 168,2 (C=O).
 HR MALDI-MS: $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{FNO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: změřený m/z 362,15478; požadovaný m/z 362,15508.

(3R,4S*)-1-(4-Fluorfenyl)-4-(4-methoxyfenyl)-3-methylazetidin-2-on (IV)*

Stejným způsobem bylo z navážky 6 g (26,2 mmol) výchozí Schiffovy báze **IIb**, 9,7 g (52,3 mmol) tributylaminu a 2,5 g (27,0 mmol) propanoylchloridu v 60 ml sušeného toluenu připraveno 4,3 g (58 %) světle žluté krystalické látky **IV** (b. t. 95–96 °C).

^1H NMR (CDCl_3-d_1): $\delta = 1,50$ (d; 3H; J 8,0; CH_3); 3,16 (qd, 1H, CH); 3,84 (s; 3H; OCH_3); 4,55 (d; 1H; J 4,0; CH); 6,92-6,99 (m, 4H, ArOR- $\text{H}_{3,5}$ + ArF- $\text{H}_{2,6}$); 7,26-7,32 (m, 4H, ArOR- $\text{H}_{2,6}$ + ArF- $\text{H}_{3,5}$); ^{13}C NMR (CDCl_3-d_1): $\delta = 13,0$ (CH_3); 55,3 (CH); 55,5 (OCH_3); 62,6 (NCH); 114,5 (ArOR- $\text{C}_{3,5}$); 115,6 a 115,9 (d; J 23,1; ArF- $\text{C}_{3,5}$); 118,3 a 118,4 (d; J 10,1; ArF- $\text{C}_{2,6}$); 127,14 (ArOR- $\text{C}_{2,6}$); 129,4 (ArOR- C_1); 134,1 (d; J 3,0; ArF- C_1); 157,7 a 160,1 (d; J 243,5; ArF- C_4); 159,8 (ArOR- C_4); 168,2 (C=O).

HR MALDI-MS: $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{FNO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: změřený m/z 286,12417; požadovaný m/z 286,12378.

3.4.3 Odstranění chránící benzylové skupiny

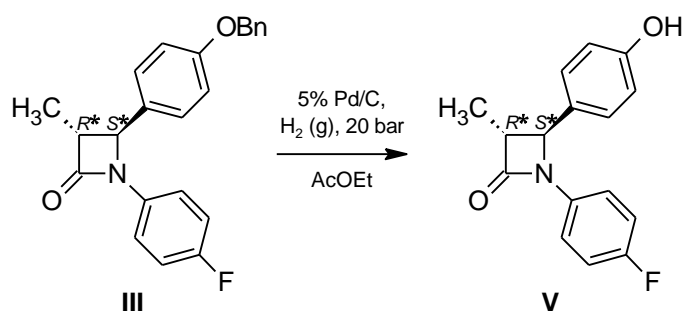


Schéma 12 Hydrogenolýza.

Do autoklávu bylo předloženo 4,8 g (13,3 mmol) substituovaného azetidinonu **III** v 60 ml ethyl-acetátu. Reakce byla prováděna v atmosféře H_2 za zvýšeného tlaku 20 bar a katalýzy 0,93 g 5% Pd/C.³ Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC a k ukončení došlo po 27

hodinách. Následně byl katalyzátor zfiltrován a roztok byl odpařen na vakuové odparce. Takto bylo získán surový produkt, který byl rekrystalován ze směsi petroletheru a diethyletheru (1:1) za vzniku 2,5 g (69,4 %) bílé krystalické látky **V** (b. t. 113–115 °C).

^1H NMR (CDCl_3-d_1): $\delta = 1,46$ (d; 3H; J 8,0; CH_3); 3,11 (qd, 1H, CH); 4,50 (d; 1H; J 4,0; CH); 5,21 (s, 1H, OH); 6,83-6,86 (m, 2H); 6,90-6,96 (m, 2H); 7,21 (m, 2H); 7,26 (m, 2H); ^{13}C NMR (CDCl_3-d_1): $\delta = 12,9$ (CH_3); 55,3 (CH); 62,7 (NCH); 115,7 a 115,9 (d; J 22,6; ArF-C_{3,5}); 116,1 (ArOR-C_{3,5}); 118,5 (d; J 7,7; ArF-C_{2,6}); 127,3 (ArOR-C_{2,6}); 128,9 (ArOR-C₁); 133,8 (d; J 3,0; ArF-C₁); 156,3 (ArOR-C₄); 157,8 a 160,2 (d; J 243,6; ArF-C₄); 168,8 (C=O).

HR MALDI-MS: $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{FNO}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: změřený m/z 272,10820; požadovaný m/z 272,10813.

3.5 Alkalická hydrolýza Ezetimibu a β -laktamu

3.5.1 Hydrolýza Ezetimibu v methanolickém roztoku NaOH

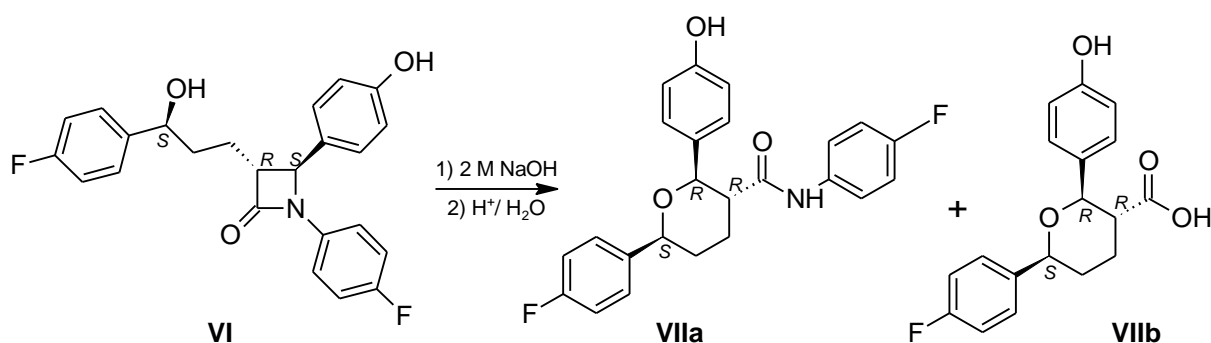


Schéma 13 Hydrolýza Ezetimibu 2M methanolickým roztokem NaOH.

Do 100 ml baňky bylo naváženo 0,7 g (1,7 mmol) Ezetimibu (**VI**), který byl pod inertní atmosférou argonu rozpuštěn v 63 ml směsného rozpouštědla methanol/voda (75/25 hm. %). Po rozpuštění byl ponechán reagovat s 12,6 ml (126 mmol) 10M hydroxidu sodného, aby výsledná koncentrace roztoku byla 2M, po dobu 1 hodiny při teplotě 40 °C. Poté byla reakční směs ochlazená na laboratorní teplotu a zneutralizována 8 ml vodného roztoku HCl (35 hm. %). Vyloučilo se tak 76 mg (11 %) pyran-3-karboxamidu **VIIa** (b. t. 244–245 °C), který byl zfiltrován a vysušen. Filtrát byl poté odpařen na vakuové odparce a odparek byl extrahován suchým etanolem. Extrakt byl po odpaření na vakuové odparce zpracován sloupcovou chromatografií (silikagel 60 μm , dichlormethan:ethyl-acetát, 3:1), kde po rekrystalizaci ze směsného rozpouštědla dichlormethan:ethyl-acetát (2:1) vzniklo 270 mg (50 %) nažloutlé krystalické látky **VIIb** (b. t. 232–258 °C za rozkladu).

(2R,3R,6S)-N,6-Bis(4-fluorfenyl)-2-(4-hydroxyfenyl)-3,4,5,6-tetrahydro-2H-pyran-3-karboxamid (VIIa)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ = 1,55 a 1,99 (2×m, 4H, CH₂–CH₂); 2,70 (m, 1H, CH–CO); 4,62 (s, 1H, OCH); 4,64 (s, 1H, OCH); 6,68 (d, 2H, ArOH-H_{3,5}); 7,07 (t, 2H, ArF-H_{3,5}); 7,16 (t, 2H, ArF-H_{3,5}); 7,20 (d, 2H, ArOH-H_{2,6}); 7,40-7,45 (m, 4H, Ar₁F-H_{2,6} + Ar₂F-H_{2,6}); 9,35 (s, 1H, OH); 9,81 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ = 28,3 (CH₂); 32,6 (CH₂); 50,1 (CH–CO); 78,2 (OCH); 80,9 (OCH); 114,9 (ArOH, C_{3,5}); 114,8 a 115,1 (d; *J* 23,5; ArF-C_{3,5}); 115,2 a 115,4 (d; *J* 23,5; ArF-C_{3,5}′); 121,1 a 121,2 (d; *J* 8,0; ArF-C_{2,6}′); 127,8 a 127,9 (d; *J* 8,0; ArF-C_{2,6}); 128,4 (ArOH-C_{2,6}); 131,3 (ArOH-C₁); 135,4 (d; *J* 2,2; ArF-C₁′); 139,2 (d; *J* 2,2; ArF-C₁); 156,9 (ArOH-C₄); 156,9 a 159,3 (d, *J* 240, ArF-C₄′); 160,3 a 162,7 (d, *J* 242, ArF-C₄); 171,6 (C=O). ¹H a ¹³C NMR spektra jsou v souladu s lit.³¹

(2R,3R,6S)-6-(4-Fluorfenyl)-2-(4-hydroxyfenyl)-3,4,5,6-tetrahydro-2H-pyran-3-karboxylová kyselina (VIIb)

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ = 1,51-1,61 (m, 1H, CH₂); 1,87-2,02 (m, 2H, CH₂); 2,12-2,18 (m, 1H, CH₂); 2,53-2,59 (m, 1H, CH–CO); 4,48 (d; 1H; *J* 10,4; OCH); 4,58 (d; 1H; *J* 10,4; OCH); 6,70 (m; 2H; *J* 8,4; ArOH-H_{3,5}); 7,12-7,19 (m, 4H, ArOH-H_{2,6} + ArF-H_{2,6}); 7,37-7,41 (m, 2H, ArF-H_{3,5}); 9,40 (s, 1H); 12,13 (s, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ = 28,1 (CH₂); 32,2 (CH₂); 48,6 (CH–CO); 78,3 (OCH); 80,6 (OCH); 114,7 (ArOH-C_{3,5}); 114,8 a 115,0 (d; *J* 20,9; ArF-C_{3,5}); 127,8 a 127,9 (d; *J* 8,2; ArF-C_{2,6}); 128,6 (ArOH-C_{2,6}); 131,2 (ArOH-C₁); 139,1 (d; *J* 2,8; ArF-C₁); 157,1 (ArOH-C₄); 160,2 a 162,6 (d; *J* 242,8; ArF-C₄); 174,6 (C=O).

HR MALDI-MS: C₁₈H₁₇FO₄ [M+Na]⁺: změřený *m/z* 339,09964; požadovaný *m/z* 339,10031.

Další minoritní chromatografická frakce (<5%) obsahuje methylester a methyl poloacetal kyseliny **XIV**, jehož LC-MS spektrum je uvedeno v příloze VI.

3.5.2 Hydrolýza β -laktamů IV, V ve vodném roztoku NaOH

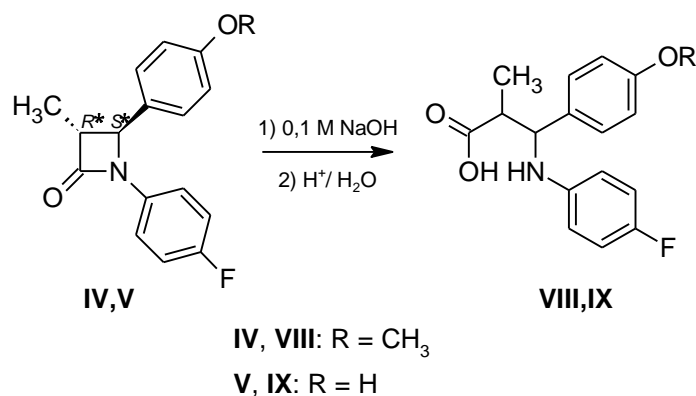


Schéma 14 Hydrolýza β -laktamů IV a V 0,1M vodným roztokem NaOH.

(2R,3S*)-3-(4-Fluorfenylamin)-3-(4-hydroxyfenyl)-2-methylpropanová kyselina (VIII)*

β -laktam IV (0,8 g; 2,8 mmol) byl ponechán reagovat pod inertní atmosférou argonu s hydroxidem sodným (0,22 g, 5,5 mmol) v 56 ml vody při teplotě 40 °C. Po dvou dnech byla pro urychlení reakce zvýšena koncentrace hydroxidu na dvojnásobnou (11,3 mmol) a zvýšena teplota na 50 °C. Po 24 hod. byla reakční směs ochlazena na laboratorní teplotu a zneutralizována 1M vodným roztokem HCl. Vyloučilo se tak nejprve 0,4 g β -aminokyseliny VIII, která byla zfiltrována a filtrát byl odpařen na vakuové odparce. Odparek byl poté extrahován suchým etanolem, extrakt byl odpařen na vakuové odparce za vzniku dalších 0,3 g surového produktu. Oba podíly produktu byly poté zpracovány krystalizací ze směsného rozpouštědla dichlormethan:ethyl-acetát (4:1). Takto vzniklo 0,56 g (66 %) bílé krystalické látky VIII (b. t. 153–155 °C).

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ = 0,83 (d; 3H; *J* 6,8; CH₃); 2,64 (q, 1H, CO-CH); 3,69 (s, 3H, OCH₃); 4,40 (t; 1H; *J* 7,2; NH-CH); 6,19 (d; 1H; *J* 7,2; NH-CH); 6,54 (m; 2H; *J* 8,0; ArOH-H_{3,5}); 6,77-6,84 (m; 4H; ArF-H_{2,6} + ArOH-H_{2,6}); 7,32 (m; 2H; ArF-H_{3,5}); 12,27 (s, 1H, COOH); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ = 15,1 (CH₃); 46,2 (CH-CO); 55,0 (OCH₃); 59,4 (NCH); 113,6 (ArOH-C_{3,5}); 114,2 (d; *J* 7,2; ArF-C_{2,6}); 115,0 a 115,2 (d; *J* 21,7; ArF-C_{3,5}); 128,7 (ArOH-C_{2,6}); 133,4 (ArOH-C₁); 144,6 (d, ArF-C₁); 153,3 a 155,6 (d; *J* 231,5; ArF-C₄); 158,3 (ArOH-C₄); 176,4 (C=O).

HR MALDI-MS: C₁₇H₁₈FNO₃ [M]⁺: změřený *m/z* 303,12604; požadovaný *m/z* 303,12652.

(2R,3S*)-3-(4-Fluorfenylamino)-3-(4-methoxyfenyl)-2-methylpropanová kyselina (IX)*

Stejným způsobem bylo připraveno 0,35 g surové β -aminokyseliny **IX** z 0,4 g (1,5 mmol) β -laktamu **V** reakcí s hydroxidem sodným (0,12 g, 2,95 mmol) ve 30 ml vody po dobu 4 dnů při teplotě 40 °C. Surový produkt byl nejprve zpracován sloupcovou chromatografií (silikagel 60 μ m, dichlormethan:ethyl-acetát, 3:1) a poté rekrystalován v dichlormethanu. Takto vzniklo 50 mg (12 %) nažloutlé krystalické látky **IX** (b. t. 179–181 °C). V ^1H NMR spektru se objevují 2 nestejně sady signálů naznačující částečnou racemizaci na uhlíku C2, což potvrzuje i literatura.³²

Majoritní diastereoizomer (58%):

^1H NMR ($\text{CD}_3\text{OD}-d_4$): $\delta = 0,91$ (d; 3H; J 6,8; CH_3); 2,70-2,79 (m, 1H, $\text{CO}-\underline{\text{CH}}$); 4,64 (d; 1H; J 9,2; $\text{NH}-\underline{\text{CH}}$); 6,78 (m; 2H; J 6,8; $\text{ArOH}-\text{H}_{3,5}$); 7,02-7,07 (m; 2H; $\text{ArF}-\text{H}_{2,6}$); 7,18-7,22 (m, 2H, $\text{ArOH}-\text{H}_{2,6}$); 7,58-7,62 (m; 2H; $\text{ArF}-\text{H}_{3,5}$); ^{13}C NMR ($\text{CD}_3\text{OD}-d_4$): $\delta = 15,6$ (CH_3); 50,6 ($\underline{\text{CH}}-\text{CO}$); 77,5 (NCH); 116,3 ($\text{ArOH}-\text{C}_{3,5}$); 116,2 a 116,4 (d; J 22,1; $\text{ArF}-\text{C}_{3,5}$); 123,4 (d; J 8,0; $\text{ArF}-\text{C}_{2,6}$); 129,4 ($\text{ArOH}-\text{C}_{2,6}$); 135,1 ($\text{ArOH}-\text{C}_1$); 136,0 (d; J 3,0; $\text{ArF}-\text{C}_1$); 158,4 ($\text{ArOH}-\text{C}_4$); 159,7 a 162,1 (d; J 242,5; $\text{ArF}-\text{C}_4$); 176,8 ($\text{C}=\text{O}$).

Minoritní diastereoizomer (42%):

^1H NMR ($\text{CD}_3\text{OD}-d_4$): $\delta = 1,34$ (d; 3H; J 6,8; CH_3); 2,70-2,79 (m, 1H, $\text{CO}-\underline{\text{CH}}$); 4,64 (d; 1H; J 9,2; $\text{NH}-\underline{\text{CH}}$); 6,71 (m; 2H; J 6,8; $\text{ArOH}-\text{H}_{3,5}$); 6,93-6,97 (m; 2H; $\text{ArF}-\text{H}_{2,6}$); 7,18-7,22 (m, 2H, $\text{ArOH}-\text{H}_{2,6}$); 7,25-7,29 (m; 2H; $\text{ArF}-\text{H}_{3,5}$); ^{13}C NMR ($\text{CD}_3\text{OD}-d_4$): $\delta = 14,9$ (CH_3); 51,2 ($\underline{\text{CH}}-\text{CO}$); 76,9 (NCH); 116,0 ($\text{ArOH}-\text{C}_{3,5}$); 116,1 a 116,3 (d; J 23,1; $\text{ArF}-\text{C}_{3,5}$); 123,8 a 123,9 (d; J 8,0; $\text{ArF}-\text{C}_{2,6}$); 129,0 ($\text{ArOH}-\text{C}_{2,6}$); 135,4 ($\text{ArOH}-\text{C}_1$); 135,7 (d; J 3,0; $\text{ArF}-\text{C}_1$); 158,1 ($\text{ArOH}-\text{C}_4$); 159,6 a 162,0 (d; J 242,5; $\text{ArF}-\text{C}_4$); 175,9 ($\text{C}=\text{O}$).

HR MALDI-MS: $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{FNO}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$: změřený m/z 312,10063; požadovaný m/z 312,10064.

3.6 Aminolýza Ezetimibu a β -laktamů

3.6.1 Aminolýza Ezetimibu reakcí s primárními aminy

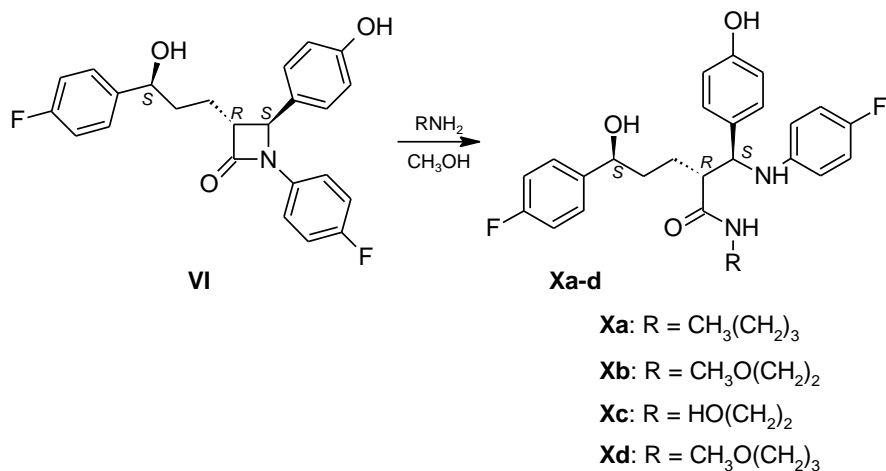


Schéma 15 Příprava β -aminoamidu reakcí Ezetimibu s primárními aminy.

Příprava β -aminoamidů Xa-d

(2*R*,5*S*)-*N*-Butyl-5-hydroxy-2-[(*S*)-(4-fluorfenylamino)(4-hydroxyfenyl)methyl]pentanamid (*Xa*)

Do Schlenkovy baňky bylo pod inertní atmosférou argonu předloženo 0,5 g (1,2 mmol) Ezetimibu (**VI**) ve 30 ml methanolu a 0,2 g (2,7 mmol) butylaminu. Reakční směs byla zahřívána na 40 °C po dobu 2 dní do zreagování veškerého Ezetimibu. Následně byla reakční směs odpařena na vakuové odparce a surový produkt byl zpracován sloupcovou chromatografií (silikagel 60 μm , dichlormethan:ethyl-acetát, 1:1). Takto byly odstraněny výchozí látka a produkt intramolekulárního přesmyku **VIIa** a produkt byl nakonec z kolony vypláchnut methanolem. Přesto ale v produktu zůstala část nečistot, která byla oddělena z produktu další chromatografií (silikagel 60 μm , dichlormethan:ethyl-acetát, 1:2). Výsledný produkt byl nakonec rekrystalován ze směsi petroletheru a diethyletheru (1:2) za vzniku 0,24 g (45 %) bílé krystalické látky **Xa** (b. t. 144–145 °C).

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ = 0,72 (t; 3H; *J* 7,2; CH₃); 1,06-1,42 (m, 8H); 2,09-2,23 (m, 2H); 3,49 (d; 1H; *J* 8,0); 4,29 (q; 1H; *J* 11,2); 5,07 (d; 1H; *J* 4,4); 6,69-6,72 (m; 2H; *J* 8,4; ArOH-H_{3,5}); 7,00-7,05 (m, 4H, ArOH-H_{2,6} + ArF'-H_{2,6}); 7,11-7,15 (m, 4H, ArF'-H_{2,6} + ArF'-H_{3,5}); 7,58-7,62 (m, 2H, ArF'-H_{3,5}); 9,27 (s, 1H); 9,92 (s, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ = 14,0 (CH₃^{Bu}); 20,0 (CH₂^{Bu}); 26,7 (CH₂^{Bu}); 31,7 (CH₂); 37,2 (CH₂); 46,2 (NCH₂^{Bu}); 3,9 (CH); 64,3 (NCH); 71,9 (OCH); 114,7 a 114,9 (d; *J* 21,1; ArF'-C_{3,5}); 115,2 (ArOH-C_{3,5}); 115,3 a 115,6 (d; *J* 22,1; ArF'-C_{3,5}); 121,2 a 121,3 (d; *J* 8,0; ArF'-C_{2,6}); 127,7 a 127,8 (d; *J* 8,0;

ArF-C_{2,6}); 128,7 (ArOH-C_{2,6}); 132,9 (ArOH-C₁); 135,8 (d; *J* 3,0; ArF-C₁); 142,4 (d; *J* 3,0; ArF'-C₁); 156,4 (ArOH-C₄); 157,0 a 159,3 (d; *J* 239,5; ArF'-C₄); 160,0 a 162,4 (d; *J* 242,5; ArF-C₄); 173,5 (C=O).

HR MALDI-MS: C₂₈H₃₂F₂N₂O₃ [M+H]⁺: změřený *m/z* 483,24589; požadovaný *m/z* 483,24538 (100 %).

(2R,5S)-N-(2-Methoxyethyl)-5-hydroxy-2-[(S)-(4-fluorfenylamino)(4-hydroxyfenyl)methyl]-pentanamid (Xb)

Stejným postupem bylo připraveno z 0,5 g (1,2 mmol) Ezetimibu (**VI**) ve 30 ml methanolu a 0,2 g (2,4 mmol) 2-methoxyethylaminu, po sloupcové chromatografii (silikagel 60 μm, dichlormethan:ethyl-acetát, 1:1) a následné rekrytalizaci v dichlormethanu, 0,36 g (61 %) bílé krystalické látky **Xb** (b. t. 152–153 °C).

¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ = 1,07-1,44 (m, 5H); 2,25-2,37 (m, 2H); 3,09 (s, 3H, OCH₃); 3,16-3,27 (m, 2H); 3,51 (d; 1H; *J* 8,0); 4,29 (q; 1H; *J* 12,0); 5,08 (d; 1H; *J* 4,8); 6,71 (m; 2H; *J* 8,0; ArOH-H_{3,5}); 7,00-7,05 (m, 4H, ArOH-H_{2,6} + ArF'-H_{2,6}); 7,11-7,16 (m, 4H, ArF-H_{2,6} + ArF'-H_{3,5}); 7,58-7,62 (m, 2H, ArF-H_{3,5}); 9,29 (s, 1H); 10,00 (s, 1H); ¹³C NMR (DMSO-*d*₆): δ = 26,6 (CH₂); 37,1 (CH₂); 46,2 (NCH₂^{MEA}); 53,7 (CH); 57,9 (OCH₃); 64,4 (NCH); 71,5 (CH₂O^{MEA}); 71,7 (OCH); 114,5 a 114,8 (d; *J* 21,0; ArF'-C_{3,5}); 115,1 (ArOH-C_{3,5}); 115,2 a 115,4 (d; *J* 22,1; ArF-C_{3,5}); 121,1 a 121,2 (d; *J* 7,7; ArF'-C_{2,6}); 127,6 a 127,7 (d; *J* 7,9; ArF-C_{2,6}); 128,7 (ArOH-C_{2,6}); 132,5 (ArOH-C₁); 135,6 a 135,7 (d; *J* 2,3; ArF-C₁); 142,3 a 142,4 (d; *J* 2,9; ArF'-C₁); 156,4 (ArOH-C₄); 156,8 a 159,2 (d; *J* 239,4; ArF'-C₄); 159,9 a 162,3 (d; *J* 241,6; ArF-C₄); 173,1 (C=O).

HR MALDI-MS: C₂₇H₃₀F₂N₂O₄ [M+H]⁺: změřený *m/z* 485,22441; požadovaný *m/z* 485,22464 (100 %).

(2R,5S)-N-(2-Hydroxyethyl)-5-hydroxy-2-[(S)-(4-fluorfenylamino)(4-hydroxyfenyl)methyl]-pentanamid (Xc)

Navážka výchozího Ezetimibu (**VI**) byla 0,5 g (1,2 mmol) a 2-hydroxyethylaminu 0,15 g (2,4 mmol) ve 25 ml methanolu. Takto bylo připraveno 0,35 g (57 %) bílé krystalické látky **Xc** (b. t. 171–173 °C).

^1H NMR (DMSO- d_6): $\delta = 1,08-1,46$ (m, 4H); 1,92 (s, 1H); 2,17-2,28 (m, 2H); 3,23-3,31 (m, 2H); 3,51 (d; 1H; J 9,6); 4,30 (q; 1H; J 12,0); 5,08 (d; 1H; J 4,4); 6,71 (m; 2H; J 8,0; ArOH-H_{3,5}); 7,00-7,06 (m, 4H, ArOH-H_{2,6} + ArF'-H_{2,6}); 7,11-7,16 (m, 4H, ArF'-H_{2,6} + ArF'-H_{3,5}); 7,59-7,63 (m, 2H, ArF'-H_{3,5}); 9,29 (s, 1H); 10,01 (s, 1H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): $\delta = 26,6$ (CH₂); 37,0 (CH₂); 49,2 (NCH₂^{EA}); 53,8 (CH); 60,4 (CH₂OH^{EA}); 64,4 (NCH); 71,7 (OCH); 114,5 a 114,7 (d; J 21,2; ArF'-C_{3,5}); 115,1 (ArOH-C_{3,5}); 115,2 a 115,4 (d; J 22,1; ArF'-C_{3,5}); 121,1 a 121,2 (d; J 7,7; ArF'-C_{2,6}); 127,6 a 127,7 (d; J 7,9; ArF'-C_{2,6}); 128,7 (ArOH-C_{2,6}); 132,7 (ArOH-C₁); 135,7 (d; J 2,4; ArF'-C₁); 142,3 a 142,4 (d; J 2,8; ArF'-C₁); 156,3 (ArOH-C₄); 156,8 a 159,2 (d; J 239,7; ArF'-C₄); 159,8 a 162,3 (d; J 241,9; ArF'-C₄); 173,2 (C=O).

HR MALDI-MS: C₂₆H₂₈F₂N₂O₄ [M+H]⁺: změřený m/z 471,20970; požadovaný m/z 471,20899 (100 %).

(2R,5S)-5-Hydroxy-2-[(S)-(4-fluorfenylamino)(4-hydroxyfenyl)methyl]-N-(3-methoxypropyl)-pentanamid (Xd)

Navážka výchozího Ezetimibu (VI) byla 0,5 g (1,2 mmol) a 3-methoxypropylaminu 0,22 g (2,4 mmol) ve 25 ml methanolu. Surový produkt byl navíc zpracován druhou sloupcovou chromatografií (silikagel 60 μm , ethyl-acetát:methanol 5 obj. %) a rekrystalován ze směsi petroletheru a diethyletheru (2:1). Takto bylo připraveno 0,42 g (69 %) oranžovobílé krystalické látky **Xd** (60–62 °C).

^1H NMR (DMSO- d_6): $\delta = 1,05-1,15$ (m, 1H); 1,22-1,41 (m, 3H); 1,44 (qui; 2H; $^3J_1 = 12,0$; $^3J_2 = 8,0$); 2,14-2,19 (m, 1H); 2,24-2,31 (m, 1H); 3,03 (s, 3H, OCH₃); 3,19 (t; 2H; J 8,0); 3,49 (d; 1H; J 8,0); 4,29 (t; 1H; J 4,0); 5,08 (s, 1H); 6,71 (m; 2H; J 8,0; ArOH-H_{3,5}); 7,00-7,06 (m, 4H, ArOH-H_{2,6} + ArF'-H_{2,6}); 7,11-7,15 (m, 4H, ArF'-H_{2,6} + ArF'-H_{3,5}); 7,61-7,64 (m, 2H, ArF'-H_{3,5}); 9,30 (s, 1H); 9,94 (s, 1H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): $\delta = 29,2$ (CH₂); 37,1 (CH₂); 43,8 (NCH₂^{MPA}); 50,4 (CH₂); 53,8 (CH); 57,8 (OCH₃); 64,1 (NCH); 70,4 (CH₂O^{MPA}); 71,7 (OCH); 114,5 a 114,7 (d; J 20,8; ArF'-C_{3,5}); 115,1 (ArOH-C_{3,5}); 115,2 a 115,4 (d; J 21,7; ArF'-C_{3,5}); 121,0 a 121,1 (d; J 7,5; ArF'-C_{2,6}); 125,2 (ArOH-C₁); 127,6 a 127,7 (d; J 8,0; ArF'-C_{2,6}); 128,6 (ArOH-C_{2,6}); 135,7 a 135,8 (d; J 2,3; ArF'-C₁); 142,3 a 142,4 (d; J 2,7; ArF'-C₁); 156,4 (ArOH-C₄); 156,8 a 159,2 (d; J 239,0; ArF'-C₄); 159,9 a 162,3 (d; J 241,7; ArF'-C₄); 173,2 (C=O).

HR MALDI-MS: $C_{28}H_{32}F_2N_2O_4$ $[M+H]^+$: změřený m/z 499,24027; požadovaný m/z 499,24029.

3.6.2 Aminolýza β -laktamů IV, V reakcí s primárními aminy

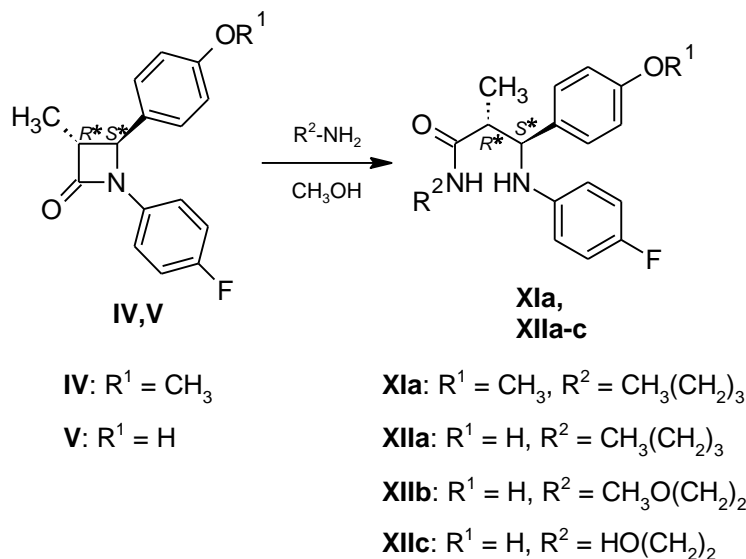


Schéma 16 Příprava β -aminoamidu reakcí β -laktamu s primárními aminy.

Příprava β -aminoamidů XIa, XIIa-c

(2R,3S*)-3-(4-Fluorfenylamino)-N-butyl-3-(4-methoxyfenyl)-2-methylpropanamid (XIa)*

Do Schlenkovy baňky bylo pod inertní atmosférou argonu předloženo 0,5 g (1,8 mmol) β -laktamu **IV** a 0,35 ml (3,5 mmol) butylaminu ve 25 ml methanolu. Avšak po 2 dnech reakční doby byly v reakční směsi přítomny pouze výchozí látky. Proto byla reakční doba prodloužena na 4 dny a poté i zvýšena koncentrace butylaminu. Ani to však nevedlo k požadovanému β -aminoamidu **XIa**. Tuto skutečnost potvrdil i následný kinetický pokus.

(2R,3S*)-3-(4-Fluorfenylamino)-N-butyl-3-(4-hydroxyfenyl)-2-methylpropanamid (XIIa)*

β -aminoamid **XIIa** byl připravován z navážky 0,45 g (1,7 mmol) β -laktamu **V** ve 25 ml methanolu a 0,25 g (3,4 mmol) butylaminu. Reakční směs byla zahřívána na 40 °C po dobu 2 dnů do zreagování veškerého β -laktamu. Následně byla reakční směs odpařena na vakuové odparce a surový produkt byl rekrystalován v dichlormethanu za vzniku 0,40 g (70 %) bílé krystalické látky **XIIa** (b. t. 158–159 °C).

^1H NMR (DMSO- d_6): δ = 0,72-0,77 (m, 6H); 1,09-1,28 (m, 4H); 2,13-2,25 (m, 2H); 2,52-2,58 (m, 1H); 3,53 (d, 1H; J 12,0); 6,72 (m; 2H; J 8,0; ArOH- $\text{H}_{3,5}$); 7,08 (m; 2H; J 8,0; ArOH- $\text{H}_{2,6}$); 7,12-7,16 (m, 2H, ArF- $\text{H}_{2,6}$); 7,60-7,64 (m, 2H, ArF- $\text{H}_{3,5}$); 10,10 (s, 1H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ = 13,9 (CH_3^{Bu}); 15,7 (CH_3); 19,9 (CH_2^{Bu}); 31,6 (CH_2^{Bu}); 46,3 (NCH_2^{Bu}); 47,7 (CH-CO); 64,8 (NCH); 115,1 (ArOH- $\text{C}_{3,5}$); 115,2 a 115,4 (d; J 22,1; ArF- $\text{C}_{3,5}$); 120,1 a 121,0 (d; J 8,0; ArF- $\text{C}_{2,6}$); 128,6 (ArOH- $\text{C}_{2,6}$); 132,6 (ArOH- C_1); 135,9 (d; J 2,0; ArF- C_1); 156,3 (ArOH- C_4); 156,7 a 159,1 (d; J 239,5; ArF- C_4); 173,9 (C=O).

HR MALDI-MS: $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{FN}_2\text{O}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: změřený m/z 345,19772; požadovaný m/z 345,19728 (100 %).

(2R,3S*)-3-(4-Fluorfenylamino)-N-(2-methoxyethyl)-3-(4-hydroxyfenyl)-2-methylpropanamid (XIIb)*

Výtěžek: 74 % bílé krystalické látky; b. t. 155–157 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ = 0,76 (d; 3H; J 6,8; CH_3); 2,00 (s, 1H); 2,31-2,38 (m, 2H); 2,54-2,64 (m, 1H); 3,12 (s, 3H, OCH_3); 3,17-3,30 (m, 2H); 3,54 (d; 1H; J 9,6; CH); 6,73 (m; 2H; J 8,4; ArOH- $\text{H}_{3,5}$); 7,09 (m; 2H; J 8,4; ArOH- $\text{H}_{2,6}$); 7,11-7,17 (m, 2H, ArF- $\text{H}_{2,6}$); 7,61-7,65 (m, 2H, ArF- $\text{H}_{3,5}$); 9,30 (s, 1H); 10,23 (s, 1H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ = 15,7 (CH_3); 46,3 ($\text{NCH}_2^{\text{MEA}}$); 47,5 (CH); 57,9 (OCH_3); 64,9 (NCH); 71,5 ($\text{OCH}_2^{\text{MEA}}$); 115,1 (ArOH- $\text{C}_{3,5}$); 115,2 a 115,4 (d; J 22,1; ArF- $\text{C}_{3,5}$); 121,0 a 121,1 (d; J 7,7; ArF- $\text{C}_{2,6}$); 128,7 (ArOH- $\text{C}_{2,6}$); 132,3 (ArOH- C_1); 135,8 (d; J 2,3; ArF- C_1); 156,4 (ArOH- C_4); 156,8 a 159,1 (d; J 239,3; ArF- C_4); 173,8 (C=O).

HR MALDI-MS: $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{FN}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: změřený m/z 347,17700; požadovaný m/z 347,17655 (100 %).

(2R,3S*)-3-(4-Fluorfenylamino)-N-(2-hydroxyethyl)-3-(4-hydroxyfenyl)-2-methylpropanamid (XIIc)*

Výtěžek: 63 % bílé krystalické látky; b. t. 163–165 °C; ^1H NMR (DMSO- d_6): δ = 0,77 (d; 3H; J 6,8; CH_3); 2,07 (s, 1H); 2,23-2,32 (m, 2H); 2,54-2,62 (m, 1H); 3,28-3,35 (m, 2H); 3,56 (d; 1H; J 9,6; CH); 4,36 (t; 1H; J 4,0; OH); 6,73 (m; 2H; J 8,4; ArOH- $\text{H}_{3,5}$); 7,09 (m; 2H; J 8,4; ArOH- $\text{H}_{2,6}$); 7,11-7,16 (m, 2H, ArF- $\text{H}_{2,6}$); 7,63-7,66 (m, 2H, ArF- $\text{H}_{3,5}$); 9,25 (s, 1H); 10,23 (s, 1H); ^{13}C NMR (DMSO- d_6): δ = 15,8 (CH_3); 47,7 (CH); 49,3 (NCH_2^{EA}); 60,4 (OCH_2^{EA}); 64,9 (NCH); 115,1 (ArOH- $\text{C}_{3,5}$); 115,2 a 115,4 (d; J 22,1; ArF- $\text{C}_{3,5}$); 121,0 a 121,1 (d; J 7,5;

ArF-C_{2,6}); 128,7 (ArOH-C_{2,6}); 132,5 (ArOH-C₁); 135,9 (d; *J* 3,0; ArF-C₁); 156,4 (ArOH-C₄); 156,8 a 159,1 (d; *J* 239,3; ArF-C₄); 173,9 (C=O).

HR MALDI-MS: C₁₈H₂₁FN₂O₃ [M+H]⁺: změřený *m/z* 333,16078; požadovaný *m/z* 333,16090.

3.7 Kinetická měření

Měření hydrolyzy a aminolýzy byla provedena na přístroji HP UV/VIS 8453 Diode Array v 1 cm v uzavíratelné kyvetě temperované v bloku přístroje při 39 °C. Před vlastním měřením bylo proměřeno elektronové spektrum sledované látky v daných prostředích (rozmezí vlnových délek 200–400 nm). Tímto pokusem byla vybrána vhodná vlnová délka pro kinetická měření (246–250 nm). Do kyvety byly postupně pipetovány 2 ml roztoků primárních aminových pufrů (přípravy jednotlivých pufrů jsou uvedeny v příloze I) nebo hydroxidu sodného o známé koncentraci resp. pH změřeném pomocí skleněné elektrody na přístroji Radiometer Copenhagen PHM 93. Po vytemperování (cca 5 minut) bylo do kyvety vstříknuto 5–10 µl methanolického roztoku Ezetimibu či β-laktamů **IV** a **V**. Pro přípravu methanolického roztoku byl použit methanol spektroskopické čistoty. Ze změřené závislosti absorbance na čase byly vypočteny pozorované rychlostní konstanty pseudoprvního řádu k_{poz} pomocí programu⁷⁸ OPKIN.

4 Výsledky a diskuse

4.1 Zhodnocení syntézy připravených sloučenin

Prvním reakčním krokem syntézy substituovaných β -laktamů **IV** a **V** s relativní konfigurací *trans* byla příprava *Schiffových* bází **IIa** a **IIb** dle schématu 17. Výchozími látkami pro syntézu byly 4-benzyloxybenzaldehyd (**Ia**), 4-methoxybenzaldehyd (**Ib**) a 4-fluoranilin. Oproti literatuře²⁵ byla reakce prováděna za katalýzy kyselinou octovou. Průběh reakce byl značně závislý na zvoleném rozpouštědle. Nejdříve byla reakce prováděna v 96% ethanolu (azeotropický), avšak přítomná voda způsobovala ustavení rovnováhy mezi výchozími látkami a produktem. Proto byla reakce provedena v bezvodém methanolu, kde byla rovnováha zcela posunuta ve směru produktu s izolovaným výtěžkem 90 % iminu **IIa** a 76 % iminu **IIb**.

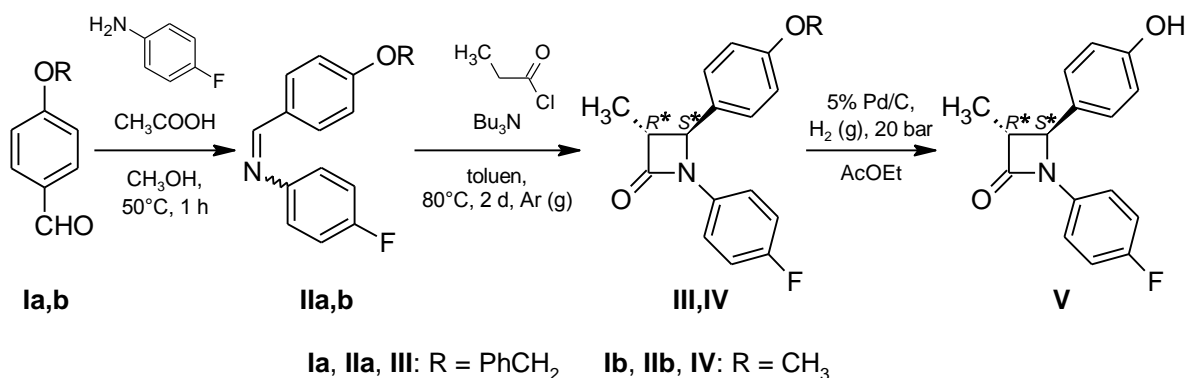


Schéma 17 Syntéza β -laktamů **IV** a **V**.

Dalším krokem syntézy byla cykloadiční reakce chloridu kyseliny propanové s *Schiffovými* bázemi **IIa** a **IIb** dle literatury³. Reakce byla prováděna za podmínek termodynamické kontroly, která upřednostňuje vznik požadovaného *trans*-izomeru (98% de). Cykloadiční reakce byla nejprve provedena za přístupu vzduchu, a tedy i vzdušné vlhkosti, avšak za těchto podmínek docházelo k částečnému rozkladu iminů na výchozí aldehyd a 4-fluoranilin. Z tohoto důvodu byla syntéza opakována a prováděna pod inertní atmosférou argonu. Pro zabránění rozkladných procesů a tedy zvýšení výtěžku byla reakce navíc prováděna v sodíkem sušeném toluenu. Tentokrát již vznikl požadovaný substituovaný β -laktam **III** v celkovém výtěžku 61 % a β -laktam **IV** ve výtěžku 58 %. Vznik *trans*-isomeru byl prokázán pomocí 1D-NOESY spektra (viz příloha IV), ze kterého vyplývá prostorová blízkost mezi methinovým vodíkem v poloze 4 a methylovými vodíky v poloze 3 β -laktamového kruhu. Vznik *trans*-isomeru navíc potvrzuje i hodnota interakční konstanty, která je podle literatury³³

$^3J = 2$ Hz pro relativní konfiguraci *trans* a $^3J = 5-6$ Hz pro relativní konfiguraci *cis*. Mnou experimentálně zjištěná hodnota byla $^3J = 2,4$ Hz.

Posledním krokem syntézy bylo v případě β -laktamu **III** odstranění chránicí benzylové skupiny za mírně modifikovaných podmínek popsanych v literatuře³. Odchránění bylo provedeno v atmosféře vodíku za zvýšeného tlaku 20 bar. Od popsaného pracovního postupu se můj postup lišil použitím 5% Pd/C a reakční dobou, kterou bylo třeba prodloužit. Takto byl připraven požadovaný substituovaný β -laktam **V** s uspokojivým výtěžkem 69 %. Charakterizace byla provedena pomocí ^1H a ^{13}C NMR (viz příloha III) a MALDI.

4.2 Hydrolýza

Jak již bylo řečeno v teoretické části, doprovází aminolýzu β -laktamového kruhu vždy hydrolýza, i když její podíl při nízkých hodnotách pH tvoří méně než 15 %. V roztocích s vyšší hodnotou pH se však tento podíl postupně zvyšuje a od jisté hodnoty pH je bazická hydrolýza hlavním probíhajícím procesem. Vzhledem k tomu, že aminolýza Ezetimibu i strukturně příbuzných β -laktamů **IV**, **V** probíhá měřitelnou rychlostí až se silně bazickými aminy ($\text{p}K_{\text{a}} > 9$) v roztocích s $\text{pH} > 9$, zabývala jsem se i studiem samotné hydrolýzy v roztocích hydroxidu sodného i v roztocích aminových pufrů (viz následující kapitola).

V rámci své bakalářské práce³⁴ jsem se zabývala identifikací produktů vznikajících působením vodných roztoků terciárních aminových pufrů a zředěného hydroxidu sodného na Ezetimib. Na základě rentgenostrukturní analýzy, ^1H , ^{13}C NMR spektroskopie a HPLC s použitím chirální kolony jsem jako produkt jednoznačně potvrdila (2*R*,3*R*,6*S*)-*N*,6-bis(4-fluorfenyl)-2-(4-hydroxyfenyl)-3,4,5,6-tetrahydro-2*H*-pyran-3-karboxamid (**VIIa**) (Schéma 18 a Obr. 3) namísto chybně navržené³⁵ soli 5-(4-fluorfenyl)-2-[(4-fluorfenylamino)-(4-hydroxyfenyl)methyl]pent-4-enové kyseliny (**XIII**). Má zjištění byla vzápětí nezávisle potvrzena i dalšími autory.³⁶

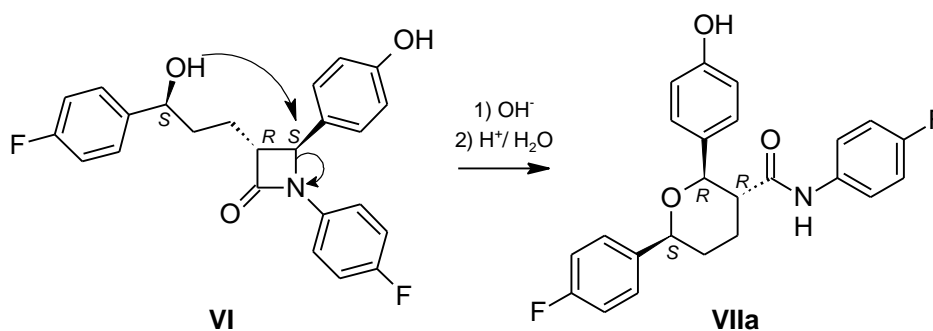
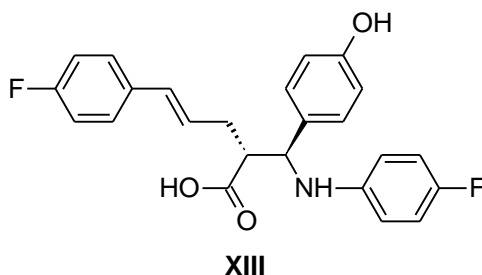
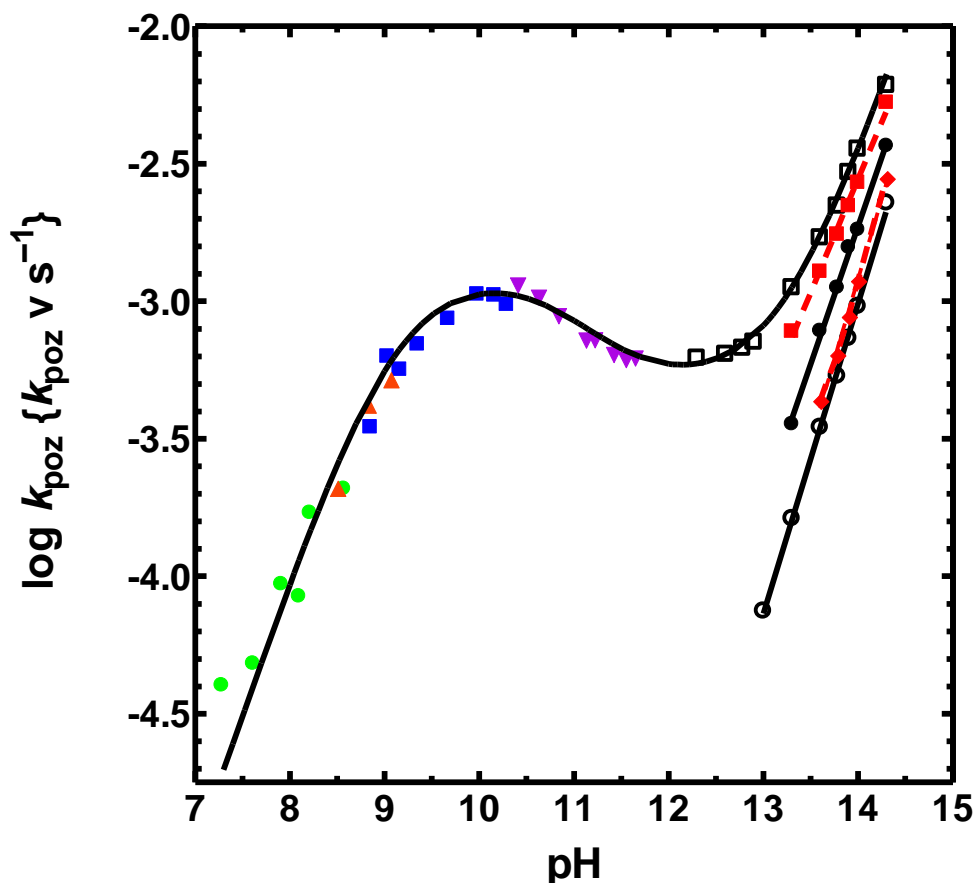


Schéma 18 Produkt **VIIa** vznikající přesmykem Ezetimibu.



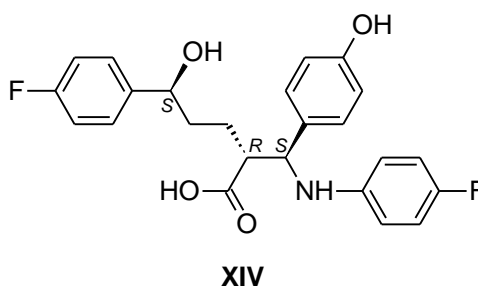
Obr. 3 Chybně³⁵ navržená struktura **XIII** rozkladu Ezetimibu.

Po zjištění struktury produktu jsem se ve své bakalářské práci³⁴ zabývala i studiem mechanismu transformace uvedené ve Schématu 18. Na základě změřeného pH-profilu (Obr. 4) byl navržen mechanismus zahrnující vznik reaktivního aniontu resp. dianiontu v předřazených rovnováhách, po kterém následoval intramolekulární atak alkoholátu na uhlík C-4 laktamového kruhu.



Obr. 4 – pH profil přesmyku Ezetimibu měřený v *N*-methylmorfolinovém (NMF; ●), *N*-methyl-diethanolaninovém (NDA; ▲), *N,N*-dimethylaminoethanolovém (DMAE; ■) a triethylaminovém pufru (TEA; ▼), v roztocích hydroxidu sodného ve vodě (NaOH; □) resp. v D₂O (NaOD; ■) a pH profily β-laktamů **IV** (●) a **V** (○) v roztocích hydroxidu sodného a β-laktam **V** navíc v D₂O (NaOD; ◆) roztoku při 39 °C.

V rámci mé bakalářské práce³⁴ však zůstala nedořešena otázka produktu rozkladu Ezetimibu vznikajícího v koncentrovaných roztocích hydroxidu sodného (tj. při pH > 13), ve kterých se podle pH-profilu otevírá nová reakční cesta charakterizovaná lineárním nárůstem log k_{poz} . Tento lineární nárůst by mohl odpovídat tvorbě 2-[[[(4-fluorfenyl)amino]-(4-hydroxyfenyl)methyl]-5-(4-fluorfenyl)-5-hydroxypentanové kyseliny (**XIV**; Obr. 5) vznikající bazickou hydrolyzou β -laktamového kruhu Ezetimibu.

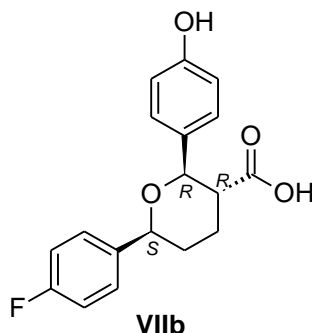


Obr. 5 Navržený produkt po alkalické hydrolyze Ezetimibu v silně bazickém prostředí vodných roztoků NaOH (pH = 12).

Tomu by nasvědčovalo i kinetické chování připravených β -laktamů **IV** a **V**, které nemohou na rozdíl od Ezetimibu podléhat přesmyku ale jen hydrolyze na odpovídající β -aminokyselinu (Schéma 14). U β -laktamů **IV** a **V**, se totiž pozorovaná rychlostní konstanta k_{poz} lineárně zvyšuje s koncentrací hydroxidu (viz. Obr. 4), což odpovídá kinetické rovnici, v níž vystupuje hydroxid v 1. řádu a změřené hodnoty k_{poz} se blíží hodnotám zjištěným pro reakci Ezetimibu. Rovněž publikované hodnoty^{37,38} bimolekulárních rychlostních konstant různých β -laktamů jsou řádově podobné hodnotě zjištěné u reakce Ezetimibu s hydroxidovým iontem ($k = 3,1 \cdot 10^{-3} \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).³⁴ Ze srovnání rychlosti hydrolyzy β -laktamů **IV** a **V** dále plyne, že blokace fenolické hydroxyskupiny methylací nemá významný vliv na průběh této reakce.

Abych potvrdila svou domněnku, že vzniká kyselina **XIV**, pokusila jsem se ji izolovat po reakci Ezetimibu v roztoku 2M NaOH. Vzhledem k malé rozpustnosti Ezetimibu však tento experiment poskytl pouze směs obsahující jak nezreagovaný výchozí Ezetimib, tak i produkt jeho přesmyku **VIIa** spolu s dalšími minoritními složkami, které se mi však nepodařilo izolovat v čisté podobě a identifikovat jejich strukturu. Abych eliminovala nízkou rozpustnost Ezetimibu ve vodě, pokusila jsem se jej solubilizovat přidávkem methanolu. V 75% vodném methanolu, v němž byla reakční směs od počátku homogenní jsem po 1 hod. při 40 °C isolovala malý podíl (11 %) produktu přesmyku **VIIa** (ten byl izolován i po 4 hod. zahřívání) a surový produkt (61 %), který se mi podařilo vyčistit chromatografií a krystalizací. Na základě ¹H, ¹³C a LC-MS jsem zjistila, že vzniklým produktem je

(2*R*,3*R*,6*S*)-6-(4-fluorfenyl)-2-(4-hydroxyfenyl)tetrahydro-2*H*-pyran-3-karboxylová kyselina (**VIIb**, Obr. 6) obsahující i velmi malé množství kyseliny **XIV**.



Obr. 6 Potvrzený produkt bazické hydrolyzy Ezetimibu.

Zatímco u produktu přesmyku Ezetimibu pravděpodobně nedochází k racemizaci, protože ^1H NMR spektrum obsahuje pouze jednu sadu signálů, β -aminokyselina **IX**, vzniklá otevřením β -laktamového kruhu **V** v prostředí 2M NaOH racemizuje a v ^1H NMR spektru se objevují dvě sady signálů s nestejnou integrální intenzitou. Tato racemizace je však velmi pomalá, protože ani po 4 dnech nedošlo ke vzniku racemátu. Obdobná racemizace β -aminokyselin v roztocích silných bazí byla již dříve popsána.³²

Produkt **VIIb** by mohl vznikat následnou hydrolyzou amidické skupiny produktu transformace **VIIa**. Abych tuto domněnku potvrdila, pokusila jsem se nezávisle připravit kyselinu **VIIb** z amidu **VIIa** za stejných podmínek, za kterých vznikal přímo z Ezetimibu. Překvapivě jsem však zjistila, že amid **VIIa** je v koncentrovaných roztocích methanolického hydroxidu sodného úplně stabilní, což jsem potvrdila i sledováním UV-VIS spektra amidu **VIIa** v 1M a 2M vodném NaOH. Ani za podmínek pseudoprvního řádu, tj. ve velkém nadbytku hydroxidu nedocházelo k žádným změnám ve spektru, které by ukazovaly na přeměnu **VIIa** na **VIIb**. Důvodem nízké reaktivity amidické funkční skupiny je pravděpodobně fakt, že v silně bazickém prostředí je tato skupina ve významné míře přítomna ve formě konjugované báze (vodík *N*-fenylamidů je slabě kyselý - $\text{p}K_a = 15\text{--}26$; měřené v DMF)³⁹, která již prakticky nereaguje s dalším nukleofilem. Kromě toho by následná hydrolyza neodpovídala nárůstu k_{poz} v pH profilu.

Alternativní vysvětlení vzniku kyseliny **VIIb** spočívá v rychlé cyklizaci kyseliny **XIV** vznikající buď původně navrhovanou paralelní hydrolyzou β -laktamového kruhu Ezetimibu, případně z dočasně vzniklého (3*R*,6*S*)-6-(4-fluorfenyl)-3-[(*S*)-[(4-fluorofenyl)amino](4-hydroxyfenyl)methyl]tetrahydro-2*H*-pyran-2-onu (Schéma 19). Pro reakční cestu zahrnující laktonizaci svědčí i přítomnost methylesteru kyseliny **XIV** v reakční směsi, který byl opět

isolován při sloupcové chromatografii jako minoritní frakce (<5%). Tento ester totiž v silně bazickém prostředí nemůže vznikat následnou esterifikací kyseliny **XIV**, ale pouze otevřením laktonového kruhu sloučeniny **XV** v rovnováze s přítomným methanolátem.

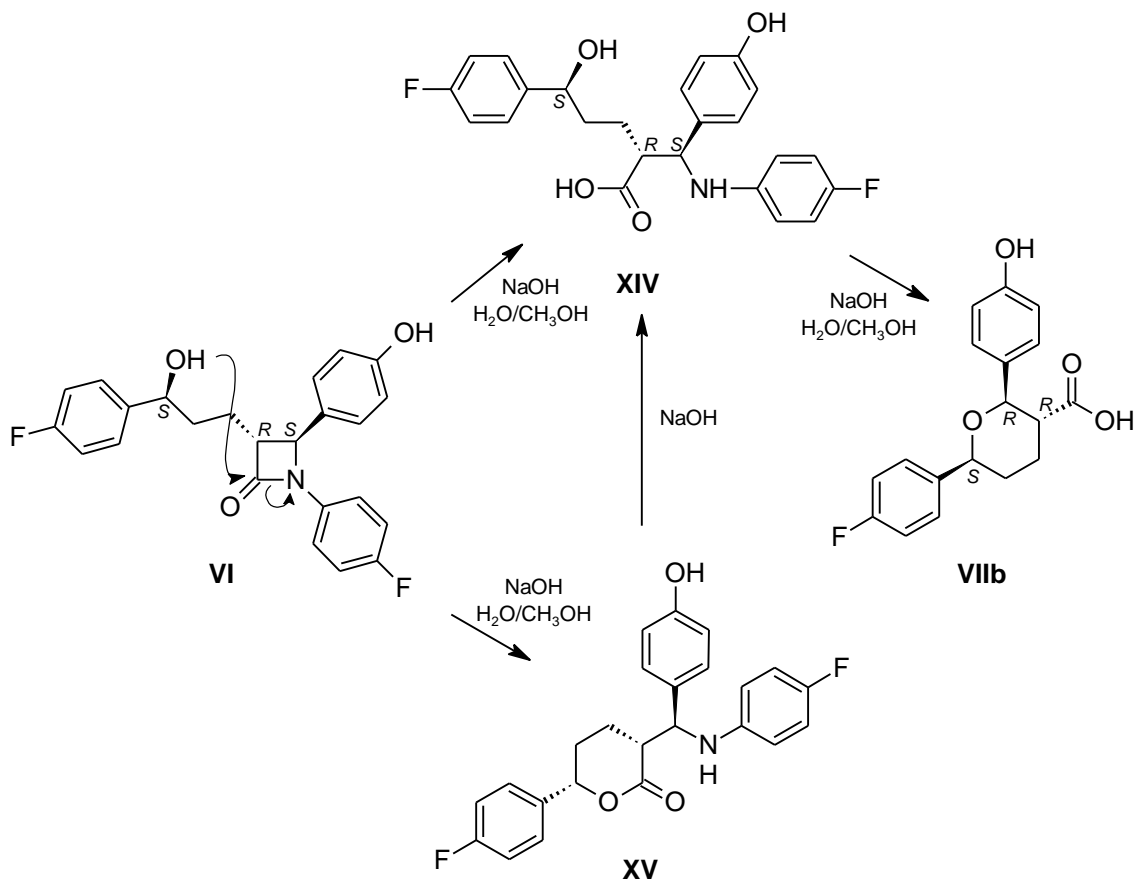
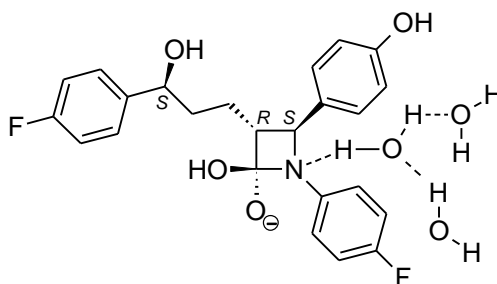


Schéma 19 Mechanismus vzniku kyseliny **VIIIb**.

Abych získala další informaci o reakci Ezetimibu v koncentrovanějších roztocích hydroxidu sodného, provedla jsem měření pozorované rychlostní konstanty v roztocích deuteriumoxidu. Pro hydrolyzu β -laktamů je totiž typický^{40,41} inverzní rozpouštědlový kinetický isotopový efekt odpovídající rychlost určujícímu ataku OH^- resp. OD^- na karbonylovou skupinu β -laktamů. Rozpouštědlový kinetický isotopový efekt blízký nebo větší než jedna je pozorován pouze v případech, kdy je rychlost určujícím krokem vodou katalyzovaný rozpad vzniklého tetraedrálního intermediátu. V mém případě byla pro Ezetimib zjištěna (viz Příloha V) hodnota rozpouštědlového kinetického isotopového efektu S-KIE = 1,29, avšak pro β -laktam **V** S-KIE = 0,79. To znamená, že u Ezetimibu nedochází v rychlost určujícím kroku k ataku hydroxidového iontu, ale k jinému ději ovlivněnému rozpouštědlem (viz Obr. 7). Naproti tomu u β -laktamu **V** je v souladu s literaturou^{40,41} rychlost určujícím krokem atak hydroxidového aniontu na karbonylovou skupinu.

Hodnota zjištěná pro Ezetimib prakticky přesně odpovídá vypočtenému⁴¹ efektu (1,27) pro rychlost určující rozpad komplexu aniontového intermediátu s vodou, jehož struktura je uvedena na následujícím obrázku:



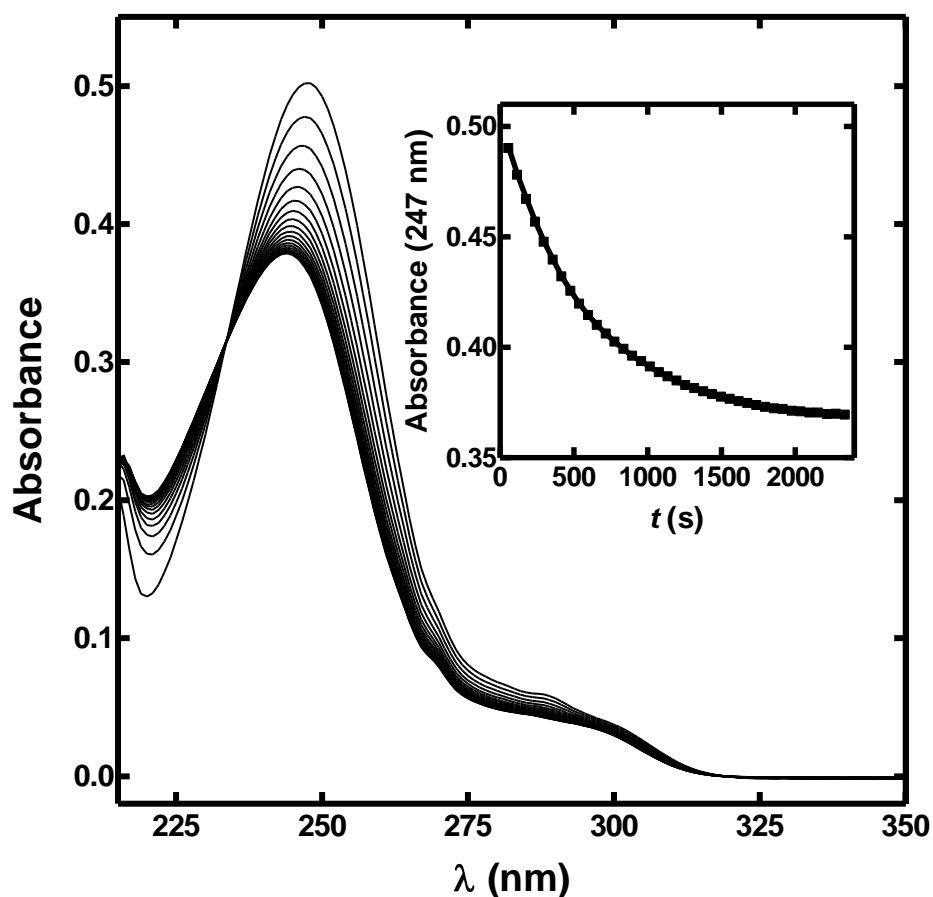
Obr. 7 Rozpad aniontového intermediátu.

Tato varianta je však díky přítomnosti methylesteru kyseliny **XIV** v reakční směsi málo pravděpodobná. Navíc pouhá záměna methylskupiny u sloučeniny **V** za elektronicky podobnou 3-(4-fluorfenyl)-3-hydroxypropyl skupinu by jen stěží generovala takto významnou změnu v mechanismu. Jako pravděpodobnější se mi proto jeví výše navrhaná cesta spočívající v rychlost určující laktonizaci Ezetimibu poskytující **XV** (Schéma 19). I při uplatnění tohoto mechanismu by se sice projevily inverzní rozpouštědlový kinetický isotopový efekt u předřazené rovnováhy zahrnující disociaci alkoholické skupiny, avšak samotný intramolekulární atak alkoxidu na karbonylovou skupinu by mohl vykazovat hodnotu rozpouštědlového kinetického isotopového efektu větší než 1. Podobná situace byla popsána například při cyklizaci amidů na imidazolinony.⁴²

4.3 Aminolýza

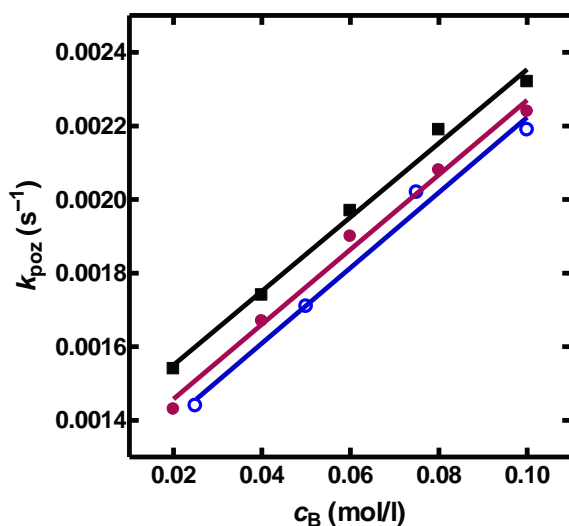
Aminolýza Ezetimibu a strukturně příbuzného β -laktamu **V** poskytuje příslušné β -aminoamidy **Xa-d** a **XIIa-c** v průměrném výtěžku 45-75%. O něco nižší výtěžek derivátů **Xa-c** (typicky okolo 60%) je způsoben paralelně probíhajícím přesmykem výchozího Ezetimibu na **VIIa** a s tím spojenými ztrátami při chromatografické separaci a následné krystalizaci produktu. U derivátů **XIIa-c** jsem získala o něco vyšší průměrné výtěžky (okolo 70%) a ztráty souvisely pouze se závěrečnou krystalizací. Překvapivě se nepodařilo připravit β -aminoamidy odvozené od β -laktamu **IV**, kde i po několikadenním zahřívání s butylaminem byl izolován pouze výchozí β -laktam **IV** a žádný produkt aminolýzy. Vzhledem k tomu, že hydrolyza **IV** probíhá normálně a dokonce i řádově srovnatelnou rychlostí jako u β -laktamu **V**, je toto chování při aminolýze stěží pochopitelné a nemám pro ně žádné logické vysvětlení.

Kinetika aminolýzy Ezetimibu a strukturně příbuzného β -laktamu **V** byla následně studována spektrofotometricky (Obr. 8) za podmínek pseudoprvního řádu ve vodných roztocích primárních aminových pufrů, konkrétně v butylaminovém (BA), 3-methoxypropylaminovém (MPA), 2-methoxyethylaminovém (MEA) a 2-hydroxyethylaminovém (HEA) při 39 °C a iontové síle $I = 0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Výběr jednotlivých aminů byl učiněn na základě snadné měřitelnosti pozorované rychlostní konstanty aminolýzy. U primárních aminů s nižší hodnotou pK_a než 9 totiž aminolýza probíhá extrémně pomalu a navíc je u Ezetimibu významně doprovázena přesmykem na **VIIa**.

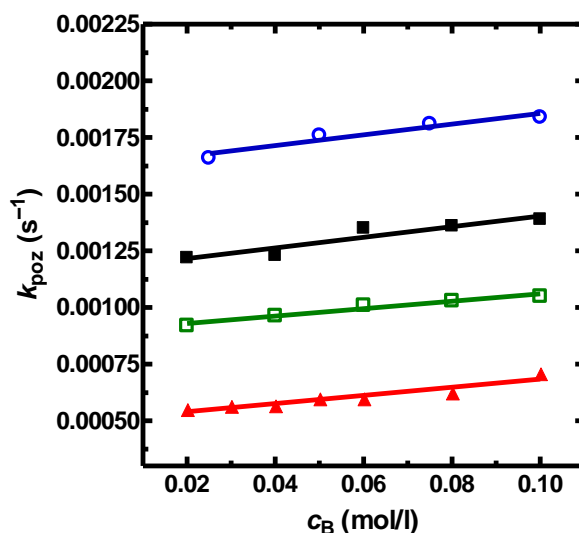


Obr. 8 Spektrální záznam aminolýzy Ezetimibu v tlumivém roztoku butylaminu s poměrem $[B]/[BH^+] = 2/1$ a o koncentraci báze $0,04 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a z něj zkonstruovaná kinetická křivka při 247 nm.

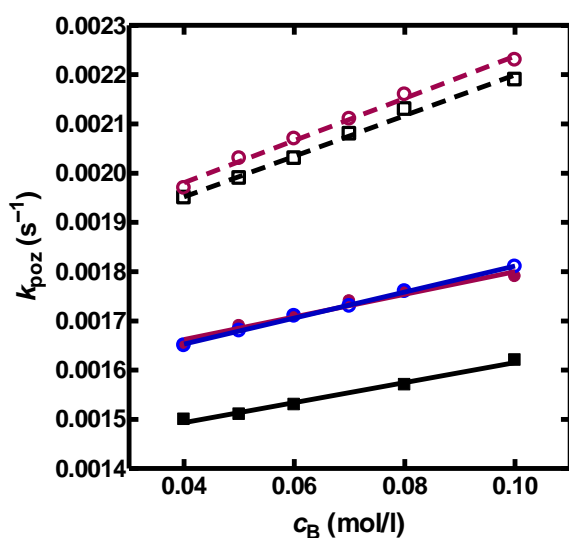
V uvedených pufrách lišících se poměrem kyselá a bazická složky bylo zjištěno, že stanovené rychlostní konstanty k_{poz} stoupají lineárně s koncentrací aminu v pufru. Změna bazicity pufru vyvolaná změnou poměru mezi kyselou a bazickou složkou pufru pak vede pouze k posunutí přímky ve vertikálním směru (viz. Obr. 9-14).



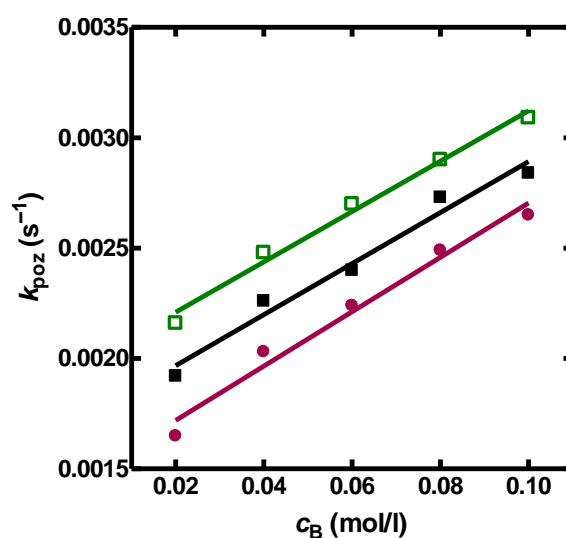
Obr. 9 Závislost k_{poz} pseudoprvního řádu u Ezetimibu na koncentraci BA měřená v roztocích s různým poměrem $[B]/[BH^+]$; BA [2/1, ■, (pH = 11,33); 3/1, ●, (pH = 11,34); 4/1, ○, (pH = 11,52)].



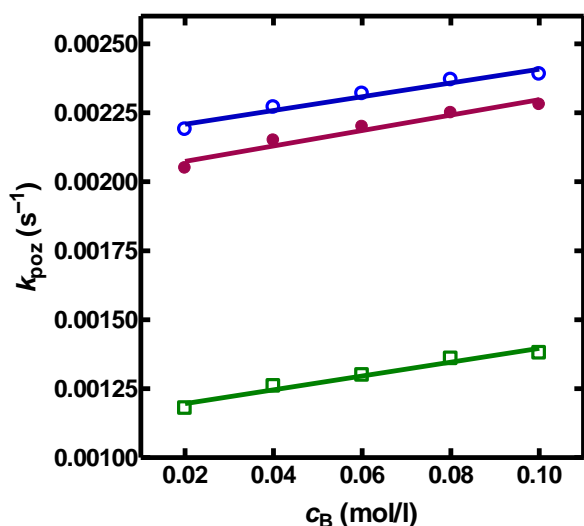
Obr. 10 Závislost k_{poz} pseudoprvního řádu u Ezetimibu na koncentraci MEA měřená v roztocích s různým poměrem $[B]/[BH^+]$; MEA [1/2, ▲, (pH = 9,35); 1/1, □, (pH = 9,63); 2/1, ■, (pH = 9,97); 4/1, ○, (pH = 10,25)].



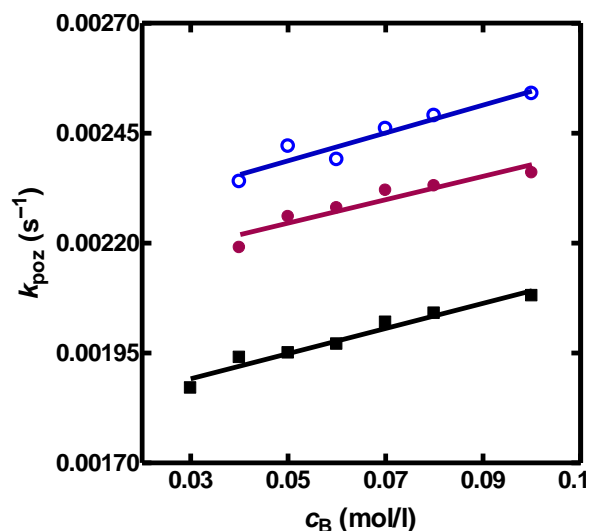
Obr. 11 Závislost k_{poz} pseudoprvního řádu u Ezetimibu na koncentraci HEA měřená v roztocích s různým poměrem $[B]/[BH^+]$; HEA [2/1, ■, (pH = 10,01); 3/1, ●, (pH = 10,20); 4/1, ○, (pH = 10,32)] a na koncentraci MPA s poměry $[B]/[BH^+] = [2/1, \square, (pH = 10,56); 3/1, \circ, (pH = 10,73)]$.



Obr. 12 Závislost k_{poz} pseudoprvního řádu u β -laktamu V na koncentraci BA měřená v roztocích s různým poměrem $[B]/[BH^+]$; BA [1/1, □, (pH = 11,07); 2/1, ■, (pH = 11,33); 3/1, ●, (pH = 11,34)].



Obr. 13 Závislost k_{poz} pseudoprvního řádu u β -laktamu **V** na koncentraci MEA měřená v roztocích s různým poměrem $[B]/[BH^+]$; MEA [1/1, \square , (pH = 9,63); 3/1, \bullet , (pH = 10,06); 4/1, \circ , (pH = 10,25)].



Obr. 14 Závislost k_{poz} pseudoprvního řádu u β -laktamu **V** na koncentraci HEA měřená v roztocích s různým poměrem $[B]/[BH^+]$; HEA [2/1, \blacksquare , (pH = 10,01); 3/1, \bullet , (pH = 10,20); 4/1, \circ , (pH = 10,32)].

Z uvedeného pozorování vyplývají dva důležité závěry pro mechanismus aminolýzy. Z lineárního nárůstu pozorované rychlostní konstanty vyplývá, že kinetická rovnice je vůči aminu prvního řádu a molekula aminu tak vystupuje pouze jako nukleofil a nikoliv jako báze katalyzující rozpad primárně vzniklého tetraedráního intermediátu T^\pm resp. T^0 . Z paralelnosti přímků v jednotlivých obrázcích dále vyplývá, že funkci katalyzující báze zde nemá ani hydroxidový aniont a rovnice (1) v kapitole 2.1 se redukuje na tvar (2):

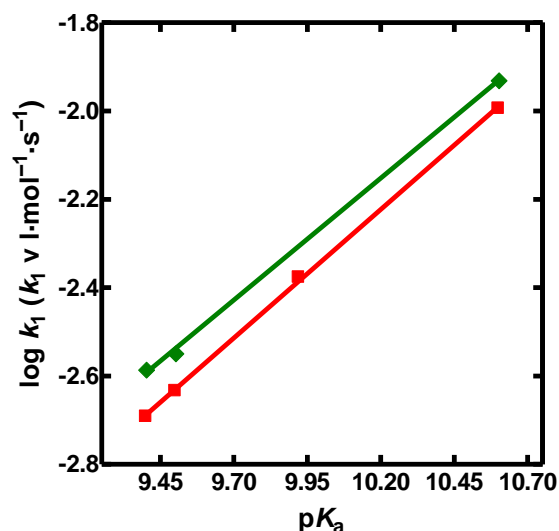
$$k_{\text{poz}} = k_0 + k_1[\text{RNH}_2] \quad (2)$$

kde k_0 odpovídá hydrolýze β -laktamového kruhu **V**, resp. přesmyku Ezetimibu a k_1 rychlost určujícímu ataku molekuly aminu na laktamové uskupení. Z přímkových závislostí lze tedy jako klíčový parametr aminolýzy určit rychlostní konstantu k_1 pro každý ze studovaných aminů (Tab. 2)

Tab. 2 Průměrné hodnoty rychlostní konstanty k_1 pro Ezetimib a β -laktam **V** měřené v primárních aminech s daným pK_a .⁴³

Amin	pK_a	$10^3 \cdot k_1$ (Ezetimib)	$10^3 \cdot k_1$ (β -laktam V)
MEA	9,40	2,036	2,600
HEA	9,50	2,326	2,832
MPA	9,92	4,208	–
BA	10,60	10,15	11,75

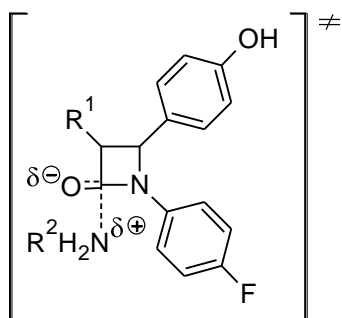
Vynesením dekadického logaritmu rychlostní konstanty k_1 proti pK_a příslušného aminu⁴³ (viz Tab. 2) lze získat vztah Brønstedova typu, který je lineární a jeho směrnice udává hodnotu $\beta_{Nuc} = 0,58$ pro Ezetimib a $\beta_{Nuc} = 0,55$ pro β -laktam **V** (Obr. 15).



Obr. 15 Brønstedův vztah pro vznik tetraedráního intermediátu reakcí primárních aminů s Ezetimibem (\blacksquare) a s β -laktamem **V** (\blacklozenge)

Získané hodnoty β_{Nuc} odráží míru vzniku vazby mezi dusíkem aminu a uhlíkem karbonylové skupiny β -laktamového kruhu. V literatuře⁴⁴ se mi podařilo nalézt změřenou hodnotu $\beta_{Nuc} = 1,05$ pro strukturně příbuzný 1-(4-nitrofenyl)azetidín-2-on, u něhož byla navržena symetrická struktura tranzitního stavu, kde dochází ke vzniku i zániku obou vazeb C–N zhruba ve stejné míře. V mém případě je změřená hodnota β_{Nuc} prakticky poloviční, což odpovídá ranému tranzitnímu stavu (viz Obr. 16), v němž je nově vytvořená vazba C–N vytvořena jen v malé míře, zatímco vazba C–N v laktamovém kruhu je prakticky nedotčena.

Důvodem změny struktury tranzitního stavu je zejména výrazné zhoršení odstupující skupiny – 4-fluoranilinového zbytku ve srovnání s 4-nitroanilinovým zbytkem.



Obr. 16 Tranzitní stav Ezetimibu a β -laktamu **V** po ataku aminovým nukleofilem.

5 Literatura:

1. Fleming A.: *Br. J. Exp. Pathol.* **1929**, *10*, 226.
2. Page M. I.: *Acc. Chem. Res.* **1984**, *17*, 144–151.
3. Rosenblum S. B., Huynh T., Alfonso A., Davis H.R., Yumibe N., Clader J. W., Burnett D. A.: *J. Med. Chem.* **1998**, *41*, 973-980.
4. Takeshi K., Kiyoshi T.: *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9282–9285.
5. Díaz N., Suárez D., Sordo T. L., Méndez R., Villacorta J. M.: *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 4161–4172.
6. Fersht A. R., Requena Y.: *J. Am. Chem. Soc.* **1971**, *93*, 3499-3502.
7. Page M. I.: *Chem. Soc. Rev.* **1973**, 295.
8. Tsang W. Y., Ahmed N., Page M. I.: *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 485–493.
9. Díaz N., Suárez D., Sordo T. L.: *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3281–3289.
10. Díaz N., Suárez D., Sordo T. L.: *Chem. Eur. J.* **1999**, *5*, 1045–1055.
11. Díaz N., Suárez D., Sordo T. L.: *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 793–801.
12. Díaz N., Suárez D., Sordo T. L.: *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 6710–6719.
13. Gensmantel N. P., Page M. I.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II, Phys. Org. Chem.* **1979**, *2*, 137–142.
14. Page M. I., Williams A.: *Org. and Bioorg. Mechanisms* **1997**, Longman, Singapore.
15. Díaz N., Suárez D., Sordo T. L.: *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9144–9152.
16. Page M. I., Proctor P.: *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 3820–3825.
17. Martin A. F., Morris J. J., Page M. I.: *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1976**, *13*, 495–496.
18. Martin A. F., Morris J. J., Page M. I.: *J. Chem. Soc., Chem. Comm.* **1979**, *6*, 298–299.
19. Llinás A., Page M. I.: *Org. Biomol. Chem.* **2004**, *2*, 651–654.
20. Gensmantel N. P., Gowling E. W., Page M. I.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II, Phys. Org. Chem.* **1978**, *4*, 335–442.
21. Gensmantel N. P., Gowling E. W., Page M. I.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans. II, Phys. Org. Chem.* **1978**, *11*, 1725–1732.

22. Arcelli A., Cecchi R., Porzi G., Sandri M.: *J. Phys. Org. Chem.* **2005**, *18*, 255–263.
23. Oliveira A. G., Nothenberg N. S., Cuccovia I. M., Chaimovich H.: *J. Phys. Org. Chem.* **1991**, *4*, 19–24.
24. Crombie L., Jones R. C. F., Haigh D.: *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 5151–5154.
25. Thiruvengadam K. T., Fu X., Tann Ch. H., McAllister T. L., Chiu J. S., Colon C. (Schering Corporation, N.J.): US 6207822 (2001).
26. Guillon J., Stiebing S., Robba M.: *Pharm. Pharmacol. Commun.* **2006**, *6*, 25–29.
27. Sawant M. S., Pillai B. K. G., Bhirud S. B., Sharma K. (Glenmark Pharmaceuticals Ltd.): WO 017705 A1 (2007).
28. Neuvonen H., Neuvonen K., Fueleop F.: *J. Org. Chem.* **2006**, *71*, 3141–3148.
29. Larson S., Pfefferkorn J. (Pfizer Products Inc.): WO 104675 A1 (2008).
30. Al-Rawi J. M. A., Saleem L. M. N.: *Magnet. Resonance in Chem.* **1989**, *27*, 540–543.
31. Swamy G. Y. S. K., Ravikumar K., Wadhwa L. K., Saxena R., Singh S.: *Acta Crystallogr.* **2005**, *E61*, o3608–3610.
32. Vilanova B., Donoso J., Muñoz F., Blanco G. F.: *Int. J. Chem. Kin.* **1993**, *25*, 865–874.
33. Browne M., Burnett A. D., Caplen A. M. et al.: *Tetrahedron Letters*, **1995**, *36*, 2555–2558.
34. Bařová J.: Studium stability antidiabetika Ezetimibu v kyselém a bazickém prostředí, *Bakalářská práce*, Univerzita Pardubice, **2011**.
35. Gajjar A. K., Shah V. D.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *55*, 225–229.
36. Filip K., Bańkowski K., Sidoryk K., Zagrodzka J., Łaszcz M., Trzcińska K., Szyprowska A., Cmoch P., Maruszak W.: *J. Molec. Struct.* **2011**, *991*, 162–170.
37. Butler A. R., Freeman K. A., Wright D. E.: In *Recent Adv. Chem. β-Lactam Antibiot. Special Publication* - Chemical Society, Vol. 28, 299–303 (1977).
38. Blackburn G. M., Plackett J. D.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans II* **1972**, 1366–1371.
39. Maran F., Celadon D., Severin M. G., Vianello E.: *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 9320–9329.

40. Deraniyagala S. A., Adediran S. A., Pratt R. F.: *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1619-1625
a literatura zde citovaná.
41. Brown R. S., Bennet A. J., Slebocka-Tilk H.: *Acc. Chem. Res.* **1992**, *25*, 481-488.
42. Sedlák M., Hanusek J., Bina R., Kaválek J., Macháček V.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1999**, *64*, 1629-1640.
43. Haynes W. M.: *CRC Handbook of Chemistry and Physics* **2011**, *92*, CRC Press/Taylor and Francis, Boca Raton, FL.; Love P., Cohen R. B., Taft R. W.: *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *90*, 2455–2462.
44. Blackburn G. M., Plackett J. D.: *J. Chem. Soc., Perkin Trans II* **1973**, 981–985.

PŘÍLOHY

Příloha I

Příprava roztoků pufrů:

$$c_{\text{pufr}} = c_{\text{B}} + c_{\text{BH}}$$

c_{B} – koncentrace bazické složky pufru ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), c_{BH} – koncentrace kyselé složky pufru ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), c_{pufr} – koncentrace pufru ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), V_{B} – objem bazické složky pufru (ml), V_{BH} – objem kyselé složky pufru (ml), V_{HA} – objem HCl (ml), V_{KCl} – objem roztoku chloridu draselného (ml).

Všechny roztoky pufrů byly připraveny do odměrných baněk o $V = 25$ ml.

Tab. pI 1 Příprava roztoků pufrů primárních aminů s poměrem $[\text{B}]/[\text{BH}] = 1/2$

- koncentrace zásobních roztoků: $c_{\text{B}} = 0,5$ M; $c_{\text{HA}} = 1,0$ M; $c_{\text{KCl}} = 1,0$ M; $I = 0,1$ M

$[\text{B}]/[\text{BH}^+]$	c_{B} ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	c_{HB} ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	c_{pufr} ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	V_{B} (ml)	V_{HA} (ml)	V_{KCl} (ml)
1/2	0,020	0,040	0,060	3,0	1,0	1,5
	0,030	0,060	0,090	4,5	1,5	1,0
	0,040	0,080	0,120	6,0	2,0	0,5
	0,050	0,100	0,150	7,5	2,5	–
	0,060	0,120	0,180	9,0	3,0	–
	0,080	0,160	0,240	12,0	4,0	–
	0,100	0,200	0,300	15,0	5,0	–

Tab. pI 2 Příprava roztoků pufrů primárních aminů s poměrem $[\text{B}]/[\text{BH}] = 1/1$

- koncentrace zásobních roztoků: $c_{\text{B}} = 1,0$ M; $c_{\text{HA}} = 0,25$ M; $c_{\text{KCl}} = 1,0$ M; $I = 0,1$ M

$[\text{B}]/[\text{BH}^+]$	c_{B} ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	c_{HB} ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	c_{pufr} ($\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	V_{B} (ml)	V_{HA} (ml)	V_{KCl} (ml)
1/1	0,020	0,020	0,040	1,0	2,0	2,00
	0,030	0,030	0,060	1,5	3,0	1,75
	0,040	0,040	0,080	2,0	4,0	1,50
	0,050	0,050	0,100	2,5	5,0	1,25
	0,060	0,060	0,120	3,0	6,0	1,00
	0,070	0,070	0,140	3,5	7,0	0,75
	0,080	0,080	0,160	4,0	8,0	0,50
	0,100	0,100	0,200	5,0	10,0	–

Tab. pI 3 Příprava roztoků pufrů primárních aminů s poměrem $[B]/[BH] = 2/1$

- koncentrace zásobních roztoků: $c_B = 1,0 \text{ M}$; $c_{HA} = 0,25 \text{ M}$; $c_{KCl} = 1,0 \text{ M}$; $I = 0,1 \text{ M}$

$[B]/[BH^+]$	$c_B \text{ (mol}\cdot\text{l}^{-1}\text{)}$	$c_{HB} \text{ (mol}\cdot\text{l}^{-1}\text{)}$	$c_{\text{pufr}} \text{ (mol}\cdot\text{l}^{-1}\text{)}$	$V_B \text{ (ml)}$	$V_{HA} \text{ (ml)}$	$V_{KCl} \text{ (ml)}$
2/1	0,020	0,010	0,030	0,750	1,0	2,250
	0,030	0,015	0,045	1,125	1,5	2,125
	0,040	0,020	0,060	1,500	2,0	2,000
	0,050	0,025	0,075	1,875	2,5	1,875
	0,060	0,030	0,090	2,250	3,0	1,750
	0,070	0,035	0,105	2,625	3,5	1,625
	0,080	0,040	0,120	3,000	4,0	1,500
	0,100	0,050	0,150	3,750	5,0	1,250

Tab. pI 4 Příprava roztoků pufrů primárních aminů s poměrem $[B]/[BH] = 3/1$

- koncentrace zásobních roztoků: $c_B = 1,0 \text{ M}$; $c_{HA} = 0,25 \text{ M}$; $c_{KCl} = 1,0 \text{ M}$; $I = 0,1 \text{ M}$

$[B]/[BH^+]$	$c_B \text{ (mol}\cdot\text{l}^{-1}\text{)}$	$c_{HB} \text{ (mol}\cdot\text{l}^{-1}\text{)}$	$c_{\text{pufr}} \text{ (mol}\cdot\text{l}^{-1}\text{)}$	$V_B \text{ (ml)}$	$V_{HA} \text{ (ml)}$	$V_{KCl} \text{ (ml)}$
3/1	0,020	0,0067	0,0267	0,67	0,67	2,33
	0,030	0,0100	0,0400	1,00	1,00	2,25
	0,040	0,0133	0,0533	1,33	1,33	2,17
	0,050	0,0167	0,0667	1,67	1,67	2,08
	0,060	0,0200	0,0800	2,00	2,00	2,00
	0,070	0,0233	0,0933	2,33	2,33	1,92
	0,080	0,0267	0,1067	2,67	2,67	1,83
	0,100	0,0333	0,1333	3,33	3,33	1,67

Tab. pI 5 Příprava roztoků pufrů primárních aminů s poměrem $[B]/[BH] = 4/1$

- koncentrace zásobních roztoků: $c_B = 1,0 \text{ M}$; $c_{HA} = 0,25 \text{ M}$; $c_{KCl} = 1,0 \text{ M}$; $I = 0,1 \text{ M}$

$[B]/[BH^+]$	$c_B \text{ (mol}\cdot\text{l}^{-1}\text{)}$	$c_{HB} \text{ (mol}\cdot\text{l}^{-1}\text{)}$	$c_{\text{pufr}} \text{ (mol}\cdot\text{l}^{-1}\text{)}$	$V_B \text{ (ml)}$	$V_{HA} \text{ (ml)}$	$V_{KCl} \text{ (ml)}$
4/1	0,020	0,0050	0,0250	0,625	0,50	2,375
	0,030	0,0075	0,0375	0,938	0,75	2,313
	0,040	0,0100	0,0500	1,250	1,00	2,250
	0,050	0,0125	0,0625	1,563	1,25	2,188
	0,060	0,0150	0,0750	1,875	1,50	2,125
	0,070	0,0175	0,0875	2,188	1,75	2,063
	0,080	0,0200	0,1000	2,500	2,00	2,000
	0,100	0,0250	0,1250	3,125	2,50	1,875

Příloha II

Kinetická měření

- Měření k_1 aminolýzy Ezetimibu v roztocích pufrů primárních aminů

Tab. pII 1 Měření závislosti k_{poz} na koncentraci butylaminu (BA)

[B]/[BH ⁺]	c_B [mol·l ⁻¹]	c_{BH} [mol·l ⁻¹]	pH	$10^3 \cdot k_{\text{poz}}$ (s ⁻¹)	$\tau_{1/2}$ (s)	$10^3 \cdot k_1$ (s ⁻¹)
2/1	0,020	0,010	11,31	1,54	450	$10,05 \pm 0,506$
	0,040	0,020	11,33	1,74	400	
	0,060	0,030	11,35	1,97	352	
	0,080	0,040	11,34	2,19	317	
	0,100	0,025	11,33	2,32	299	
3/1	0,020	0,0067	11,30	1,43	459	$10,15 \pm 0,519$
	0,040	0,0133	11,34	1,67	414	
	0,060	0,0200	11,36	1,90	342	
	0,080	0,0267	11,37	2,08	328	
	0,100	0,0333	11,34	2,24	308	
4/1	0,025	0,0063	11,50	1,44	480	$10,24 \pm 0,812$
	0,050	0,0125	11,50	1,71	406	
	0,075	0,0188	11,53	2,02	342	
	0,100	0,0250	11,54	2,19	317	

Tab. pII 2 Měření závislosti k_{poz} na koncentraci 2-methoxyethylaminu (MEA)

[B]/[BH ⁺]	c_B [mol·l ⁻¹]	c_{BH} [mol·l ⁻¹]	pH	$10^4 \cdot k_{\text{poz}}$ (s ⁻¹)	$\tau_{1/2}$ (s)	$10^3 \cdot k_1$ (s ⁻¹)
1/2	0,02	0,04	9,35	5,51	1258	$1,802 \pm 0,264$
	0,03	0,06	9,35	5,65	1227	
	0,04	0,08	9,35	5,67	1222	
	0,05	0,10	9,35	5,97	1162	
	0,06	0,12	9,35	5,98	1159	
	0,08	0,16	9,36	6,24	1111	
	0,10	0,20	9,35	7,09	977	
1/1	0,02	0,02	9,62	9,20	725	$1,630 \pm 0,190$
	0,04	0,04	9,65	9,64	693	
	0,06	0,06	9,65	10,1	677	
	0,08	0,08	9,65	10,3	654	
	0,10	0,10	9,60	10,5	638	

2/1	0,02	0,01	9,96	12,2	570	2,350 ± 0,492
	0,04	0,02	9,97	12,3	562	
	0,06	0,03	9,99	13,5	534	
	0,08	0,04	9,98	13,6	508	
	0,10	0,05	9,97	13,9	500	
4/1	0,025	0,0063	10,24	16,6	418	2,360 ± 0,451
	0,050	0,0125	10,25	17,6	395	
	0,075	0,0188	10,25	18,1	382	
	0,100	0,0250	10,25	18,4	376	

Tab. pII 3 Měření závislosti k_{poz} na koncentraci 2-hydroxyethylaminu (HEA)

[B]/[BH ⁺]	c_B [mol·l ⁻¹]	c_{BH} [mol·l ⁻¹]	pH	$10^3 \cdot k_{\text{poz}}$ (s ⁻¹)	$\tau_{1/2}$ (s)	$10^3 \cdot k_1$ (s ⁻¹)
2/1	0,040	0,020	10,06	1,50	460	2,034 ± 0,130
	0,050	0,025	9,94	1,51	459	
	0,060	0,030	10,06	1,53	452	
	0,080	0,040	10,05	1,57	443	
	0,100	0,025	10,03	1,62	428	
3/1	0,040	0,0133	10,23	1,65	421	2,300 ± 0,204
	0,050	0,0166	10,12	1,69	409	
	0,060	0,0200	10,23	1,71	405	
	0,070	0,0233	10,11	1,74	399	
	0,080	0,0267	10,23	1,76	399	
	0,100	0,0333	10,23	1,79	393	
4/1	0,040	0,010	10,36	1,65	421	2,643 ± 0,062
	0,050	0,013	10,24	1,68	413	
	0,060	0,015	10,36	1,71	405	
	0,070	0,018	10,24	1,73	401	
	0,080	0,020	10,36	1,76	394	
	0,100	0,025	10,35	1,81	382	

Tab. pII 4 Měření závislosti k_{poz} na koncentraci 3-methoxypropylaminu (MPA)

[B]/[BH ⁺]	c_B [mol·l ⁻¹]	c_{BH} [mol·l ⁻¹]	pH	$10^3 \cdot k_{\text{poz}}$ (s ⁻¹)	$\tau_{1/2}$ (s)	$10^3 \cdot k_1$ (s ⁻¹)
2/1	0,040	0,020	10,56	1,95	356	4,129 ± 0,183
	0,050	0,025	10,55	1,99	349	
	0,060	0,030	10,57	2,03	341	
	0,070	0,035	10,55	2,08	333	
	0,080	0,040	10,56	2,13	326	
	0,100	0,050	10,56	2,19	317	

3/1	0,040	0,0133	10,72	1,97	352	4,286 ± 0,177
	0,050	0,0167	10,71	2,03	342	
	0,060	0,0200	10,73	2,07	335	
	0,070	0,0233	10,72	2,11	328	
	0,080	0,0267	10,73	2,16	320	
	0,100	0,0333	10,74	2,23	311	

• Měření k_1 aminolýzy β -laktamu v roztocích pufrů primárních aminů

Tab. pII 5 Měření závislosti k_{poz} na koncentraci butylaminu (BA)

[B]/[BH ⁺]	c_B [mol·l ⁻¹]	c_{BH} [mol·l ⁻¹]	pH	$10^3 \cdot k_{\text{poz}}$ (s ⁻¹)	$\tau_{1/2}$ (s)	$10^3 \cdot k_1$ (s ⁻¹)
1/1	0,02	0,02	11,06	2,16	322	11,40 ± 0,735
	0,04	0,04	11,09	2,48	280	
	0,06	0,06	11,08	2,70	256	
	0,08	0,08	11,07	2,90	239	
	0,10	0,10	11,07	3,09	223	
2/1	0,020	0,010	11,31	1,92	362	11,55 ± 1,095
	0,040	0,020	11,33	2,26	306	
	0,060	0,030	11,35	2,40	297	
	0,080	0,040	11,34	2,73	254	
	0,100	0,050	11,33	2,84	244	
3/1	0,020	0,0067	11,30	1,65	419	12,30 ± 1,069
	0,040	0,0133	11,34	2,03	349	
	0,060	0,0200	11,36	2,24	307	
	0,080	0,0267	11,37	2,49	278	
	0,100	0,0333	11,34	2,65	262	

Tab. pII 6 Měření závislosti k_{poz} na koncentraci 2-methoxyethylaminu (MEA)

[B]/[BH ⁺]	c_B [mol·l ⁻¹]	c_{BH} [mol·l ⁻¹]	pH	$10^3 \cdot k_{\text{poz}}$ (s ⁻¹)	$\tau_{1/2}$ (s)	$10^3 \cdot k_1$ (s ⁻¹)
1/1	0,02	0,02	9,62	1,18	586	2,50 ± 0,277
	0,04	0,04	9,65	1,26	550	
	0,06	0,06	9,65	1,30	534	
	0,08	0,08	9,65	1,36	508	
	0,10	0,10	9,60	1,38	503	
3/1	0,020	0,0067	10,04	2,05	339	2,80 ± 0,361
	0,040	0,0133	10,06	2,15	321	
	0,060	0,0200	10,07	2,20	316	
	0,080	0,0267	10,06	2,25	308	
	0,100	0,0333	10,06	2,28	305	

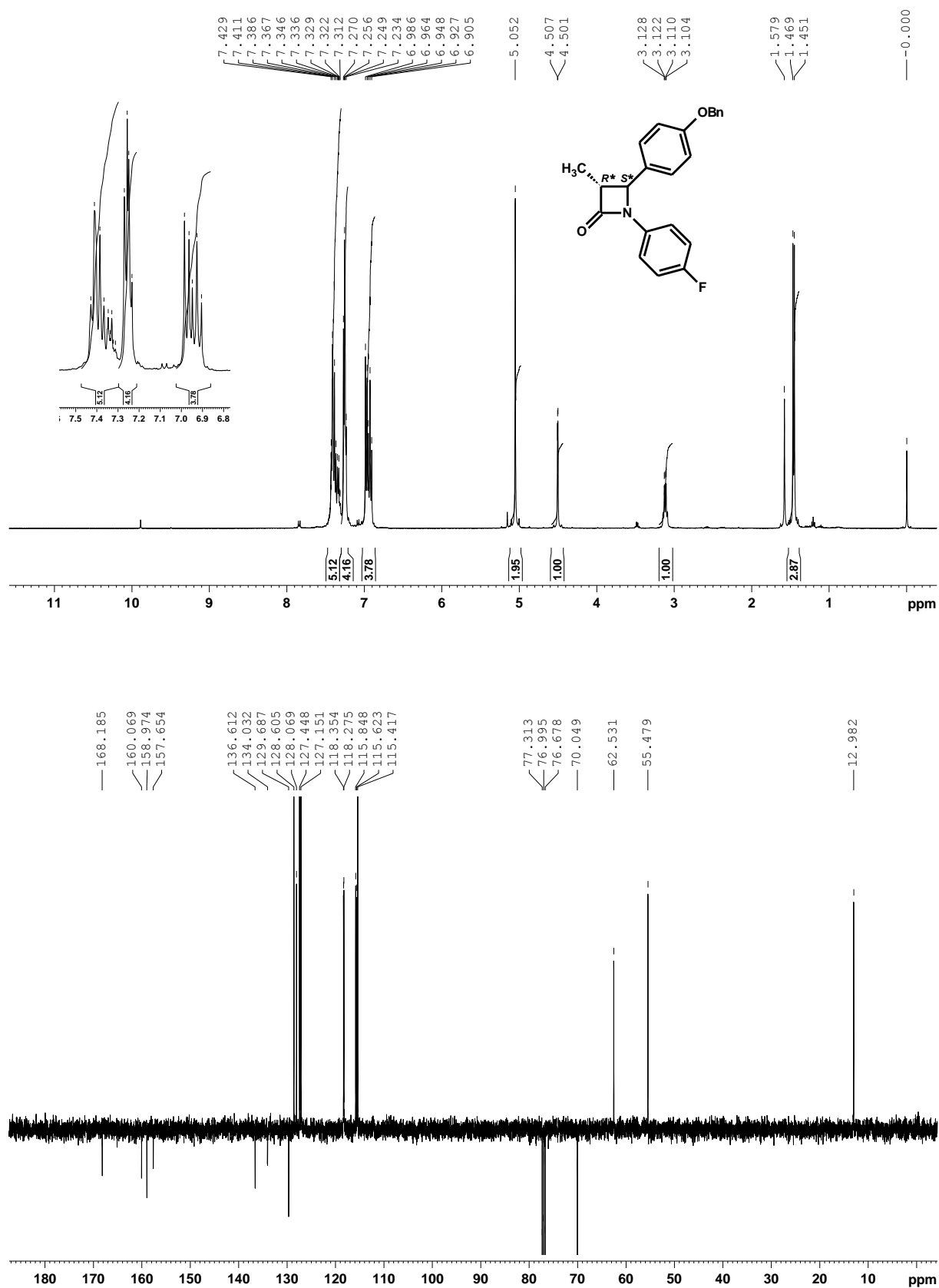
4/1	0,020	0,005	10,16	2,19	316	2,50 ± 0,300
	0,040	0,010	10,17	2,27	306	
	0,060	0,015	10,18	2,32	298	
	0,080	0,020	10,19	2,37	291	
	0,100	0,025	10,17	2,39	290	

Tab. pII 7 Měření závislosti k_{poz} na koncentraci 2-hydroxyethylaminu (HEA)

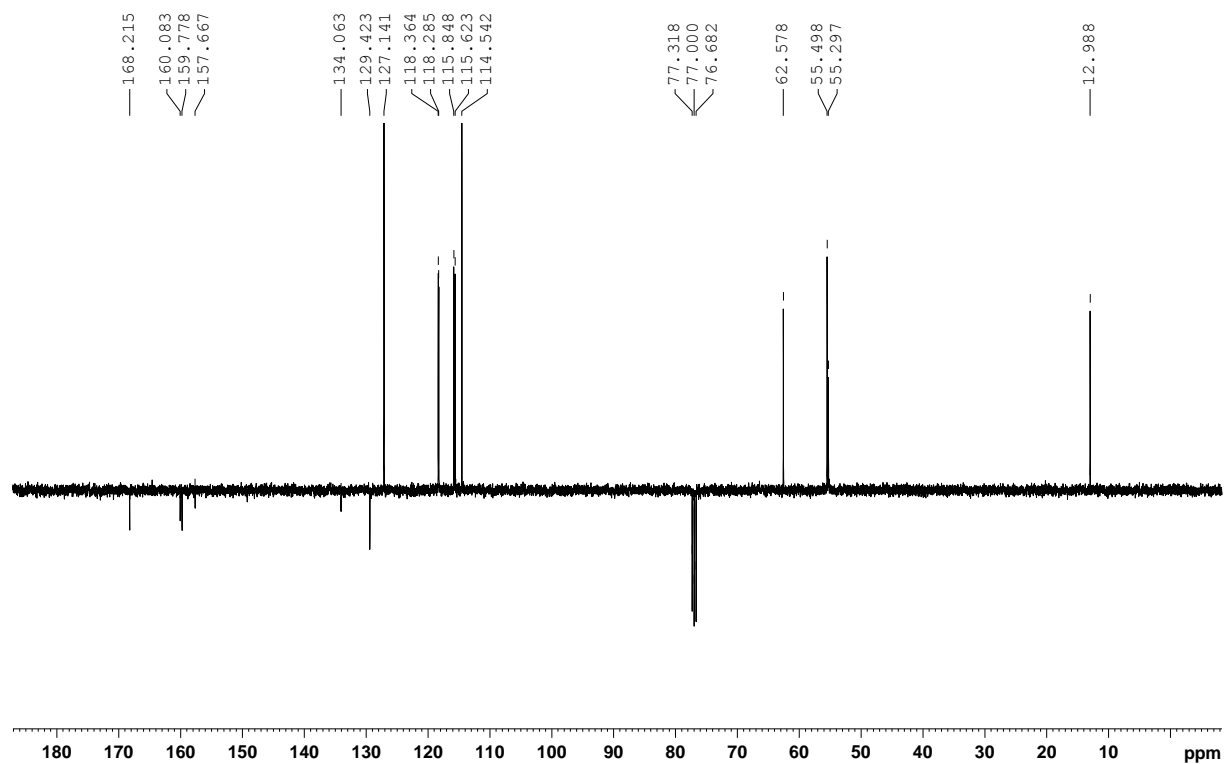
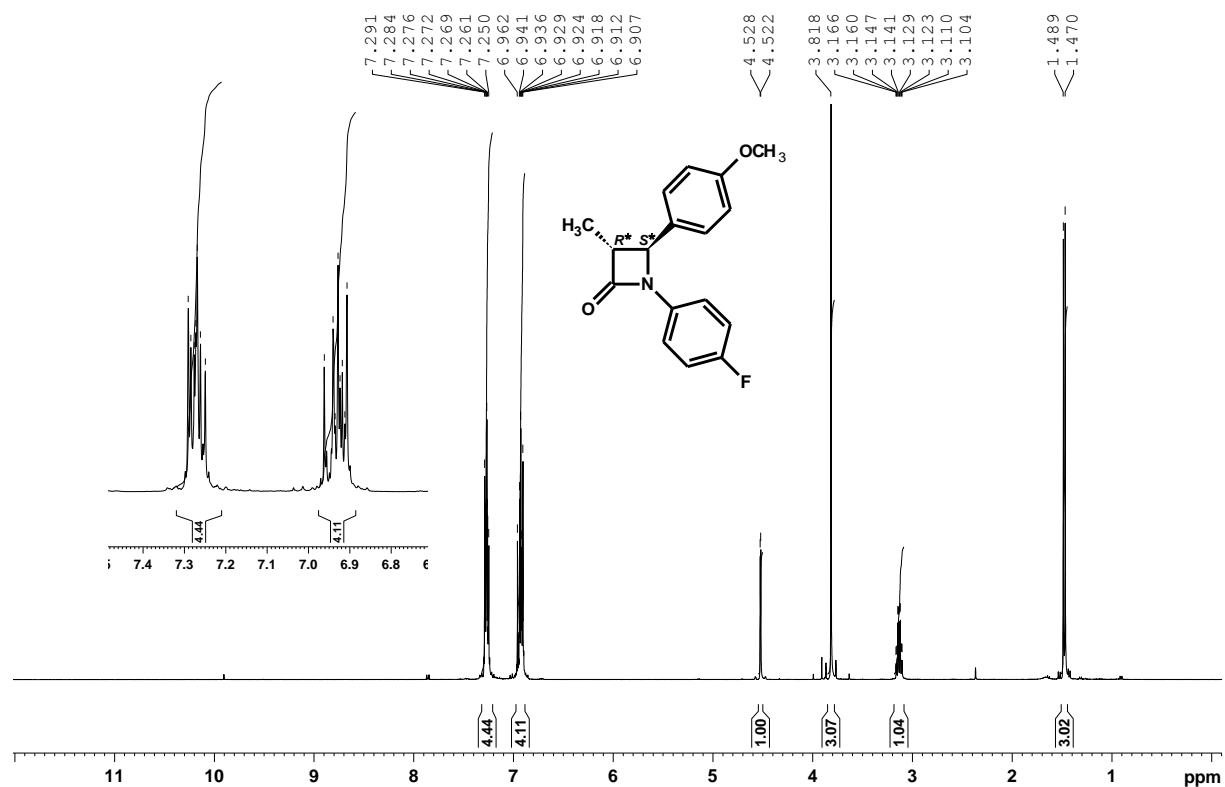
[B]/[BH ⁺]	c_B [mol·l ⁻¹]	c_{BH} [mol·l ⁻¹]	pH	$10^3 \cdot k_{\text{poz}}$ (s ⁻¹)	$\tau_{1/2}$ (s)	$10^3 \cdot k_1$ (s ⁻¹)
2/1	0,030	0,015	9,94	1,87	371	2,811 ± 0,268
	0,040	0,020	10,06	1,94	357	
	0,050	0,025	9,94	1,95	356	
	0,060	0,030	10,06	1,97	353	
	0,070	0,035	9,94	2,02	327	
	0,080	0,040	10,05	2,04	340	
	0,100	0,050	10,03	2,08	332	
3/1	0,040	0,0133	10,23	2,19	316	2,657 ± 0,454
	0,050	0,0167	10,12	2,26	307	
	0,060	0,0200	10,23	2,28	305	
	0,070	0,0233	10,11	2,32	297	
	0,080	0,0267	10,23	2,33	297	
	0,100	0,0333	10,23	2,36	296	
4/1	0,0400	0,0100	10,36	2,34	296	3,029 ± 0,516
	0,0500	0,0125	10,24	2,42	287	
	0,0600	0,0150	10,36	2,39	292	
	0,0700	0,0175	10,24	2,46	282	
	0,0800	0,0200	10,36	2,49	277	
	0,1000	0,0250	10,35	2,53	273	

Příloha III

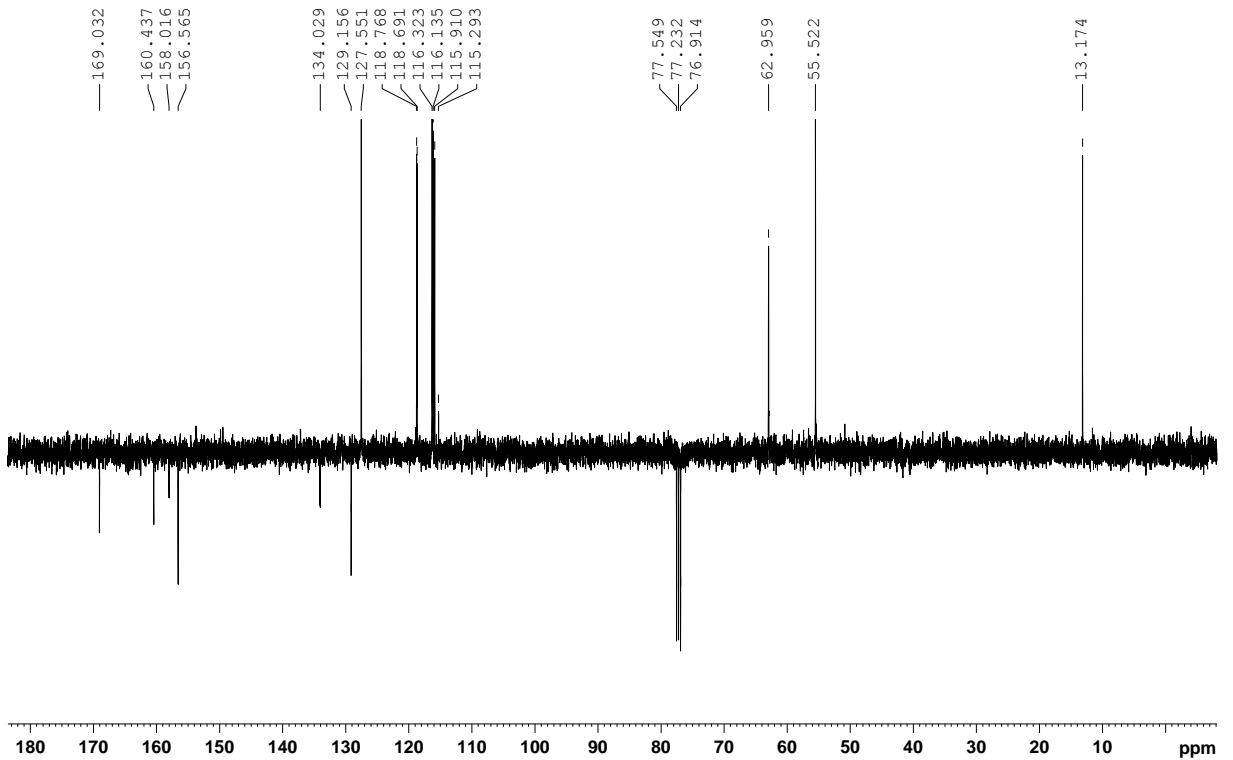
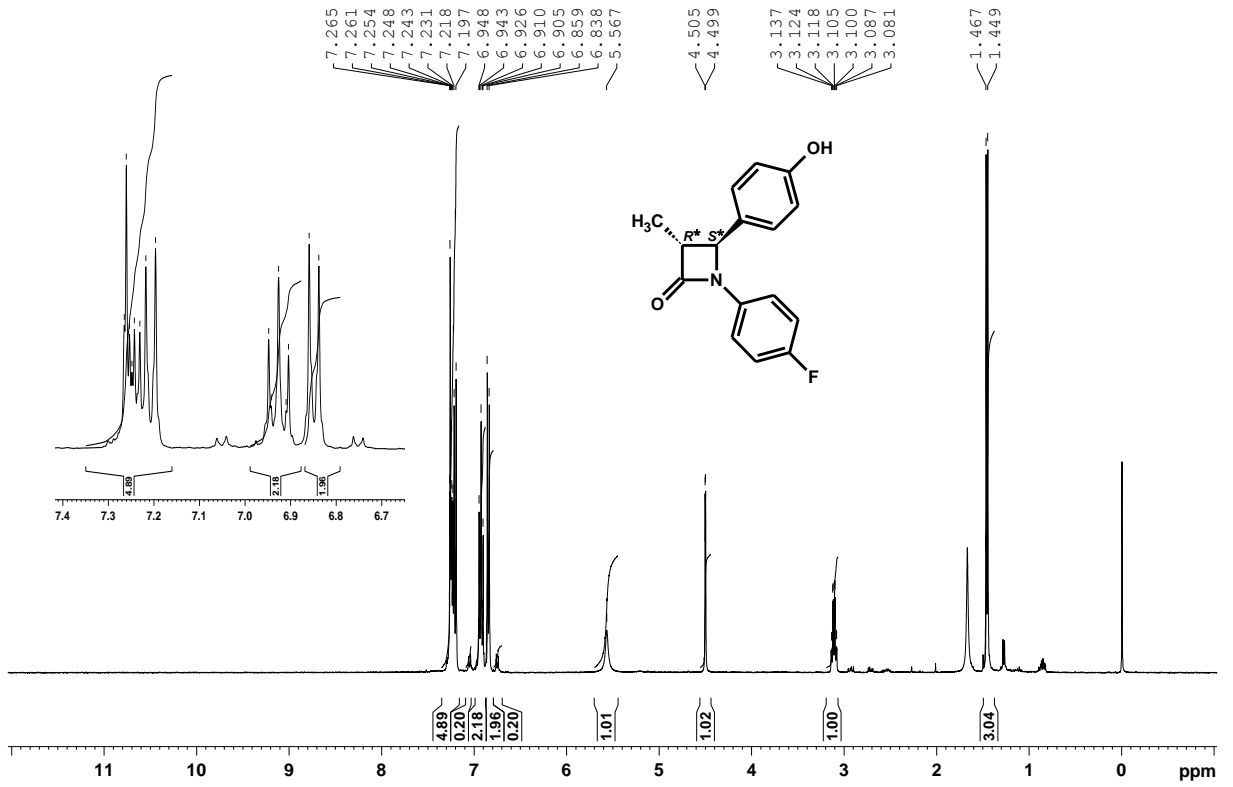
^1H a ^{13}C NMR spektrum (3*R**,4*S**)-4-[4-(benzyloxy)fenyl]-1-(4-fluorfenyl)-3-methyl-azetidín-2-onu (III).



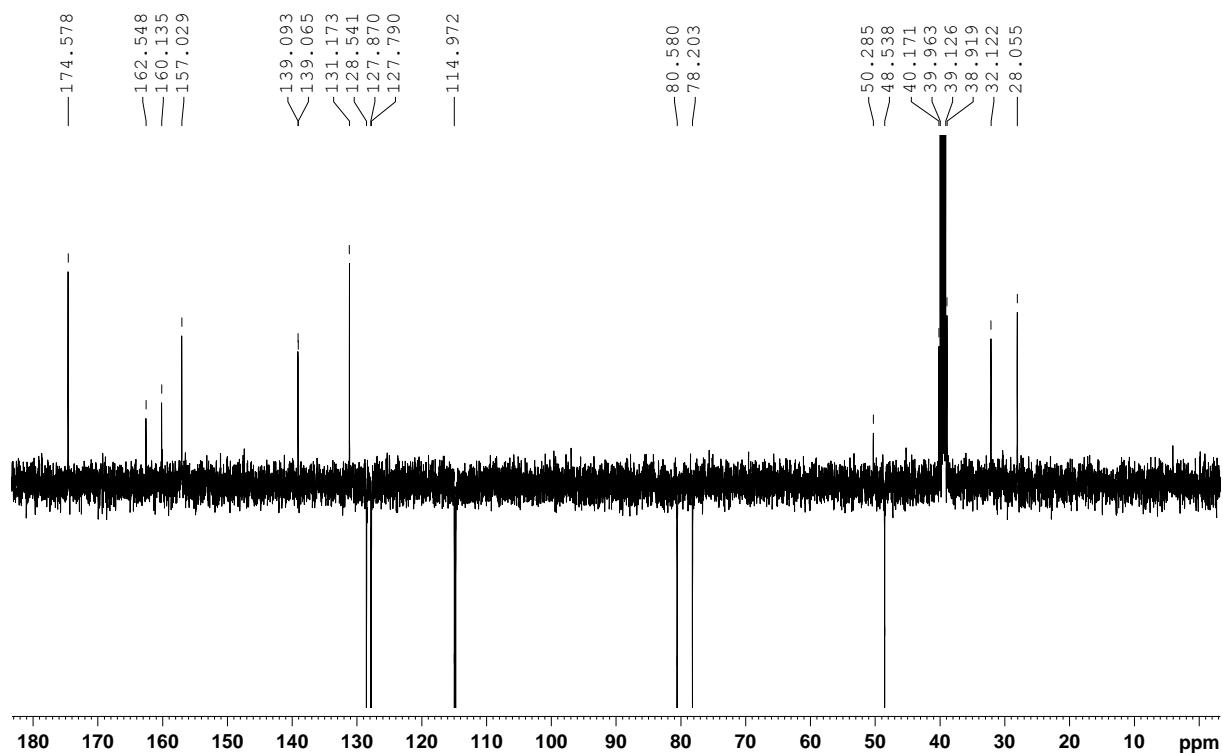
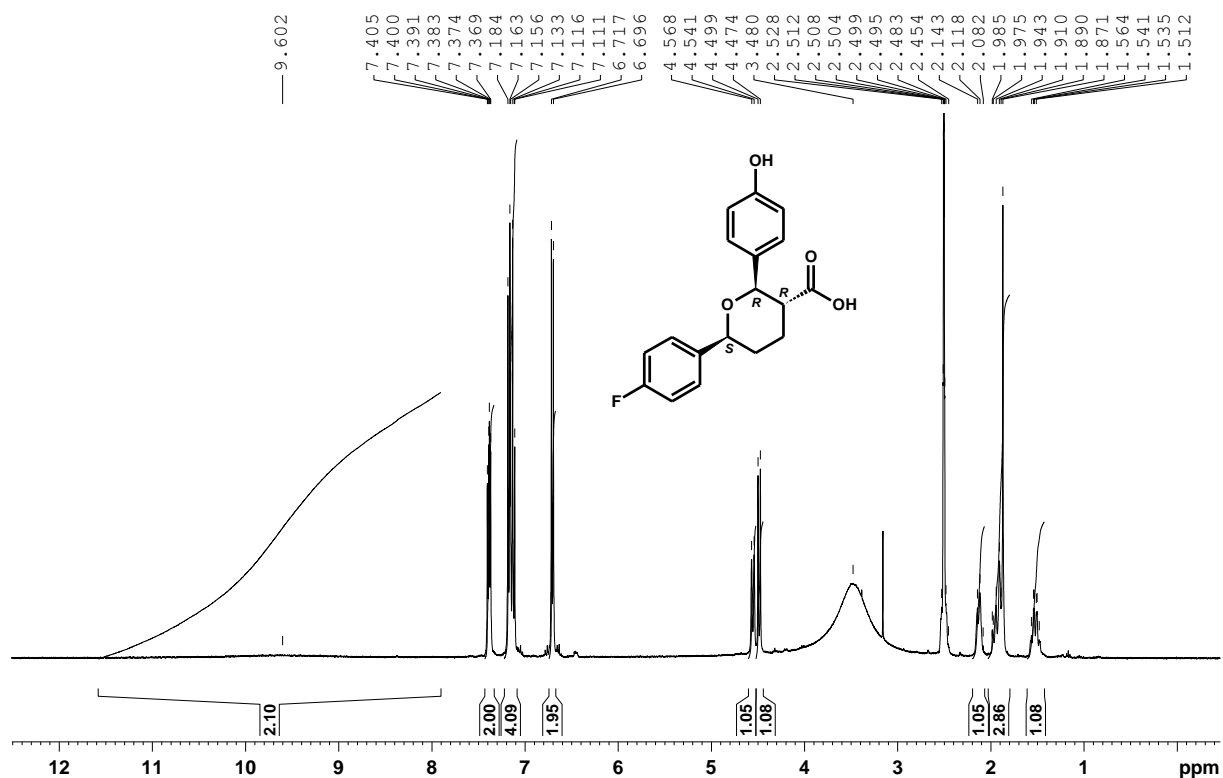
¹H a ¹³C NMR spektrum (3*R,4*S**)-1-(4-fluorfenyl)-4-(4-metoksyfenyl)-3-methylazetidin-2-onu (IV).**



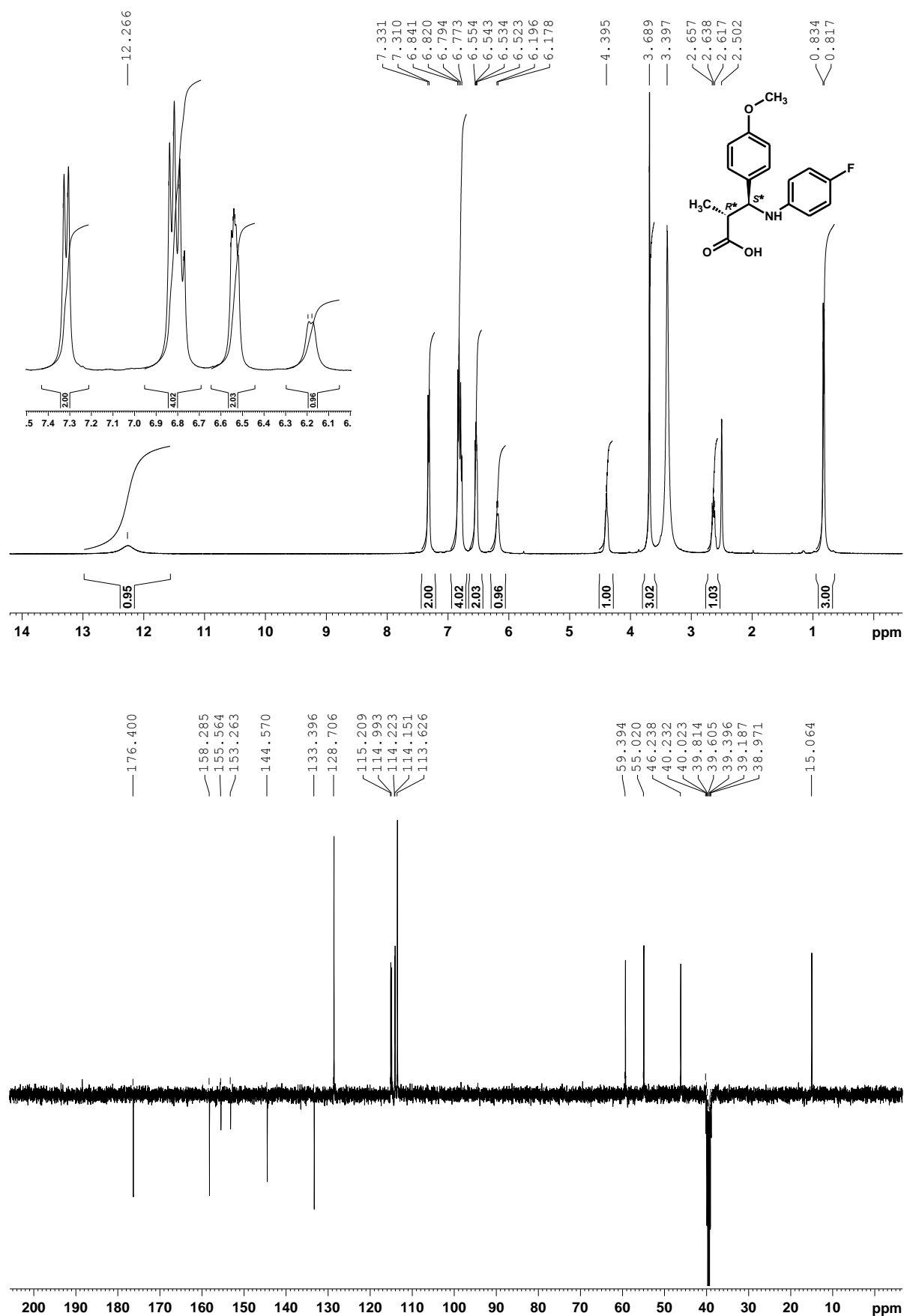
^1H a ^{13}C NMR spektrum (3*R,4*S**)-1-(4-fluorfenyl)-4-(4-hydroxyfenyl)-3-methylazetidin-2-
onu (V).**



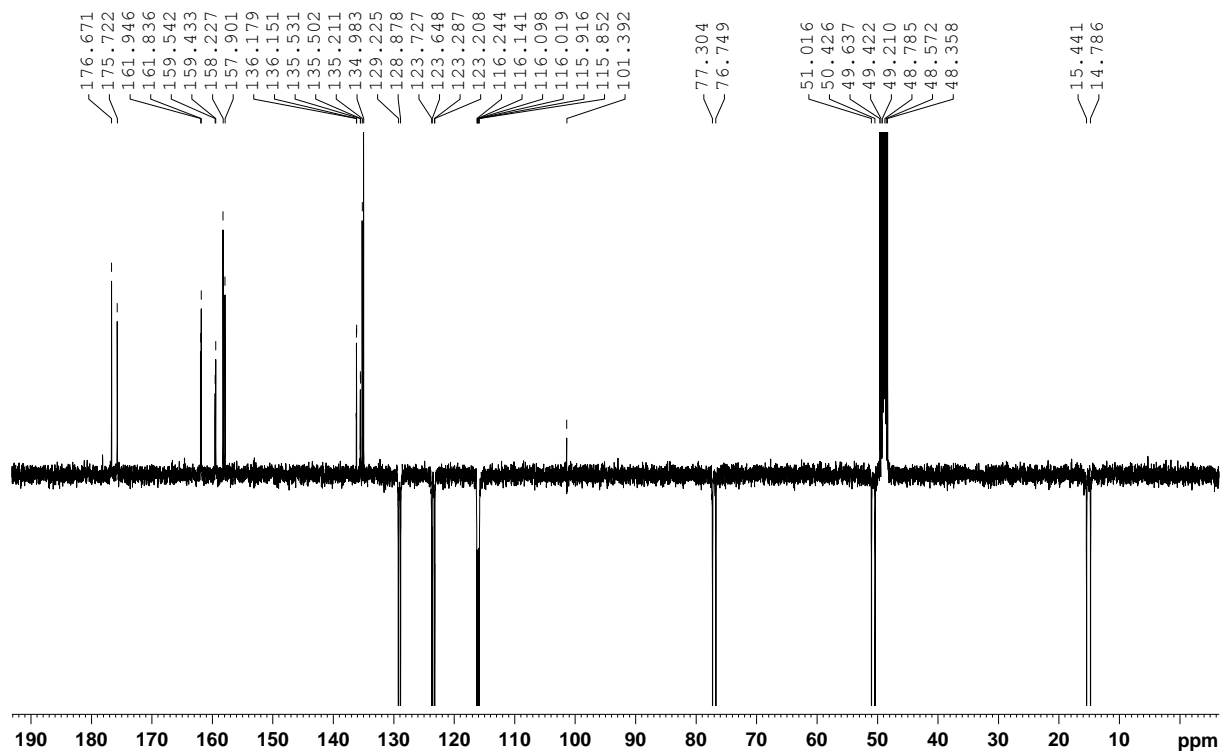
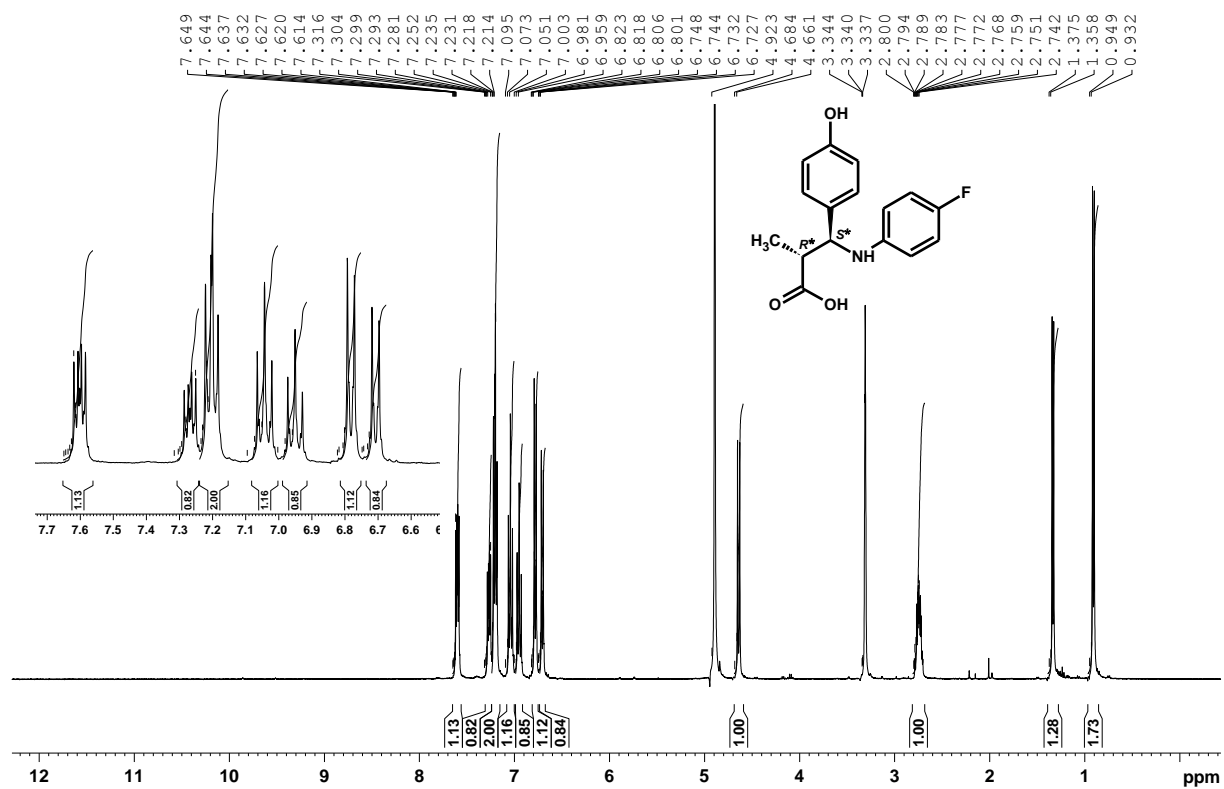
^1H a ^{13}C NMR spektrum (2*R*,3*R*,6*S*)-6-(4-fluorfenyl)-2-(4-hydroxyfenyl)-3,4,5,6-tetrahydro-2*H*-pyran-3-karboxylové kyseliny (VIIb).



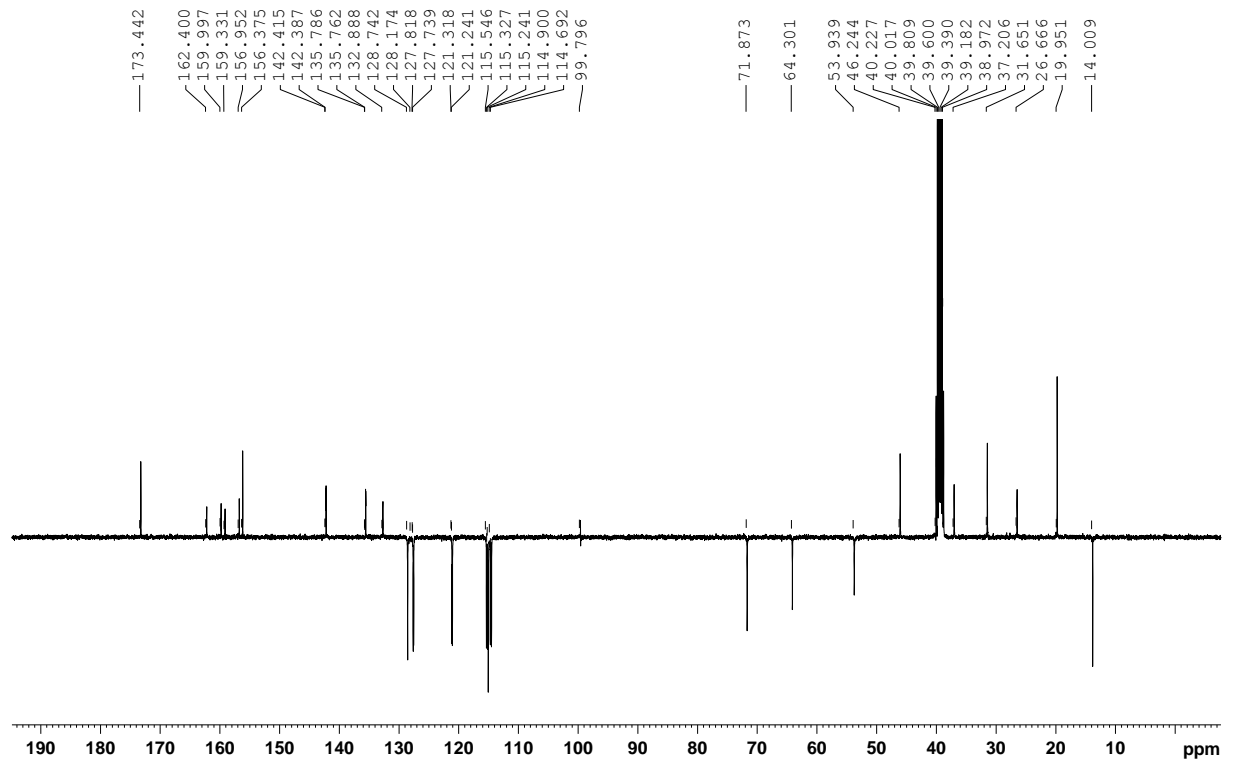
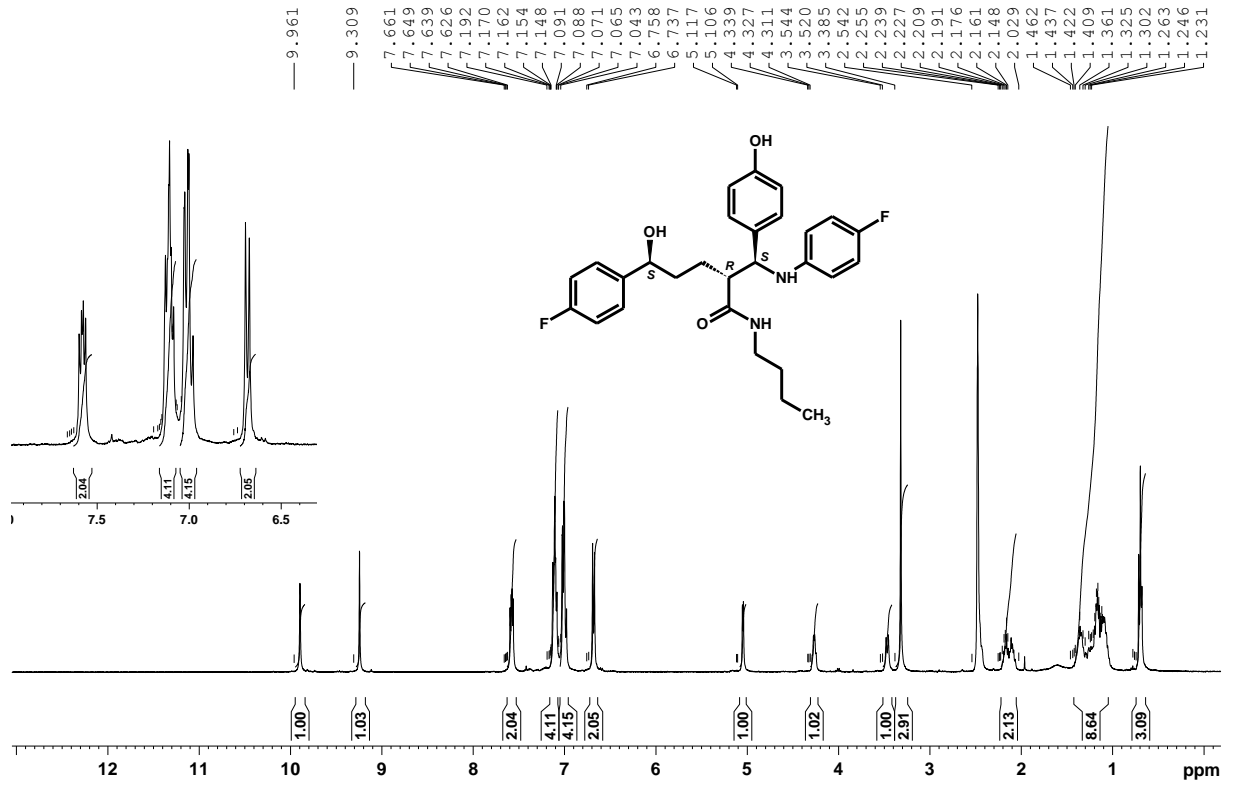
^1H a ^{13}C NMR spektrum (2*R**,3*S**)-3-(4-fluorfenylamino)-3-(4-methoxyfenyl)-2-methylpropanové kyseliny (VIII).



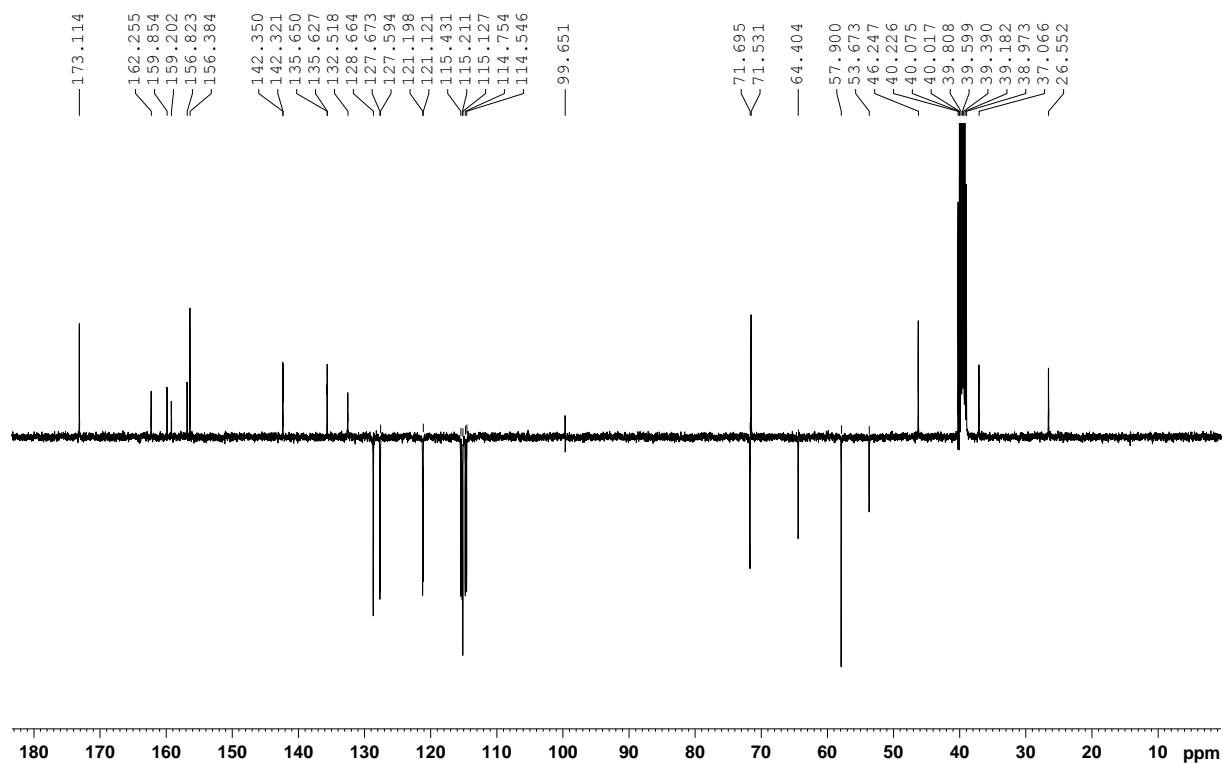
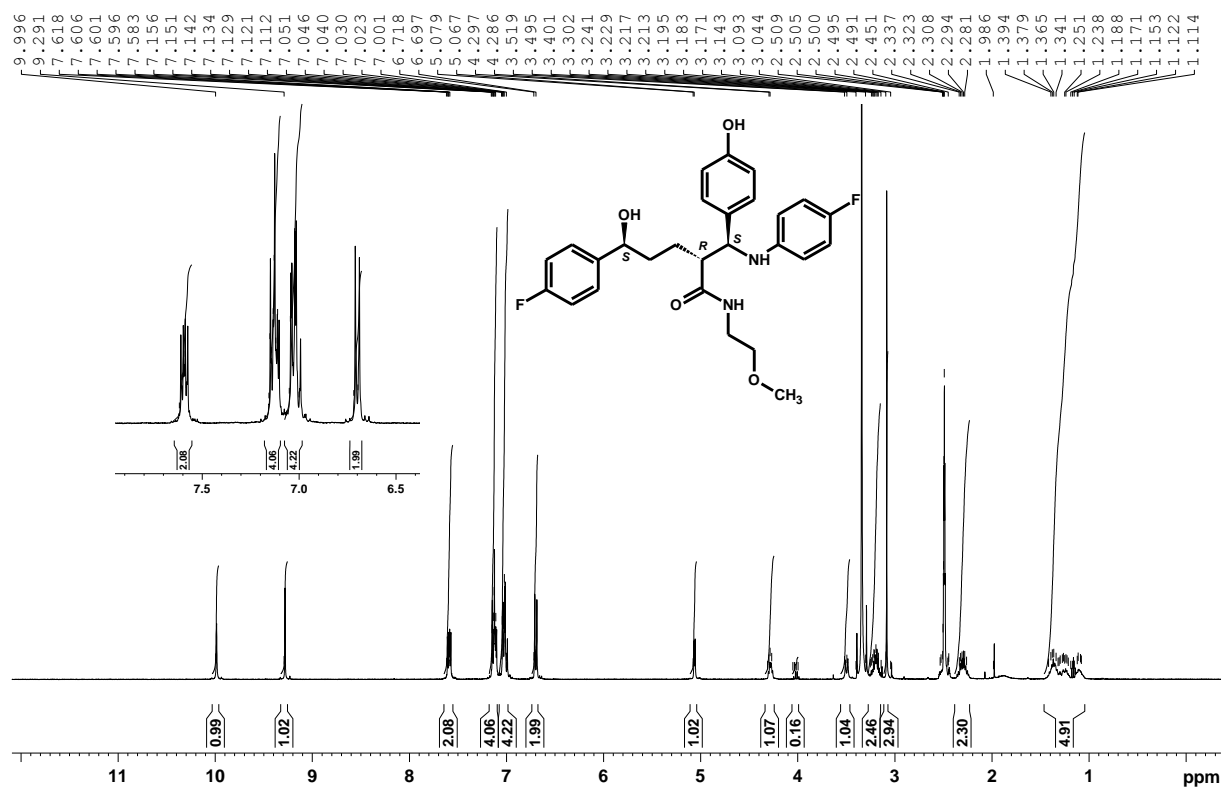
^1H a ^{13}C NMR spektrum (2*R**,3*S**)-3-(4-fluorfenylamino)-3-(4-hydroxyfenyl)-2-methylpropanové kyseliny (IX).



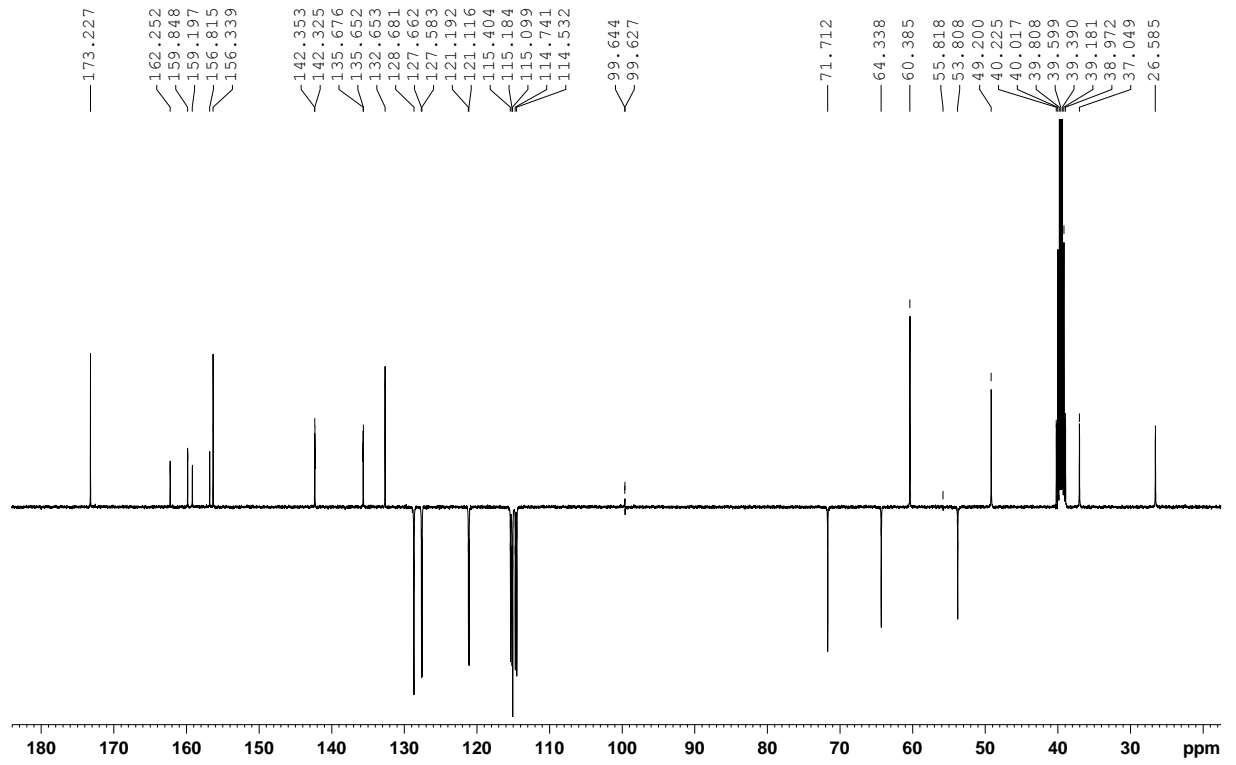
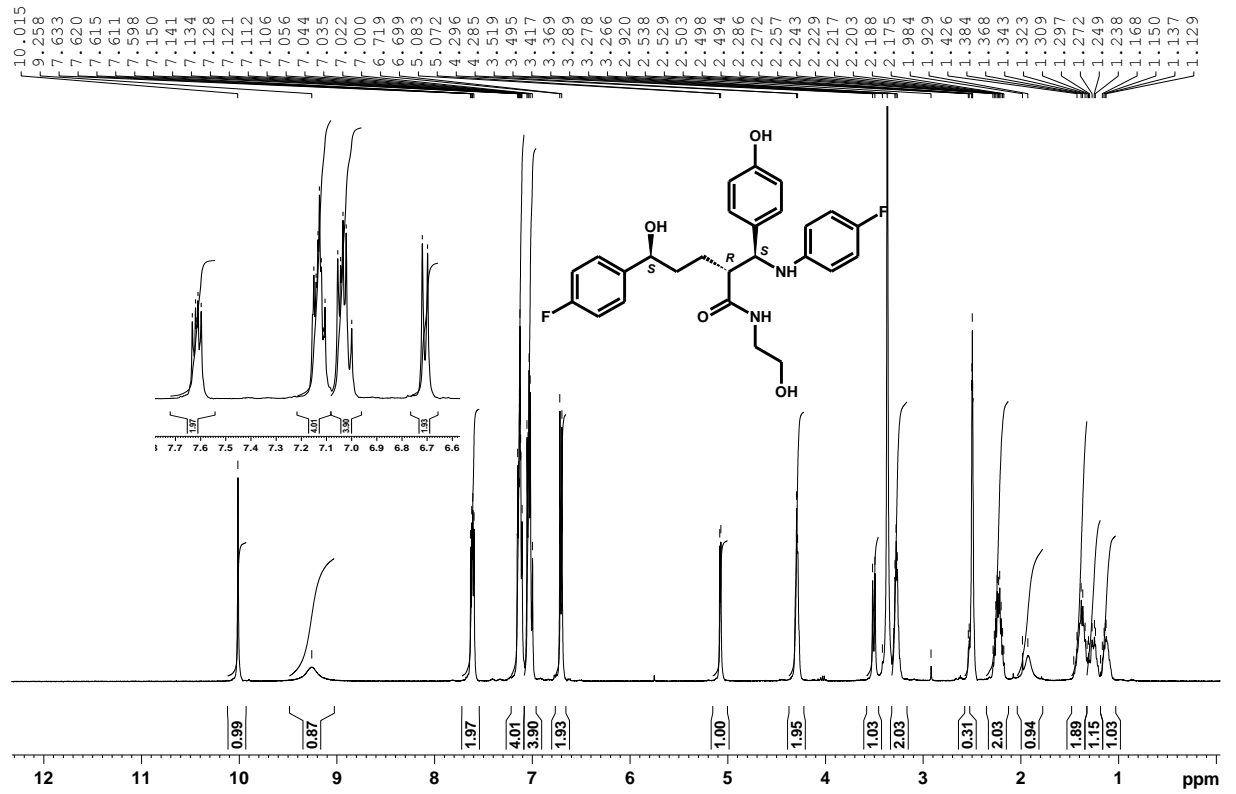
^1H a ^{13}C NMR spektrum (2*R*,5*S*)-*N*-butyl-5-hydroxy-2-[(*S*)-(4-fluorfenylamino)(4-hydroxyfenyl)methyl]pentanamidu (**Xa**).



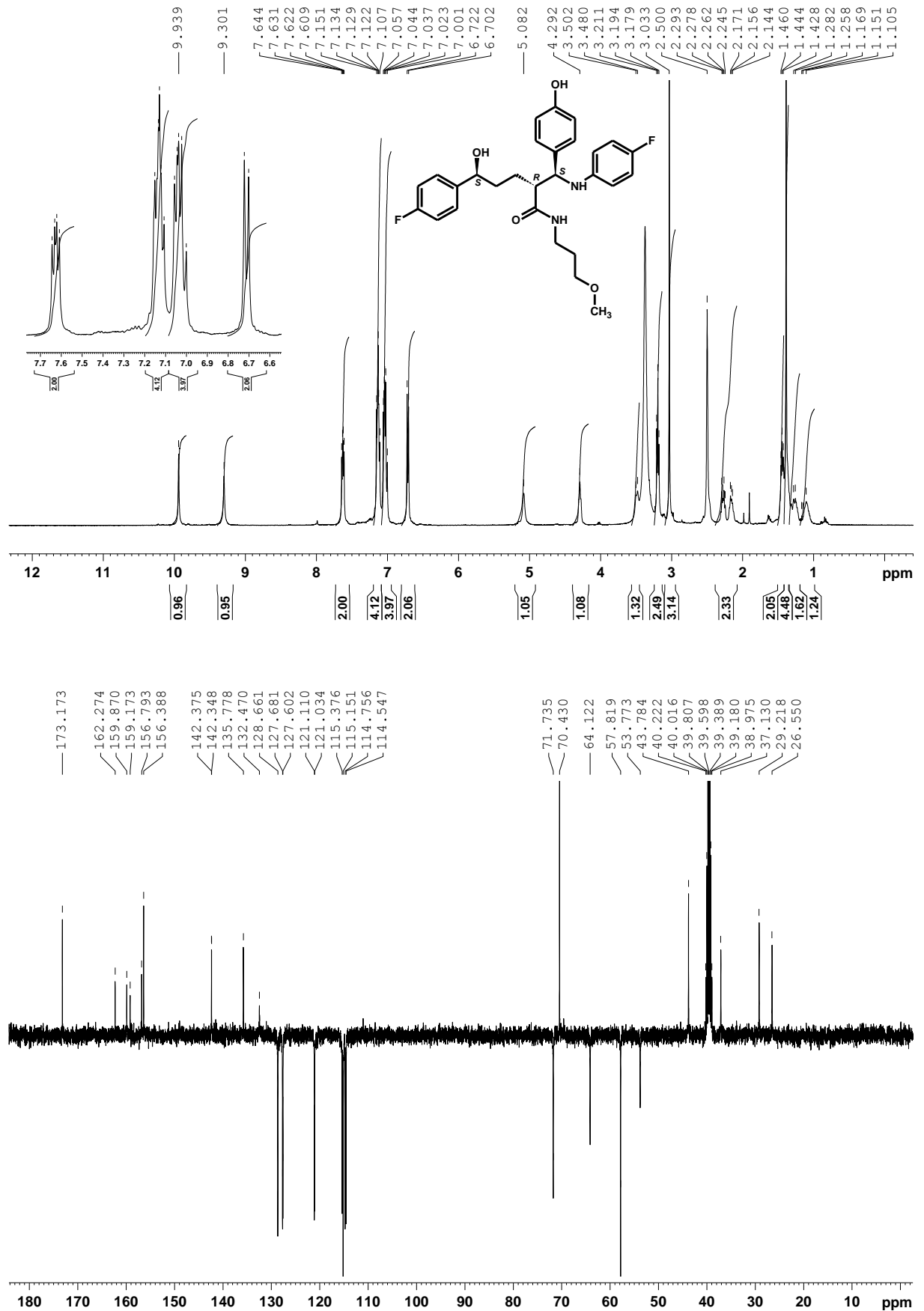
^1H a ^{13}C NMR spektrum (2*R*,5*S*)-*N*-(2-methoxyethyl)-5-hydroxy-2-[(*S*)-(4-fluorofenylamino)(4-hydroxyfenyl)methyl]pentanamidu (**Xb**).



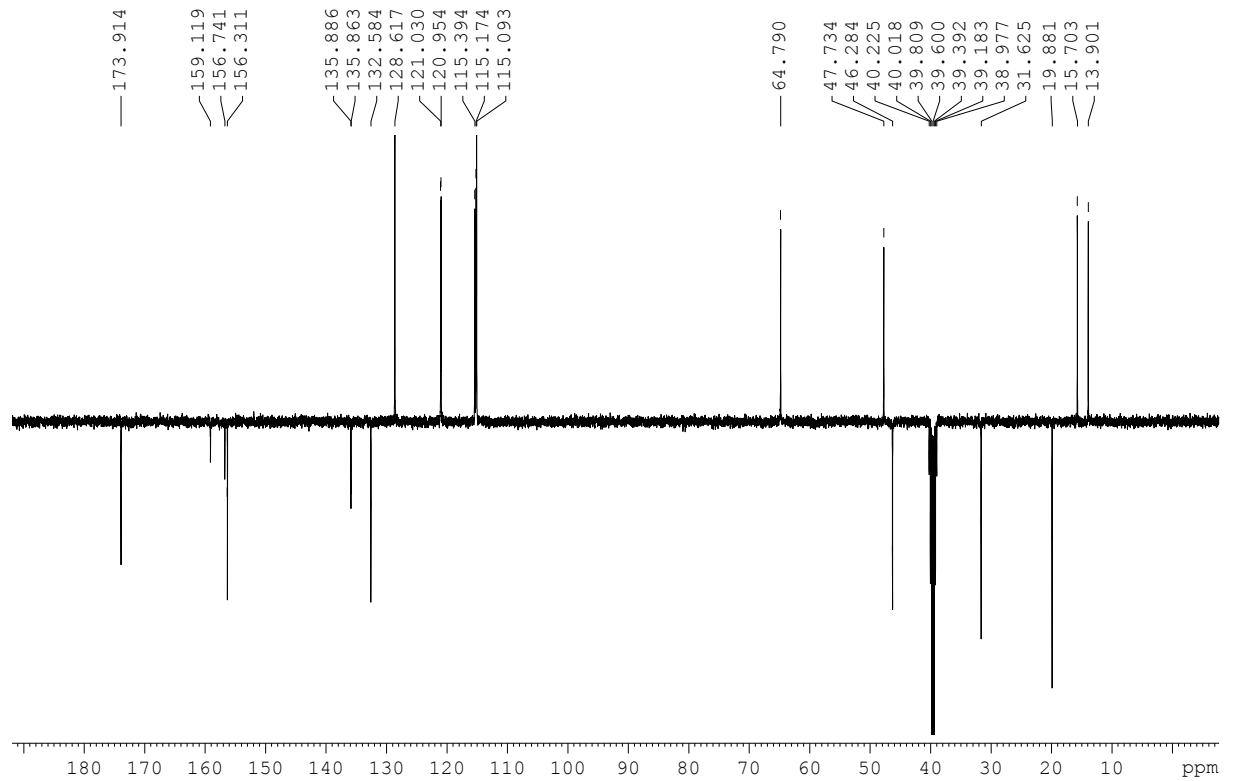
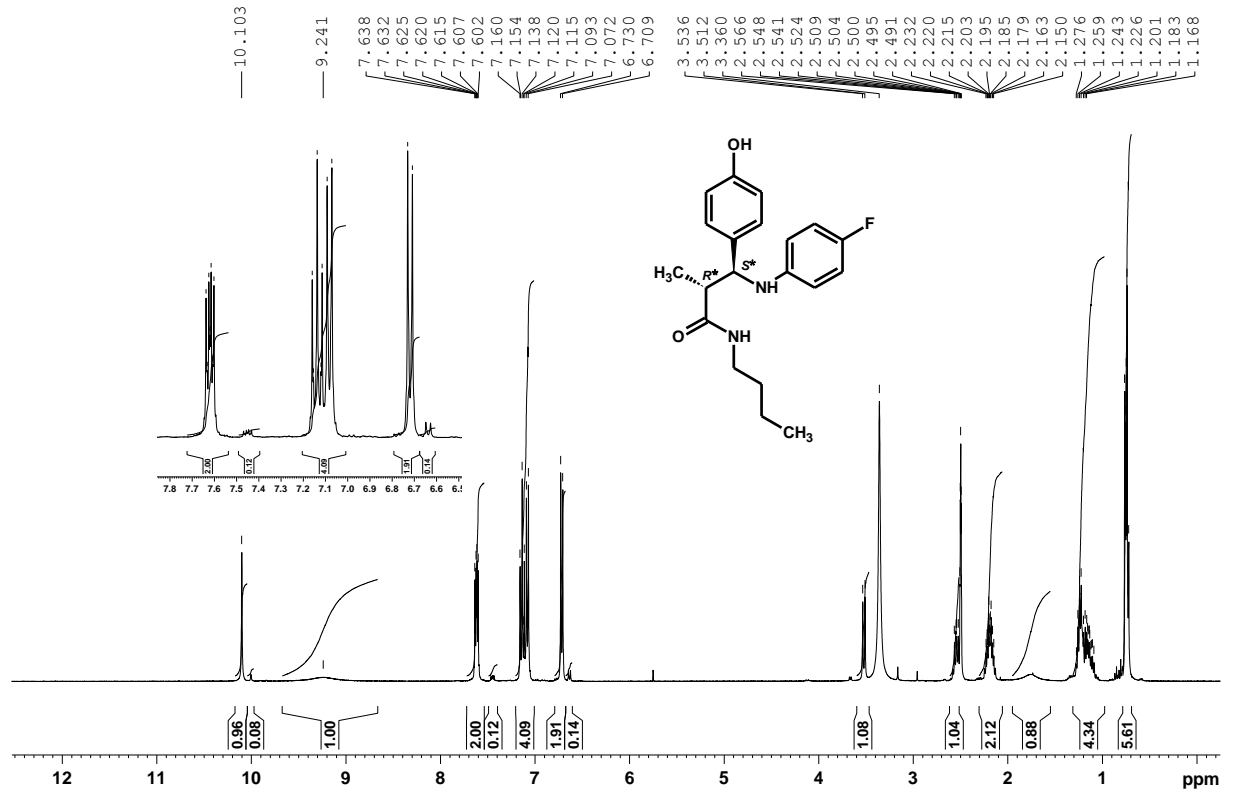
^1H a ^{13}C NMR spektrum (2*R*,5*S*)-*N*-(2-hydroxyethyl)-5-hydroxy-2-[(*S*)-(4-fluorfenyl)-amino](4-hydroxyfenyl)methyl]pentanamidu (**Xc**).



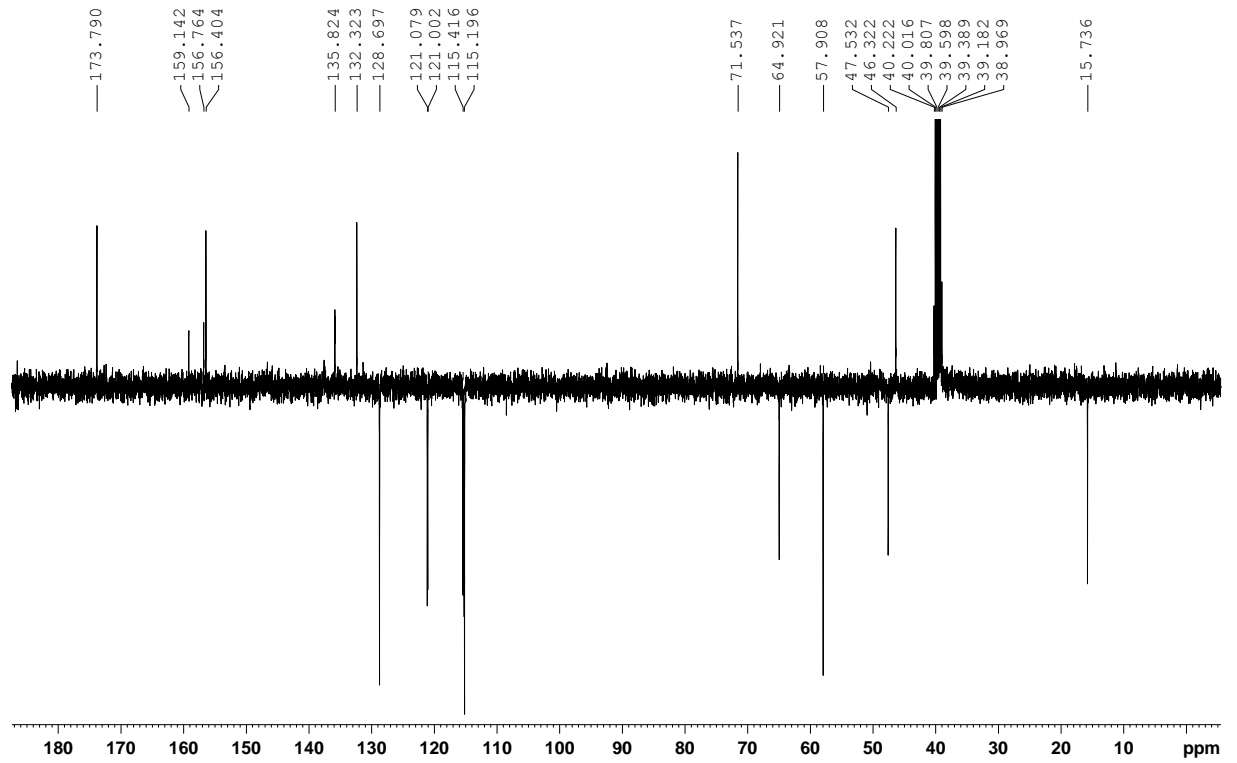
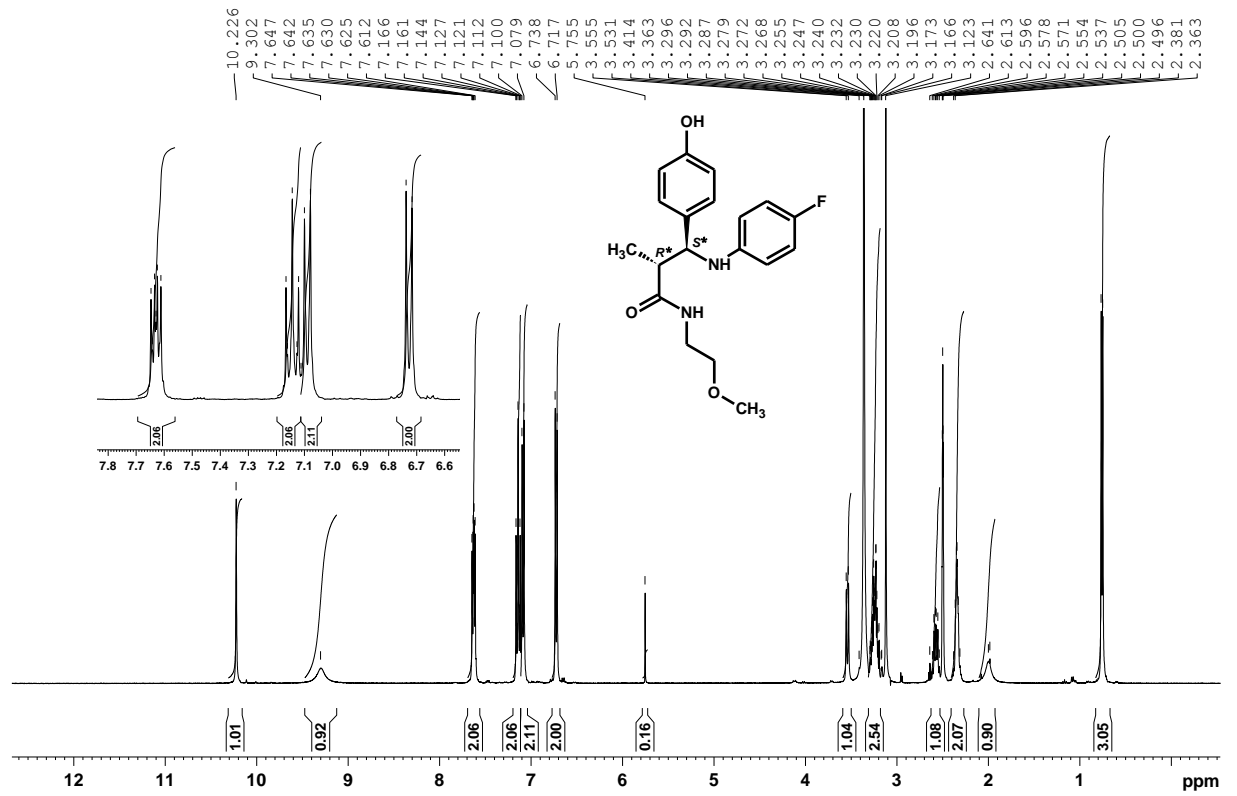
^1H a ^{13}C NMR spektrum (2*R*,5*S*)-5-hydroxy-2-[(*S*)-(4-fluorfenyl)amino](4-hydroxyfenyl)-methyl]-*N*-(3-metoksypropyl)pentanamidu (Xd**).**



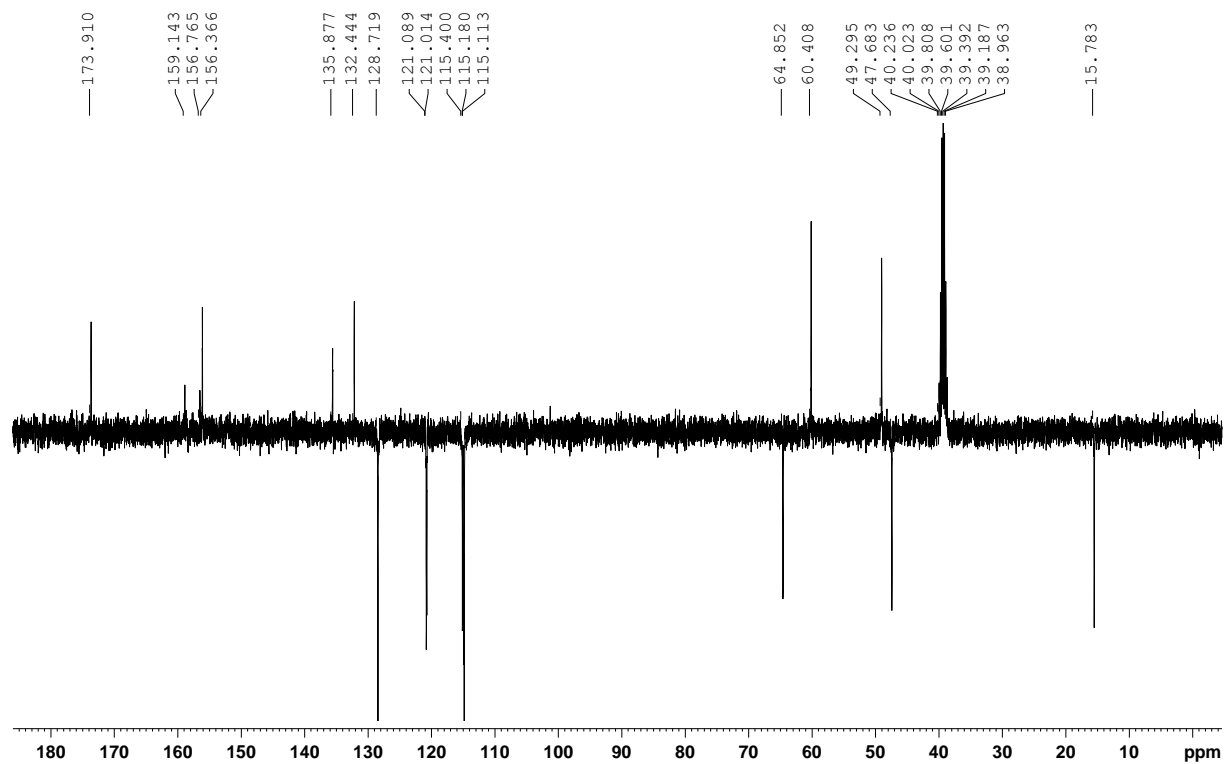
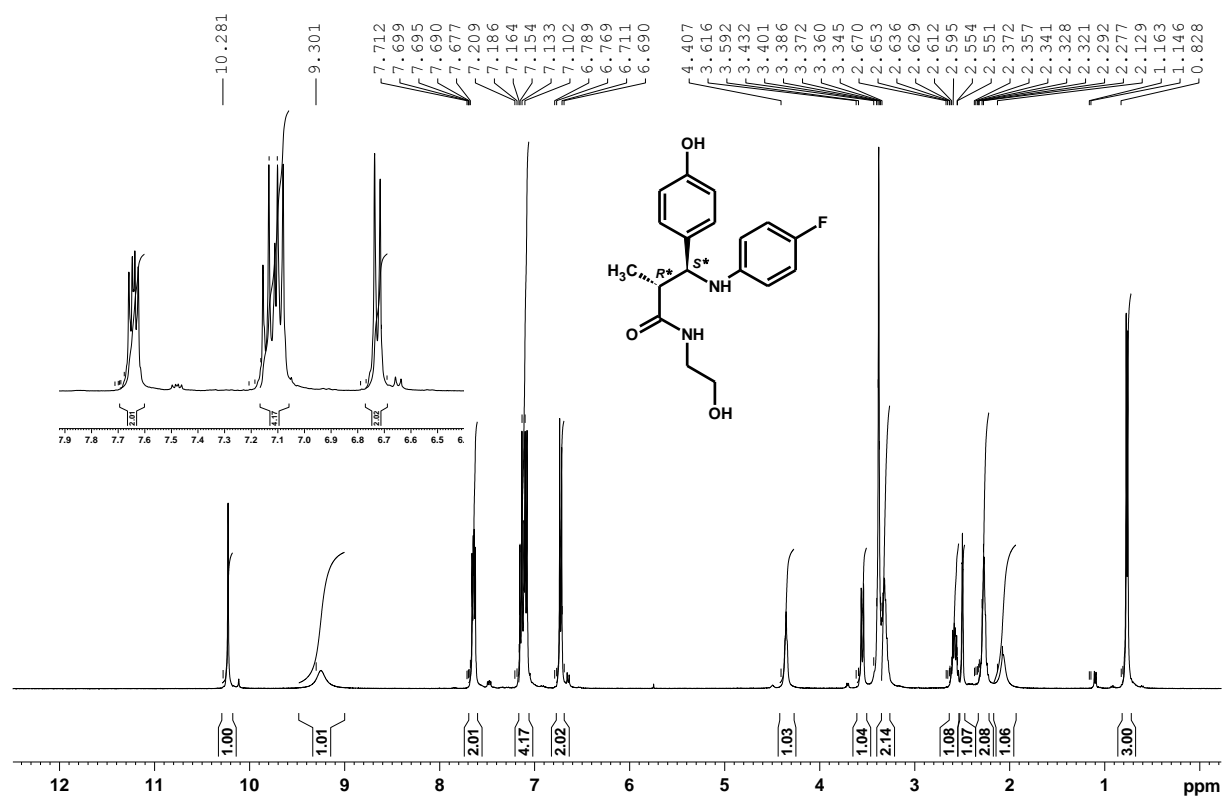
^1H a ^{13}C NMR spektrum (2*R,3*S**)-*N*-butyl-3-(4-fluorfenylamino)-3-(4-hydroxyfenyl)-2-methylpropanamidu (XIIa).**



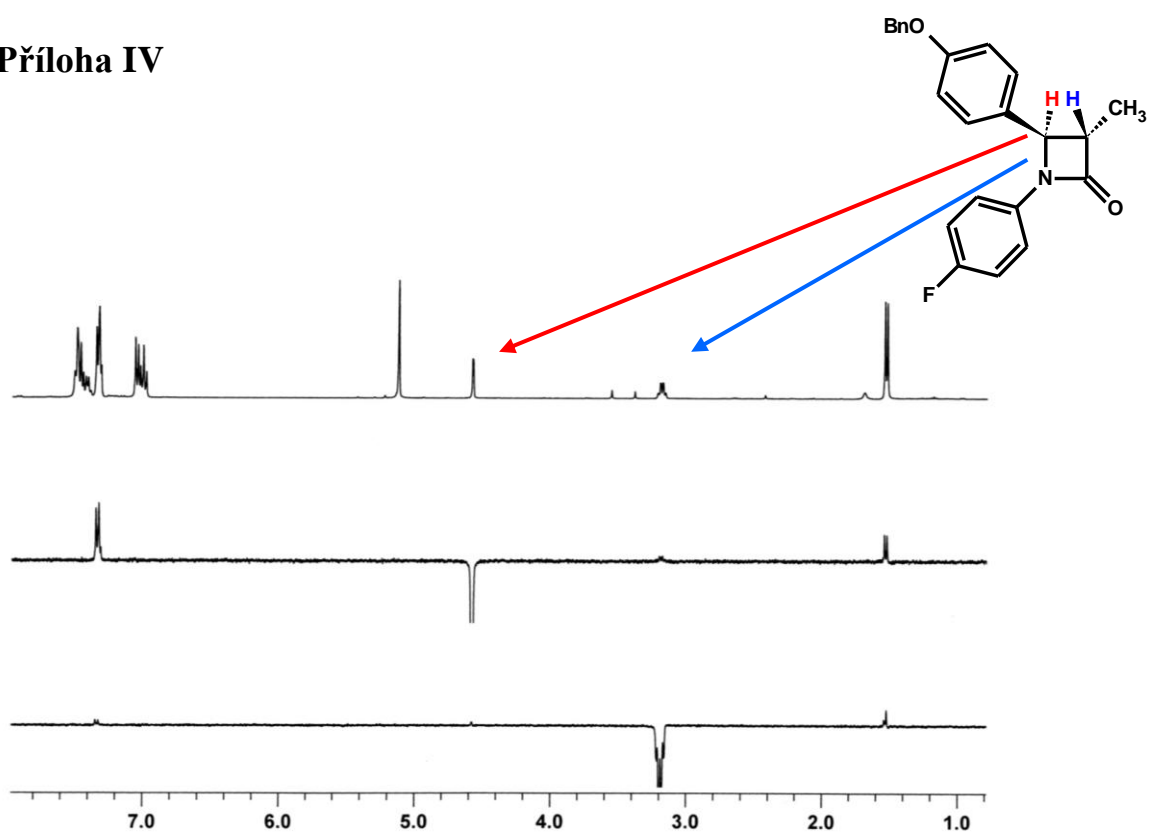
^1H a ^{13}C NMR spektrum (2*R**,3*S**)-3-(4-fluorfenylamino)-3-(4-hydroxyfenyl)-*N*-(2-methoxyethyl)-2-methylpropanamidu (**XIIb**).



^1H a ^{13}C NMR spektrum (2*R**,3*S**)-3-(4-fluorfenylamino)-*N*-(2-hydroxyethyl)-3-(4-hydroxyfenyl)-2-methylpropanamidu (**XIIc**).



Příloha IV

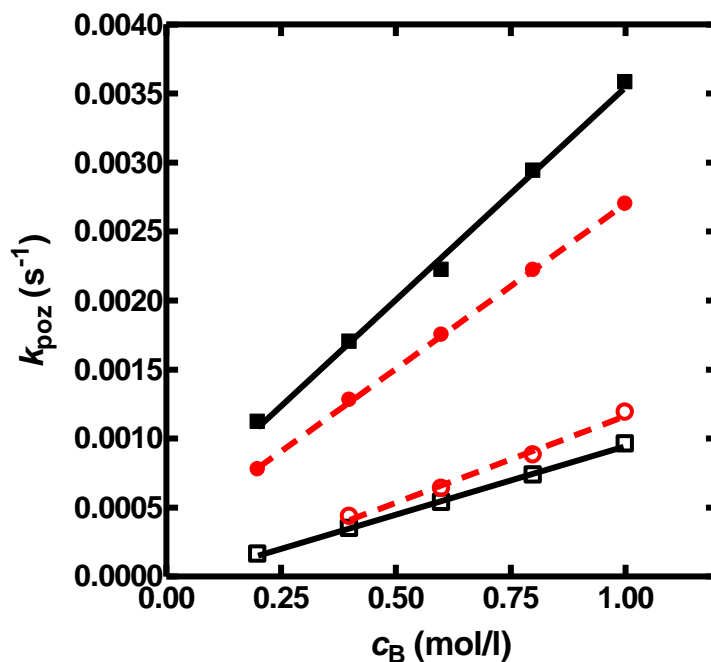


Obr. pIV 1D-NOESY - první spektrum je ^1H NMR spektrum substituovaného β -laktamu **III**, druhé a třetí spektrum je již po selektivní excitaci methinových vodíků v poloze 3 a 4 β -laktamového kruhu.

Příloha V

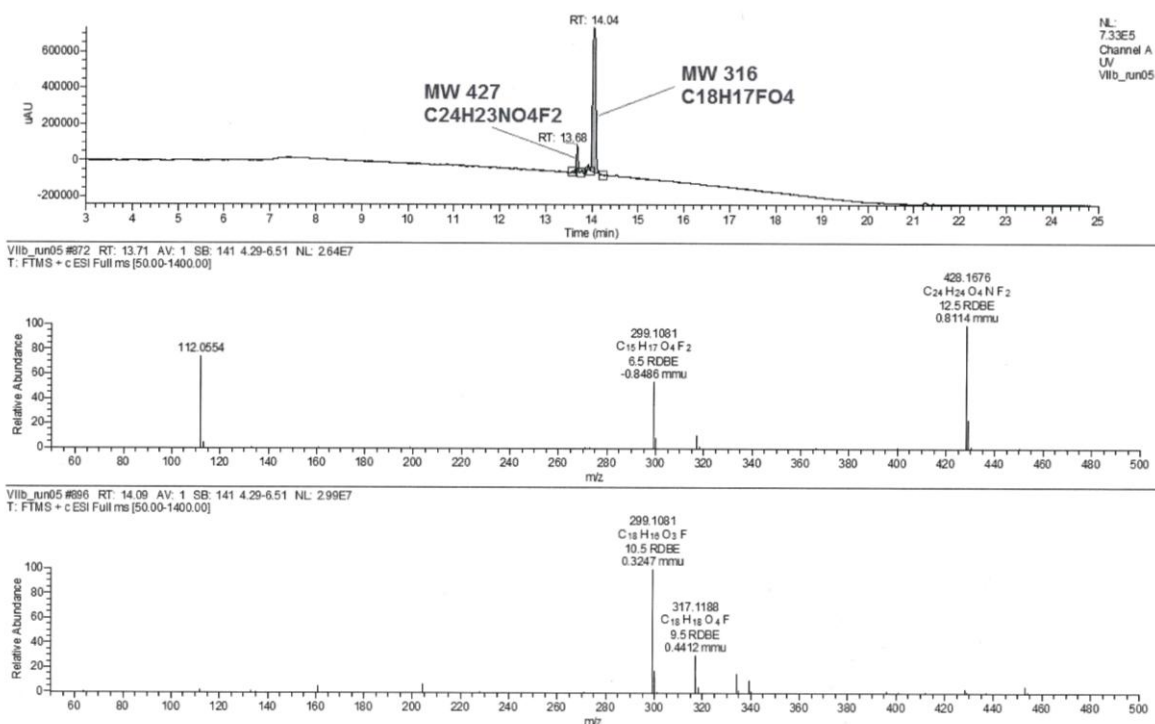
Tab. pV Naměřené hodnoty k_{poz} pro určení S–KIE Ezetimibu a β -laktamu V ve vodných resp. D₂O roztocích NaOH.

β -laktam		c_B [mol·l ⁻¹]	pH	$10^3 \cdot k_{\text{poz}}$ (s ⁻¹)	$\tau_{1/2}$ (s)	$10^3 \cdot k_1$ (s ⁻¹)
<i>Ezetimib</i>	NaOH v H ₂ O	0,20	13,30	1,120	617	3,080 ± 0,098
		0,40	13,60	1,700	409	
		0,60	13,78	2,220	312	
		0,80	13,90	2,940	236	
		1,00	14,00	3,580	193	
	NaOH v D ₂ O	0,20	13,30	0,776	894	2,394 ± 0,017
		0,40	13,60	1,280	542	
		0,60	13,78	1,750	396	
		0,80	13,90	2,220	313	
		1,00	14,00	2,700	256	
β -laktam V	NaOH v H ₂ O	0,20	13,30	0,162	4275	0,991 ± 0,024
		0,40	13,60	0,348	1990	
		0,60	13,78	0,535	1296	
		0,80	13,90	0,734	945	
		1,00	14,00	0,960	722	
	NaOH v D ₂ O	0,40	13,60	0,435	1595	1,254 ± 0,085
		0,60	13,78	0,638	1087	
		0,80	13,90	0,880	787	
		1,00	14,00	1,190	585	

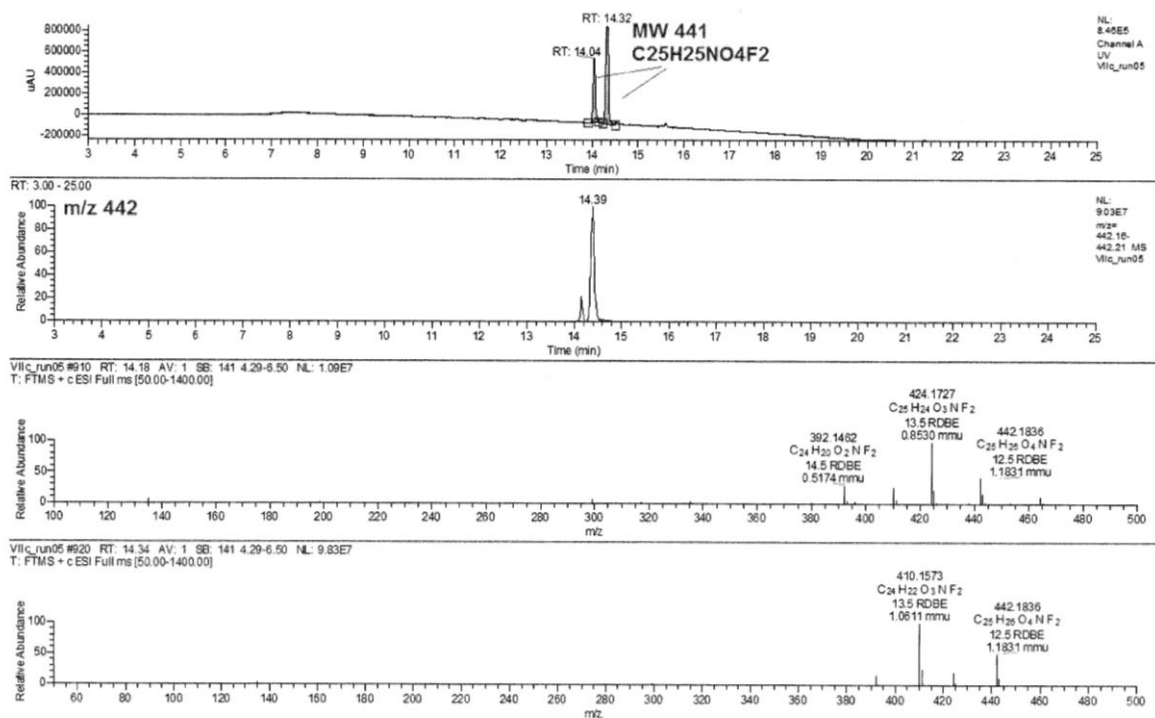


Obr. pV Závislost k_{poz} pseudoprvního řádu u Ezetimibu ve vodných roztocích NaOH (NaOH; ■) resp. v D₂O (NaOD; ●) a u β -laktamu V ve vodných roztocích NaOH (NaOH; □) a D₂O (NaOD; ○) při 39 °C.

Příloha VI



Obr. pVI 1 LC-MS prokazující vznik (2*R*,3*R*,6*S*)-6-(4-fluorfenyl)-2-(4-hydroxyfenyl)tetrahydro-2*H*-pyran-3-karboxylové kyseliny (**VIIb**) jako hlavního produktu hydrolyzy v silně bazickém prostředí a velmi malé množství kyseliny **XIV**.



Obr. pVI 2 LC-MS prokazující, že další minoritní chromatografickou frakcí (<5%) jsou methylester a methyl poloacetal kyseliny **XIV** vznikající po ataku methanolátu na lakton **XV**.

ÚDAJE PRO KNIHOVNICKOU DATABÁZI:

Název práce	Studium aminolýzy Ezetimibu
Autor práce	Bc. Jana Baťová
Obor	Organická chemie
Rok obhajoby	2013
Vedoucí práce	Doc. Ing. Jiří Hanusek, Ph.D.
Anotace	<p>V první části se diplomová práce zabývá určením produktů hydrolyzy vznikajících v silně bazickém prostředí z Ezetimibu a strukturně podobných β-laktamů. S využitím ^1H NMR, ^{13}C NMR spektroskopie, MALDI-MS a LC-MS spektrometrie byla jako produkt rozpadu Ezetimibu v koncentrovaném roztoku NaOH potvrzena (2<i>R</i>,3<i>R</i>,6<i>S</i>)-6-(4-fluorfenyl)-2-(4-hydroxyfenyl)-3,4,5,6-tetrahydro-2<i>H</i>-pyran-3-karboxylová kyselina. Na základě kinetických měření byl určen S-KIE, který potvrzuje odlišný mechanismus hydrolyzy u obou substrátů. Dále byly studovány produkty aminolýzy vznikající reakcí Ezetimibu a strukturně podobného 1-(4-fluorfenyl)-4-(4-hydroxyfenyl)-3-methyl-azetidín-2-onu s primárními aminy. Studium kinetiky ve vodných roztocích primárních aminů bylo zjištěno, že molekula aminu se při aminolýze Ezetimibu i strukturně podobného β-laktamu uplatňuje pouze jako nukleofil a nikoliv jako báze. Z korelace Brønstedova typu bylo zjištěno, že reakce probíhá přes ranný tranzitní stav.</p>
Klíčová slova	Ezetimib, β -laktamy, bazická hydrolyza, intramolekulární přesmyk, rozpouštědlový kinetický izotopový efekt, aminolýza β -laktamového kruhu, Brønstedova korelace.