

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra anorganické a organické chemie



SYNTÉZA PREKURZORŮ FLUORESCENČNÍHO
POLYENOVÉHO CERAMIDU

Diplomová práce

Michal Říha

Vedoucí diplomové práce: Doc. PharmDr. Kateřina Vávrová, Ph.D.

Hradec Králové 2011

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracoval samostatně. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

Michal Říha
V Hradci Králové 2011

Na tomto místě bych rád poděkoval všem, kteří se větší či menší měrou, i nepřímo, podíleli na vypracování této závěrečné práce. Mé poděkování patří zejména vedoucí práce Doc. PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D. za pomoc a cenné rady a ostatním pracovníkům katedry za ochotu a vstřícný přístup.

Obsah

Abstrakt	5
Abstract	6
1. Zadání diplomové práce	7
2. Teoretická část	8
2.1. Ceramidy a buněčná signalizace.....	8
2.2. <i>Stratum corneum</i> a role ceramidů v kůži.....	8
2.3. Struktura ceramidů	9
2.4. Fluorescenční značení lipidů	11
2.5. Fluorescenční ceramidy ve studiu kožní bariéry	13
2.6. Polyenové lipidy	16
3. Experimentální část	19
3.1. Chemikálie a přístroje.....	19
3.2. Syntéza.....	19
3.2.1. Syntéza A.....	20
3.2.2. Syntéza B.....	29
3.2.3. Syntéza C	38
4. Výsledky a diskuse	45
4.1. Syntéza A.....	45
4.2. Syntéza B.....	48
4.3. Syntéza C	49
5. Závěr	51
6. Seznam použitých zkratk	52
7. Literatura	53

Abstrakt

Ceramidy, komplexní skupina lipidů patřící mezi sfingolipidy, mají významné funkce v mnoha dějích v živých soustavách. Jejich zásadní význam spočívá jednak v buněčné signalizaci, jednak ve spoluvytváření funkční kožní bariéry.

Při výzkumu lipidů jsou často využívána fluorescenčně značená lipidová analoga. Moderní způsob fluorescenčního značení lipidových molekul představují polyenové lipidy, v nichž je fluorofor tvořen systémem pěti konjugovaných dvojných vazeb. Polyenové lipidy díky své struktuře jedinečně napodobují své přirozené předlohy.

Tato práce zkoumá možnosti syntézy fluorescenčního polyenového ceramidu a přináší prekurzory jeho syntézy, to znamená klíčové látky, použitelné pro přípravu cílového značeného ceramidu. Fluorofor bylo plánováno lokalizovat ve sfingosinové části molekuly, aby mohly být v budoucnu studovány vlastnosti analogů s různou délkou acylového řetězce.

Byly navrženy a vyzkoušeny tři syntetické přístupy. První přístup (Syntéza A) spočíval v navázání terminálního alkynu nesoucího polyenový fluorofor na Garnerův aldehyd. Výchozí látkou byl (2*E*,4*E*)-hexa-2,4-dienal, z něhož byl zmíněný terminální alkyň získán několika-
stupňovou syntézou. Protože však byly získané meziprodukty s polyenovým řetězcem poměrně nestabilní, byly navrženy přístupy, v nichž polyenový fluorofor, představovaný nenasyceným aldehydem, měl být navázán na analog ceramidu nesoucího halogen ve sfingosinové části až ve druhé fázi syntézy. Sled reakcí byl tedy oproti prvnímu přístupu v principu opačný. Prvním krokem při přípravě chlorderivátu ceramidu byla alkynylace Garnerova aldehydu (Syntéza B), bromderivát byl získán Grubbsovou metatezí (Syntéza C).

Připravenými prekurzory jsou (2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-deka-2,4,6,8-tetraenal a *N*-((2*S*,3*R*,*E*)-8-brom-1,3-dihydroxyokt-4-en-2-yl)tetrakosanamid. Tyto látky budou využity v další práci k syntéze fluorescenčních polyenových ceramidů.

Abstract

Ceramides, a complex group of lipids belonging to sphingolipids, have significant functions in many processes in living systems. Their crucial importance consists in the cell signaling and co-creation of functional skin barrier.

Fluorescently labelled lipid analogues are often used in the lipid research. Polyene-lipids, in which the fluorophore is formed by five conjugated double bonds, represent an advanced way of fluorescent labelling of lipid molecules. Thanks to their structure, the polyene-lipids uniquely mimic their natural counterparts.

This thesis studies the possibilities of the synthesis of fluorescent polyene ceramide and describes the precursors, i.e. the key substances, suitable for the preparation of the target labelled ceramide. The fluorophore was planned to be situated in the sphingosine part of the molecule, so as the properties of analogues with variable acyl chain length could be studied in the future.

Three synthetic ways have been designed and investigated. The first way (Synthesis A) consists in the reaction of the terminal alkyne carrying polyene fluorophore with Garner aldehyde. The mentioned terminal alkyne was obtained from (2*E*,4*E*)-hexa-2,4-dienal as starting compound in several steps. Since the obtained polyene intermediates were relatively unstable, other approaches were designed, in which the polyene fluorophore, represented by unsaturated aldehyde, should be attached on a ceramide analogue carrying halogen in the sphingosine part in the latter stage of the synthesis. Thus the sequence of reactions was reversed in comparison to the first approach. The first step for the preparation of the chloro derivative of ceramide was alkynylation of Garner aldehyde (Synthesis B), the bromo derivative was obtained by Grubbs metathesis (Synthesis C).

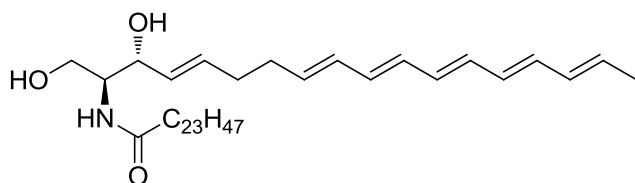
The prepared precursors are (2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-deca-2,4,6,8-tetraenal and *N*-((2*S*,3*R*,*E*)-8-bromo-1,3-dihydroxyoct-4-en-2-yl)tetracosanamide. These substances will be used in further study for the synthesis of fluorescent polyene ceramides.

1. Zadání diplomové práce

Ceramidy jsou složené lipidy, patří do skupiny látek označovaných jako sfingolipidy. Klíčovou roli hrají ceramidy v buněčné signalizaci a zcela zásadní význam mají pro tvorbu kožní bariéry – jsou základní komponentou lipidové matrix *stratum corneum*. Vzhledem ke svým úlohám ve fyziologických, respektive patofyziologických dějích jsou v současné době ceramidy předmětem intenzivního výzkumu.

Důležitý nástroj studia lipidů představují fluorescenčně značená lipidová analoga. Některé nedostatky klasických fluorescenčních značek překonávají takzvané polyenové lipidy, což jsou lipidy obsahující ve své struktuře systém pěti konjugovaných dvojných vazeb. Tato strukturální modifikace má minimální dopad na vlastnosti značených molekul oproti jejich přirozeným předlohám.

Cílem této práce bylo prozkoumat možnosti syntézy fluorescenčního polyenového ceramidu (**Obrázek 1**) a připravit látky, které by byly využitelné jako základní stavební kameny pro přípravu cílového značeného ceramidu. Konečný produkt syntézy by měl posloužit zejména při studiu vlastností kožní bariéry, jejich potenciálního ovlivnění a objasnění, jakým mechanismem exogenní ceramidy regenerují porušenou kožní bariéru.



Obr. 1. Struktura fluorescenčního polyenového ceramidu.

2. Teoretická část

Ceramidy patří mezi sfingolipidy a tvoří komplexní skupinu lipidických látek. Existují jednak volné, jednak tvoří hydrofobní kostru sfingomyelinu, cerebrosidů a gangliosidů. Volné ceramidy se nachází ve velkém množství pouze ve *stratum corneum*, dále, i když v mnohem menší míře, v buněčných membránách. Ceramidy v buňkách představují signální molekuly a mají dále zásadní úlohu pro bariérovou funkci kůže.^{1,2}

2.1. Ceramidy a buněčná signalizace

Ceramidy a jim příbuzné látky ovlivňují osud buňky, vytváří systém tzv. druhých posílů (ceramid – sfingosin – sfingosin-1-fosfát). Sfingolipidy hrají klíčovou roli v regulaci některých základních procesů spojených s patogenezi nádorů. Zjištění, že ceramid, ústřední látka sfingolipidového metabolismu, účinkuje jako tumor-supresorová látka a navozuje antiproliferativní a apoptotické odpovědi v různých nádorových buňkách, a další poznatky podporují zájem o výzkum v této oblasti.^{1,3}

2.2. *Stratum corneum* a role ceramidů v kůži

Hlavní funkcí kůže je chránit tělo před nadměrnými ztrátami vody a dalších důležitých látek, spoluvytvářet termoregulační systém a poskytovat účinnou bariéru proti vlivům z vnějšího prostředí, a to fyzikálním, chemickým i biologickým. Bariérovou funkci kůže tvoří nejvyšší vrstva kůže, *stratum corneum*.⁴

Stratum corneum je tvořeno obvykle 18-21 vrstvami zploštělých, odumřelých, plně zrohovatělých buněk – korneocytů, přičemž mezibuněčný prostor je vyplněn lipidovou matrix. Lipidová matrix je složena z ceramidů (50 %), cholesterolu (25 %), mastných kyselin (10 %), v menší míře jsou zastoupeny estery cholesterolu s organickými kyselinami, cholesterol-sulfát a další látky, nejsou zde však téměř žádné fosfolipidy. Lipidová mezibuněčná hmota *stratum corneum*, jež má díky svému složení lamelární uspořádání, představuje přibližně 20 % objemu vrstvy.² Význam mezibuněčných lipidů pro bariérovou funkci kůže byl dokázán pokusy z roku 1970, kdy byl pozorován značný nárůst propustnosti kůže po extrakci lipidů *stratum corneum* organickými rozpouštědly. Vývoj takovéto protektivní vrstvy představoval v minulosti zásadní krok pro evoluci života na suchou zem.⁵ Neobvyklé složení *stratum corneum*

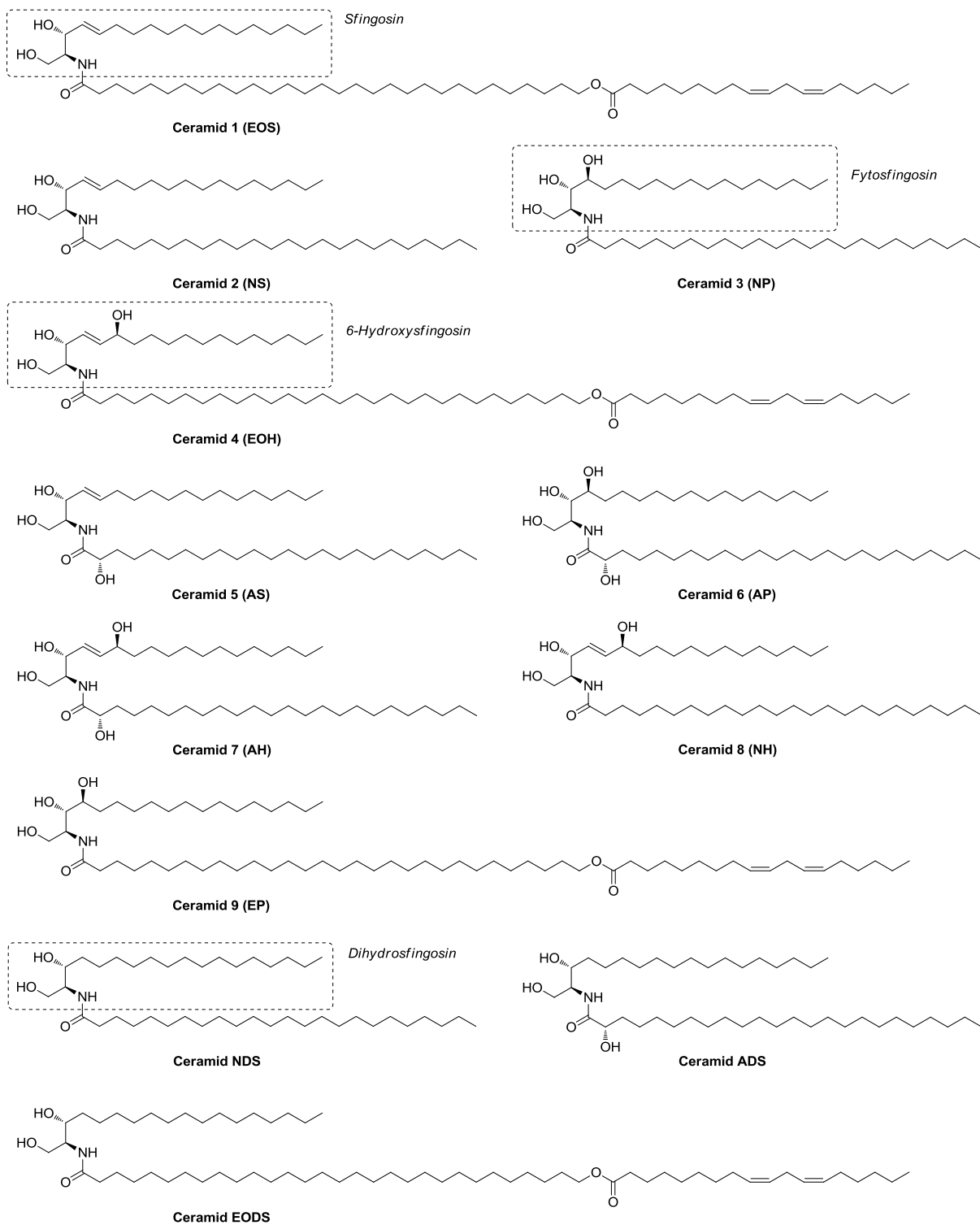
s vysokým obsahem ceramidů a zejména jejich výjimečné uspořádání se zdá být zásadní pro udržení kožní bariérové funkce.²

Není bez zajímavosti, že některá významná kožní onemocnění, například atopická dermatitida či psoriáza, mají souvislost se sníženým obsahem kožních ceramidů a stav onemocnění může být zlepšen exogenním podáním ceramidů nebo jejich analog.⁶ Zmíněné skutečnosti jsou podnětem k výzkumu v této oblasti. Další směr studia *stratum corneum* a kožních lipidů je zaměřen na možnosti modulace průniku léčiv přes kůži. Pouze omezené množství léčiv je totiž schopno projít kůží v té míře, aby dosáhlo terapeutických koncentrací v plazmě. Transdermální podání léčiv přitom představuje potenciálně velmi perspektivní aplikační cestu.⁷

2.3. Struktura ceramidů

Molekula ceramidu se skládá z bazické části (tzv. sfingoidní báze, kterou může představovat sfingosin (S), 6-hydroxysfingosin (H), fytosfingosin (P) nebo dihydrosfingosin (DS)), na jejíž primární aminoskupinu v poloze 2 je amidickou vazbou připojena mastná kyselina (**Obrázek 2**). Obvykle se jedná o nasycené mastné kyseliny s délkou 16 až 30 uhlíků. Mastná kyselina může být nesubstituovaná (N), nebo nese v poloze α - (A) či ω - (O) hydroxylovou skupinu. Nejčastěji vázanou mastnou kyselinou v ceramidech kůže je kyselina lignocerová (C₂₄) a kyselina behenová (C₂₂). Z hlediska uspořádání lipidové matrix jsou důležité ceramidy, u nichž je ω -hydroxyskupina mastné kyseliny o délce 30-34 uhlíků esterifikována kyselinou linoleovou (E), a ceramidy s ω -hydroxyskupinou připojenou ke karboxylovému řetězci na vnějším povrchu korneocytu, díky čemuž vytváří vrstvu kovalentně vázaných lipidů.^{2,6,7}

Dosud bylo v lidské kůži nalezeno 12 různých typů ceramidů, poslední ceramid 12 byl prokázán v roce 2010.^{8,9} Běžně užívaná nomenklatura dle Motty označuje ceramidy písmeny na základě jejich struktury (písmena jsou uvedena v závorkách výše)^{6,10}, narozdíl od původního značení ceramidů arabskými číslicemi na základě polaritity a tím i separace při chromatografii.¹¹ Například v lidském *stratum corneum* nejběžnější ceramid 2 je označen ceramid NS.



Obr. 2. Strukturní typy ceramidů v lidské kůži.

Ačkoliv byly fyzikálně-chemické vlastnosti, biosyntéza, fyziologická a patologická role ceramidů v kůži široce studovány, poměrně málo jsou objasněny vztahy mezi jejich strukturou a účinkem. Za základní předpoklady kompetentní kožní bariéry jsou obecně přijímány

tyto skutečnosti: relativně malá polární hlava ceramidů oproti fosfolipidům, značná schopnost tvořit síť vodíkových vazeb, výjimečně dlouhé nasycené řetězce dovolující silné hydrofobní interakce a heterogenita jejich struktur.¹²

O významu délky acylových řetězců ceramidů je široce pojednáváno ve studiích zabývajících se rolí ceramidů v buněčné signalizaci. Tato strukturní modifikace v souvislosti s ceramidy v kůži začala být objasňována později. Nyní je zřejmé, že délka řetězců ceramidů je klíčová pro jejich bariérové vlastnosti. Důležitý poznatek byl zjištěn použitím řady krátkořetězcových ceramidových analog a fyziologického ceramidu NS na prasečí kůži se dvěma modelovými léčivy (theofylinem a indometacinem). Ceramidy s acylovým řetězcem o délce 4 až 8 uhlíků zvyšují kožní permeabilitu, s maximálním efektem patrným u délky 6 uhlíků. Studie též potvrdila, že ceramidy s krátkým řetězcem se nechovají jako přirozené ceramidy a pro jejich užití jako nástroje v experimentech je třeba obezřetnosti.¹²

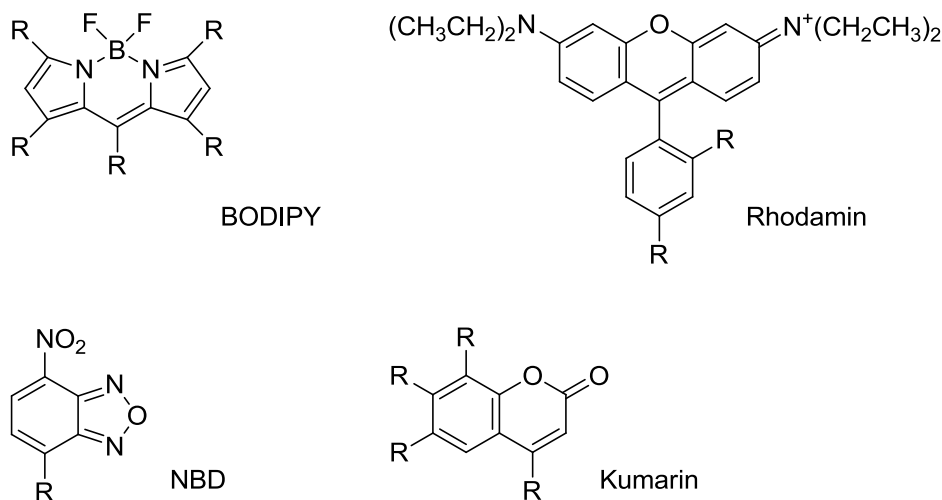
2.4. Fluorescenční značení lipidů

Mikroskopie lipidů v živých buňkách, a tím i vývoj v porozumění funkcí lipidů v různých dějích, je komplikována nedostatkem vhodných zobrazovacích metod. Relativní jednoduchost lipidové struktury je určitým způsobem brzdou ve výzkumu lipidů. Je v této oblasti známa řada technik, avšak některé z nich jsou nevyhovující či příliš náročné, získané informace navíc mohou být zavádějící (například radioaktivně značené prekurzory).¹³ Specifické protilátky, významný nástroj pro výzkum proteinů, jsou buď nedostupné, nebo jsou pro svoji citlivost nespolehlivé ve studiu dynamiky lipidů.¹⁴ I některé další techniky, nezastupitelné v jiných oblastech výzkumu, zde nejsou využitelné, a proto velká část výzkumu lipidů spoléhá na značená lipidová analoga. Vzhledem k obvyklé velikosti lipidové molekuly musí být výběr značení velmi pečlivý, neboť velikost i intramolekulární lokalizace značky může významně ovlivnit vlastnosti odvozené látky. Zejména intramolekulární lokalizace je významná pro studium buněčné biologie.¹³

Průlom přišel v 80. letech 20. století se zavedením fluorescenčně značených lipidových analog. Pohyb lipidů tak mohl být sledován pomocí fluorescenčního mikroskopu přímo v živých buňkách. Připravená analoga s fluorescenční značkou navázanou na hexadecylový řetězec namísto jedné z mastných kyselin vykazovala oproti svým přirozeným protějškům méně hydrofobní charakter. Díky tomu mohla být tato lipidová analoga s výhodou integrována do cílových membrán. Tento fakt podpořil zájem o syntézu různých fluorescenčně

značených lipidů, jejichž osud v buňce začal být zkoumán. Jako u jiných derivatizovaných sloučenin, je i zde stěžejní kriticky posuzovat spolehlivost použití daných značek.¹³

Lipidy, jako amfifilní sloučeniny, se obecně skládají z hydrofilní hlavové části a části hydrofobní, tvořené uhlovodíkovými řetězci. V principu je na takovou molekulu možno kovalentně připojit fluorescenční značku do dvou oblastí. Chemická povaha konkrétní značky a umístění uvnitř dané molekuly je velmi důležité, neboť tyto aspekty ovlivní výsledné vlastnosti fluorescenčního analoga. Většina fluoroforů, které jsou užívány pro derivatizaci lipidů, mají hydrofilní charakter. V případě připojení takové značky na oblast řetězce značka změní hydrofilně-lipofilní rovnováhu lipidové molekuly, což s sebou může nést jisté problémy. Po integraci do membrány může docházet k odlišným interakcím s okolními lipidy s dalšími následky. Na druhou stranu nutno dodat, že pro výzkum jevů, ve kterých hlavová část lipidů hraje zásadní roli (lipidové třídění a translokace, specifické děje metabolismu sfingolipidů a další), lze užít jedině analoga se značkou v řetězci. Stejně tak lipidová analoga se značenou hlavovou částí jsou připravována pro případy, kdy jsou důležité vlastnosti řetězcové oblasti molekuly (například pro fázové stanovení v biologických membránách). Zejména v pokusech membránové fúze mají takové značky široké uplatnění.¹³

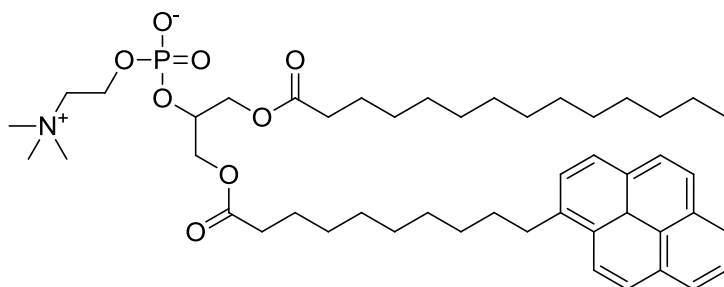


Obr. 3. Struktury vybraných fluorescenčních značek. R představuje zbytek lipidu nebo funkční skupinu.

Analoga lipidů nesoucí fluorescenční značky NBD (7-nitrobenzo[*c*][1,2,5]oxadiazol-4-yl), BODIPY (4,4'-difluoro-4-bora-(3a,4a)-diazas-indacen) nebo také anthracen, pyren, difenylhexatrien a další (**Obrázek 3**) jsou široce používány ke studiu různých buněčných procesů, zejména metabolismu a buněčného transportu. Tyto značky však byly zavedeny ještě před do-

ceněním důležitosti fázového chování lipidů a teprve nedávno byly poznány jejich nežádoucí efekty na vlastnosti lipidů. Silné ovlivňování vlastností lipidů těmito značkami bylo pozorováno v *in vitro* studiích, a tak vyvstaly otázky ohledně důvěryhodnosti výsledků *in vivo* pokusů, založených na využití těchto značek.¹⁴

Jednou z nejčastěji užívaných fluorescenčních značek je pyren (**Obrázek 4**), který je hydrofobní a nedeformuje významně konformaci značené lipidové molekuly. Takto značené deriváty mají využití v buněčné biologii, membránové biofyzice a biochemii.¹⁵ Pyren je však relativně rozměrný, navíc fluorescenční mikroskopie s využitím tohoto uhlovodíku je složitá. Jeho monomery totiž emitují při vlnové délce 380 nm a pouze vysoké koncentrace mohou být vizualizovány díky formaci tzv. excimerů s emisí při 470 nm.¹⁶



Obr. 4. Struktura fluorescenčně značeného fosfatidylcholinu pomocí pyrenu.¹⁵

Fluorescenční vlastnosti některých značek jsou ovlivňovány prostředím. Ve studiích používajících lipidová analoga jsou důležitými faktory změny pH a změny rozpouštědla, respektive polarita rozpouštědla, obklopujícího fluorofor.¹³

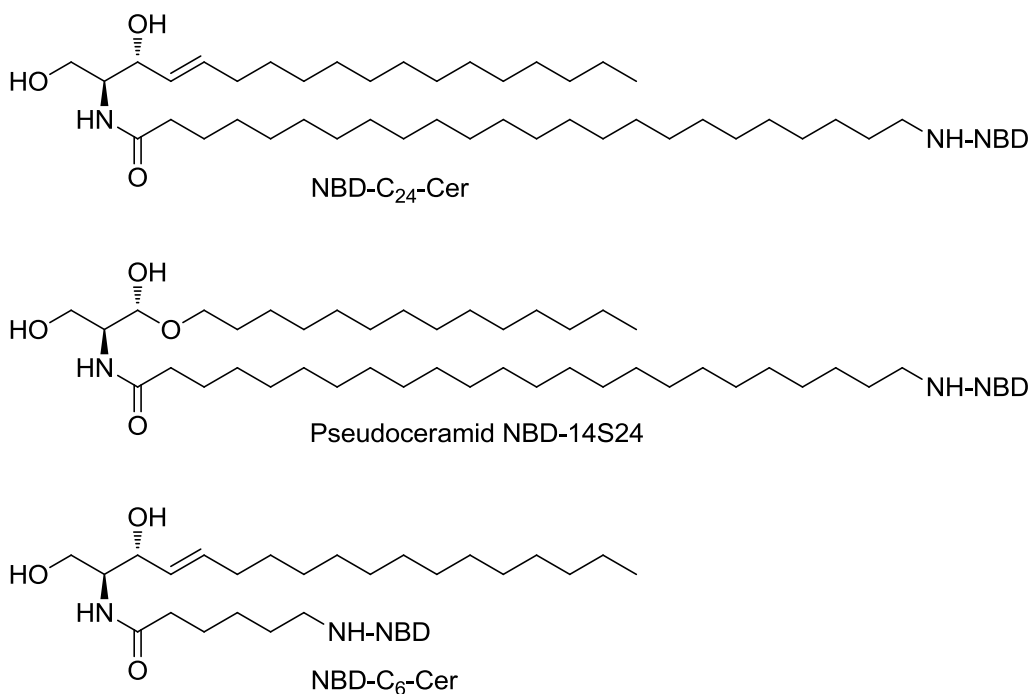
2.5. Fluorescenční ceramidy ve studiu kožní bariéry

Je stále předmětem diskuse, jakým mechanismem exogenní ceramidy regenerují narušenou bariérovou funkci kůže. Bylo zjištěno, že NBD-C₆-ceramid proniká do jaderných epidermálních buněk během dvou hodin, je transportován do Golgiho aparátu a následně zpracován.^{17,18} NBD-C₆-ceramid je krátkořetězcový, fluorescenční NBD-skupinou značený ceramidový analog, široce používaný vzhledem ke své rozpustnosti. Na základě těchto studií byl tak rychlý průnik a metabolismus topicky podaných ceramidů považován za mechanismus, jakým ceramidy, i přirozeně se vyskytující dlouhořetězcové, regenerují porušenou kožní bariéru. Avšak s přihlédnutím k nedávno popsaným podstatným rozdílům mezi analogy s krátkým řetězcem a přirozenými ceramidy, týkajících se role jak v buněčné signalizaci, tak kožní permeabilitě,

vyvstala hypotéza, že průnik ceramidů kožní bariérou by mohl být závislý na délce acylového řetězce.¹⁹

K potvrzení či vyvrácení této domněnky byla připravena řada fluorescenčních analog s různou délkou acylového řetězce (6, 12 a 24 uhlíků) a hodnocena jejich penetrace acetone narušenou a intaktní lidskou kůží. Navíc byla srovnávána penetrace NBD-C₂₄-ceramidu s NBD-14S24. 14S24 je nefyziologický pseudoceramid obsahující odlišnou polární hlavu, ale mající stejnou délku řetězce (**Obrázek 5**).

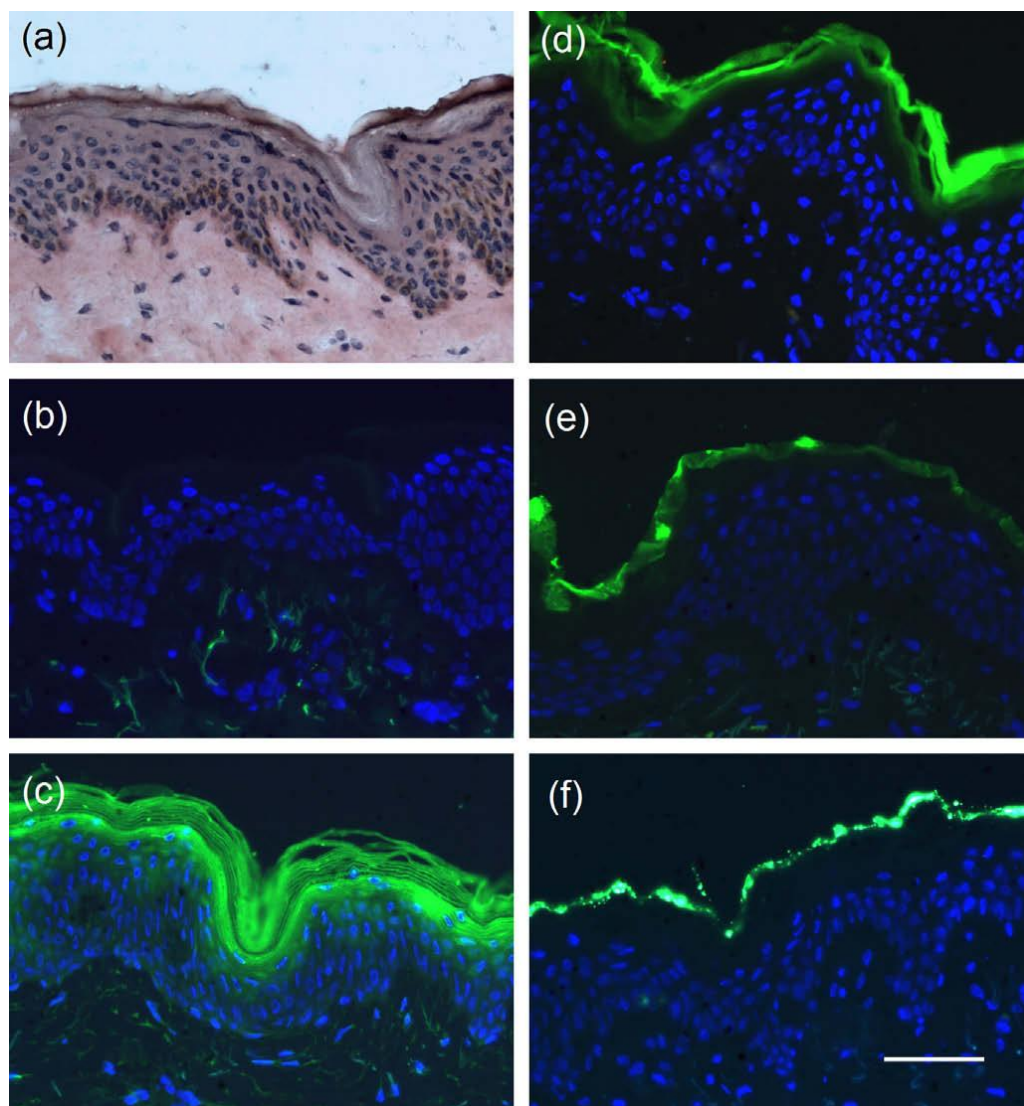
Řezy lidské kůže (původní práce Mana a kol. byla provedena s kůží myši)¹⁷ byly zkoumány pod fluorescenčním mikroskopem. Fluorescence krátkořetězcového ceramidu NBD-C₆ byla pozorována v živé *epidermis* jak u intaktní, tak i narušené kůže, což je plně v souladu s Manem a kol.¹⁷ Naopak obě lipidová analoga o délce acylového řetězce 24 uhlíků, tj. NBD-C₂₄-Cer a NBD-14S24, zůstala ve vyšších vrstvách *stratum corneum* (**Obrázek 6**).¹⁹



Obr. 5. Struktura NBD-fluorescenčně značených ceramidů a pseudoceramidu 14S24.

Pomocí fluorescenčně značených analog tedy bylo dokázáno, že průnik ceramidů kožní bariérou je závislý na délce acylového řetězce a rychlé vychytávání do jaderných epidermálních buněk je specifické pro analoga ceramidů s krátkým řetězcem. Příčina pozorované závislosti v penetraci ceramidů může souviset s rozdílným fázovým rozdělováním a mobilitou krátko- a dlouhořetězcových ceramidů, ceramidy s dlouhým řetězcem jsou navíc možná příliš

hydrofobní, aby se rozdělaly ze *stratum corneum* do hydrofilní živé *epidermis*.¹⁹ Pomocí permeačních pokusů bylo zjištěno, že ceramidy s krátkým acylovým řetězcem zvyšují kožní propustnost.¹²

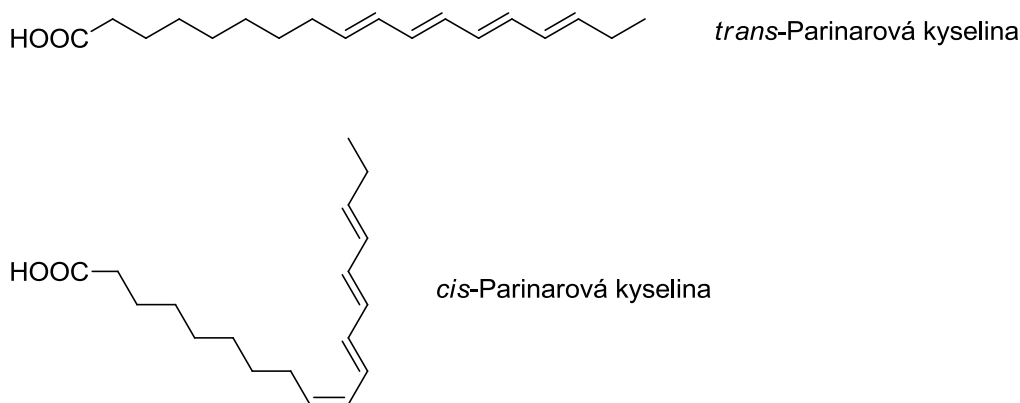


Obr. 6. Penetrace exogenních fluorescenčních ceramidů s různou délkou acylového řetězce a pseudoceramidu 14S24 do lidské kůže. Ceramid značí zelená fluorescence. Histologické řezy acetonem narušené kůže znázorněny užitím (a) mikroskopie v jasném poli, (b-f) fluorescenční mikroskopie s jádry buněk (modře) obarvenými barvivem Hoechst 33258. (a) a (b) kontroly, (c) NBD-C₆-ceramid, (d) NBD-C₁₂-ceramid, (e) NBD-C₂₄-ceramid, (f) NBD-14S24. Měřítko 50 μm .¹⁹

2.6. Polyenové lipidy

Po užití fluorescenčních značek v úvodních studiích membránové fyziky byl zájem o fluorescenční analoga umocněn řadou studií Pagana a kol. s živými buňkami v 80. letech 20. století. Byla užitá analoga přírodních lipidů, v nichž mastná kyselina byla nahrazena krátkým řetězcem se šesti uhlíky nesoucím fluorescenční NBD značku (C₆-NBD). Vyšší rozpustnost ve vodě oproti přírodním lipidům umožnila snadné vložení do plazmatické membrány. Později bylo zjištěno, že použitá analoga mají odlišné vlastnosti od jejich přirozených předloh, a tak vznikla potřeba připravit lipidy značené přirozenějšími, méně polárními fluorescenčními skupinami, jako je například výše uvedený uhlovodík pyren.¹⁶

Již v 70. letech 20. století byla představena kyselina parinarová (oktadeka-9,11,13,15-tetraenová kyselina, různé geometrické izomery), přirozeně se vyskytující polyenová mastná kyselina obsahující systém čtyř konjugovaných dvojných vazeb (**Obrázek 7**). Strukturou a konformací se blíže podobá běžně se vyskytujícím mastným kyselinám v membránách. Byla užívána pro fyzikálně-chemické studie (za pomoci různých spektrálních měření, například absorpčního posunu), přinesla poznatky z oblasti lipidového uspořádání v membránách nebo lipid-proteinových interakcí.²⁰ Obtížnosti spojené s použitím parinarové kyseliny však vedly k dalšímu vývoji na poli nenasycených mastných kyselin. Novou fluorescenční značkou s výhodnějšími vlastnostmi se stala oktadekapentaenová kyselina (kyselina all-*trans*-oktadeka-8,10,12,14,16-pentaenová a její 8-*cis*-izomer).²¹



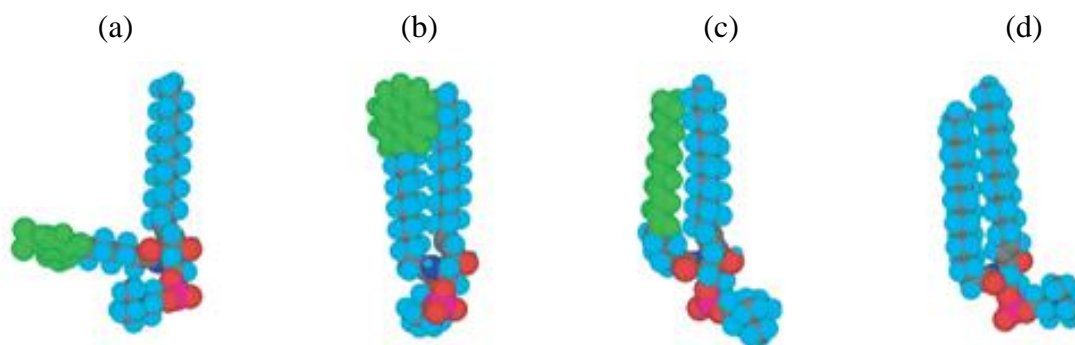
Obr. 7. Struktura parinarové kyseliny.¹³

Vzhledem ke krátkovlnné UV excitaci a emisi je parinarová kyselina nevhodná pro mikroskopii (její emisní vlnová délka je 416 nm). Nový způsob značení lipidů (viz dále) byl inspirován právě parinarovou kyselinou, avšak v řetězci se nenachází čtyři, nýbrž pět konjugova-

ných dvojných vazeb. Takové systémy, pentaeny, mají absorpční a emisní spektra posunuta více do červené oblasti (excitační a emisní vlnové délky jsou 350 nm, respektive 470 nm).¹⁶

Polyenové struktury mají potenciál pro široké uplatnění ve studiu různých jevů spojených s lipidy. Zajímavou sondou pro studium buněčných lipidových membrán a interakcí mezi lipidy navzájem, či mezi lipidy a proteiny jsou polyenové bolaamfifilní molekuly. Jedná se o lineární struktury se dvěma polárními terminálními skupinami (příkladem lze uvést skupinu karboxylovou nebo methylesterovou). Přípravou takových látek s vhodnou vzdáleností koncových skupin dojde k přemostění lipidové dvojvrstvy, přičemž fluorofor (zde systém čtyř, pěti či šesti konjugovaných dvojných vazeb) se nachází ve středové části membrány.^{22,23}

Kuerschner a kol. uvedli v roce 2005 nový typ lipidové značky, lipidy obsahující uhlovodíkový řetězec s pěti konjugovanými dvojnými vazbami – polyenové lipidy. Polyenové lipidy díky své struktuře unikátně napodobují přirozené lipidy (**Obrázek 8**), z čehož vyplývá minimální změna jejich vlastností. Přednosti těchto lipidových analog před analogy využívajícími skupiny NBD či BODIPY byly odhaleny analýzou fázového rozdělování v membránách. Bylo zjištěno, že buňky ochotně přijímají různé prekurzory polyenových lipidů a vytváří očekávané produkty bez žádného zřetelného poškození vlivem značky. S použitím dvoufotonové excitační mikroskopie byla zobrazena distribuce polyenových lipidů v živých savčích buňkách a vůbec poprvé byly úspěšně vizualizovány etherové lipidy, látky důležité pro funkci mozku.¹⁴



Obr. 8. Modely fluorescenčních analog sfingomyelinu (SM). Sfingomyelin se skládá z mastné kyseliny, navázané amidovou vazbou (dusík – tmavě modře) ke sfingosinovému řetězci, který je přes fosfát napojen na cholinovou hlavovou část (uhlík – černě, vodík – světle modře, kyslík – červeně). Fluorescenční značky jsou znázorněny zelenou barvou. **(a)** NBD-C₆-SM (polární NBD-skupina se situuje na fázové rozhraní voda-lipidy), **(b)** pyren-C₁₂-SM (hydrofobní, avšak rozměrný pyren je začleněn dovnitř membrány), **(c)** pentaen-C₁₆-SM (řetězec s pěti konjugovanými dvojnými vazbami), **(d)** přirozený C₁₆-SM.¹⁶

Polyenovou značku lze inkorporovat do jakéhokoliv lipidu s přímým uhlovodíkovým řetězcem. Výsledkem tak mohou být nejen fluorescenčně značené sfingolipidy, ale i glycerofosfolipidy, neutrální lipidy a etherové lipidy.¹⁴

Je zřejmé, že obdobně jako u jiných fluorescenčních značek, i u polyenových lipidů se nabízí v obecném principu dvojí umístění fluoroforu. V závislosti na cílech studia lze připravit například polyenové ceramidy s konjugovaným systémem dvojných vazeb ve sfingoidní části molekuly, nebo v řetězci mastné kyseliny. Pozici značky v řetězci lze přizpůsobit zaměření studie. Konfigurace první dvojně vazby v konjugovaném systému (tj. dvojně vazby nejbližší karboxylové skupině) může být *cis* nebo *trans*, přičemž výsledné geometrické rozdíly jsou podobné rozdílům mezi přirozenými *cis*-nenasycenými a nasycenými mastnými kyselinami. Rozdíly jsou však v případě polyenů mnohem menší.¹⁴

Vlastnosti polyenových lipidů byly studovány použitím pokusu fluorescenčního zhášení na základě liposomů. Byla znázorněna distribuce různých typů značených lipidů. V dalším významném pokusu byl buněčný metabolismus polyenových mastných kyselin srovnáván s radioaktivně značenými přírodními mastnými kyselinami. Výsledek demonstroval podobnost polyenových mastných kyselin a přírodních mastných kyselin srovnatelné délky. Pentaenové mastné kyseliny napodobují své přirozené předlohy tvarem a metabolismem a nemají výrazný efekt na změny fázového chování. Přesto je třeba určitá opatrnost, neboť fluorofor tvořený systémem konjugovaných dvojných vazeb by mohl díky své rigiditě ovlivnit osud značené látky v biologickém systému.^{14,16}

3. Experimentální část

3.1. Chemikálie a přístroje

Chemikálie byly pořízeny od firmy Sigma-Aldrich, pouze v případě *N*-((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl)tetrakosanamidu (ceramidu NS) byla využita část výtěžku získaného předchozí prací¹² (látka je též komerčně dostupná).

Pro charakterizaci látek byly využity přístroje Varian Mercury-Vx BB (NMR analýza, ¹H při 300 MHz a ¹³C při 75 MHz, později ¹H při 500 MHz a ¹³C při 125 MHz), spektrofotometr Nicolet Impact 400 (IČ spektra), LCQ Max advantage (Thermo Finnigan, San Jose, U.S.A., hmotnostní spektrometrie) a Koflerův přístroj (měření teploty tání pevných látek).

Tenkvrstvá chromatografie byla prováděna na TLC deskách (silikagel 60 F₂₅₄) od firmy Merck, při detekci byla použita UV lampa, ninhydrin nebo směs CeSO₄, H₃[P(Mo₃O₁₀)₄] a H₂SO₄.

3.2. Syntéza

Byly navrženy a vyzkoušeny tři syntézy, během nichž byly získány prekurzory dále využitelné pro přípravu cílových látek.

Nejprve jsme se pokusili o reakci Garnerova aldehydu s terminálním alkynem nesoucím polyenový fluorofor (**11**, syntéza A). Dalším přístupem byla příprava analogu ceramidu obsahujícího halogen ve sfingosinové části (**21** a **29**), na který jsme plánovali připojit polyenový fluorofor pomocí Wittigovy reakce. Chlorderivát **21** byl připraven alkynylací Garnerova aldehydu (syntéza B), bromderivát **29** Grubbsovou metatezí (syntéza C).

3.2.1. Syntéza A

Tato první syntéza vycházela z aldehydu (2*E*,4*E*)-hexa-2,4-dienalu (**3**) a spočívala v první fázi v přípravě (2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-deka-2,4,6,8-tetraenalu (**5**). Prodloužení uhlíkového skeletu výchozí látky o čtyři uhlíky a dvě konjugované dvojně vazby bylo dosaženo opakovanou Wittigovou reakcí pomocí trifenyfosfoniové soli **2**.^{14,24,25} (2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-deka-2,4,6,8-tetraenal (**5**) je prvním z prekurzorů přípravy fluorescenčních ceramidů.

Při syntéze A byl (5-chlorpent-1-yn-1-yl)trimethylsilan (**6**) převeden Finkelsteinovou reakcí na jodderivát **7**,^{26,27} který s trifenyfosfinem vytvořil příslušnou trifenyfosfoniovou sůl **8**.^{27,28} Tato sůl, respektive z ní vytvořený ylid, s (2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-deka-2,4,6,8-tetraenalem Wittigovou reakcí poskytla chráněný alkyn **9**, obsahující po izomerizaci jodem pět konjugovaných *trans*-dvojných vazeb.^{29,30,31,32} V reakci s tetrabutylammonium-fluoridem došlo k odbourání trimethylsilylové chránící funkční skupiny za vzniku sloučeniny s terminální trojnou vazbu (**11**).^{26,32} Vzniklý alkyn se však ukázal být poměrně nestabilní, proto posledním prozkoumaným krokem syntézy byla alkynylace Garnerova aldehydu (**12**) (5*E*,7*E*,9*E*,11*E*,13*E*)-pentadeka-5,7,9,11,13-pentaen-1-ynem (**11**) pomocí butyllithia a hexamethylfosforamidu (HMPA).¹²

Viz **Schéma 1**.

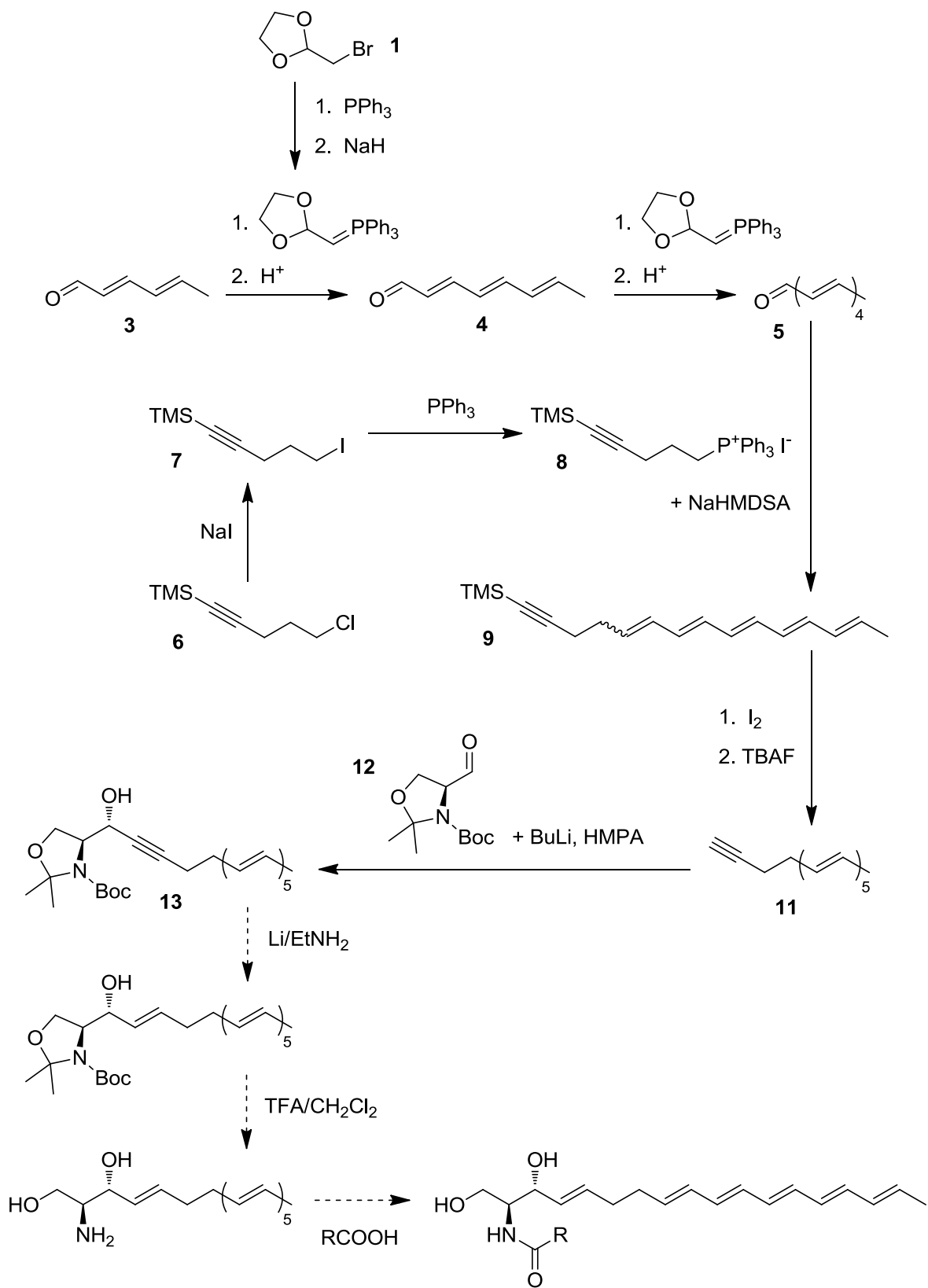
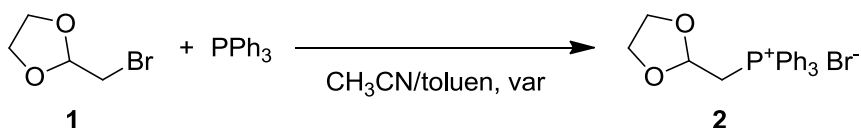


Schéma 1. Syntéza A, kde RCOOH je karboxylová kyselina různé délky. Reakční kroky značené plnou šipkou byly vyzkoušeny (obdobně ve Schématu 2 a 3).

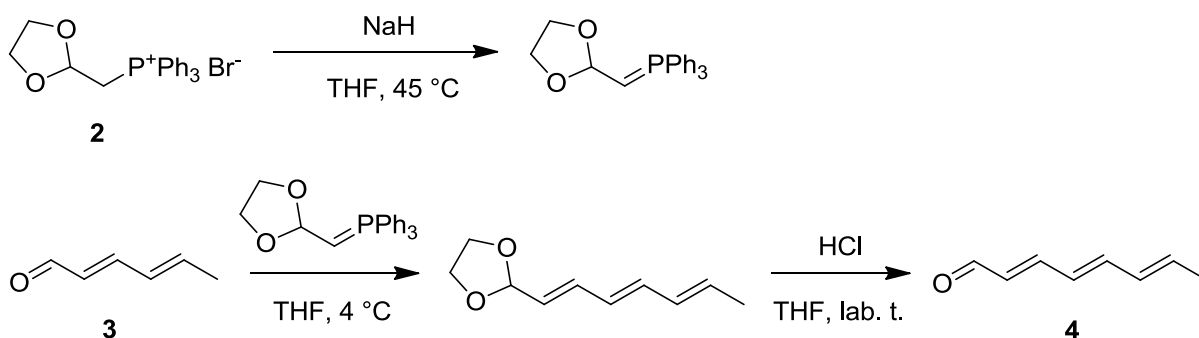
3.2.1.1. Příprava ((1,3-dioxolan-2-yl)methyl)trifenylfosfonium-bromidu (2)



100,0 g (598,8 mmol) 2-(bromomethyl)-1,3-dioxolanu (**1**) a 157,0 g (598,6 mmol) trifenylofosfinu bylo za stálého míchání zahříváno k varu pod zpětným chladičem, nejdříve v prostředí 500 ml acetonitrilu. Aby se podpořila tvorba krystalů produktu **2**, bylo v průběhu reakce asi poloviční množství acetonitrilu oddestilováno za sníženého tlaku a nahrazeno toluenem. Obsah byl po 43 hodinách zfiltrován, produkt rozsuspendován v acetonitrilu, opět přefiltrován a důkladně vysušen v exsikatoru. Filtrát umístěný v mrazicím zařízení poskytl další část produktu. Celkem bylo získáno 125,4 g bílé krystalické látky, výtěžek činil 48,8 %. Teplota tání soli byla 191 °C (literatura uvádí 194-195 °C)²⁴.

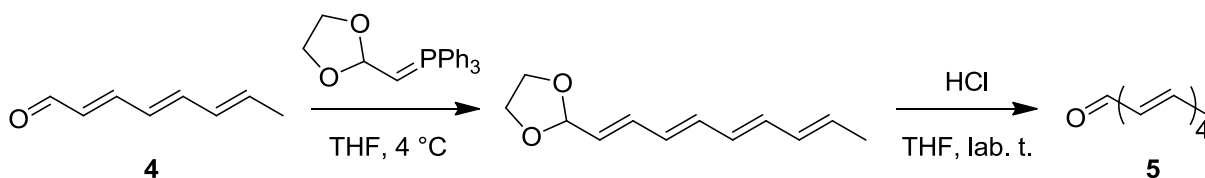
Reakce byla znovu provedena se stejnými navážkami. Výtěžek 43,8 %, teplota tání 193 °C.

3.2.1.2. Příprava (2E,4E,6E,8E)-deka-2,4,6,8-tetraenalů (5)



Ke 44,3 g (103,3 mmol) trifenylofosfoniové soli **2** bylo za stálého míchání přidáno 3,8 g (95,8 mmol) hydridu sodného (60% v parafinovém oleji) a směs byla suspendována pod atmosférou dusíku ve 250 ml suchého tetrahydrofuranu (THF) při 45 °C. Po přidání hydridu sodného se uvolňoval plynný vodík a reakční směs se zbarvila do oranžova. Po skončení vývoje vodíku byla směs zchlazena na 4 °C a injekční stříkačkou bylo přikapáno 9,2 g (10,6 ml, 95,7 mmol) (2E,4E)-hexa-2,4-dienalu (**3**) v 10 ml THF tak, aby teplota reakční směsi nestoupala na více než 10 °C. Reakční směs ztmavla. Po 1 hodině míchání při 50 °C

bylo rozpouštědlo za sníženého tlaku oddestilováno, zbytek byl extrahován hexanem a extrakt přefiltrován přes vrstvu silikagelu. Oddestilováním rozpouštědla byla získána pevná látka, která byla dále rozpuštěna v 90 ml THF a míchána za laboratorní teploty 1 hodinu s 6 ml 12% kyseliny chlorovodíkové. Po neutralizaci hydrogenuhličitanem sodným byla směs opakovaně vytřepávána hexanem (3 x 100 ml) a destilovanou vodou (20 ml). Z hexanové vrstvy bylo po odstranění zbytku vody bezvodým síranem sodným a následným přefiltrováním přes vatou odstraněno rozpouštědlo na vakuové rotační odparce. Bylo získáno 12,4 g (2*E*,4*E*,6*E*)-okta-2,4,6-trienalu (**4**, žlutá pevná látka), který byl bez přečištění použit do další reakce.

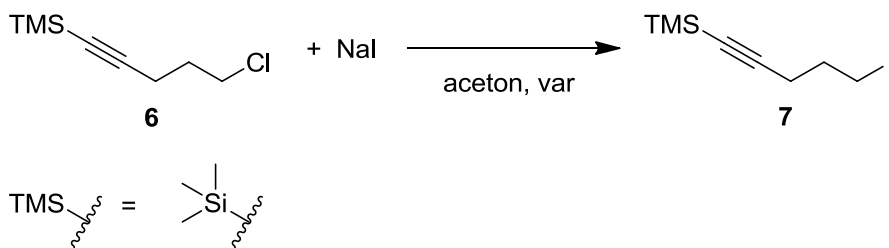


Výše uvedený postup byl zopakován se 40,3 g (93,9 mmol) trifenylofosfoniové soli **2** a 3,5 g (86,8 mmol) NaH (60% v parafinovém oleji). Bylo přidáno 12,4 g (101,5 mmol) (2*E*,4*E*,6*E*)-okta-2,4,6-trienalu (**4**) v 10 ml THF. Chránicí skupina byla odstraněna výše uvedeným postupem a rozdělením 12,2 g výsledné směsi na silikagelu (mobilní fáze hexan/ethyl-acetát (EtOAc) 4:1) bylo vyizolováno 2,9 g čistého (2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-deka-2,4,6,8-tetraenalu (**5**), oranžové pevné látky. Výtěžek těchto dvou po sobě jdoucích reakcí byl 20,7 %. Obě reakce byly ještě jednou zopakovány s celkovým výtěžkem 19,0 %.

(2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-Deka-2,4,6,8-tetraenal (**5**)

Oranžová pevná látka, teplota tání 86-88 °C, mol. hm. 148,20 g/mol. TLC: mobilní fáze hexan/EtOAc 4:1, $R_f = 0,62$. ^1H NMR (500 MHz, THF- d_8): $\delta = 9.52$ (1H, d, $J = 7.9$ Hz, COH), 7.20 (1H, dd, $J_1 = 15.2$ Hz, $J_2 = 11.2$ Hz, C-3), 6.74 (1H, dd, $J_1 = 14.7$ Hz, $J_2 = 11.2$ Hz, C-4), 6.47 (2H, dd, $J_1 = 14.8$ Hz, $J_2 = 11.2$ Hz, 2 =CH), 6.30-6.15 (2H, m, 2 =CH), 6.07 (1H, dd, $J_1 = 15.2$ Hz, $J_2 = 7.9$ Hz, C-2), 5.95-5.80 (1H, m, C-9), 1.80 (3H, d, $J = 7.5$, C-10). ^{13}C NMR (125 MHz, THF): $\delta = 192.7, 152.0, 143.3, 139.4, 134.1, 132.8, 131.9, 130.6, 130.5, 18.6$. IR (ATR): ν_{max} 3015, 2759, 2730, 1912, 1671, 1658, 1589, 1108, 995 cm^{-1} .

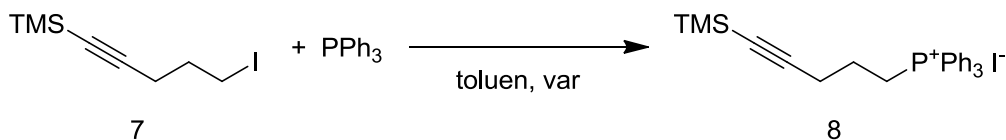
3.2.1.3. Příprava (5-jodpent-1-yn-1-yl)trimethylsilanu (7)



7,0 g (39,9 mmol) (5-chlorpent-1-yn-1-yl)trimethylsilanu (6) a 9,0 g (60,0 mmol) jodidu sodného bylo zahříváno k varu za stálého míchání pod zpětným chladičem v 50 ml acetonu po dobu 24 hodin. Vzniklá reakční směs byla rozdělena mezi hexan a vodu a několikrát extrahována hexanem (3 x 80 ml). Hexanové frakce byly promyty vodou a po vysušení Na_2SO_4 zahuštěny. Bylo získáno 9,8 g (5-jodpent-1-yn-1-yl)trimethylsilanu (7), výtěžek této reakce činil 92,7 %.

Reakce byla znovu zopakována s 10,0 g (57,2 mmol) (5-chlorpent-1-yn-1-yl)trimethylsilanu (6), 13,1 g (87,5 mmol) NaI v 80 ml acetonu. Bylo získáno 12,9 g produktu 7, výtěžek činil 84,8 %.

3.2.1.4. Příprava trifenyl(5-(trimethylsilyl)pent-4-yn-1-yl)fosfonium-jodidu (8)



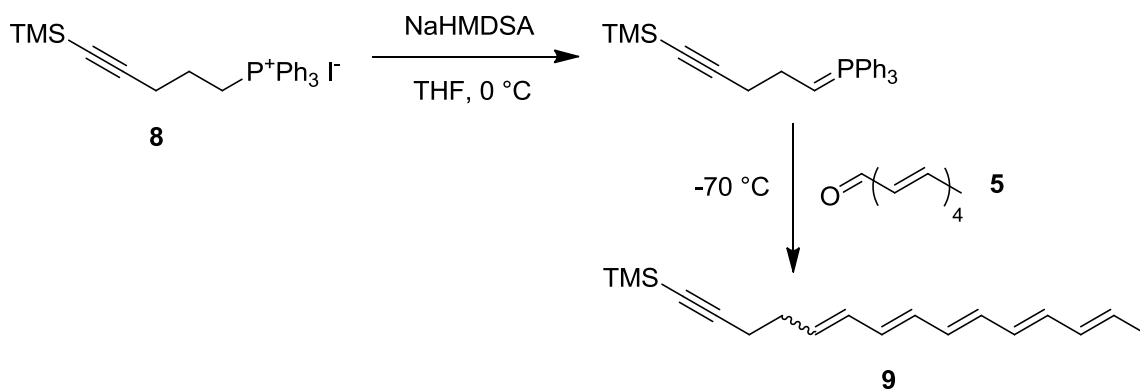
9,8 g (36,9 mmol) (5-jodpent-1-yn-1-yl)trimethylsilanu (7) a 9,7 g (36,9 mmol) trifenylfosfinu bylo v 50 ml toluenu za stálého míchání zahříváno k varu 18 hodin pod zpětným chladičem, reakční směs se vzniklými krystaly produktu byla následně zfiltrována. Bylo získáno 16,35 g trifenylfosfoniové soli 8 – bílé krystalické látky. Výtěžek reakce činil 83,8 %. Teplota tání 233-235 °C.

Reakce byla znovu zopakována s výtěžkem 80,8 %.

Trifenyl(5-(trimethylsilyl)pent-4-yn-1-yl)fosfonium-jodid (**8**)

Bílá krystalická látka, teplota tání 233-235 °C, mol. hm. 528,48 g/mol. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 7.85-7.65 (15H, m, 3 C₆H₅), 3.90-3.75 (2H, m, C-1), 2.65 (2H, t, *J* = 6.2, C-3), 1.95-1.75 (2H, m, C-2), 0.15-0.05 (9H, m, 3 CH₃). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 135.2, 135.1, 133.6, 133.5, 130.6, 130.4, 118.4, 117.3, 105.1, 86.6, 22.0, 21.3, 20.4, 0.0. IR (ATR): ν_{max} 2169, 1585, 1485, 1440, 1247, 1110, 994, 734, 689 cm⁻¹.

3.2.1.5. Příprava trimethyl((7*E*,9*E*,11*E*,13*E*)-pentadeka-5,7,9,11,13-pentaen-1-yn-1-yl)silanu (**9**)



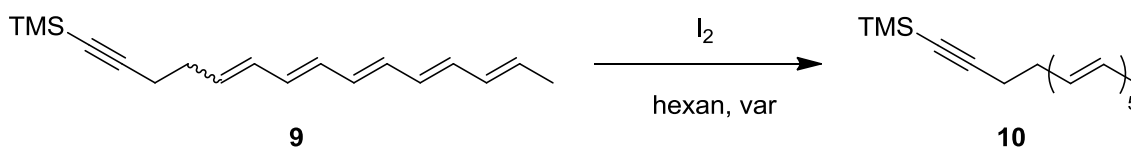
2,85 g (5,4 mmol) trifeny(5-(trimethylsilyl)pent-4-yn-1-yl)fosfonium-jodidu (**8**) bylo za stálého míchání suspendováno v suchém THF pod atmosférou dusíku. Po ochlazení na 0 °C byla přikapána injekční stříkačkou baze – 2,7 ml (5,4 mmol) bis(trimethylsilyl)amidu sodného (NaHMDSA, 2M roztok v THF). Reakční směs byla při teplotě 0 °C míchána 1 hodinu. Suspenze se postupně zbarvila do oranžova a pak se úplně rozpustila. Při teplotě -70 °C bylo po kapkách injekční stříkačkou přidáno 0,40 g (2,7 mmol) (2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-deka-2,4,6,8-tetraenalu (**5**) rozpuštěného v suchém THF, reakční směs byla míchána 2 hodiny při stejné teplotě a po vypnutí chladicího zařízení její teplota pomalu vystoupala na teplotu laboratorní. Vznikla tmavě hnědá suspenze, ke které bylo přidáno 50 ml nasyceného roztoku chloridu amonného. Po 15 minutách míchání byla směs extrahována hexanem (3 x 70 ml), hexanové frakce byly vytřepány vodou a po vysušení organické frakce Na₂SO₄ a přefiltrování přes vatou bylo rozpouštědlo oddestilováno za sníženého tlaku. Produkt byl předčištěn sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze hexan/EtOAc 19:1), zejména kvůli odstranění zbytku trifeny-

fosfinoxidu. Bylo získáno 1,2 g žluté směsi, která byla bez dalšího přečištění použita do další reakce.

Reakce byla zopakována, k separaci na silikagelu byla použita mobilní fáze hexan/EtOAc 50:1. Výtěžek 0 % (viz Výsledky a diskuse).

Vzhledem k nestabilitě produktu bylo 9,1 g zahuštěné reakční směsi, získané při zopakování reakce, bez přečištění použito do další reakce.

3.2.1.6. Izomerizace trimethyl((7*E*,9*E*,11*E*,13*E*)-pentadeka-5,7,9,11,13-pentaen-1-yn-1-yl)silanu (**9**)



K produktu z předchozí reakce (**9**), rozpuštěném v hexanu (oranžový roztok), byl za varu pod zpětným chladičem v atmosféře dusíku přidán roztok jodu v hexanu až na červený roztok. Směs byla takto míchána 30 minut. Po oddestilování rozpouštědla byla pevná směs přímo nanesena na silikagel a přečištěna sloupcovou chromatografií (mobilní fáze hexan/EtOAc 30:1). Bylo získáno 0,50 g čistého trimethyl((5*E*,7*E*,9*E*,11*E*,13*E*)-pentadeka-5,7,9,11,13-pentaen-1-yn-1-yl)silanu (**10**). Výtěžek reakcí 3.2.1.5. a 3.2.1.6. činil 68,5 %.

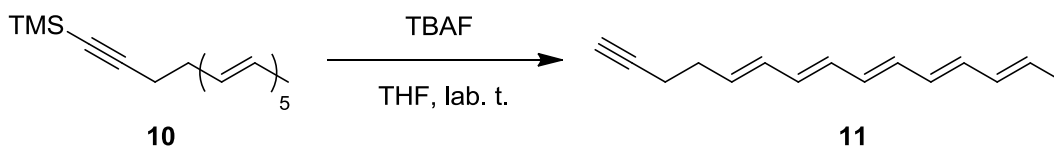
Izomerizace polyenu byla při zopakování provedena za mírnějších podmínek než poprvé. K hexanovému roztoku produktu (**9**) byl přidáván roztok jodu v hexanu až do červeného zbarvení a soustava byla míchána za laboratorní teploty 1 hodinu. Po reakci bylo zahuštěním do sucha získáno 7,2 g pevné směsi, která byla následně chromatograficky separována (mobilní fáze hexan/EtOAc 80:1). Procesem bylo vyizolováno 2,7 g téměř bílé pevné směsi s produktem, která byla znovu podrobena chromatografickému přečištění (mobilní fáze hexan/EtOAc 100:1). Získána byla opět směs látek s produktem. Tato směs byla dále chromatograficky rozdělována, jako mobilní fáze byla použita směs hexan/EtOAc/triethylamin (TEA) 100:1:1. Produkt se nepodařilo získat. Výtěžek 0 %.

Znovu byla izomerizační reakce provedena přidáním hexanového roztoku jodu a zahříváním k varu 30 minut pod zpětným chladičem za stálého míchání. Oddestilováním rozpouštědla za sníženého tlaku vznikla oranžová směs o hmotnosti 350 mg, která byla bez přečištění použita do další reakce.

Trimethyl((5*E*,7*E*,9*E*,11*E*,13*E*)-pentadeka-5,7,9,11,13-pentaen-1-yn-1-yl)silan (**10**)

Žlutá pevná látka, mol. hm. 270,48 g/mol. TLC: mobilní fáze hexan/EtOAc 4:1, $R_f = 0,98$; mobilní fáze hexan/EtOAc 30:1, $R_f = 0,76$; mobilní fáze hexan, $R_f = 0,34$. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 6.30\text{-}6.05$ (8H, m, 8 =CH), 5.80-5.65 (2H, m, C-5 + C-14), 2.35-2.25 (4H, m, 2 CH_2), 1.79 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, C-15), 0.20-0.10 (9H, m, 3 CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 133.1, 132.9, 132.6, 132.4, 132.3, 132.0, 131.8, 130.6, 130.1, 106.6, 85.1, 34.7, 22.7, 18.4, 0.1$. IR (ATR): ν_{max} 3010, 2175, 1457, 1377, 1249, 1000, 840, 759 cm^{-1} .

3.2.1.7. Příprava (5*E*,7*E*,9*E*,11*E*,13*E*)-pentadeka-5,7,9,11,13-pentaen-1-ynu (**11**)



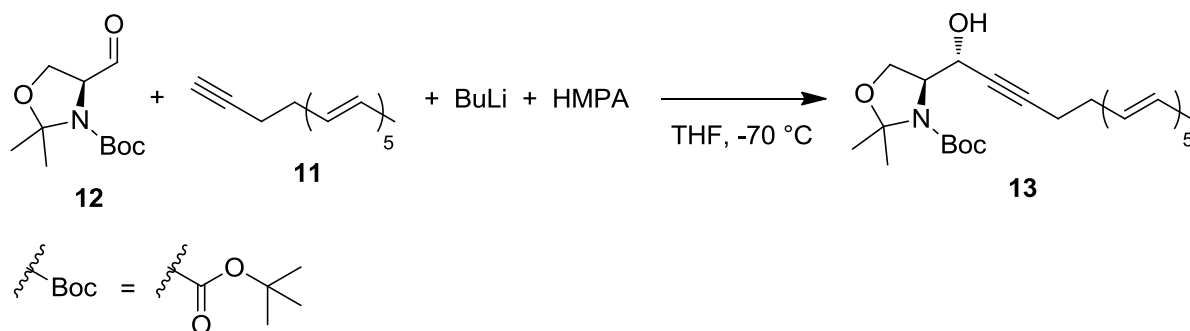
K 350 mg surového chráněného alkyneu **10** v THF bylo za laboratorní teploty v atmosféře dusíku přikapáno injekční stříkačkou 1,6 ml (1,60 mmol) roztoku tetrabutylammonium-fluoridu (TBAF) v THF. Roztok mírně zhnědl. Vzhled soustavy se po 2 hodinách míchání dále neměnil, bylo přidáno ještě 1,0 ml (1,00 mmol) roztoku TBAF v THF. Po další hodině míchání byl přidán nasycený roztok NH_4Cl (40 ml) a reakční směs byla extrahována hexanem (3 x 70 ml). Organická vrstva byla vysušena Na_2SO_4 , přefiltrována přes vatku a jejím zahuštěním bylo získáno 150 mg směsi s produktem **11**.

Tato látka se však ukázala být velmi nestabilní, proto byla reakce provedena znovu a 80 mg výsledné směsi bylo bez chromatografického čištění použito do další reakce.

(5*E*,7*E*,9*E*,11*E*,13*E*)-Pentadeka-5,7,9,11,13-pentaen-1-yn (**11**)

Slabě žlutá voskovitá pevná látka, mol. hm. 198,30 g/mol. TLC: mobilní fáze hexan/EtOAc 20:1, $R_f = 0,62$; mobilní fáze hexan se stopami EtOAc, $R_f = 0,88$.

3.2.1.8. Příprava (*S*)-*tert*-butyl-4-((*R*,6*E*,8*E*,10*E*,12*E*,14*E*)-1-hydroxyhexadeka-6,8,10,12,14-pentaen-2-yn-1-yl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylátu (**13**)



80 mg nepřečištěného alkyneu **11** z předchozí reakce bylo rozpuštěno v 5 ml suchého THF. Po ochlazení na $-70\text{ }^\circ\text{C}$ v atmosféře dusíku bylo za stálého míchání přikapáno injekční stříkačkou 0,30 ml (0,49 mmol) 1,6M roztoku butyllithia v hexanu. Po 1,5 hodině míchání při $-70\text{ }^\circ\text{C}$ byl přikapán roztok 95 mg (0,40 mmol) Garnerova aldehydu (**12**, (*S*)-*tert*-butyl-4-formyl-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylát) a 0,14 ml (0,81 mmol) hexamethylfosforamidu ve 4 ml suchého THF. Chlazení bylo vypnuto a za dvě hodiny byl přidán nasycený roztok NH_4Cl (30 ml). Po extrakci ethyl-acetátem (3 x 100 ml) byla organická fáze vysušena Na_2SO_4 a rozpouštědlo bylo odpařeno za sníženého tlaku. 227 mg pevné směsi bylo přečištěno sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze hexan/EtOAc 9:1). Bylo získáno 17 mg produktu **13**, výtěžek reakcí 3.2.1.5. až 3.2.1.8. činil 0,8 %. Kromě produktu se separačním procesem podařilo vyizolovat 35 mg nezreagované výchozí látky **11**.

(*S*)-*tert*-Butyl-4-((*R*,6*E*,8*E*,10*E*,12*E*,14*E*)-1-hydroxyhexadeka-6,8,10,12,14-pentaen-2-yn-1-yl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylát (**13**)

Žlutá pevná látka, mol. hm. 427,58 g/mol. TLC: mobilní fáze hexan/EtOAc 4:1, $R_f = 0,41$. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 6.30\text{--}6.05$ (8H, m, 8 =CH), 5.80-5.65 (2H, m, C-6 + C-15), 4.75-4.45 (2H, m, 2 CH), 4.20-3.85 (3H, m, 2 CH + OH), 2.35-2.25 (4H, m, 2 CH_2), 1.78 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, C-16), 1.55-1.40 (15H, m, 5 CH_3). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 152.8, 135.8, 133.1, 133.0, 132.5, 132.2, 131.9, 130.5, 130.1, 129.7, 94.9, 81.3, 79.1, 65.0, 64.2, 62.7, 34.2, 28.4, 25.8, 22.7, 18.4$. IR (ATR): ν_{max} 2925, 2361, 1691, 1365, 1000 cm^{-1} .

3.2.2. Syntéza B

Úvodním krokem syntézy B byla alkynylace Garnerova aldehydu (**12**) 5-chlorpent-1-ynem (**14**) za účasti butyllithia a HMPA.¹² Odbouráním chránících skupin v prostředí 1M HCl a dioxanu vznikl analog sfingosinu **16**,¹² jehož volné hydroxylové skupiny bylo potřeba pro další reakce ochránit. Zvolenou chránicí funkční skupinou byla skupina *tert*-butyldimethylsilylová (TBS), jako reakční činidlo byl použit *tert*-butyldimethylsilylchlorid (TBSCl).³³ Následovala acylace primární aminoskupiny chráněného sfingosinu **17** karboxylovou kyselinou, v našem případě kyselinou lignocerovou, pomocí 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu (WSC) a 1-hydroxypyrrolidin-2,5-dionu (HO-SI, *N*-hydroxysukcinimid).³⁴ Vzniklý ceramid **19** byl podroben redukci trojné vazby lithiem v ethylaminu.^{35,36,37}

Viz **Schéma 2**.

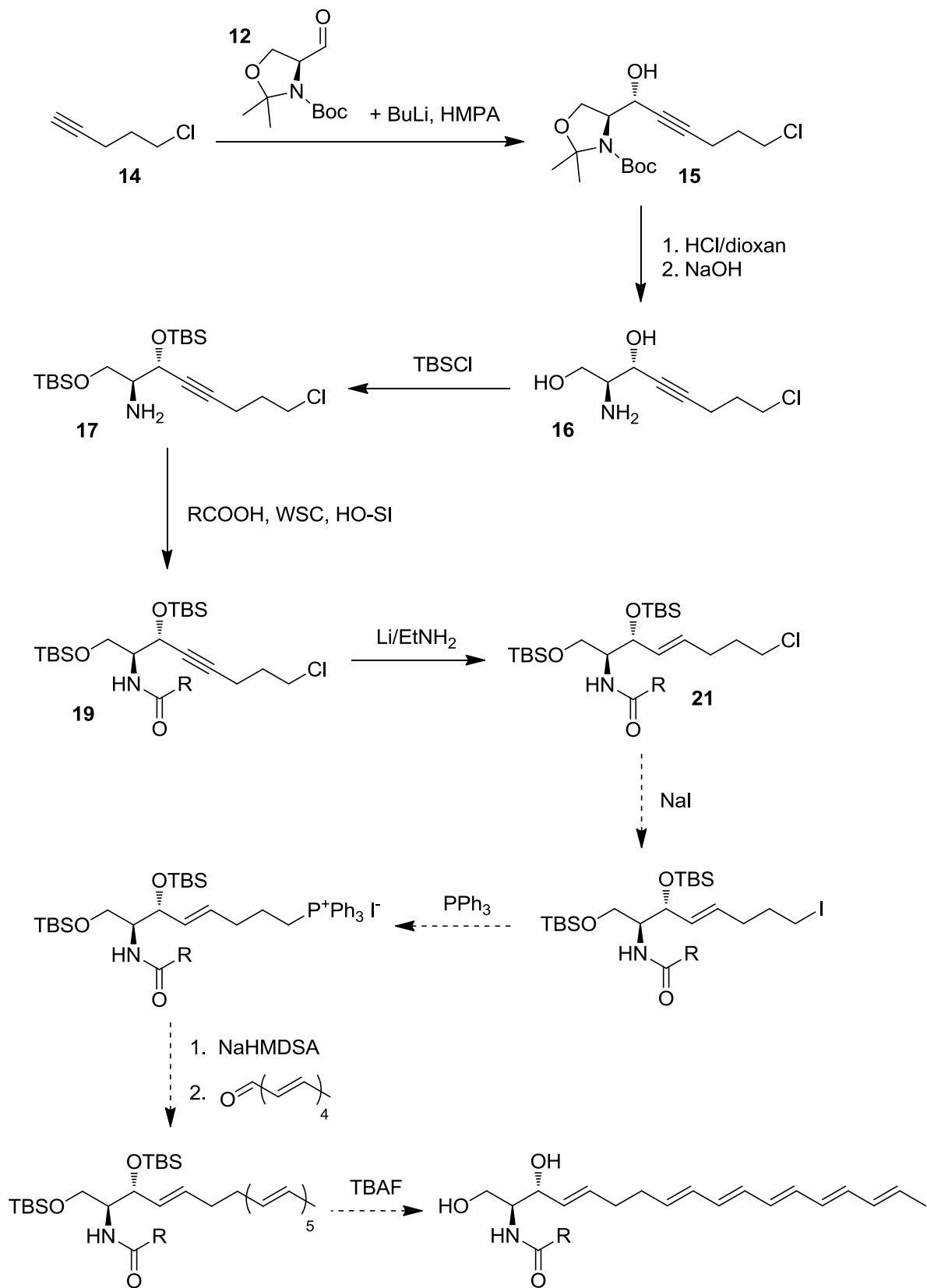
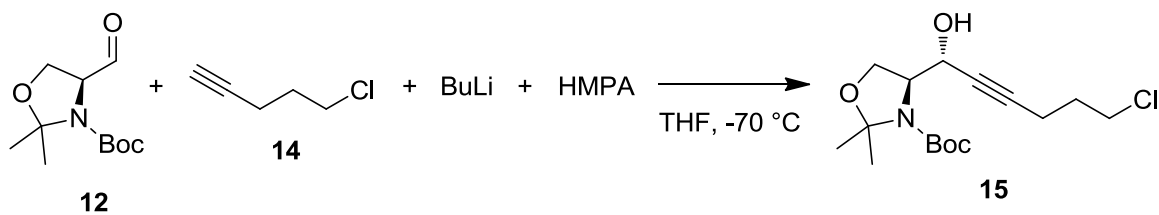


Schéma 2. Syntéza B, kde RCOOH je C₂₃H₄₇COOH.

3.2.2.1. Příprava (*S*)-*tert*-butyl-4-((*R*)-6-chlor-1-hydroxyhex-2-yn-1-yl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylátu (**15**)

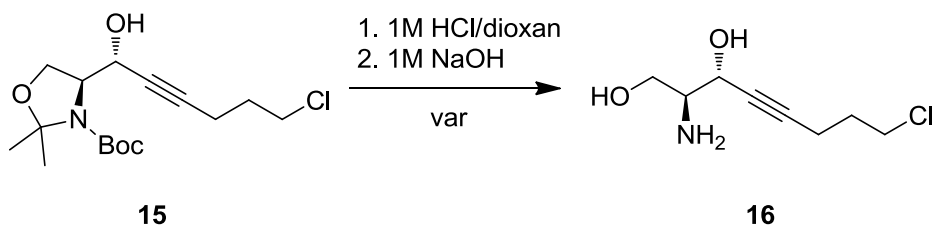


492 mg (0,50 ml, 4,8 mmol) 5-chlorpent-1-ynu (**14**) bylo rozpuštěno za stálého míchání ve 30 ml suchého THF pod atmosférou dusíku. Po ochlazení roztoku na $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ byly injekční stříkačkou přikapány 3 ml (4,8 mmol) 1,6M roztoku butyllithia v hexanu. Reakční směs byla míchána 1 hodinu při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ a poté bylo přikapáno 1,4 ml (8,0 mmol) HMPA a roztok 917 mg (0,87 ml, 4,0 mmol) Garnerova aldehydu (**12**) ve 20 ml suchého THF. Po 1 hodině míchání při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ bylo chlazení vypnuto. Podle TLC (mobilní fáze hexan/EtOAc 4:1) provedeného za další 2 hodiny ve vzorku reakční směsi již nebyl přítomen nezreagovaný Garnerův aldehyd. Bylo přidáno 50 ml nasyceného roztoku NH_4Cl a směs byla extrahována ethyl-acetátem (4 x 100 ml). Organická fáze byla vysušena Na_2SO_4 a zahuštěna na rotační vakuové odparce. Přečištěním sloupcovou chromatografií (mobilní fáze hexan/EtOAc 9:1) bylo získáno 1226 mg produktu **15**, olejovité kapalně lehce nažloutlé látky. Výtěžek reakce činil 92,4 %.

(*S*)-*tert*-Butyl-4-((*R*)-6-chlor-1-hydroxyhex-2-yn-1-yl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylát (**15**)

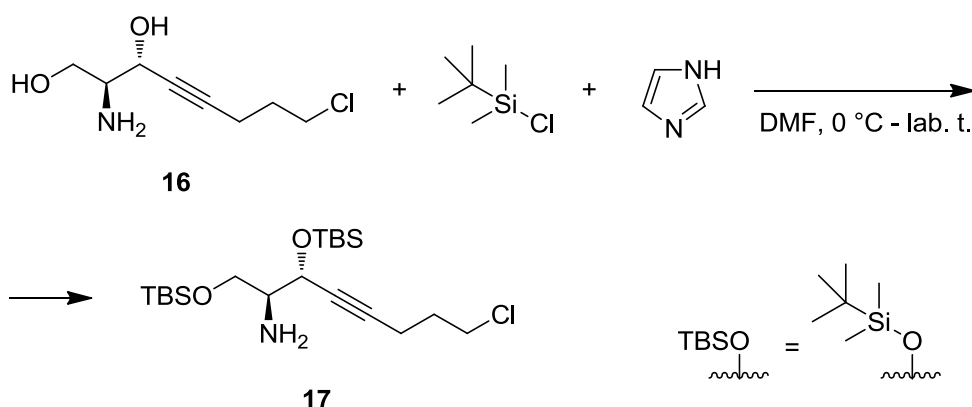
Olejovitá lehce nažloutlá kapalina, mol. hm. 331,83 g/mol. TLC: mobilní fáze hexan/EtOAc 4:1, $R_f = 0,31$. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 4.50$ (1H, bs, CH); 4.20–3.80 (4H, m, CH + CH_2 + OH); 3.62 (2H, t, $J = 6.4$ Hz, C-6); 2.40 (2H, dt, $J_1 = 6.8$ Hz, $J_2 = 1.9$ Hz, C-4); 2.00–1.90 (2H, m, C-5); 1.55–1.45 (15H, m, 5 CH_3). ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 152.8, 95.0, 84.4, 81.5, 79.1, 77.2, 65.1, 64.4, 43.5, 31.2, 28.3, 25.8, 16.2$.

3.2.2.2. Příprava (2*S*,3*R*)-2-amino-8-chlorokt-4-yn-1,3-diolu (**16**)



1204 mg (3,63 mmol) chráněného alkyneu **15** z předchozí reakce bylo za stálého míchání rozpuštěno ve 100 ml směsi 1M HCl a dioxanu (v poměru 1:1) a zahříváno k varu pod zpětným chladičem. Po 3 hodinách podle TLC nebyla v reakční směsi přítomna nezreagovaná výchozí látka. TLC bylo provedeno s mobilními fázemi butanol/kyselina octová/voda 4:1:1 (produkt $R_f = 0,59$) a dichlormethan/methanol/triethylamin 40:10:1 (produkt $R_f = 0,66$). Za laboratorní teploty byla vodná fáze alkalizována 1M roztokem NaOH na pH ~ 10 a následně extrahována ethyl-acetátem (5 x 100 ml). Organická vrstva byla vysušena bezvodým Na_2SO_4 , přefiltrována přes vatku a zahuštěna na rotační vakuové odparce. Bylo získáno 607 mg hnědé olejovité látky **16**. Produkt byl bez přečištění použit do další reakce.

3.2.2.3. Příprava (5*R*,6*S*)-5-(5-chlorpent-1-yn-1-yl)-2,2,3,3,9,9,10,10-oktamethyl-4,8-dioxa-3,9-disilaundekan-6-aminu (**17**)



607 mg nepřečištěného (2*S*,3*R*)-2-amino-8-chlorokt-4-yn-1,3-diolu (**16**) bylo za stálého míchání rozpuštěno ve 25 ml suchého dimethylformamidu (DMF) pod atmosférou dusíku. Po ochlazení roztoku na 0 °C byl injekční stříkačkou přes septum přikapán roztok 2864 mg

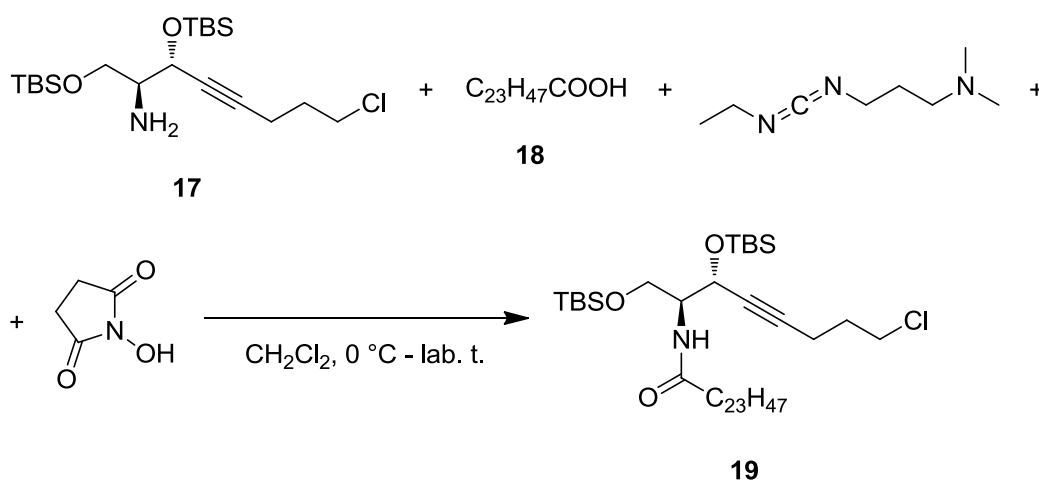
(19,00 mmol) *tert*-butyldimethylsilylchloridu a 1294 mg (19,00 mmol) imidazolu v suchém DMF. Následně byla reakční směs vyjmuta z ledové lázně a míchána 2 hodiny při laboratorní teplotě. Podle TLC (mobilní fáze hexan/EtOAc 9:1) již byla výchozí látka zcela zreagovaná. Bylo přidáno 50 ml vody, směs byla vytřepávána diethyletherem (4 x 70 ml), spojené etherové podíly byly ještě jednou vytřepávány vodou a po vysušení bezvodým Na₂SO₄ byla organická fáze zahuštěna za sníženého tlaku. Vzniklý produkt **17** byl čištěn sloupcovou chromatografií (mobilní fáze hexan/EtOAc – zpočátku 7:1, poté 5:1). Bylo vyizolováno 861 mg nažloutlé olejovité kapaliny – čistého produktu.

Výtěžek těchto dvou reakcí činil 56,5 %.

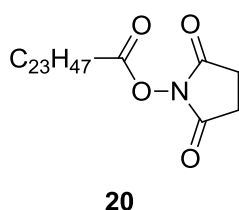
(5*R*,6*S*)-5-(5-Chlorpent-1-yn-1-yl)-2,2,3,3,9,9,10,10-oktamethyl-4,8-dioxa-3,9-disilaundekan-6-amin (17)

Slabě žlutá olejovitá kapalina, mol. hm. 420,18 g/mol. TLC: mobilní fáze hexan/EtOAc 9:1, $R_f = 0,12$. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.77$ (2H, d, $J = 8.8$ Hz, NH₂); 4.40 (1H, d, $J = 5.9$ Hz, C-3); 3.80 (1H, dd, $J_1 = 10.1$ Hz, $J_2 = 4.6$ Hz, C-1); 3.69 (1H, dd, $J_1 = 10.1$ Hz, $J_2 = 4.9$ Hz, C-1); 3.65-3.60 (2H, m, C-8); 2.85-2.75 (1H, m, C-2); 2.45-2.35 (2H, m, C-6); 2.00-1.90 (2H, m, C-7); 0.95-0.85 (18H, m, 6 CH₃); 0.15-0.05 (12H, m, 4 CH₃). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): $\delta = 86.2, 84.3, 65.4, 63.8, 58.7, 43.5, 31.3, 31.0, 25.9, 25.8, 25.7, 16.1, -4.6, -5.1$.

3.2.2.4. Příprava *N*-((5*R*,6*S*)-5-(5-chlorpent-1-yn-1-yl)-2,2,3,3,9,9,10,10-oktamethyl-4,8-dioxa-3,9-disilaundekan-6-yl)tetrakosanamidu (19)



309 mg (0,84 mmol) lignocerové kyseliny (**18**), 130 mg (0,15 ml, 0,84 mmol) WSC a 96 mg (0,84 mmol) HO-SI bylo za stálého míchání rozpuštěno v 15 ml suchého dichlormethanu. Po ochlazení roztoku na 0 °C bylo injekční stříkačkou přikapáno 320 mg (0,76 mmol) chráněného sfingosinu **17**, rozpuštěného ve 3 ml suchého CH₂Cl₂. Reakční směs byla následně míchána při laboratorní teplotě 18 hodin. Průběh reakce byl monitorován pomocí TLC (mobilní fáze hexan/EtOAc 6:1 a 4:1, dále CHCl₃/MeOH 50:1). Následovala izolace produktu vytřepáváním reakční směsi 12% HCl (60 ml) a poté vodou s přidavkem 10% roztoku NaCl (2 x 60 ml). Vodné fáze byly extrahovány CH₂Cl₂ (2 x 50 ml) a organické podíly spojeny, vysušeny Na₂SO₄ a zahuštěny na rotační vakuové odparce. Vznikla téměř bílá pevná směs, která byla podrobena chromatografické separaci (mobilní fáze CHCl₃). Výsledkem bylo 250 mg čisté látky, která byla použita do další reakce ještě před obdržением výsledků NMR analýzy. Tato látka na TLC (mobilní fáze CHCl₃) s R_f = 0,38 byla mylně považována za žádaný produkt. Na základě NMR analýzy bylo zjištěno, že se jedná o sukcinimidylester lignocerové kyseliny (**20**, **Obrázek 9**). Chromatografií bylo dále získáno 262 mg směsi látek s žádaným produktem **19** (hlavní podíl však tvořil výše popsáný ester lignocerové kyseliny), kterou se nepodařilo opětovnou separací (mobilní fáze CHCl₃/hexan 4:1) rozdělit, byla proto použita dále jako směs.



Obr. 9. Sukcinimidylester kyseliny lignocerové.

Reakce byla ještě jednou zopakována. Po extrakci byly ve směsi přítomny na TLC (mobilní fáze hexan/EtOAc 4:1) dvě hlavní skvrny – žádaného ceramidu **19** (R_f = 0,73) a sukcinimidylesteru kyseliny lignocerové (**20**, R_f = 0,32). Postříkáním TLC záznamu roztokem ninhydrinu bylo ověřeno, že ve směsi látek není přítomen výchozí sfingosin s volnou primární aminoskupinou. Vzniklý produkt byl izolován sloupcovou chromatografií (jako mobilní fáze byla použita směs hexan/EtOAc 4:1 – tato mobilní fáze byla vhodnější než původně použitý chloroform). Bylo získáno 110 mg ceramidu **19**, jednalo se o vysoce viskózní olejovitou čirou látku. Výtěžek reakce činil 30,0 %. Látka byla potvrzena NMR spektry.

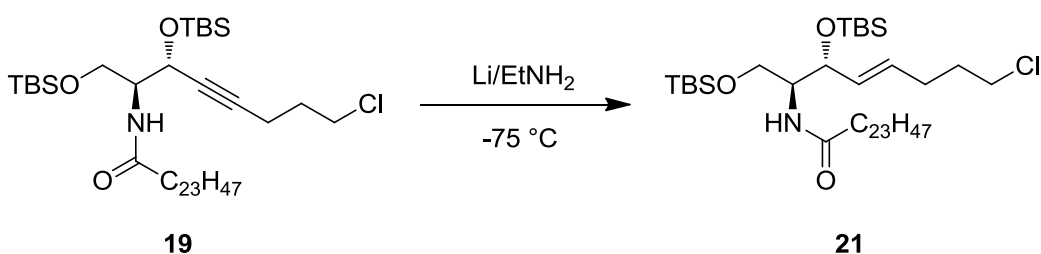
***N*-((5*R*,6*S*)-5-(5-Chlorpent-1-yn-1-yl)-2,2,3,3,9,9,10,10-oktamethyl-4,8-dioxa-3,9-disilaundekan-6-yl)tetrakosanamid (19)**

Viskózní olejovitá čirá kapalina, mol. hm. 770,80 g/mol. TLC: mobilní fáze hexan/EtOAc 4:1, $R_f = 0,73$. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.64$ (1H, d, $J = 8.6$ Hz, NH); 4.59 (1H, d, $J = 5.5$ Hz, C-3); 4.10-4.05 (1H, m, C-2); 3.82 (1H, dd, $J_1 = 10.2$ Hz, $J_2 = 4.7$ Hz, C-1); 3.63 (2H, t, $J = 6.3$ Hz, C-8); 3.65-3.60 (1H, m, C-1); 2.40 (2H, dt, $J_1 = 6.8$ Hz, $J_2 = 1.9$ Hz, C-6); 2.17 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, C-2'); 1.95-1.90 (2H, m, C-7); 1.65-1.55 (2H, m, C-3'); 1.35-1.20 (40H, m, 20 CH_2); 0.95-0.85 (21H, m, 2 tBu + C-24'); 0.12 (3H, s, Si- CH_3), 0.08 (3H, s, Si- CH_3), 0.05 (6H, s, 2 Si- CH_3). $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 172.8, 84.3, 79.8, 62.4, 61.3, 55.4, 43.6, 37.1, 31.9, 31.1, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 25.8, 25.7, 22.7, 18.2, 16.1, 14.1, -4.6, -5.1, -5.3$.

Sukcinimidylester kyseliny lignocerové (20)

Mol. hm. 465,71 g/mol. TLC: mobilní fáze CHCl_3 , $R_f = 0,38$. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 2.83$ (4H, s, 2 CH_2), 2.60 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, CH_2), 1.80-1.65 (2H, m, CH_2), 1.45-1.15 (40H, m, 20 CH_2), 0.90-0.85 (3H, m, CH_3). $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 169.2, 168.7, 31.9, 30.9, 29.7, 29.5, 29.3, 29.1, 28.8, 25.8, 25.7, 25.6, 24.6, 22.7, 14.1$.

3.2.2.5. Příprava *N*-((5*R*,6*S*)-5-((*E*)-5-chlorpent-1-en-1-yl)-2,2,3,3,9,9,10,10-oktamethyl-4,8-dioxa-3,9-disilaundekan-6-yl)tetrakosanamidu (21)

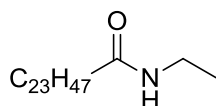


Do baňky bylo ke 34 mg (4,87 mmol) kovového lithia (nakrájeného nožem na plátky o délce asi 1 mm) přidáno 7 ml ethylaminu. Během 3 hodin stálého míchání při teplotě -75°C pod atmosférou dusíku se lithium zcela rozpustilo – vznikl temně modrý roztok. Roztok 250 mg (0,32 mmol) čistého produktu z předchozí reakce ve 4 ml suchého THF byl k roztoku lithia přikapán injekční stříkačkou přes septum. Reakční směs zůstala zabarvena tmavě modře a byla dále míchána 1 hodinu při teplotě -75°C . Reakce byla ukončena přidáním pevného NH_4Cl

a ethylamin byl odstraněn proudem dusíku. Vzniklý produkt byl poté čtyřikrát extrahován soustavou $\text{CHCl}_3/\text{H}_2\text{O}$ (s přídatkem 10% roztoku NaCl). Organická fáze byla vysušena bezvodým Na_2SO_4 a zahuštěna do sucha na rotační vakuové odparce.

Reakce byla stejným způsobem provedena s 262 mg vyizolované směsi z předchozí reakce. Bylo použito 35 mg (5,10 mmol) kovového lithia.

Získané směsi látek byly separovány sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze $\text{CHCl}_3/\text{hexan}$ 5:1). Podařilo se vyizolovat 67 mg bílé pevné látky (na TLC s mobilní fází $\text{CHCl}_3/\text{hexan}$ 5:1 $R_f = 0,28$). Podle NMR analýzy se jednalo o ethylamid kyseliny lignocerové (**22**, **Obrázek 10**), pouze se stopami žádaného produktu **21**, proto byly ostatní frakce z chromatografie sloučeny a znovu chromatograficky separovány (mobilní fáze CHCl_3). 20 mg získaného podílu bylo podrobena NMR analýze. Bylo zjištěno, že se jedná o znečištěný monosilylovaný ceramid.



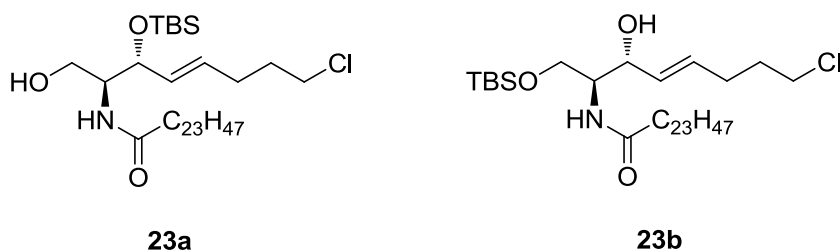
22

Obr. 10. Ethylamid kyseliny lignocerové.

Reakce byla zopakována. 15 mg (2,14 mmol) kovového lithia bylo nakrájeno na plátky do baňky pod atmosférou dusíku. Bylo vstříknuto jehlou 10 ml ethylaminu. Ani po 3 hodinách míchání při teplotě $-70\text{ }^\circ\text{C}$ nebylo lithium v ethylaminu rozpuštěné. Při teplotě vyšší než $-20\text{ }^\circ\text{C}$ se lithium začalo rozpouštět na tmavě modrý roztok, ale při podchlazení se při zhruba $-50\text{ }^\circ\text{C}$ začal roztok zpět odbarvovat a postupně se žlutě zakalil.

Při dalším pokusu bylo použito 50 mg (7,20 mmol) lithia nakrájeného na kousky, které byly před vložením do baňky krátce ponořeny do methanolu, následně do diethyletheru a opláchnuty hexanem. Po 3 hodinách míchání v 10 ml ethylaminu při teplotě $-10\text{ }^\circ\text{C}$ bylo lithium rozpuštěno na tmavě modrý roztok. Do roztoku bylo pomalu přikapáno injekční stříkačkou 110 mg (0,14 mmol) chráněného ceramidu **19** ve 2 ml suchého THF. Reakční směs byla 1 hodinu míchána při teplotě $-10\text{ }^\circ\text{C}$, reakce byla poté ukončena přídatkem pevného NH_4Cl a ethylamin byl odstraněn proudem dusíku. Zbytek byl vytřepáván CHCl_3 (4 x 30 ml) a 50 ml vody, spojené chloroformové podíly byly ještě promyty 50 ml vody, následně vysušeny bezvodým Na_2SO_4 a rozpouštědlo bylo oddestilováno za sníženého tlaku. Vzniklá oranžovo-

hnědá směs byla chromatograficky separována na silikagelu (mobilní fáze CHCl₃). 22 mg vyzolovaného podílu tvořil monosilylovaný produkt **23a/23b** (Obrázek 11) s nečistotami.



Obr. 11. Monosilylovaný produkt redukční reakce 3.2.2.5.

Ethylamid kyseliny lignocerové (**22**)

Bílá pevná látka, mol. hm. 395,71 g/mol. TLC: mobilní fáze CHCl₃/hexan 5:1, R_f = 0,28. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 5.55-5.30 (1H, m, NH), 3.35-3.20 (2H, m, C-1), 2.14 (2H, t, J = 7.3 Hz, C-2'), 1.70-1.55 (2H, m, C-3'), 1.40-1.20 (40H, m, 20 CH₂), 1.13 (3H, t, J = 7.3 Hz, C-2), 0.95-0.80 (3H, m, C-24'). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 173.0, 36.9, 34.3, 31.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.3, 25.8, 22.7, 14.9, 14.1.

N-((2*S*,3*R*,*E*)-3-((*tert*-Butyldimethylsilyl)oxy)-8-chlor-1-hydroxyokt-4-en-2-yl)tetrakosanamid (**23a**),

N-((2*S*,3*R*,*E*)-1-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-8-chlor-3-hydroxyokt-4-en-2-yl)tetrakosanamid (**23b**)

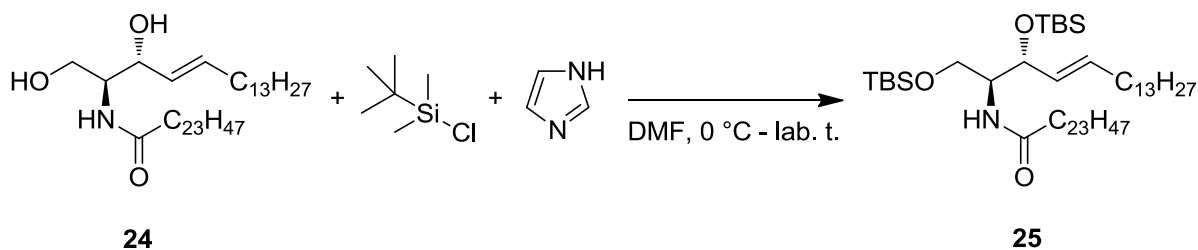
Mol. hm. 658,55 g/mol. TLC: mobilní fáze hexan/EtOAc 4:1, R_f = 0,62. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 5.75-5.30 (3H, m, 2 =CH + NH); 4.10-3.90 (1H, m, C-3); 3.70-3.50 (2H, m, C-1); 3.35-3.25 (3H, m, C-2 + C-8); 2.14 (2H, t, J = 7.5 Hz, C-2'); 2.05-1.95 (2H, m, C-6); 1.70-1.55 (4H, m, C-7 + C-3'); 1.40-1.20 (40H, m, 20 CH₂); 1.13 (3H, t, J = 7.3 Hz, C-24'); 0.90-0.85 (9H, m, tBu); 0.15-0.00 (6H, m, 2 Si-CH₃). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 173.0, 133.6, 126.0, 77.2, 65.3, 63.3, 49.9, 49.0, 36.9, 34.5, 31.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 25.8, 22.7, 18.2, 14.1, -5.5.

3.2.3. Syntéza C

Třetí navržená syntéza fluorescenčního ceramidu vycházela z výše zmíněného ceramidu NS (**24**). Nejdříve byly ochráněny volné hydroxylové skupiny ceramidu TBS skupinami. K tomu byl použit *tert*-butyldimethylsilylchlorid, podruhé byla reakce provedena pomocí *tert*-butyldimethylsilyltrifluormethansulfonátu.³⁷ Grubbsova metateze (za použití 5-brom-pent-1-enu (**26**) a Grubbsova katalyzátoru druhé generace) byla použita k výměně koncového alkylidenového řetězce chráněného ceramidu **25** za bromalkylidenový. Vzhledem k nulovému výtěžku byla reakce provedena znovu na nechráněném ceramidu NS (**24**).^{38,39,40} Tato reakce přinesla důležitý, dále použitelný produkt **29**.

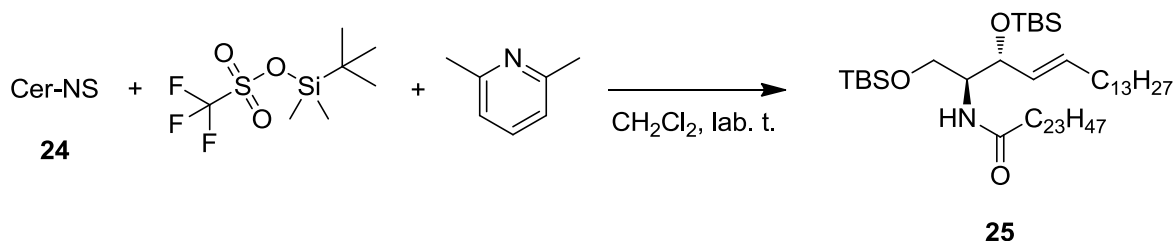
Viz **Schéma 3**.

3.2.3.1. Příprava *N*-((5*R*,6*S*)-2,2,3,3,9,9,10,10-oktamethyl-5-((*E*)-pentadec-1-en-1-yl)-4,8-dioxa-3,9-disilaundekan-6-yl)tetrakosanamidu (**25**)



200 mg (0,31 mmol) ceramidu NS (**24**) bylo suspendováno pod atmosférou dusíku v 10 ml suchého dimethylformamidu a ochlazeno na 0 °C. Ve 2 ml suchého DMF bylo rozpuštěno 278 mg (1,85 mmol) TBSCl a 126 mg (1,85 mmol) imidazolu, roztok byl ochlazen na 0 °C a injekční stříkačkou přes septum pomalu přikapán k suspendovanému ceramidu. Suspenze se zhruba po 30 minutách rozpustila. Po 16 hodinách stálého míchání za laboratorní teploty podle TLC již ve směsi nebyla přítomna nezreagovaná výchozí látka (při použití mobilní fáze CHCl₃/MeOH 10:1 ceramid NS měl $R_f = 0,29$). Směs byla zahuštěna na rotační vakuové odparce a následně rozdělována mezi chloroform (3 x 20 ml) a vodu (20 ml). Organické podíly byly spojeny, vysušeny bezvodým Na₂SO₄ a rozpouštědlo bylo oddestilováno za sníženého tlaku. Směs byla chromatograficky separována (mobilní fáze hexan/EtOAc 4:1). Bylo získáno 140 mg chráněného ceramidu **25**, výtěžek reakce činil 51,8 %.

Reakce byla zopakována s použitím jiného silylačního činidla.



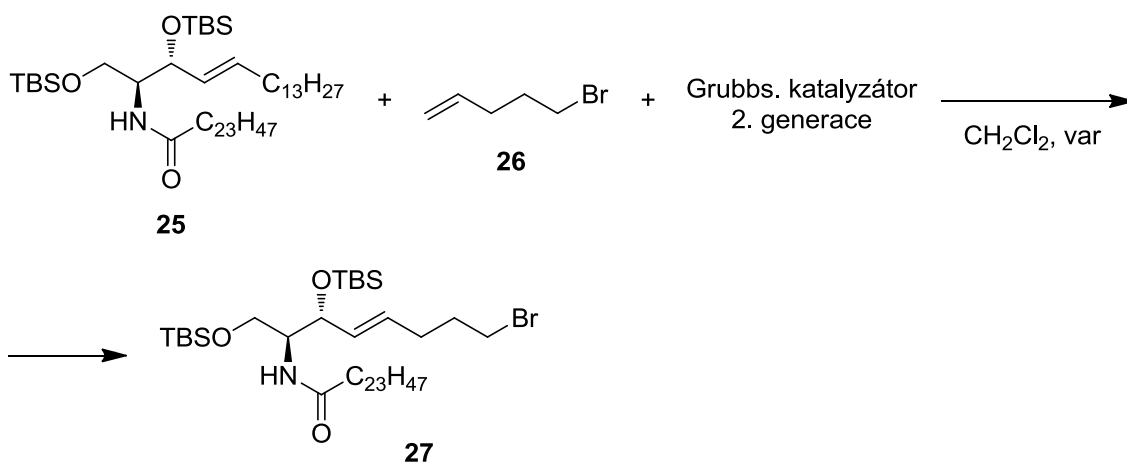
150 mg (0,23 mmol) ceramidu NS (**24**, Cer-NS) bylo suspendováno v suchém dichlormethanu pod atmosférou dusíku. Při teplotě 0 °C byl injekční stříkačkou přikapán roztok 366 mg (0,32 ml, 1,38 mmol) *tert*-butyldimethylsilyltrifluormethansulfonátu (TBSOTf) a 148 mg (0,16 ml, 1,38 mmol) 2,6-dimethylpyridinu (2,6-lutidinu) ve 2 ml suchého dichlormethanu. Reakční směs byla míchána 1 hodinu při laboratorní teplotě a následně zahuštěna na rotační

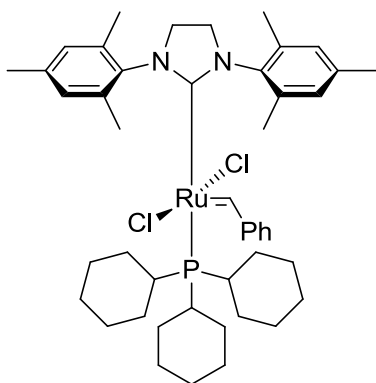
vakuové odparce. Směs byla naadsorbována na silikagel a separována sloupcovou chromatografií (mobilní fáze hexan/EtOAc 9:1). Bylo získáno 36 mg chráněného ceramidu **25** a 15 mg blíže neurčené směsi látek. Vypláchnutím chromatografické kolony methanolem a zahuštěním do sucha byl získán pevný podíl, který byl rozpuštěn v chloroformu a opakovaně vytřepáván vodou a přídatkem roztoku NaCl. Po vysušení organické fáze bezvodým Na₂SO₄ a oddestilování rozpouštědla se podařilo získat zpět 98 mg výchozí látky, neochráněného ceramidu **24**. Výtěžek reakce činil 17,8 %.

***N*-((5*R*,6*S*)-2,2,3,3,9,9,10,10-Oktamethyl-5-((*E*)-pentadec-1-en-1-yl)-4,8-dioxa-3,9-disilaundekan-6-yl)tetrakosanamid (**25**)**

Bílá krystalická látka, teplota tání 37-39 °C, mol. hm. 878,64 g/mol. TLC: mobilní fáze hexan/EtOAc 4:1, $R_f = 0,93$. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): $\delta = 5.58$ (1H, dt, $J_1 = 15.4$ Hz, $J_2 = 6.6$ Hz, C-5); 5.54 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, NH); 5.42 (1H, dd, $J_1 = 15.4$ Hz, $J_2 = 7.3$ Hz, C-4); 4.19 (1H, t, $J = 6.8$ Hz, C-3); 3.95-3.90 (1H, m, C-2); 3.84 (1H, dd, $J_1 = 10.1$ Hz, $J_2 = 4.1$ Hz, C-1); 3.58 (1H, dd, $J_1 = 10.1$ Hz, $J_2 = 4.7$ Hz, C-1); 2.11 (2H, dt, $J_1 = 7.5$ Hz, $J_2 = 3.5$ Hz, C-2'); 2.00 (2H, dt, $J_1 = 7.1$ Hz, $J_2 = 7.1$ Hz, C-6); 1.65-1.55 (4H, m, 2 CH₂); 1.40-1.20 (62H, m, 31 CH₂); 0.89 (9H, s, tBu); 0.90-0.85 (15H, m, tBu + 2 CH₃). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): $\delta = 172.4$, 133.3, 130.2, 72.9, 61.1, 54.9, 37.1, 32.2, 31.9, 29.7, 29.5, 29.4, 29.3, 25.9, 25.8, 25.7, 22.7, 14.1, -3.0, -4.0, -4.9, -5.3. IR (ATR): ν_{\max} 2923, 2853, 1643, 1547, 835, 776 cm⁻¹. $m/z = 878.5$ [M+H]⁺.

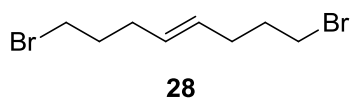
3.2.3.2. Příprava *N*-((5*R*,6*S*)-5-((*E*)-5-brompent-1-en-1-yl)-2,2,3,3,9,9,10,10-oktamethyl-4,8-dioxa-3,9-disilaundekan-6-yl)tetrakosanamidu (27**)**





Obr. 12. Grubbsův katalyzátor 2. generace, benzylden[1,3-bis(2,4,6-trimethylfenyl)-2-imidazolidinylden]dichloro(tricyklohexylfosfin)ruthenium.

120 mg (0,14 mmol) chráněného ceramidu **25** z předešlé reakce a 17 mg (0,02 mmol) Grubbsova katalyzátoru 2. generace (**Obrázek 12**) bylo rozpuštěno v 5 ml suchého dichlormethanu. Za stálého míchání při laboratorní teplotě pod atmosférou dusíku byl přikapán injekční stříkačkou roztok 81 mg (0,07 ml, 0,55 mmol) 5-brompent-1-enu (**26**) ve 2 ml suchého dichlormethanu. Poté byla reakční směs zahřívána pod zpětným chladičem k varu 2,5 hodiny. Na TLC (mobilní fáze hexan/EtOAc 19:1) byly pozorovány 2 výrazné skvrny. Bylo přidáno ještě 20 mg (0,13 mmol) alkenu **26** v 0,5 ml suchého dichlormethanu, ani po 1 hodině však žádná změna na TLC nenastala. Reakční směs byla zahuštěna na vakuové odparce a vzniklá směs byla chromatograficky dělena na silikagelu (mobilní fáze hexan/EtOAc 19:1). Bylo izolováno 65 mg čiré olejovité kapaliny, která na TLC (mobilní fáze hexan/EtOAc 19:1) měla $R_f = 0,79$. NMR analýzou bylo zjištěno, že jde o (*E*)-1,8-dibromokt-4-en (**28**, **Obrázek 13**). Dále bylo získáno 110 mg výchozího chráněného ceramidu **25** ($R_f = 0,41$) – struktura byla potvrzena hmotnostní spektroskopií (NMR analýzu nebylo v tu dobu možno využít).



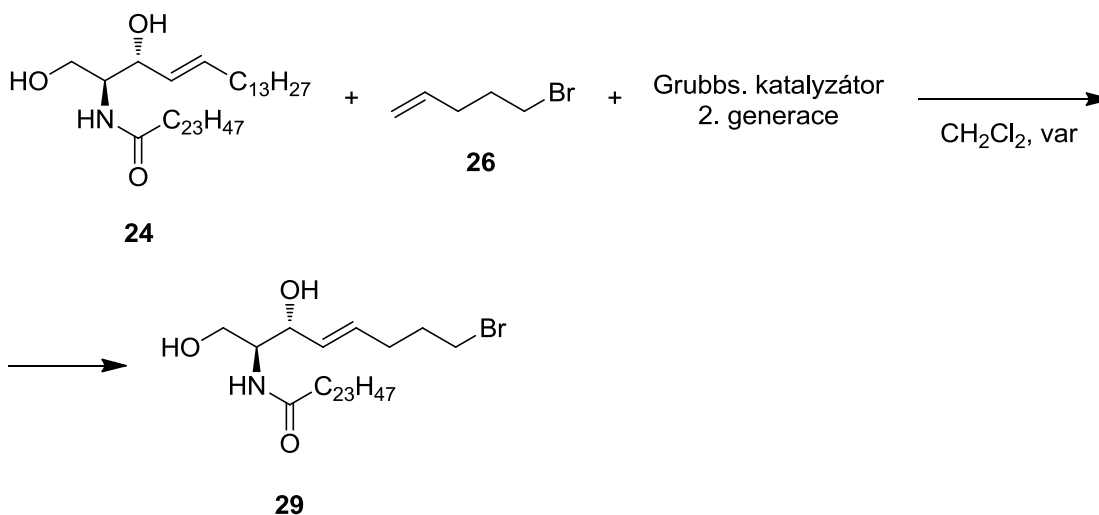
Obr. 13. (*E*)-1,8-dibromokt-4-en.

(*E*)-1,8-Dibromokt-4-en (**28**)

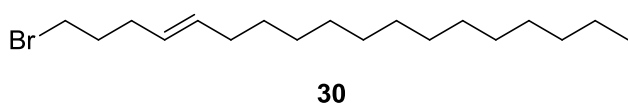
Bezbarvá olejovitá kapalná látka, mol. hm. 270,00 g/mol. TLC: mobilní fáze hexan/EtOAc 19:1, $R_f = 0,74$. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.55\text{-}5.35$ (2H, m, 2 =CH), 3.40 (4H, t,

$J = 6.8$ Hz, C-1 + C-8), 2.20-2.10 (4H, m, C-3 + C-6), 1.95-1.85 (4H, m, C-2 + C-7). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 129.3, 33.2, 32.2, 30.8$.

3.2.3.3. Příprava *N*-((2*S*,3*R*,*E*)-8-brom-1,3-dihydroxyokt-4-en-2-yl)tetrakosanamidu (**29**)



Reakce byla provedena obdobným postupem, jako v případě reakce 3.2.3.2. Bylo použito 110 mg (0,17 mmol) ceramidu NS (**24**), 101 mg (0,08 ml, 0,68 mmol) 5-brompent-1-enu (**26**) a 22 mg (0,03 mmol) Grubbsova katalyzátoru 2. generace. Separací získané směsi sloupcovou chromatografií na silikagelu (mobilní fáze hexan/EtOAc zpočátku v poměru 19:1, později 1:1) bylo získáno 53 mg (*E*)-1-bromoktadec-4-enu (**30**, **Obrázek 14**, při použití mobilní fáze hexan/EtOAc 19:1 $R_f = 0,91$), jednalo se o viskózní čirou kapalinu, a 42 mg (*E*)-1,8-dibrom-okt-4-enu (**28**). Dále bylo vyizolováno 103 mg pevné směsi s hlavní skvrnou odpovídající výchozímu ceramidu **24** ($R_f = 0,41$) a 47 mg směsi, která byla získána zahuštěním frakce vymyté z chromatografické kolony methanolem. Těchto 47 mg směsi bylo znovu podrobena chromatografickému dělení (mobilní fáze $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 30:1), jehož výsledkem bylo 12 mg žádaného produktu **29**. Výtěžek reakce činil 12,0 %.



Obr. 14. (*E*)-1-bromoktadec-4-en.

***N*-((2*S*,3*R*,*E*)-8-Brom-1,3-dihydroxyokt-4-en-2-yl)tetrakosanamid (29)**

Téměř bílá pevná látka, teplota tání 83-85 °C, mol. hm. 588,74 g/mol. TLC: mobilní fáze CHCl₃/MeOH 30:1, R_f = 0,33. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 6.33 (1H, d, *J* = 6.8 Hz, NH); 5.75 (1H, dt, *J*₁ = 15.4 Hz, *J*₂ = 6.7 Hz, C-5); 5.10 (1H, dd, *J*₁ = 15.5 Hz, *J*₂ = 6.0 Hz, C-4); 4.35-4.25 (1H, m, C-3); 3.95-3.85 (2H, m, C-1); 3.75-3.65 (1H, m, C-2); 3.40 (2H, t, *J* = 6.6 Hz, C-8); 2.30-2.20 (4H, m, C-6 + C-2'); 2.00-1.85 (4H, m, 2 CH₂); 1.80-1.60 (4H, m, 2 CH₂); 1.40-1.20 (36H, m, 18 CH₂); 0.87 (3H, t, *J* = 6.9 Hz, CH₃). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 174.0, 131.3, 130.6, 74.3, 62.4, 54.4, 36.8, 33.0, 31.9, 31.7, 30.5, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.3, 26.2, 25.7, 22.7, 14.1. IR (ATR): ν_{max} 3312, 2919, 2849, 1646, 1549 cm⁻¹.

***(E)*-1-Bromoktadec-4-en (30)**

Bezbarvá olejovitá kapalná látka, mol. hm. 331,37 g/mol. TLC: mobilní fáze hexan/EtOAc 19:1, R_f = 0,93. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 5.55-5.25 (2H, m, 2 =CH), 3.40 (2H, t, *J* = 6.8 Hz, C-1), 2.25-1.95 (4H, m, 2 CH₂), 1.95-1.85 (2H, m, C-2), 1.40-1.15 (22H, m, 11 CH₂), 0.88 (3H, t, *J* = 6.8 Hz, C-18). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 132.3, 127.8, 33.3, 32.6, 32.5, 31.9, 30.9, 29.7, 29.6, 29.5, 29.4, 29.2, 22.7, 14.1.

4. Výsledky a diskuse

Polyenové lipidy velmi dobře napodobují své přirozené předlohy, pro studium chování lipidických látek v živých systémech jsou tak nesmírně cenným nástrojem. S přihlédnutím ke struktuře ceramidů je principiálně možno fluorofor, sestávající v tomto případě z konjugovaného systému pěti dvojných vazeb, umístit do řetězce sfingoidní báze nebo do acylového řetězce. Rozhodli jsme se zabudovat fluorofor do sfingosinové části molekuly ceramidu, aby bylo v návaznosti na této práci možno připravit řadu značených ceramidů s různou délkou acylového řetězce pro další výzkum vztahů mezi délkou navázaného acylu a průnikem ceramidů kožní bariérou.

Pro přípravu ceramidů, popřípadě jejich analog, lze využít celé řady různých syntetických přístupů, které byly předmětem již mnoha výzkumných prací. Základním krokem je příprava sfingoidní báze, z níž jsou vlastní ceramidy získány konvenčními metodami acylace, např. pomocí acylhalogenidů, anhydridů, sukcinimidylesterů či karbodiimidu.⁶ U modernějších metod syntézy sfingosinu je kladen důraz na stereoselektivitu výsledných produktů, čehož je dosahováno využitím chirálních výchozích sloučenin (jako zdroj chiraloty mohou sloužit sacharidy,⁴¹ významným chirálním prekurzorem je L-serin^{35,42} apod.) nebo specifickými reakčními podmínkami. V této práci byla převzata část metodiky syntézy dle Garnera a kol.³⁵

Byly navrženy a vyzkoušeny tři základní cesty syntézy.

4.1. Syntéza A

Prvním přístupem bylo navázání terminálního alkynu nesoucího polyenový fluorofor (**11**) na Garnerův aldehyd.

Klíčovým prekurzorem v této syntéze, a vůbec prekurzorem i pro další způsoby přípravy polyenového fluorescenčního ceramidu, byl (2*E*,4*E*,6*E*,8*E*)-deka-2,4,6,8-tetraenal (**5**). Příprava tohoto nenasyceného aldehydu, jejímž základem je opakovaná Wittigova reakce, byla převzata z práce Kuerschnera a kol.¹⁴ Trifenylfosfoniová sůl **2** byla připravena reakcí 2-(brommethyl)-1,3-dioxolanu (**1**) s trifenylfosfinem. Jako reakční prostředí literární zdroje uvádí toluen²⁴ nebo acetonitril (jiné homology)^{25,43}. Použili jsme nejprve acetonitril, avšak abychom podpořili tvorbu krystalů produktu, část acetonitrilu jsme oddestilovali a nahradili méně polárním toluenem. Výchozí (2*E*,4*E*)-hexa-2,4-dienal (**3**) tak byl v prvním kroku prodloužen na (2*E*,4*E*,6*E*)-okta-2,4,6-trienal (**4**), ze kterého opakováním Wittigovy reakce vznikl aldehyd **5** se čtyřmi konjugovanými dvojnými vazbami.

V dalším kroku byl získaný aldehyd **5** podroben další Wittigově reakci s trifenyfosfoniovou solí, opět ve formě ylidu vzniklého působením báze (zde NaHMDSA), za vzniku terminálního alkynu **9** obsahujícího systém pěti konjugovaných dvojných vazeb, chráněného trimethylsilylovou skupinou. Nejdříve jsme zkoušeli připravit pro Wittigovu reakci trifenyl(5-(trimethylsilyl)pent-4-yn-1-yl)fosfonium-bromid. (5-chlorpent-1-yn-1-yl)trimethylsilan (**6**) s trifenyfosfinem a bromidem draselným (2,1 ekvivalentu) za varu v prostředí acetonitrilu nereagoval. Proto byl acetonitril oddestilován a místo něho byla reakce zkoušena v dimethylformamidu a následně v toluenu (opět za varu), bez výsledku. Reakce byly opakovány s katalytickým množstvím jodidu sodného, také však neúspěšně. Obdobné reakce s bromidem sodným či draselným a trifenyfosfinem v dimethylformamidu při 100 °C jsou přitom popsány v literatuře.⁴⁴ Rozhodli jsme se tedy připravit jodid trifenyfosfoniové soli (**8**). Výchozí sloučeninou byl opět (5-chlorpent-1-yn-1-yl)trimethylsilan (**6**), který byl ovšem převeden v prostředí acetonu reakcí s jodidem sodným na jodderivát **7** (Finkelsteinova reakce). Reakce byla provedena v souladu s literaturou,^{26,27} obdobně jako vlastní tvorba fosfoniové soli reakcí jodderivátu **7** s trifenyfosfinem v toluenu (podle některých zdrojů by reakci šlo provést i v benzenu).^{27,28} Zvolený postup byl neproblematický, s relativně vysokými výtěžky.

Následovala Wittigova reakce nenasyceného aldehydu **5** s připravenou trifenyfosfoniovou solí **8**, jejímž produktem byla směs *cis*- a *trans*-izomerů chráněného alkynu **9** s polyenovým řetězcem. Byly použity 2 ekvivalenty fosfoniové soli, 2 ekvivalenty NaHMDSA a 1 ekvivalent aldehydu. Postup provedení reakce včetně použitých reakčních teplot byl převzat z práce Wanga a kol.²⁹ Jiný zdroj uvádí mírnější podmínky pro reakci.³² Reakční směs byla chromatograficky předčištěna, zejména kvůli odstranění vedlejšího produktu reakce, trifenyfosfinoxidu. Ve zmiňované práci Wanga a kol.²⁹ byla ke chromatografické separaci použita kolona s oxidem hlinitým, my jsme použili jako stacionární fázi silikagel (silikagel byl použit například při syntéze konjugovaných pentaenových kyselin dle Souta a kol.)³⁰. Vzhledem k nestabilitě produktu byla při opakování reakce získaná reakční směs bez přečištění použita do další reakce.

K izomerizaci vzniklé směsi *cis*- a *trans*-izomerů chráněného alkynu (**9**, před izomerizací však z TLC nebyly jednotlivé izomery patrné) bylo použito katalytické množství jodu v hexanovém roztoku. Literatura popisuje obdobnou reakci v dichlormethanu za laboratorní teploty nebo dokonce při -30 °C.²⁹ Jiné zdroje uvádí použití hexanového roztoku s katalytickým množstvím jodu za varu.^{30,31} Reakci jsme nechali probíhat nejdříve za varu 30 minut, při opakování izomerizace byly použity mírnější podmínky – laboratorní teplota. Po izomerizaci byla reakční směs dělena na silikagelu. Jednotlivé frakce byly monitorovány pomocí TLC.

Ve frakcích s očekávaným produktem ($R_f = 0,76$ při použití mobilní fáze hexan/EtOAc 30:1) byly současně přítomny skvrny na startu. Při dalším pokusu o separaci a získání čistého produktu opět v žádaných frakcích nebyly přítomny čisté látky, produktu bylo podstatně méně. Výsledkem bylo tak malé množství produktu **10**, že jsme syntézu museli opakovat. Při opětovné chromatografické separaci reakční směsi po Wittigově reakci a izomerizaci jodem byl k mobilní fázi hexan/EtOAc přidán triethylamin (v poměru 100:1:1). Ani takto se však nepodařilo získat čistý produkt. Při separaci docházelo zřejmě k jeho rozkladu, proto jsme nakonec při dalším opakování reakcí nepřečištěný produkt použili do další reakce.

Na tomto místě je vhodné podotknout, že práce s polyeny vyžaduje dodržování určitých podmínek. Na tyto skutečnosti upozorňuje i Kuerschner a kol. ve své práci.¹⁴ Polyenové sloučeniny jsou citlivé na oxidaci a působení silných kyselin, neměly by být zbytečně vystavovány jasnému světlu. Komerčně dostupný chloroform často obsahuje jako nečistoty kyselinu chlorovodíkovou, fosgen a jiné, které velmi účinně polyeny rozbíjí. Abychom zabránili jejich rozkladu, reakce s nimi jsme prováděli za minimalizace přístupu světla, zkoušeli jsme chromatografické dělení s triethylaminem, vyhýbali jsme se chloroformu. Při opakování syntézy byl k polyenům přidáván 2,6-di-*terc*-butyl-4-methylfenol, působící jako antioxidant (tato sloučenina byla před izomerizací jodem odstraněna – obdobně působící butylhydroxytoluen totiž zřejmě mechanismem vycytávání volných radikálů inhibuje účinek jodu)³¹.

Pro následující reakce bylo nutné ochránit koncovou trojnou vazbu polyenu **10**. Odstranění TMS-chránící skupiny bylo provedeno za laboratorní teploty působením 1M roztoku TBAF v THF. Podmínky při reakci byly v souladu s literaturou²⁶ (jiný zdroj popisuje reakci při chlazení ledem)³².

Posledním vyzkoušeným krokem syntézy A byla reakce Garnerova aldehydu (**12**) s terminálním alkynem **11** za vzniku chráněného alkynylového analogu sfingosinu s navázaným polyenovým řetězcem (**13**).¹² Bohužel jsme měli k dispozici již velmi malé množství výchozího polyenu (80 mg bez předchozího přečištění). Výtěžek 0,8 % je vztažen ke čtyřem předcházejícím krokům, neboť produkty reakcí 3.2.1.5. až 3.2.1.7. byly při posledním opakování syntézy vzhledem k předpokládanému rozkladu použity bez předchozího přečištění.

Vzhledem k výše popsaným problémům se stabilitou alkynu nesoucího polyen jsme od tohoto postupu upustili a rozhodli se zavést polyenový řetězec do molekuly ceramidu až v konečné fázi syntézy, viz níže.

4.2. Syntéza B

Aby se minimalizovala práce se sloučeninami obsahujícími polyenový řetězec, spočíval druhý přístup nejprve v přípravě analogu ceramidu s halogenem (chlorem) ve sfingosinové části (**21**), na který jsme plánovali až v závěrečné fázi syntézy připojit polyenový fluorofor pomocí Wittigovy reakce (sled reakcí tedy byl při tomto přístupu oproti předchozímu opačný). Chlorderivát **21** byl připraven alkynylací Garnerova aldehydu (**12**) příslušným chloralkynem. Dále jsme odstranili chránící skupiny polární hlavy analogu sfingosinu, acylovali primární aminoskupinu a následně redukovali trojnou vazbu lithiem v ethylaminu na požadovanou *trans*-dvojnou vazbu. Reakce by bylo možno provést v opačném pořadí, při redukcii lithiem v ethylaminu (viz dále) však vzniká složitější reakční směs vzhledem k částečnému odbourání chránících skupin sfingoidní báze vlivem silného redukčního prostředí.³⁵

První reakcí tohoto syntetického přístupu byla reakce Garnerova aldehydu s 5-chlorpent-1-ynem (**14**). Reakce byla již výše popsána a probíhala analogicky, v souladu s literaturou a s dobrým výtěžkem.¹²

Další krok představovala deprotektace hlavové části analogu sfingosinu **15**. Zde se naskýtal několik možností provedení. Reakci jsme provedli použitím směsi 1M HCl a dioxanu za varu po dobu 3 hodin. Obdobná reakce je popsána v literatuře.¹² (Podle jiného zdroje lze deprotektaci uskutečnit rozpuštěním příslušné látky v ethanolu a přidáním 2M vodného roztoku HCl a mícháním směsi 4 hodiny při 70 °C.³² Variantou odstranění chránící skupiny je též použití trifluoroctové kyseliny v dichlormethanu a vody při laboratorní teplotě.⁴⁵)

Před další reakcí bylo nezbytné ochránit hydroxylové funkční skupiny analogu sfingosinu **16**. Zvolenou chránící funkční skupinou byla skupina TBS, silylačním činidlem byl TBSCl v přítomnosti imidazolu.³³

V této fázi bylo možno na primární aminoskupinu v poloze 2 chráněného analogu sfingosinu **17** navázat karboxylovou kyselinu libovolné délky řetězce. Rozhodli jsme se pro kyselinu lignocerovou (**18**), fyziologicky nejčastěji se vyskytující mastnou kyselinu v ceramidech kůže. Ze vzniklé reakční směsi byly separací na silikagelu získány dva hlavní podíly. Jednalo se jednak o sukcinimidylester kyseliny lignocerové (**20**), jednak směs žádaného produktu opět s esterem lignocerové kyseliny, z níž se ovšem opakovanou separací nepovedlo ceramid vyizolovat. Při opakování acylační reakce bylo roztokem ninhydrinu ověřeno, že není v reakční směsi již přítomen nezreagovaný analog sfingosinu (detekce volné aminoskupiny). Při separaci na silikagelu byla tentokrát použita vhodnější mobilní fáze, směs hexan/EtOAc 4:1.

Kromě sukcinimidylesteru kyseliny lignocerové se podařilo získat s 30% výtěžkem chráněný analog ceramidu **19**.

Pro redukci trojné vazby v molekule chráněného ceramidu na dvojnou vazbu bylo použito jako redukční činidlo lithium v ethylaminu. Tato reakce nepřinesla uspokojivé výsledky a byla současně posledním vyzkoušeným krokem syntézy B. Teplota prvně použitá při redukci byla $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$. Obdobná teplota je pro tuto reakci popisována v mnohé literatuře (konkrétně $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$),^{12,35,37} některé zdroje však uvádějí i mírnější podmínky, například $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.³⁶ Při prvním provedení reakce se lithium (nakrájené na plátky o délce asi 1 mm) během 3 hodin míchání při teplotě $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ zcela rozpustilo na tmavě modrý roztok. Následným rozdělením reakční směsi na silikagelu byl vyizolován a následnou NMR analýzou prokázán ethylamid kyseliny lignocerové (**22**) a dále znečištěný monosilylovaný ceramid. Při opakování redukční reakce nastaly problémy s rozpouštěním lithia v ethylaminu. Ani po 3 hodinách míchání nakrájeného lithia při teplotě $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ pod atmosférou dusíku nedošlo k jeho rozpuštění. Při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ se po 30-60 minutách začalo lithium rozpouštět na modrý roztok, avšak při podchlazení na $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ se roztok odbarvil a posléze se nevratně žlutě až hnědě zakalil. Kovové lithium bylo v dalším pokusu po nakrájení na jednotlivé plátky krátce ponořeno do methanolu, poté do diethyletheru a opláchnuto hexanem – takto bylo aktivováno a jeho povrch byl čistě kovově lesklý.¹² Ani po 2 hodinách míchání při teplotě $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ se lithium nezačalo rozpouštět, teplota byla proto zvýšena na $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, při níž se reakční směs po 30 minutách začala modře zabarvovat. Při snížení teploty na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ se opět roztok rychle odbarvil a žlutě zakalil. Postup aktivace lithia byl opakován a při teplotě $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ se lithium začalo rozpouštět, po 3 hodinách míchání při stejné teplotě bylo již rozpuštěno. Do roztoku byl injekční stříkačkou při teplotě $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ pomalu přikapán roztok chráněného ceramidu v THF. Chromatografickou separací se podařilo získat pouze monosilylovaný ceramid **23a/23b** (z dostupných dat nebylo jasné, která TBS chránící skupina byla odbourána) s nečistotami v množství, které neumožňovalo dále s ním pracovat. Předpokládáme, že potíže při redukci byly způsobeny nekvalitou použitého lithia.

4.3. Syntéza C

Při této syntéze bylo zamýšleno připojit polyenový fluorofor opět pomocí Wittigovy reakce na halogenovaný analog ceramidu. Jednalo se tedy o obdobný přístup jako v syntéze B, s tím rozdílem, že meziproduktem byl bromderivát **29**, který byl připraven Grubbsovou metatezí. Syntéza vycházela z ceramidu NS (**24**). Grubbsově metatezi jsme plánovali podrobit ceramid již s ochráněnými hydroxylovými skupinami (**25**). Nejdříve byl připraven derivát

ceramidu NS s TBS chránícími funkčními skupinami, které byly na ceramid navázány dvěma metodami – reakcí s TBSCl za přítomnosti imidazolu v dimethylformamidu a reakcí se silylačním činidlem TBSOTf za přítomnosti 2,6-dimethylpyridinu v dichlormethanu.³⁷ Výhodnější (s ohledem na výtěžky obou reakcí) se ukázal způsob s použitím TBSCl.

K vlastní Grubbsově metatezi za katalýzy Grubbsovým katalyzátorem 2. generace byl použit 5-brompent-1-en (**26**), aby došlo k výměně alkylidenového řetězce za bromalkylidenový. Reakce na chráněném ceramidu vůbec neproběhla, přestože byla prováděna za podmínek uváděných v literatuře (var 2 hodiny v prostředí dichlormethanu, 4 ekvivalenty příslušného alkenu).³⁸ Jiný zdroj popisuje reakci za obdobných podmínek, ale s 10 ekvivalenty alkenu.⁴⁰ Z reakce byl vyizolován výchozí chráněný ceramid NS a (*E*)-1,8-dibromokt-4-en (**28**), který vznikl spojením dvou molekul 5-brompent-1-enu v přítomnosti Grubbsova katalyzátoru. Je možné, že v našem případě chránící TBS skupina na hydroxylové skupině v poloze 3 sfingosinu stericky bránila přístupu reagujících složek. Některá literatura popisuje Grubbsovu metatezi na ceramidech s volnými hydroxylovými skupinami,³⁹ avšak Yamamoto a kol. ve své práci³⁸ uvádí reakci kromě nesilylovaných výchozích látek i na ceramidech s poměrně objemnými substituenty v polohách 1 a 2 řetězce sfingosinu. Reakce byla tedy provedena znovu, za obdobných podmínek, avšak na nesilylovaném ceramidu NS. Chromatografickou separací na silikagelu byl získán požadovaný produkt **29**, dále nezreagovaný výchozí ceramid, (*E*)-1,8-dibromokt-4-en (**28**) a (*E*)-1-bromoktadec-4-en (**30**), vzniklý spojením 5-brompent-1-enu s příslušným alkylidenovým řetězcem ceramidu. I přes relativně nízký výtěžek Grubbsovy metateze (12 %) se však tento postup zdá být výhodný pro další studie (návrh pro další postup viz Závěr).

5. Závěr

Cílem práce bylo zjistit možnosti syntézy polyenového fluorescenčního ceramidu, potažmo nastínit nejvhodnější cestu jeho přípravy, a připravit prekurzory k jeho reprodukovatelné syntéze. Tohoto cíle bylo dosaženo vyzkoušením tří odlišných syntetických přístupů, navržených tak, aby polyenový fluorofor byl situován ve sfingosinové části molekuly.

V základním principu první přístup spočíval v navázání připraveného terminálního alkynu nesoucího polyenový fluorofor na Garnerův aldehyd. Sled reakcí byl v druhém a třetím přístupu uspořádán opačně – nejdříve byl získán halogenovaný analog ceramidu, na který bylo plánováno Wittigovou reakcí připojit polynenasycený řetězec. Třetí přístup využil k přípravě halogenderivátu ceramidu Grubbsovy metateze.

Připravenými prekurzory jsou *(2E,4E,6E,8E)*-deka-2,4,6,8-tetraenal a *N-((2S,3R,E)*-8-brom-1,3-dihydroxyokt-4-en-2-yl)tetrakosanamid.

Pro další syntézu navrhujeme využít Grubbsovou metatezí připravený bromderivát *O*-silylovaného ceramidu, který by byl následně převeden na fosfoniovou sůl, respektive příslušný ylid, a podroben Wittigově reakci s již připraveným dekatetraenalem. Pro Grubbsovu metatezi by bylo výhodnější (finančně i z hlediska reaktivity) připravit ceramid s délkou řetězce sfingosinu pouze 5 uhlíků (tedy s terminální dvojnou vazbou) reakcí Garnerova aldehydu s vinylmagnesiumbromidem.

6. Seznam použitých zkratek

Boc	<i>tert</i> -butyloxykarbonyl
DMF	dimethylformamid
EtOAc	ethyl-acetát
HMPA	hexamethylfosforamid
HO-SI	1-hydroxypyrrolidin-2,5-dion
IČ	infračervený
IR	infračervené spektrum
NaHMDSA	bis(trimethylsilyl)amid sodný
NMR	nukleární magnetická rezonance
R _f	retenční faktor
SM	sfingomyelin
TBAF	tetrabutylammonium-fluorid
TBS	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl
TBSCl	<i>tert</i> -butyldimethylsilylchlorid
TBSOTf	<i>tert</i> -butyldimethylsilyltrifluormethansulfonát
TEA	triethylamin
TFA	trifluoroctová kyselina
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TMS	trimethylsilyl
UV	ultrafialový
WSC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid

7. Literatura

-
- ¹ Goni, F. M.; Alonso, A. Biophysics of sphingolipids I. Membrane properties of sphingosine, ceramides and other simple sphingolipids. *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, *1758*, 1902-1921.
- ² Vávrová, K.; Hrabálek, A. Role ceramidů v kůži. *Prakt. Lékařen.*, **2006**, *2*, 55-58.
- ³ Ogretmen, B.; Hannum, Y. A. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat. Rev. Cancer*, **2004**, *4*, 604-16.
- ⁴ Bouwstra, J. A.; Ponc, M. The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, *1758*, 2080-2095.
- ⁵ Wertz, P. W.; van den Bergh, B. The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological membranes. *Chem. Phys. Lipids*, **1998**, *91*, 85-96.
- ⁶ Novotný, J.; Hrabálek, A.; Vávrová, K. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Skin Ceramides. *Curr. Med. Chem.*, **2010**, *17*, 2301-2324.
- ⁷ Hrabálek, A.; Vávrová, K. Lze překonat kožní bariéru? *Prakt. Lékařen.*, **2005**, *1*, 8-11.
- ⁸ Masukawa, Y.; Narita, H.; Shimizu, E.; Kondo, N.; Sugai, Y.; Oba, T.; Homma, R.; Ishikawa, J.; Takagi, Y.; Kitahara, T.; Takema, Y.; Kita, K. Characterization of overall ceramide species in human *stratum corneum*. *J. Lipid Res.*, **2008**, *49*, 1466-1476.
- ⁹ van Smeden, J.; Hankemeijer, T.; Vreeken, R. J.; Bouwstra, J. The detailed lipid composition in human *stratum corneum*, *Perspectives in Percutaneous Penetration* (konference), **2010**, *12*, 71.
- ¹⁰ Motta, S.; Monti, M.; Sesana, S.; Caputo, R.; Carelli, S.; Ghidoni, R. Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim. Biophys. Acta*, **1993**, *1182*, 147-51.
- ¹¹ Wertz, P. W.; Downing, D. T. Ceramides of pig epidermis: structure determination. *J. Lipid Res.*, **1983**, *24*, 759-65.
- ¹² Novotný, J.; Janůšová, B.; Novotný, M.; Hrabálek, A.; Vávrová, K. Short-Chain Ceramides Decrease Skin Barrier Properties. *Skin Pharmacol. Physiol.*, **2009**, *22*, 22-30.
- ¹³ Maier, O.; Oberle, V.; Hoekstra, D. Fluorescent lipid probes: some properties and applications (a review). *Chem. Phys. Lipids*, **2002**, *116*, 3-18.
- ¹⁴ Kuerschner, L.; Ejsing, C. S.; Ekroos, K.; Shevchenko, A.; Anderson, K. I.; Thiele, C. Polyene-lipids: A new tool to image lipids. *Nat. Methods*, **2005**, *2*, 39-45.
- ¹⁵ Somerharju, P. Pyrene-labeled lipids as tools in membrane biophysics and cell biology. *Chem. Phys. Lipids*, **2002**, *116*, 57-74.
- ¹⁶ van Meer, G.; Liskamp, R. M. Brilliant lipids. *Nat. Methods*, **2005**, *2*, 14-15.
- ¹⁷ Man, M. Q.; Feingold, K. R.; Elias, P. M. Exogenous Lipids Influence Permeability Barrier Recovery in Acetone-Treated Murine Skin. *Arch. Dermatol.*, **1993**, *129*, 728-738.
- ¹⁸ Mao-Qiang, M.; Brown, B. E.; Wu-Pong, S.; Feingold, K. R.; Elias, P. M. Exogenous Non-physiologic vs Physiologic Lipids: Divergent Mechanisms for Correction of Permeability Barrier Dysfunction. *Arch. Dermatol.*, **1995**, *131*, 809.

-
- ¹⁹ Novotný, J.; Pospěchová, K.; Hrabálek, A.; Čáp, R.; Vávrová, K. Synthesis of fluorescent C₂₄-ceramide: Evidence for acyl chain length dependent differences in penetration of exogenous NBD-ceramides into human skin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**, *19*, 6975-6977.
- ²⁰ Sklar, L. A.; Hudson, B. S.; Simoni, R. D. Conjugated Polyene Fatty Acids As Membrane Probes: Preliminary Characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1975**, *72*, 1649-1653.
- ²¹ Mateo, C. R.; Souto, A. A.; Amat-Guerri, F.; Acuna, A. U. New Fluorescent Octadecapentaenoic Acids as Probes of Lipid Membranes and Protein-Lipid Interactions. *Biophys. J.*, **1996**, *71*, 2177-2191.
- ²² Quesada, E.; Acuna, A. U.; Amat-Guerri, F. New Transmembrane Polyene Bolaamphiphiles as Fluorescent Probes in Lipid Bilayers. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2001**, *40*, 2095-2097.
- ²³ Quesada, E.; Acuna, A. U.; Amat-Guerri, F. Synthesis of Carboxyl-Tethered Symmetric Conjugated Polyenes as Fluorescent Transmembrane Probes of Lipid Bilayers. *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, 1308-1318.
- ²⁴ Das, B.; Salman, M.; Kurhade, S. H.; Venkataramanan, R.; Kumar, R.; Kapkoti, G. S.; Katoch, R.; Bandyopadhyay, A.; Rattan, A. Ketolide derivatives as antibacterial agents, *United States Patent Application Publication*, US 2009/0170790 A1, **2009**, 23.
- ²⁵ Mithran, S.; Subbaraman, A. S. Synthesis of (3Z)-Dodeceny-(E)-2-butenate, the Pheromone of Sweet Potato Weevil, *Molecules*, **1999**, *4*, 159-164.
- ²⁶ Koft, E. R.; Smith, A. B. Intramolecular [2 + 2] Photochemical Cycloadditions. 3. Perhydrohistrionicotoxin Synthetic Studies: Synthesis of Spiro[4.5]decanones via Intramolecular [2 + 2] Photocycloaddition, *J. Org. Chem.*, **1984**, *49*, 832-836.
- ²⁷ Hodgson, D. M.; Arif, T. Convergent and Stereoselective Synthesis of Trisubstituted E-Alkenyl Bromides and Iodides via β -Oxido Phosphonium Ylides, *J. Am. Chem. Soc.*, **2008**, *130*, 16500-16501.
- ²⁸ Helmboldt, H.; Hiersemann, M. Synthetic Studies toward Jatrophone Diterpenes from *Euphorbia characias*. Enantioselective Synthesis of (-)-15-O-Acetyl-3-O-propionyl-17-norcharaciol, *J. Org. Chem.*, **2009**, *74*, 1698-1708.
- ²⁹ Wang, Y.; Ma, J.; Cheon, H.; Kishi, Y. Aggregation Behavior of Tetraenoic Fatty Acids in Aqueous Solution, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2007**, *46*, 1333-1336.
- ³⁰ Souto, A. A.; Acuna, A. U.; Amat-Guerri, F. A General and Practical Synthesis of Linear Conjugated Pentaenoic Acids, *Tetrahedron Lett.*, **1994**, *35*, 5907-5910.
- ³¹ Sklar, L. A.; Hudson, B. S.; Simoni, R. D. Conjugated Polyene Fatty Acids as Fluorescent Probes: Synthetic Phospholipid Membrane Studies, *Biochemistry*, **1977**, *16*, 819-828.
- ³² Murakami, T.; Hirono, R.; Furusawa, K. Efficient stereocontrolled synthesis of sphingadienine derivatives, *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 9233-9241.
- ³³ Corey, E. J.; Venkateswarlu, A. Protection of Hydroxyl Groups as *tert*-Butyldimethylsilyl Derivatives, *J. Am. Chem. Soc.*, **1972**, *94*, 6190-6191.
- ³⁴ Wunsch, E.; Drees, F. Zur Synthese des Glucagons, X. Darstellung der Sequenz 22-29, *Chem. Ber.*, **1966**, *99* (1), 110-120.
- ³⁵ Garner, P.; Park, J. M.; Malecki, E. A Stereodivergent Synthesis of D-erythro-Sphingosine and D-threo-Sphingosine from L-Serine, *J. Org. Chem.*, **1988**, *53*, 4395-4398.

-
- ³⁶ Sawatzki, P.; Kolter, T. Syntheses of 3-C-Methylceramides, *Eur. J. Org. Chem.*, **2004**, 3693-3700.
- ³⁷ Masuda, Y.; Mori, K. Synthesis and Absolute Configuration of 6-Hydroxylated New Ceramides in Human Skin, Ceramides B, 4, 7 and 8, *Eur. J. Org. Chem.*, **2005**, 22, 4789-4800.
- ³⁸ Yamamoto, T.; Hasegawa, H.; Hakogi, T.; Katsumura, S. Versatile Synthetic Method for Sphingolipids and Functionalized Sphingosine Derivatives via Olefin Cross Metathesis, *Org. Lett.*, **2006**, 8, 5569-5572.
- ³⁹ Nussbaumer, P.; Ettmayer, P.; Peters, C.; Rosenbeiger, D.; Högenauer, K. One-step labelling of sphingolipids *via* a scrambling cross-metathesis reaction, *Chem. Commun.*, **2005**, 5086-5087.
- ⁴⁰ Bielawska, A.; Hannun, Y.; Szulc, Z.; Obeid, L.; Ogretmen, B. Cationic ceramides, and analogs thereof, and their use for preventing or treating cancer, *PCT Int. Appl.*, WO 2006/050264 A1, **2006**.
- ⁴¹ Kiso, M.; Nakamura, A.; Tomita, Y.; Hasegawa, A. A novel route to *D-erythro*-sphingosine and related compounds from mono-*O*-isopropylidene-*D*-xylose or -*D*-galactose, *Carbohydr. Res.*, **1986**, 158, 101-111.
- ⁴² Garner, P.; Park, J. M. The Synthesis and Configurational Stability of Differentially Protected β -Hydroxy- α -amino Aldehydes, *J. Org. Chem.*, **1987**, 52, 2361-2364.
- ⁴³ Sakata, Y.; Hirano, Y.; Tatemitsu, H.; Misumi, S.; Ochiai, H.; Shibata, H. Synthesis of a photosynthetic model compound with a long alkyl chain and its incorporation into bovine serum albumin, *Tetrahedron*, **1989**, 45, 4717-4727.
- ⁴⁴ Fukumoto, T.; Hirokawa, K.; Okada, K. Process for the preparation of phosphonium salts, *European Patent Specification*, EP 0 675 130 B1, **1995**.
- ⁴⁵ Kim, S.; Lee Y. M.; Kang, H. R.; Cho, J.; Lee, T.; Kim, D. Synthesis of Novel Polyene Analogues of Sphingoid Base via an Iterative Acetylene Homologation Sequence, *Org. Lett.*, **2007**, 9, 2127-2130.