

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra anorganické a organické chemie



Diplomová práce

**SYNTÉZA CERAMIDŮ S DEUTEROVANÝM
SFINGOSINOVÝM ŘETĚZCEM**

Kateřina Havlíčková

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

Hradec Králové

2013

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

V Hradci Králové 2013

Kateřina Havlíčková

Děkuji vedoucí práce Doc. PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D. za odbornou pomoc, cenné rady a trpělivý přístup při vypracování této diplomové práce.

Obsah

Abstrakt	5
Abstract	6
1 Cíl práce	7
2 Teoretická část	8
2.1 Význam ceramidů ve <i>stratum corneum</i>	8
2.2 Ceramidy a jejich strukturní typy	8
2.3 Deuterované lipidy	9
2.4 Metody využívající deuterované lipidy	11
2.4.1 Neutronový rozptyl	11
2.4.2 Vibrační spektroskopie	12
2.4.3 Deuteriová nukleární magnetická rezonance (² H-NMR)	14
2.4.4 Hmotnostní spektrometrie ToF-SIMS	15
3 Experimentální část	18
3.1 Chemikálie a přístroje	18
3.2 Syntéza	18
3.2.1 Příprava pentadec-1-ynu[C ₃₋₁₅ -d ₂₇] (2)	20
3.2.2 Příprava (<i>S</i>)- <i>terc</i> -butyl-4-((<i>R</i>)-1-hydroxyhexadec-2-yn-1-yl[C ₄₋₁₆ -d ₂₇])- 2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylátu (4)	21
3.2.3 Příprava (<i>S</i>)- <i>terc</i> -butyl-4-((<i>R</i>)-1-hydroxyhexadec-2-en-1-yl[C ₄₋₁₆ -d ₂₇])- 2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylátu (5)	24
3.2.4 Příprava (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>E</i>)-2-aminooktadec-4-en-1,3-diolu[C ₆₋₁₈ -d ₂₇] (6)	26
3.2.5 Příprava N-((2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>E</i>)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl[C ₆₋₁₈ -d ₂₇]) tetrakosanamidu[C _{2'-24'} -d ₄₇] (8)	27
4 Výsledky a diskuze	30
5 Závěr	34
6 Seznam použitých zkratk	35
7 Literatura	36

Abstrakt

Ceramidy jsou komplexní skupina lipidů patřící mezi sfingolipidy. Tvoří nejdůležitější složku *stratum corneum* (SC) a podílí se tak na ochranné funkci kůže.

Přestože jsou ceramidy předmětem intenzivního výzkumu, přesný vliv jejich struktury na bariérovou funkci kůže dosud není znám. Ke studiu struktury, vlastností a dynamiky lipidových membrán SC jsou často využívána deuteriem značená analoga lipidů. Mezi metody využívající deuterované molekuly patří neutronový rozptyl, vibrační spektroskopie (infračervená spektroskopie FTIR a Ramanova spektroskopie), deuteriová nukleární magnetická rezonance ($^2\text{H-NMR}$) a hmotnostní spektrometrie ToF-SIMS.

Tato práce popisuje syntézu ceramidu s deuterovaným sfingosinovým řetězcem. Získané ceramidy s různou délkou acylového řetězce (deuterovaného i nedeuterovaného) by měly být v budoucnu využity pro studium jejich vlastností v lipidových membránách SC.

Syntéza vycházela z postupů běžně využívaných pro přípravu nedeuterovaných analogů ceramidů. Nejdůležitějším krokem syntézy bylo začlenění deuterovaného řetězce do molekuly sfingosinu. Z perdeuterovaného bromalkanu byl připraven deuterovaný terminální alkyn. V další reakci došlo k navázání deuterovaného terminálního alkynu na Garnerův aldehyd. Trojná vazba byla redukována na *trans*-dvojnou a následně došlo k odstranění chránicích skupin. Získaný deuterovaný sfingosin byl acylován deuterovanou kyselinou lignocerovou.

Syntézou se podařilo získat a charakterizovat deuterovaný sfingosin, jeho acylací byl připraven a charakterizován ceramid s deuterovaným sfingosinovým a acylovým řetězcem. Bohužel se nepodařilo izolovat tento produkt v čisté formě. Metodika syntézy byla objektivně zhodnocena a byly navrženy úpravy, které by měly vést k lepším výsledkům.

Abstract

Ceramides are a complex group of lipids belonging to sphingolipids. They are the most important component of *stratum corneum* (SC) and thus participate in a barrier function of the skin.

In spite of the ceramides are a subject of intensive research, the exact effect of their structure to the barrier function of the skin is poorly understood. For studying the structure, properties and dynamics of SC lipid membranes, analogues of lipids labelled by deuterium are often used. The methods using deuterated molecules include neutron scattering, fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), Raman spectroscopy, deuterium nuclear magnetic resonance ($^2\text{H-NMR}$) and time of flight secondary ion mass spectrometry (ToF-SIMS).

This work describes the synthesis of the ceramide with a deuterated sphingosine chain. The acquired ceramides with a different acyl chain length (deuterated as well as non-deuterated) should be used for studying their properties in SC lipid membranes in the future.

The synthesis was based on methods commonly used for preparation of non-deuterated analogues of ceramides. The most important step of the synthesis was the incorporation of the deuterated chain into the molecule of sphingosine. The deuterated terminal alkyne was prepared from the perdeuterated bromoalkane. Next the deuterated terminal alkyne reacted with Garner's aldehyde. The triple bond was reduced to a *trans*-double bond and subsequently the functional groups were deprotected. The deuterated sphingosine was acylated by the deuterated lignoceric acid.

This work led to the preparation and characterization of the deuterated sphingosine, which was acylated to yield the ceramide with the deuterated sphingosine and acyl chains. Unfortunately, we did not succeed in the isolation of the pure ceramide. The methodology of the synthesis was objectively evaluated and the modifications that should lead to better results were suggested.

1 Cíl práce

Ceramidy, komplexní skupina lipidů, jsou nejdůležitější složkou lipidové matrix *stratum corneum* (SC) a hrají nezastupitelnou roli v tvorbě kožní bariéry.

V současné době jsou ceramidy předmětem intenzivního výzkumu. Deuterovaná analoga ceramidů hrají významnou roli při objasňování struktury, vlastností a dynamiky lipidových membrán SC pomocí neutronového rozptylu, vibrační spektroskopie (infračervené spektroskopie FTIR a Ramanovy spektroskopie), deuteriové nukleární magnetické rezonance ($^2\text{H-NMR}$) a hmotnostní spektrometrie ToF-SIMS.

Cílem této práce je syntéza ceramidů s deuterovaným řetězcem sfingosinu. Ceramidy značené deuteriem jsou svými chemickými vlastnostmi shodné s fyziologickými ceramidy, na rozdíl od fluorescenčně značených analogů. Získané ceramidy s různou délkou acylového řetězce (deuterovaného i nedeuterovaného) by měly být v budoucnu využity pro studium jejich vlastností v lipidových membránách SC, především k objasnění, jakým způsobem exogenně podaný ceramid regeneruje poškozenou kožní bariéru.

2 Teoretická část

2.1 Význam ceramidů ve *stratum corneum*

Hlavní funkcí kůže je chránit organismus před vnějšími vlivy a zabránit nadměrným ztrátám vody. *Stratum corneum* (SC) je nejsvrchnější vrstva kůže, která plní funkci kožní bariéry. Skládá se z korneocytů, oploštělých mrtvých buněk vyplněných keratinem, a mezibuněčné lipidové matrix, která tvoří přibližně 20 % objemu SC. Vnitřní uspořádání SC je často přirovnáváno ke struktuře „cihel a malty“, přičemž korneocyty představují cihly a lipidová matrix tvoří maltu. Díky tomuto uspořádání je průnik látek přes kožní bariéru značně komplikovaný.¹ Lipidová matrix SC se svým složením značně odlišuje od složení buněčných membrán.² Je tvořena z přibližně ekvimolární směsi ceramidů, cholesterolu a volných mastných kyselin.³ V menší míře jsou zde zastoupeny estery cholesterolu, cholesterol sulfát a další látky.⁴

Ceramidy tvoří nejdůležitější a nejspecifičtější složku SC. Molekula ceramidu se skládá z polární hlavy a ze dvou dlouhých hydrofobních řetězců. V porovnání s fosfolipidy je polární hlava ceramidů výrazně menší, hydrofobní řetězce tvořené nasycenými mastnými kyselinami jsou velmi dlouhé a jednotlivé molekuly ceramidů jsou pospojovány vodíkovými vazbami. Díky těmto strukturním vlastnostem mohou být ceramidy těsněji uspořádány a ve SC vytváří několikvrstevné, vzájemně propletené lamelární struktury. Propustnost ceramidových lamel SC je řádově tisíckrát menší než propustnost fosfolipidových dvojvrstev.^{4,5,6}

2.2 Ceramidy a jejich strukturní typy

Ceramidy, neboli *N*-acylsfingosiny, jsou řazeny do skupiny sfingolipidů. Molekula ceramidu se skládá z bazického alkoholu – sfingosinu (S), 6-hydroxysfingosinu (H), fytosfingosinu (P) nebo dihydrosfingosinu (dS). Na primární aminoskupinu v poloze 2 je amidicky navázána nasycená mastná kyselina o délce 16 – 34 uhlíků. Nejčastěji se vyskytující mastná kyselina v ceramidech je kyselina lignocerová (C₂₄). Může být nesubstituovaná (N) nebo v poloze α (A) či ω (O) hydroxylovaná. Ceramidy obsahující mastnou kyselinu s ω -hydroxyskupinou jsou důležité pro soudržnost lamelárního uspořádání lipidové matrix. Ceramidy, u nichž je ω -hydroxyskupina mastné kyseliny esterifikována kyselinou linolovou (E), mají funkci molekulární spojky mezi jednotlivými

lamelami. Ceramidy s volnou ω -hydroxyskupinou se váží ke karboxylové skupině na vnějším povrchu korneocyty, díky čemuž vytváří vrstvu kovalentně vázaných lipidů.^{4,5,6}

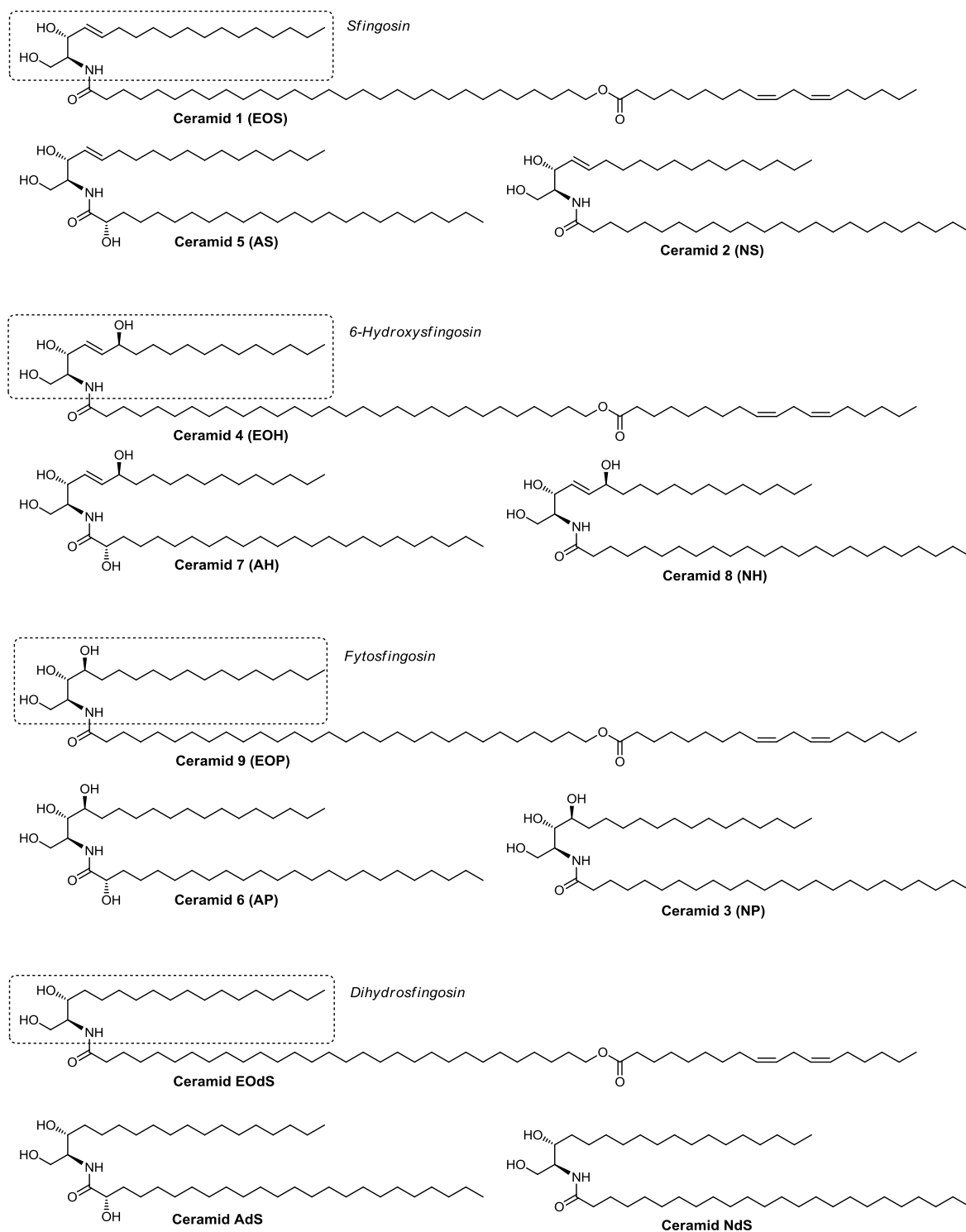
V současnosti je známo 12 strukturních typů ceramidů, ceramidy odvozené od dihydrosfingosinu byly objeveny v posledních letech.^{7,8} Starší označení přidělovalo jednotlivým ceramidům arabská čísla podle jejich separace při tenkovrstvé chromatografii (čím vyšší polarita, tím vyšší číslo). S postupným objevováním nových strukturních typů ceramidů bylo potřeba zavést nové, systematické názvosloví. V současnosti používaná nomenklatura dle Motty označuje jednotlivé ceramidy kombinací písmen podle jejich struktury. Písmena jsou uvedena v závorkách výše.^{1,9} (**Obr. 1**)

2.3 Deuterované lipidy

Získávání nových poznatků při studiu lipidů je často omežováno relativní jednoduchostí lipidové struktury. Řada technik je pro studium lipidů nevyhovujících či příliš náročných, a některé získané informace mohou být zavádějící (například využití radioaktivně nebo fluorescenčně značených prekurzorů). Specifické protilátky, které jsou velmi cenným nástrojem pro studium proteinů, jsou pro studium dynamiky lipidů buď nespolehlivé pro svoji citlivost, nebo nedostupné. Značná část výzkumu lipidů je proto závislá na využití značených lipidových analog. Výběr značení lipidů musí být velice pečlivý, protože velikost i intramolekulární lokalizace značky může výrazným způsobem ovlivnit vlastnosti lipidů. Čím více se značený analog podobá své přirozené předloze, tím větší je jeho přínos pro studium lipidů.¹⁰

Jedna z používaných technik využívá fluorescenčně značená lipidová analoga. Navázání fluoroforu více či méně ovlivňuje vlastnosti lipidů a může vést k nepřesným výsledkům. Z tohoto hlediska jsou nejvýhodnější tzv. polyenové lipidy, obsahující uhlovodíkový řetězec s pěti konjugovanými dvojnými vazbami, čímž jsou vlastnosti lipidů ovlivněny minimálně.^{10,11}

Strukturně nejpodobnější svým přirozeným předlohám jsou lipidy značené stabilními izotopy, především deuteriem. Jejich výhodou je, že si zachovávají chemické vlastnosti svých předloh.¹² Deuterované lipidy jsou využívány řadou metod, které studují strukturu a vlastnosti lipidových membrán. V této práci se budeme blíže věnovat neutronovému rozptylu, infračervené a Ramanově spektroskopii, ²H-NMR a ToF-SIMS.



Obř. 1. Chemická struktura a názvosloví ceramidů SC.

2.4 Metody využívající deuterované lipidy

2.4.1 Neutronový rozptyl

Neutronový rozptyl patří mezi nejvýznamnější metody, které dokážou charakterizovat strukturu a vlastnosti lipidových membrán SC. Jeho využití je jak v oblasti modelových lipidových membrán SC složených ze syntetických lipidů, tak i ve výzkumu nativní SC.

Principem neutronové difrakce je měření změny intenzity rozptylu neutronového paprsku o vlnové délce λ při jeho průchodu vzorkem. Zatímco rentgenové paprsky jsou rozptylovány na úrovni elektronového obalu atomu, neutronový svazek je rozptylován samotným jádrem.⁶ Základním údajem pro interpretaci dat naměřených metodikou neutronové difrakce je rozptylová délka neboli amplituda rozptylu neutronů (neutron scattering length).¹³ Ta je dána silou, kterou jednotlivé atomy rozptylují neutronový svazek.⁶

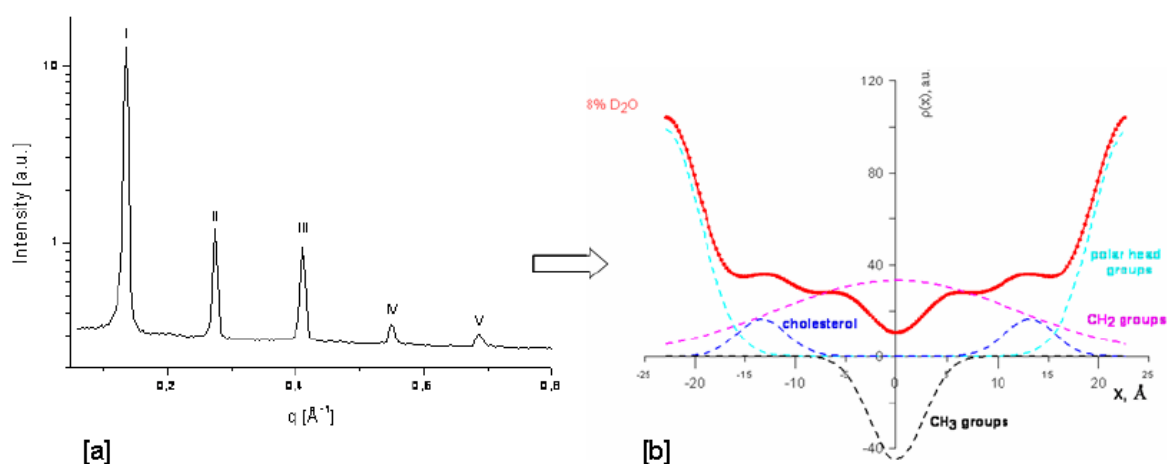
Pomocí neutronové difrakce lze velmi přesně stanovit polohy vodíkových atomů, přičemž rozptylové délky vodíku a deuteria jsou výrazně odlišné. Z toho vyplývá, že na rozdíl od rentgenových paprsků dokážou neutrony izotopy vodíku nejen poznat, ale také jednotlivé izotopy od sebe rozlišit.¹⁴ Značnou výhodou neutronové difrakce je tedy možnost značení deuteriem. Přítomné deuterium způsobí, že se molekula nebo její část stane „viditelná“ pro neutrony. Označení specifických částí lipidů deuteriem, např.: označení vybraných methylenových skupin, poskytuje přesné informace o umístění označeného vzorku v membráně.^{6,14}

Mezi dva hlavní parametry, které zkoumá neutronová difrakce, patří tloušťka dvojvrstvy a průměrná plocha obsazená lipidy na povrchu dvojvrstvy (tzv. membránová hustota). Existují dva přístupy, jak tyto parametry získat. První přístup je založen na rozptylu paprsků na mnohvrstevném vzorku, což mohou být ploché útvary nebo liposomy (MLVs). Pomocí Fourierovy transformace je z píků intenzit rozptylu určen profil hustoty rozptylových délek (neutron scattering length density profile). (**Obr. 2**) Druhý přístup využívá měření na unilamelárních liposomech (ULV) a funkce intenzity rozptylu je zde vyhodnocena jako rozptylový vektor q .⁶

Většina lipidových membrán je studována v částečně nebo plně hydratovaném stavu. Neutronový rozptyl na základě různých poměrů vodíku a deuteria ve vodě umožňuje získat

kontrastní rozdíly mezi lipidovou dvojvrstvou a vodou bez významných změn membránové struktury. Například v 8% vodné disperzi D_2O v H_2O je hustota rozptylových délek rozptylujícího média rovna nule a neutronový paprsek tak detekuje pouze rozptýlenou látku.¹⁴

Na druhou stranu mezi nevýhody neutronového rozptylu patří slabost neutronového paprsku, malá dostupnost zdroje neutronového záření a vysoká cena deuterovaných vzorků.^{6,14}



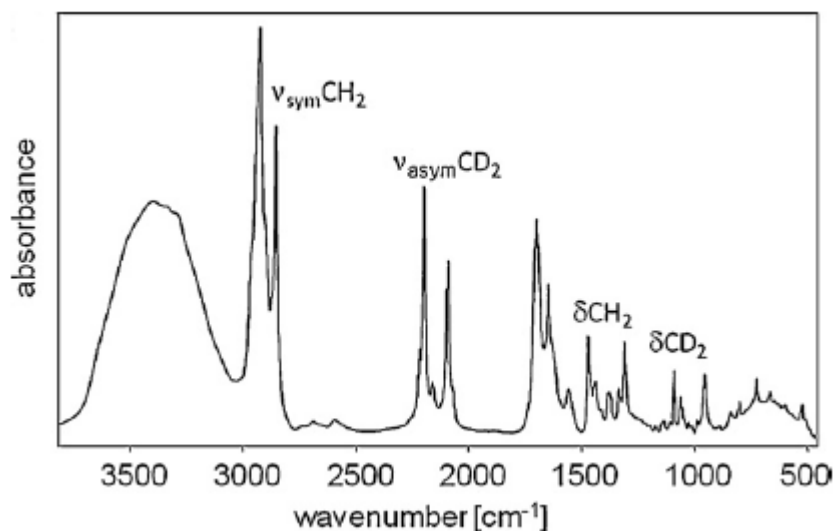
Obř. 2. (a) Příklad neutronového difraktogramu modelové membrány SC složené z ceramidu AP, cholesterolu, palmitové kyseliny a cholesterol sulfátu. Difraktogram zobrazuje pět difrakčních řádů, které byly detekovány. (b) Profil hustoty rozptylových délek (neutron scattering length density profile) stejného vzorku.⁶

2.4.2 Vibrační spektroskopie

Mezi vibrační spektroskopické metody využívané pro studium lipidů patří infračervená a Ramanova spektroskopie (obě jsou vyhodnocovány metodou Fourierovy transformace). Vibrační spektroskopické metody umožňují studovat dynamiku a uspořádání lipidů SC. Umožňují přímé měření konformačního (z hlediska *trans-gauche* konformerů) a laterálního uspořádání uhlovodíkových řetězců v lipidových membránách. Intermolekulární interakce studují jak na úrovni uhlovodíkových řetězců, tak i v oblasti polární „hlavy“ lipidů. Dále je těmito metodami možno rozpoznat fázový přechod.^{1,15} Ramanova spektroskopie je vhodnější pro studium hydratovaných vzorků z důvodu slabého rozptylu paprsku vodou. Díky tomu je, na rozdíl od infračervené spektroskopie, minimalizována interference výsledků způsobená molekulami vody.¹⁶

Nejintenzivnější vibrace v infračervených spektrech lipidů jsou odvozeny z methylenových (CH_2 ; CD_2 v případě deuterovaných řetězců) valenčních vibrací.¹⁵ Pokud je methylenový řetězec jedné složky lipidové směsi perdeuterovaný, valenční vibrace CD_2 se zobrazí v charakteristické oblasti spektra ($2080 - 2210 \text{ cm}^{-1}$), odděleně od ostatních složek. Vlastnosti deuterovaných molekul tak mohou být sledovány souběžně s ostatními molekulami ve stejném spektru.¹

Symetrické ($\nu_{\text{sym}}\text{CH}_2$ a $\nu_{\text{sym}}\text{CD}_2$) a asymetrické ($\nu_{\text{asym}}\text{CH}_2$ a $\nu_{\text{asym}}\text{CD}_2$) valenční vibrace methylenové skupiny poskytují informace o konformačním uspořádání řetězců.¹⁷ Přechod z plně natažených uhlovodíkových řetězců v *cik-cak* neboli *all-trans* konformaci do neuspořádaného stavu má za následek změnu frekvence symetrických a asymetrických valenčních vibrací methylenové skupiny. Nízká intenzita symetrických valenčních vibrací CH_2 a vysoká intenzita asymetrických valenčních vibrací CH_2 je charakteristická pro vysoký obsah *all-trans* konformerů. Posun symetrických valenčních vibrací CH_2 do oblasti vyšších vlnočtů znamená nárůst konformační neuspořádanosti.¹ Nůžkové (δCH_2 a δCD_2) a kyvadlové (ρCH_2 a ρCD_2) deformační vibrace methylenové skupiny charakterizují laterální uspořádání řetězců. Rozštěpení signálu těchto vibrací na dublet je typické pro krystalickou ortorombickou fázi, přičemž u hexagonální fáze je pozorován singlet.¹⁵ (**Obr. 3**)



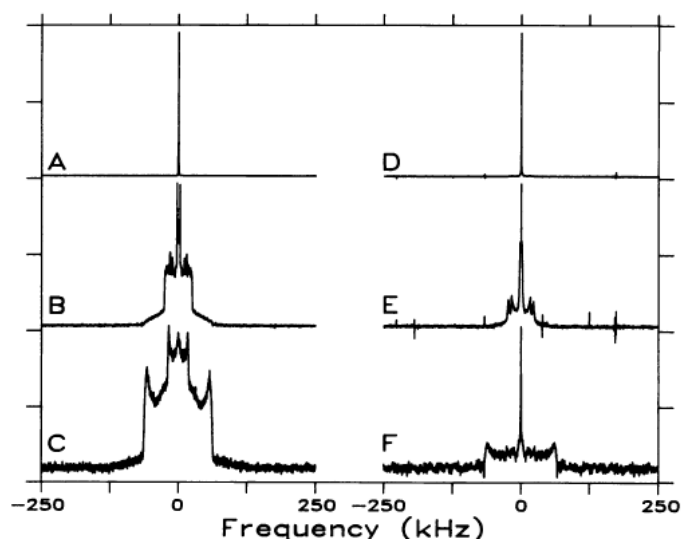
Obr. 3. Příklad FTIR spektra lipidového modelu SC složeného z ceramidu, cholesterolu a deuterované mastné kyseliny zobrazující důležité píky.¹⁷

2.4.3 Deuteriová nukleární magnetická rezonance ($^2\text{H-NMR}$)

$^2\text{H-NMR}$ je výkonná technika poskytující informace o struktuře a dynamice SC v pevném stavu. Je využívána ke zkoumání modelových membrán SC, především komplexních lipidových směsí. $^2\text{H-NMR}$ umožňuje studovat deuterované molekuly začleněné do modelové membrány SC nezávisle na ostatních složkách. Touto technikou je možno pozorovat pohyby jednotlivých značených molekul v membránových systémech, konkrétně je vhodná pro studium fázových přechodů lipidů v komplexních směsích.^{18,19}

Charakteristický útvar pozorovaný ve spektrech deuterovaných lipidů se nazývá Pakeův dublet. Pakeovy dublety tvoří nekomplikovaná spektra, ze kterých je frekvence štěpení (kvadrupolární štěpení, $\Delta\nu$) dubletu, vztahující se k jednotlivým deuteriím, snadno měřitelná. Rozsah kvadrupolárního štěpení je přímo vztážen k uspořádání CD vazeb a podává tak informaci o *trans-gauche* konformaci acylového řetězce. Kromě Pakeových dubletů se ve spektrech modelových membrán SC často nachází charakteristický rovný centrální pík. Tento pík odpovídá deuterovaným lipidům, které přešly do izotropní fáze. Poměr deuterovaných lipidů podstupujících izotropní přechod je roven ploše pod tímto píkem vydělené celkovou plochou spektra. V praxi je tento poměr získáván ze spektra metodou Fourierovy transformace.¹⁹

Teplotně závislá $^2\text{H-NMR}$ spektra dokáží zachytit fázové přechody lipidů modelových membrán SC při konkrétních teplotách. Teploty, při kterých k fázovým přechodům dochází jsou závislé na složení lipidů v membráně. Při teplotě T_m dochází k přechodu z více uspořádané krystalické fáze do fáze tekutých krystalů, ve které lipidy vykazují osově symetrické pohyby a větší konformační neuspořádanost uhlovodíkových řetězců. Při zvýšení teploty dochází k druhému fázovému přechodu, z fáze tekutých krystalů do fáze, kdy složky membrány vykazují vysoký stupeň izotropního pohybu.^{18,19} (**Obr. 4**)



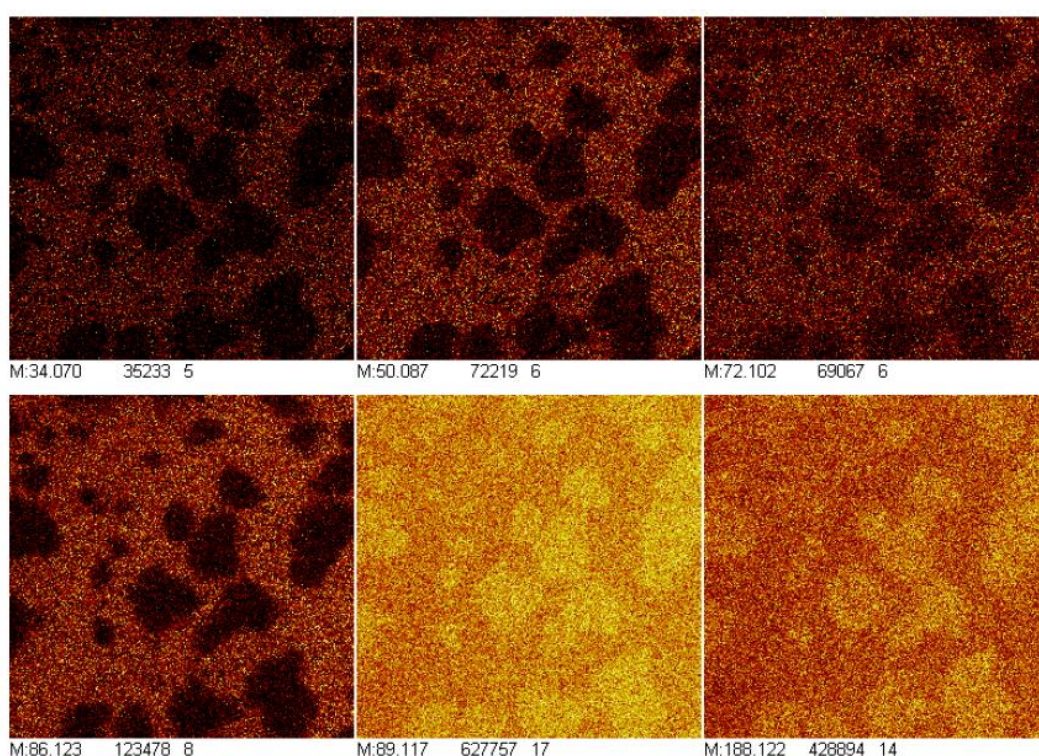
Obr. 4. Příklad teplotně závislého ^2H -NMR spektra modelové membrány SC složené z ceramidu, cholesterolu a deuterované palmitové kyseliny při 75 °C (A), 50 °C (B) a 20 °C (C) a modelové membrány SC složené z ceramidu, deuterovaného cholesterolu a palmitové kyseliny při 75 °C (D), 50 °C (E) a 25 °C (F). Bližší popis se vztahuje k modelové membráně obsahující deuterovanou kyselinu palmitovou (A-C). Při 20 °C je 80% palmitové kyseliny přítomno v pevné fázi, která je charakterizována širokým ^2H -NMR spektrem (C). Se zvyšující se teplotou přechází palmitová kyselina do fáze tekutých krystalů (B) a při 75 °C se veškerá palmitová kyselina nachází v izotropní fázi, ve spektru charakterizované rovným centrálním píkem (A).¹⁸

2.4.4 Hmotnostní spektrometrie ToF-SIMS

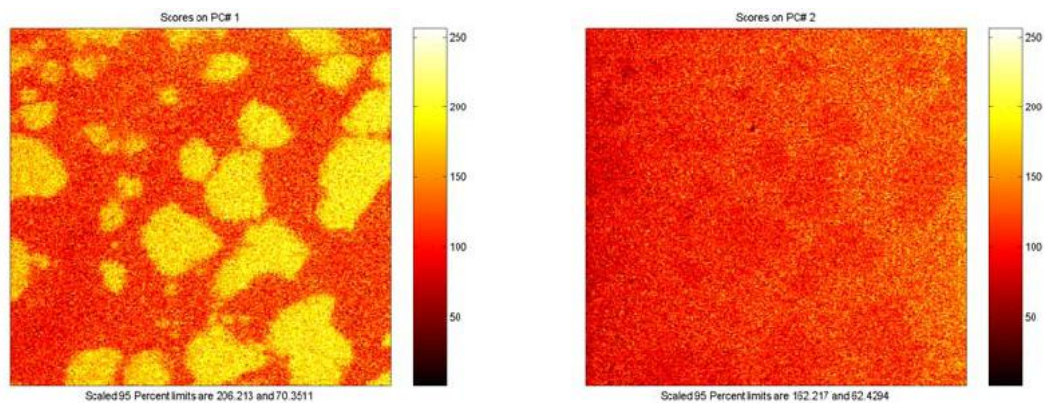
ToF-SIMS (Time of Flight Secondary Ion Mass Spektrometry) je vysoce citlivá hmotnostní spektrometrie. Principem této zobrazovací metody je bombardování vzorku ionty, na základě kterého jsou z monovrstvy emitovány sekundární ionty přítomných molekul a jejich fragmentů. Průletový analyzátor (ToF) je vhodný pro detekci sekundárních iontů díky vysokému hmotnostnímu rozlišení a schopnosti simultánní detekce iontů různých molekulových hmotností.²⁰ ToF-SIMS nachází uplatnění v analýze monovrstev komplexních lipidových směsí, které jsou modelem pro získání informací o vnitřním uspořádání lipidových membrán. ToF-SIMS je úspěšně využívána pro studium složení membránových domén v lipidových monovrstvách. Jedním z omezení využití ToF-SIMS pro analýzu komplexních lipidových směsí je skutečnost, že jednotlivé lipidy nebo jejich fragmenty mají velice podobnou molekulovou hmotnost. Proto jsou využívány částečně deuterované složky lipidových směsí, díky kterým je možno zcela přesně stanovit

daný lipid v konkrétní membránové doméně. Pro identifikaci multikomponentní směsi můžeme využít více lipidů, které mají deuteriem označené specifické části molekuly, a tím získáme pro každý lipid jedinečný hmotnostní ukazatel. **(Obr. 5)** V případě použití jednoho deuterovaného lipidu jako stopy získáme možnost jeho mapování ve vzorku.

Analýza hlavních komponent (PCA) je metoda, která vede k objasnění nesyntetizovatelných informací z ToF-SIMS zobrazení. Je využívána především pro složky obsažené v nízkých koncentracích, pro jejichž zobrazení je značení deuteriem nedostatečné. Výhodné je však tuto metodu využít i v případě vysokých koncentrací jednotlivých složek, protože zobrazení je kontrastnější a v lepším rozlišení.²¹ **(Obr. 6)**



Obr. 5. Příklad ToF-SIMS zobrazení pozitivních iontů lipidového filmu složeného z dipalmitoyl fosfatidyl tetradeuterocholinu (DPPC-d₄), palmitoyl oleoyl fosfatidyl cholinu (POPC) a perdeuteropalmitoyl oleoyl fosfatidyl glycerolu (POPG-d₃₁). Jednotlivá ToF-SIMS zobrazení vybraných iontů o dané molekulové hmotnosti ukazují distribuci těchto tří fosfolipidů. Molekulové hmotnosti 34 (C₂D₅) a 50 (C₃D₇) reprezentují POPG-d₃₁, molekulová hmotnost 72 (C₄H₁₀N) a 86 (C₅H₁₂N) přísluší POPC a molekulové hmotnosti 89 (C₅H₉D₃N) a 188 (C₅H₉D₄NPO₄H₂) představují DPPC-d₄.²¹



Obr. 6. ToF-SIMS zobrazení pozitivních iontů lipidového filmu složeného DPPC-d₄, POPC, POPG-d₃₁ porovnávající zobrazení pomocí metody PCA (vlevo) a zobrazení bez využití této metody (vpravo).²¹

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie a přístroje

Chemikálie byly pořízeny od firmy Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Německo) s výjimkou perdeuterovaného 1-bromtridekanu a deuterované lignocerové kyseliny, které byly zakoupeny od firmy C/D/N Isotopes (Pointe-Claire, Quebec, Canada).

Tenkovrstvá chromatografie byla prováděna na TLC deskách Silica gel 60 F₂₅₄ od firmy Merck (Darmstadt, Německo), pro detekci byla použita směs CeSO₄, H₃[P(Mo₃O₁₀)₄] a H₂SO₄. Připravené látky byly charakterizovány NMR spektroskopií (přístroj Varian VNMR S500, Palo Alto, USA, ¹H při 500 MHz a ¹³C při 125 MHz) a hmotnostní spektrometrií (LCQ Max advantage, Thermo Finnigan, San Jose, USA).

3.2 Syntéza

Syntéza vycházela z komerčně dostupného perdeuterovaného 1-bromalkanu (**1**), z kterého byl reakcí s lithium-acetylidem v komplexu s ethylendiaminem připraven příslušný deuterovaný terminální alkyň **2**. Následovala alkynylace Garnerova aldehydu (**3**) alkyňidem získaným z alkyňu **2** pomocí butyllithia v prostředí hexamethylfosforamidu (HMPA). Trojná vazba připraveného chráněného deuterovaného alkyňového analogu sfingosinu **4** byla redukována pomocí lithia v ethylaminu za vzniku chráněného deuterovaného analogu sfingosinu **5**. Hydrolýzou chránicích skupin 1M kyselinou chlorovodíkovou v dioxanu byl získán deuterovaný analog sfingosinu **6**. Posledním krokem syntézy byla acylace primární aminoskupiny sfingosinu deuterovanou kyselinou lignocerovou **7** pomocí 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidu (WSC) a 4-dimethylaminopyridinu (DMAP) za vzniku analogu ceramidu s deuterovaným sfingosinovým a acylovým řetězcem **8**.

Viz **Schéma 1**.

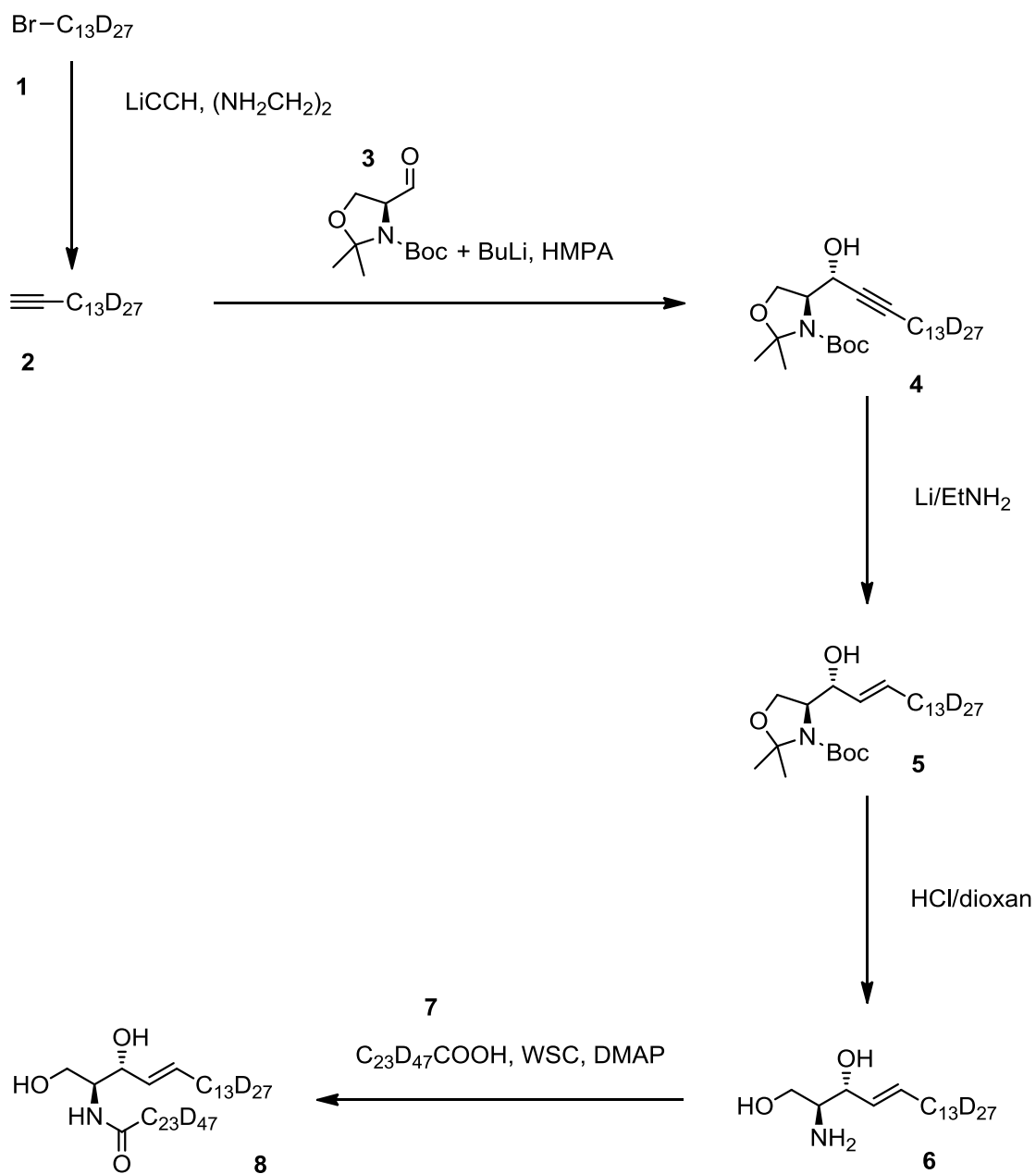
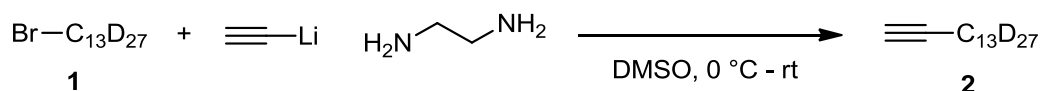


Schéma 1.

3.2.1 Příprava pentadec-1-ynu[C₃₋₁₅-d₂₇] (2)



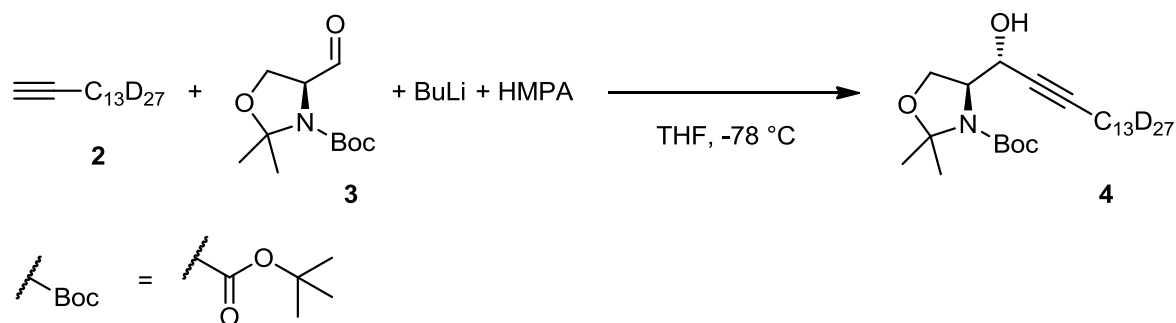
K lithium-acetylidu v komplexu s ethylendiaminem (206 mg, 2,24 mmol) byl za stálého míchání pod atmosférou dusíku přidán suchý dimethylsulfoxid (DMSO; 5 ml). Po ochlazení v ledu na 0 °C byl injekční stříkačkou pomalu přikapán perdeuterovaný 1-bromtridekan (**1**) (500 mg, 1,72 mmol). Poté bylo chlazení zastaveno. Po hodině míchání směsi za laboratorní teploty bylo provedeno TLC (mobilní fáze hexan) a bylo zjištěno, že ve směsi již není žádný nezreagovaný lithium-acetylid. Směs byla opět ochlazena v ledu na 0 °C a pomalu byla přikapávána destilovaná voda (1 ml) tak, aby nedošlo k zahřátí směsi na více jak 35 °C. Poté bylo přidáno větší množství destilované vody (přibližně 20 ml) a směs byla extrahována hexanem (3 x 20 ml). Organická fáze byla vysušena MgSO₄, zfiltrována a zahuštěna na vakuové odparce. Přechištěním sloupcovou chromatografií (mobilní fáze hexan) bylo získáno 208 mg čistého produktu **2**. Výtěžek reakce byl 51 %.

Reakce byla zopakována s dvojnásobným množstvím perdeuterovaného bromalkanu **1** (1000mg, 3,44 mmol) za stejných podmínek. Bylo získáno 460 mg čistého produktu **2**. Výtěžek reakce činil 57 %.

Pentadec-1-yn[C₃₋₁₅-d₂₇] (2)

Nažloutlá olejovitá kapalina, mol. hm. 235,55 g/mol. TLC: mobilní fáze hexan, R_f = 0,54 – 0,60. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 1,92 (s, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 84,8; 68,0.

3.2.2 Příprava (*S*)-*tert*-butyl-4-((*R*)-1-hydroxyhexadec-2-yn-1-yl[C₄₋₁₆-d₂₇])-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylátu (**4**)



Alkyn z první reakce **2** (208 mg, 0,88 mmol) byl rozpuštěn v suchém tetrahydrofuranu (THF; 10 ml) a směs byla za stálého míchání pod atmosférou dusíku ochlazena na -78 °C. Ke směsi byl injekční stříkačkou přikapán 1,6M roztok butyllithia v hexanu (0,53 ml, 0,84 mmol). Po jedné a půl hodině míchání při stálé teplotě -78 °C byl přidán Garnerův aldehyd (**3**) (224 mg, 0,97 mmol) rozpuštěný v suchém THF (10 ml) a HMPA (0,31 ml, 1,76 mmol). Po dalších dvou hodinách míchání reakční směsi při teplotě -78 °C bylo provedeno TLC (mobilní fáze hexan/EtOAc 4:1). Ve směsi se stále nacházel nezreagovaný alkyne **2**, Garnerův aldehyd (**3**), ale žádný produkt. Chlazení bylo vypnuto a směs reagovala přes noc při pozvolném zahřívání na laboratorní teplotu. Ráno bylo z TLC zřejmé, že v reakční směsi nedošlo k požadované reakci, nejspíš kvůli použití starého butyllithia. Reakce byla ukončena nasyceným roztokem NH₄Cl (10 ml) a přidána voda do rozpuštění. Následně byla směs extrahována diethyletherem (3 x 40 ml), organická fáze byla vysušena Na₂SO₄, přefiltrována a rozpouštědlo bylo odpařeno pod vakuem. Směs látek byla chromatograficky separována (mobilní fáze hexan/EtOAc 4:1) a izolovaný alkyne **2** (145 mg) byl použit znovu do reakce.

Reakce byla zopakována za stejných podmínek se 145 mg alkynu **2**, který byl izolován z předchozího pokusu. Reakce opět neproběhla, přestože bylo použito nové butyllithium. Čištěním bylo získáno 107 mg alkynu **2**, se kterým byla reakce opět zopakována.

Při dalším opakování reakce byl zachován postup, ale byly upraveny molární poměry jednotlivých složek. K alkynu **2** (107 mg, 0,45 mmol) bylo přidáno ekvimolární množství 1,6M roztoku butyllithia v hexanu (0,29 ml, 0,45 mmol) a Garnerova aldehydu (**3**) (104 mg, 0,45 mmol), molární poměr HMPA zůstal zachován jako v předchozích reakcích

(0,16 ml, 0,90 mmol). Po dvou hodinách reakce byl přidán ještě Garnerův aldehyd (**3**) (20 mg, 0,09 mmol) a směs se nechala reagovat do rána. Reakce proběhla. Po přečištění směsi sloupcovou chromatografií (mobilní fáze hexan/EtOAc 4:1) bylo získáno malé množství produktu **4** (přibližně 20 mg) a směsi produktu **4** s Garnerovým aldehydem (**3**) (přibližně 20 mg). Výtěžek byl v tomto případě velmi nízký, přibližně 10%.

Syntéza vycházející z 500 mg perdeuterovaného 1-bromtridekanu (**1**) byla v této fázi ukončena kvůli malému množství získaného chráněného deuterovaného alkynylového analogu sfingosinu **4**. Sled reakcí byl zahájen znovu, tentokrát z 1 g perdeuterovaného 1-bromtridekanu (**1**).

K další reakci byl použit alkyn **2** získaný z druhého pokusu syntézy (460 mg, 1,95 mmol). Reakce byla provedena stejným způsobem a při zachování molárních poměrů jako reakce předchozí, která poskytla požadovaný produkt. Chromatografické čištění poskytlo tři frakce. První frakce obsahovala 239 mg směsi nezreagovaného alkynu **2** a neznámé látky. Z druhé frakce bylo získáno 360 mg produktu **4**. Třetí frakce obsahovala směs produktu **4** a Garnerova aldehydu (**3**) (27 mg). Výtěžek této reakce činil 40%.

Reakce byla zopakována se směsí nezreagovaného alkynu **2** s příměsí neznámé látky (239 mg) při zachování molárních poměrů jednotlivých složek. Reakční podmínky byly upraveny a reakce probíhala při -50 °C. Směs byla chromatograficky přečištěna společně s produktem **4** a směsí Garnerova aldehydu (**3**) s produktem **4** z předchozí reakce. Byly získány čtyři frakce. Nezreagovaný pentadecyn **2** (104 mg), směs neznámých látek (60 mg) a produkt **4** (380 mg). V poslední frakci byla izolována směs produktu **4** s Garnerovým aldehydem (**3**) (112 mg), která byla následně chromatograficky přečištěna (mobilní fáze hexan/diethylether 4:1). Takto bylo izolováno 33 mg čistého produktu **4** a 24 mg Garnerova aldehydu.

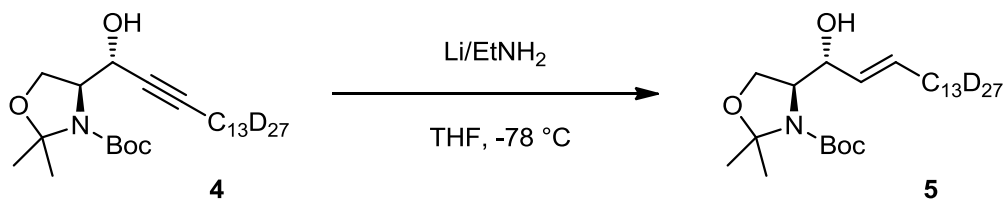
S nezreagovaným pentadecynem **2** (104 mg, 0,44 mmol) byla reakce opět zopakována. V tomto případě bylo použito ekvimolární množství HMPA (0,16 ml, 0,44 mmol). Postup reakce byl stejný, byly dodrženy reakční podmínky jako v prvním případě (-78 °C). Bylo získáno zanedbatelné množství produktu (přibližně 10 mg).

Celkový výtěžek této třikrát opakované reakce byl 46 %.

(S)-terc-butyl-4-((R)-1-hydroxyhexadec-2-yn-1-yl[C₄₋₁₆-d₂₇])-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylát (4)

Nažloutlá olejovitá kapalina, mol. hm. 464,82 g/mol. TLC: mobilní fáze hexan/EtOAc 4:1, $R_f = 0,60 - 0,63$; mobilní fáze hexan/EtOAc 6:1, $R_f = 0,26 - 0,28$. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 4,80 – 4,57 (m, 1H), 4,50 (s, 1H), 4,15 – 4,04 (m, 2H), 3,95 – 3,88 (m, 1H), 1,58 (s, 3H), 1,50 (s, 3H), 1,49 (s, 9H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 153,9; 95,0; 86,6; 81,2; 77,8; 65,1; 64,2; 62,8; 28,4; 25,7; 25,4.

3.2.3 Příprava (*S*)-*tert*-butyl-4-((*R*)-1-hydroxyhexadec-2-en-1-yl[C₄₋₁₆-d₂₇])-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylátu (**5**)



Lithium (0,61 mg, 8,9 mmol) bylo nakrájeno na malé kousky, očištěno postupně v methanolu, diethyletheru a hexanu a přidáno do baňky s ethylaminem (20 ml). Směs byla vychlazená na $-78\text{ }^\circ\text{C}$ a pod atmosférou dusíku míchána po dobu tří hodin. Nejprve se roztok zbarvil sytě modře, po třech hodinách měl hnědomodrou barvu. Alkyn **4** (415 mg, 8,90 mmol) rozpuštěný v THF (20 ml) byl pomalu přikapán k roztoku a tato směs se nechala reagovat při teplotě $-78\text{ }^\circ\text{C}$. Průběh reakce byl sledován na TLC (mobilní fáze hexan/EtOAc 6:1; R_f (alkyn **4**) = 0,26 – 0,28, R_f (produkt **5**) = 0,20 – 0,23). Po třech hodinách stále nezreagoval veškerý alkyn, chlazení bylo vypnuto a reakční směs se nechala reagovat přes noc. Ráno se ve směsi stále nacházel nezreagovaný alkyn **4** a na TLC se objevila nová skvrna na startu. Pomocí standardu sfingosinu bylo ověřeno na TLC (mobilní fáze butanol/kyselina octová/voda 4:1:1; R_f (sfingosin **6**) = 0,71 – 0,77), že se jedná o čistý analog sfingosinu **6** (v reakční směsi došlo k odstranění chránicích skupin alkenu **5**). Směs byla opět vychlazená na $-78\text{ }^\circ\text{C}$ a přidáno další lithium rozpuštěné v ethylaminu. Ani po dalších dvou hodinách však zbylý alkyn **4** nezreagoval. Reakce byla ukončena přidáním nasyceného roztoku NH_4Cl (1 ml). Ethylamin byl ze směsi odstraněn proudem dusíku a na vakuové odparce. Směs byla extrahována mezi vodou (20 ml) a diethyletherem (3 x 30 ml). Z obou fází bylo provedeno TLC pro kontrolu, zda žádaný produkt nezůstal ve vodné fázi. Organická fáze byla vysušena Na_2SO_4 , zfiltrována a rozpouštědlo odpařeno za sníženého tlaku. Směs byla chromatograficky přečištěna na silikagelu (mobilní fáze hexan/diethylether 4:1). V první frakci se nacházel nezreagovaný alkyn **4** (245 mg), v druhé frakci směs alkynu **4** i alkenu **5** (25 mg), třetí frakcí bylo získáno 60 mg požadovaného alkenu **5**. Poté byla mobilní fáze změněna na čistý diethylether a postupně byl přidáván methanol. Takto byla získána čtvrtá frakce, která obsahovala 30 mg čistého analogu sfingosinu **6**.

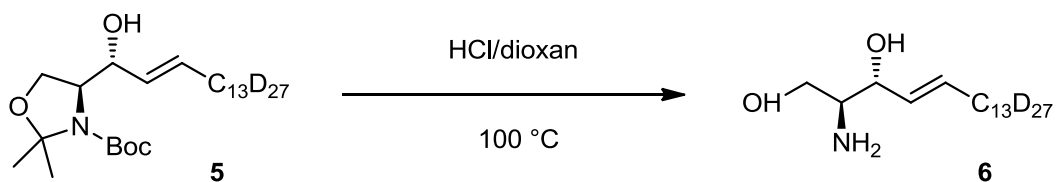
Reakce byla zopakována s 80 mg lithia. Za stejných podmínek byla směs míchána po dobu tří hodin. Po první hodině se roztok zbarvil sytě modře, v průběhu dalších dvou hodin se postupně zbarvoval do hněda. Po předchozí zkušenosti se v reakci nepokračovalo.

Při dalším pokusu bylo použito stejné množství lithia (80 mg, 5,8 mmol) za stejných podmínek. Tentokrát se však roztok lithia nenechal míchat po dobu tří hodin, ale v reakci se pokračovalo ihned po rozpuštění lithia (přibližně 1 hodina, indikováno sytě modrým zbarvením). Alkyn **4** a směs alkynu **4** s alkenem **5** (270 mg, 0,58 mmol) byly rozpuštěny v THF (10 ml) a přikapány k roztoku. Po dvou hodinách zreagoval veškerý alkyn **4**. Surový produkt z této reakce byl použit rovnou do následující reakce.

(S)-*tert*-butyl-4-((R)-1-hydroxyhexadec-2-en-1-yl[C₄₋₁₆-d₂₇])-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylátu (5)

Nažloutlá olejovitá kapalina, mol. hm. 466,84 g/mol. TLC: mobilní fáze hexan/EtOAc 6:1, $R_f = 0,20 - 0,23$.

3.2.4 Příprava (2*S*,3*R*,4*E*)-2-aminooktadec-4-en-1,3-diolu[C_{6-18-d}₂₇] (6)



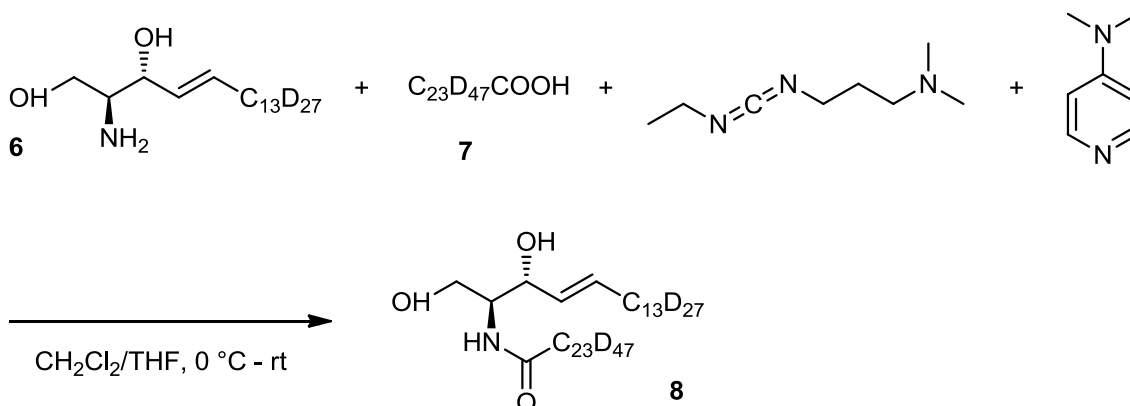
Chráněný alken **5** (60 mg) a surový produkt z předchozí reakce byly rozpuštěny ve směsi dioxanu a 1M HCl (1:1) a jednu hodinu zahřívány k varu pod atmosférou dusíku. Vznikající analog sfingosinu **6** byl detekován pomocí TLC (mobilní fáze butanol/kyselina octová/voda 4:1:1). Reakční směs byla zahuštěna na polovinu obsahu na vakuové odparce a extrahována směsí diethyletheru a hexanu (1:1; 4 x 20 ml). Vodná fáze byla zalkalizována ledovým 1M NaOH na pH 10 a extrahována dichlormethanem (3 x 40 ml). Organická fáze byla promyta nasyceným roztokem KBr (20 ml), vysušena Na₂SO₄, přefiltrována a rozpouštědlo odstraněno na vakuové odparce. Produkt **6** (118 mg) byl takto získán v dostatečné čistotě pro další reakci.

Celkový výtěžek reakcí 3.2.3 a 3.2.4 byl 41 %.

(2*S*,3*R*,4*E*)-2-aminooktadec-4-en-1,3-diol[C_{6-18-d}₂₇] (6)

Nažloutlá krystalická látka, mol. hm. 326,66 g/mol. TLC: mobilní fáze butanol/kyselina octová/voda 4:1:1, $R_f = 0,71 - 0,77$. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5,74 (d, $J = 15,2$ Hz, 1H), 5,45 (dd, $J = 15,2; 6,8$ Hz, 1H), 4,13 – 4,04 (m, 1H), 3,76 – 3,56 (m, 2H), 3,20 – 2,74 (s, 5H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 134,6; 128,9; 71,1; 64,0; 55,9. $m/z = 345,7$ (100%) [M + H⁺ + H₂O]; 309,7 (35%) [M + H⁺ - H₂O].

3.2.5 Příprava N-((2*S*,3*R*,4*E*)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl)[C_{6-18-d}₂₇]) tetrakosanamidu[C_{2'-24'-d}₄₇] (**8**)



Část získaného deuterovaného analogu sfingosinu **6** (70 mg, 0,22 mmol) byla rozpuštěna v suchém dichlormethanu (5 ml) a přidán 4-dimethylaminopyridin (DMAP; 2,7 mg, 0,02 mmol). Deuterovaná kyselina lignocerová (**7**) (91 mg, 0,22 mmol) byla rozpuštěna ve směsi suchého dichlormethanu a THF (1:1; 10 ml), přidána k roztoku sfingosinu **6** a reakční směs byla podchlazena v ledu na 0 °C. Poté byl přidán WSC (39 µl, 0,22 mmol). Průběh reakce byl sledován na TLC (mobilní fáze chloroform/methanol 10:1). Po třech dnech byla reakce ukončena a směs extrahována mezi vodou (20 ml) a dichlormethanem (2 x 20 ml). Organická fáze byla vysušena Na₂SO₄, přefiltrována a zahuštěna pod vakuem. Směs byla chromatograficky přečištěna na silikagelu (mobilní fáze chloroform, postupně přidáván methanol), ale nepodařilo se izolovat čistý produkt.

Při dalším chromatografickém čištění byl produkt nejprve úplně rozpuštěn v chloroformu, bylo přidáno trojnásobné množství silikagelu (150 mg) a chloroform byl následně odpařen na vakuové odparce. Adsorbovaný produkt na silikagelu byl poté aplikován na chromatografickou kolonu (mobilní fáze chloroform/methanol 100:1). Opět se nepodařilo získat čistý produkt.

U následujícího chromatografického čištění byl produkt nanesen na silikagel stejným způsobem jako v předchozím případě. Byla zvolena mobilní fáze chloroform/methanol/kyselina octová 390:9:1,5. Byly získány dvě frakce, přičemž v první frakci se objevila nová skvrna neznámé látky. Obě frakce byly poslány na NMR, ale spektrum bylo velmi nekvalitní a nebylo jej možné vyhodnotit.

K dalšímu čištění byla použita preparativní deska Uniplate (silikagel G 20 × 20 cm, 2 mm vrstva, Analtech, Newark, USA), na kterou byl nanesen veškerý surový produkt. Deska byla vyvíjena v mobilní fázi chloroform/methanol/kyselina octová 190:9:1,5. K detekci byl použit 0,1% roztok dichlorfluoresceinu v ethanolu a UV lampa. Z preparativní desky byly získány čtyři frakce. Silikagel byl odstraněn extrakcí ve směsi chloroformu a methanolu 2:1, následným přefiltrováním přes fritu a propláchnutím ethanolem. Fluorescein byl vyextrahován do 0,5M NaOH. Organická fáze byla poté extrahována vodou a odpařena na vakuové odparce. Z jednotlivých frakcí bylo provedeno TLC (mobilní fáze chloroform/methanol 10:1). Druhá frakce, která na TLC spektru vykazovala homogenitu, byla zaslána na NMR, které ukázalo přítomnost další látky, zřejmě izomeru.

Acylace byla provedena stejným způsobem se zbývajícím deuterovaným analogem sfingosinu **6** (48 mg, 0,15 mmol). Po třech dnech byla reakce ukončena a směs tentokrát extrahována mezi okyselenou vodou (0,01M HCl; 20 ml) a dichlormethanem (2 x 20 ml). Organická fáze byla následně extrahována vodou (2 x 20 ml). Směs byla chromatograficky přečištěna (mobilní fáze chloroform/methanol 100:1, postupně přidáván methanol). Byly izolovány 3 frakce. První frakce byla směsí látek, druhá frakce se zdála být podle TLC čistá a v třetí frakci bylo izolováno nepatrné množství nezreagovaného sfingosinu **6**. První dvě frakce byly porovnány na TLC (mobilní fáze chloroform/methanol 10:1) se standardem ceramidu NS acylovaného kyselinou lignocerovou a standardem ceramidu NS acylovaného deuterovanou kyselinou lignocerovou. Bylo zjištěno, že retenční faktor (R_f) těchto frakcí se neshoduje s R_f standardů.

Porovnáním R_f všech dosud získaných frakcí s výše zmíněnými standardy bylo vytipováno, že požadovaný deuterovaný ceramid **8** by se mohl nacházet v prvních dvou frakcích (frakce 1, 2) získaných frakcionací na preparativní desce. Nejprve byla chromatograficky přečištěna frakce 2 (mobilní fáze chloroform/EtOAc 10:1, postupně měněn poměr na 1:1, nakonec promytí methanolem). Opět se nepodařilo získat čistý produkt. Chromatografické přečištění bylo provedeno znovu, ale s jinou mobilní fází (chloroform/methanol 100:1). Byla získána čistá frakce (přibližně 1 mg). Frakce 1 byla chromatograficky přečištěna (mobilní fáze chloroform/EtOAc 10:1, poměr postupně měněn na 5:1), následně dočištěna stejným způsobem a izolována čistá frakce (přibližně 1 mg). Oba získané produkty byly spojeny a zaslány na NMR, které ukázalo, že produkt

stále není zcela čistý. Vzhledem k charakteru NMR spektra (viz níže; signály, které nepatří požadované látce, jsou podtrženy) a tomu, že hmotnostní spektra byla v souladu se strukturou produktu **8**, je příměs zřejmě jeho izomerem.

**N-((2*S*,3*R*,4*E*)-1,3-dihydroxyoktadec-4-en-2-yl)[C₆₋₁₈-d₂₇])tetrakosanamid[C_{2'-24'}-d₄₇]
(**8**)**

Nažloutlá krystalická látka, mol. hm. 724,57 g/mol. TLC: mobilní fáze chloroform/metanol 10:1, $R_f = 0,33 - 0,37$. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃/MeOH 2:1) δ 5,67 (d, $J = 15,4$ Hz, 1H, H-5), 5,42 (dd, $J = 15,4; 7,0$ Hz, 0,6H, H-4), 5,38 (dd, $J = 15,4; 6,1$ Hz, 0,4H, H-4), 4,28 (dd, $J = 6,1; 3,3$ Hz, 0,4H, H-3), 4,08 (t, $J = 6,7$ Hz, 0,6H, H-3), 3,80 (td, $J = 5,1; 3,8$ Hz, 1H, H-2), 3,75 (dd, $J = 11,2; 4,8$ Hz, 1H, H-1), 3,60 (dd, $J = 11,0; 4,5$ Hz, 1H, H-1'). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃/MeOH 2:1) δ 174,3; 133,6; 128,7; 128,5; 72,7; 70,5; 61,5; 61,1; 54,6. $m/z = 707,4$ (100%) [M + H⁺ - H₂O]; 743,4 (35%) [M + H₂O].

4 Výsledky a diskuze

Literatura uvádí celou řadu syntetických přístupů, které lze využít pro přípravu ceramidů a jejich analogů. Syntéza ceramidu s deuterovaným řetězcem sfingosinu dosud v literatuře popsána nebyla. Proto tato práce vycházela z metodik běžně využívaných pro přípravu analogů ceramidů. Základem syntéz je příprava sfingoidní báze a její N-acylace pomocí p-nitrofenylesterů, anhydridů, acylhalogenidů, sukcinimidylesterů či karbodiimidu.³ Roku 1988 Garner a kol. popsal syntézu sfingosinu vycházející z chirální sloučeniny L-serinu, jejíž hlavním krokem je alkynylace Garnerova aldehydu vedoucí k žádanému 2*S*,3*R* produktu.²² Téhož roku Herold ve své práci uvedl využití HMPA, který zvyšuje *anti*-selektivitu této reakce a vede k vyšším výtěžkům 2*S*,3*R* sfingosinu.^{23,24} Tato syntéza vede k uspokojivým výsledkům a s obměnami je stále hojně využívána. Proto se z ní vycházelo i v případě syntézy deuterovaného analogu ceramidu. Základem syntézy je alkynylace Garnerova aldehydu. Následně je trojná vazba alkynylového analogu sfingosinu redukována na *trans*-dvojnou, odstraněny chránicí skupiny a acylována primární aminoskupina. Reakce je možné provést i v opačném pořadí, tzn. trojnou vazbu redukovat až v posledním kroku. V našem případě bylo vhodné zvolit první postup, protože jsme chtěli připravit ceramidy s různou délkou acylových řetězců.

Na začátku práce bylo třeba zvolit vhodnou výchozí látku, která by snadno poskytla deuterovaný řetězec do molekuly sfingosinu. Byl použit komerčně dostupný perdeuterovaný 1-bromtridekan (**1**), který reagoval nukleofilní substitucí s lithium-acetylidem v komplexu s diethylaminem v prostředí DMSO. Touto reakcí jsme získali důležitý produkt pentadec-1-yn s deuterovaným řetězcem (**2**). Reakce probíhala za podmínek popsaných v literatuře s výtěžkem 51 % a 57 %, přestože literatura uvádí výtěžek podstatně vyšší (91 %).²⁵ Jiný zdroj popisuje reakci s nedeuterovaným bromalkanem s dosažením 100% výtěžku při použití 2 ekvivalentů lithium-acetylidu v diethylaminu a průběhu reakce po dobu 12-ti hodin při laboratorní teplotě.²⁶ Struktura deuterovaného pentadecynu **2** byla ověřena NMR, přičemž poloha píku jediného vodíkového atomu odpovídala údajům uvedeným v literatuře.^{25,26}

Problematickým krokem syntézy byla výše zmiňovaná reakce deuterovaného alkynu **2** s Garnerovým aldehydem (**3**), přestože literatura tuto reakci s nedeuterovanými sloučeninami popisuje jako bezproblémovou s dobrými výtěžky (Novotný uvádí 76 %,

Masuda a Mori 81 %, Overmeire 84 %).^{23,27,28} Reakce byla opakována celkem šestkrát, přičemž byly upravovány molární poměry a reakční podmínky. Nejprve reakce probíhala při -78 °C, v souladu s literaturou.^{23,27,28} V prvním a druhém případě nedošlo k požadované reakci, v prvním případě to bylo vysvětlováno špatnou kvalitou použitého butyllithia, v druhém případě z neznámého důvodu. Proto při třetím pokusu byly upraveny molární poměry výchozích látek. Bylo použito ekvimolární množství deuterovaného alkynu **2**, Garnerova aldehydu (**3**) a butyllithia za přítomnosti dvojnásobného molárního množství HMPA. Tato reakce poskytla požadovaný produkt **4**, avšak s velice nízkým výtěžkem (přibližně 10%). Reakce byla za stejných podmínek opět zopakována s větším množstvím alkynu **2**, tentokrát s výtěžkem 40 %. Nezareagovaný alkyne **2** byl využit k zopakování reakce za změněných reakčních podmínek, kdy teplota reakční směsi byla zvýšena na -50 °C. Literatura tuto reakci popisuje pouze při -78 °C, vyšší teplotu uvádí literatura pouze tehdy, kdy nebylo použito HMPA pro zvýšení stereoselektivity.^{29,30} Za těchto podmínek reakce téměř neproběhla, stejně jako v následujícím případě, kdy byla zachována teplota -78 °C, ale použito ekvimolární množství HMPA. Tento molární poměr HMPA není v literatuře uveden, Novotný a Overmeire používá 1,5 ekvivalentu HMPA, Masuda a Mori 2 ekvivalenty HMPA.^{23,27,28}

V následující reakci byla redukována trojná vazba v molekule chráněného deuterovaného alkynového analogu sfingosinu **4** na *trans*-dvojnou. Jako redukční činidlo bylo použito lithium v ethylaminu. Důležitým bodem této reakce je vznik tmavomodrého zbarvení roztoku lithia v ethylaminu, které indikuje přítomnost „volných“ elektronů z kovového lithia. Při prvním provedení reakce byl dodržen postup uvedený v literatuře, tzn. lithium bylo aktivováno omytím v methanolu, diethyletheru a hexanu a následně rozpouštěno v ethylaminu po dobu tří hodin při teplotě -78 °C.²³ Stejnou reakční teplotu uvádí i další zdroje.^{22,27} Lithium se rozpustilo na tmavomodrý roztok již po hodině, po třech hodinách míchání byla barva roztoku spíše hnědomodrá, přesto byl přidán roztok chráněného deuterovaného alkynového analogu sfingosinu **4** v THF. Zredukováno bylo pouze malé množství výchozí látky **4** a to i přesto, že bylo ke směsi přidáno další množství roztoku lithia v ethylaminu. V následujícím pokusu došlo opět po tříhodinovém rozpouštění lithia v ethylaminu ke změně zbarvení z tmavomodrého na hnědomodré, po předchozí zkušenosti se v reakci nepokračovalo. Při třetím pokusu byl roztok alkynového analogu sfingosinu **4** v THF přidán ihned, jakmile se roztok lithia zbarvil

tmavomodře (po 1 hodině). Reakce proběhla bez problémů, produktem byl jak chráněný deuterovaný analog sfingosinu **5**, tak i samotný deuterovaný analog sfingosinu **6**. Tento jev je popsán v literatuře, lithium vytváří silně redukční prostředí, proto dochází i k částečnému odstranění chránicích skupin sfingosinu.²² Podle jiných zdrojů lze redukci provést s vysokými výtěžky pomocí LiAlH₄ v THF za laboratorní teploty.³¹

Reakční směs byla použita bez přečištění do další reakce, kde došlo k odstranění chránicích skupin směsí dioxanu a 1M HCl. Reakce probíhala za varu po dobu jedné hodiny.²³ Deprotekci lze provést také za laboratorní teploty použitím trifluoroctové kyseliny v dichlormethanu a vodě.³¹ Produkt **6** nebyl přečištěn sloupcovou chromatografií, po extrakci se jevil na TLC jako jedna skvrna, jak v mobilní fázi butanol/kyselina octová/voda 4:1:1, tak i s použitím mobilní fáze hexan/EtOAc 6:1. Struktura produktu **6** a jeho homogenita byla ověřena pomocí NMR a hmotnostní spektrometrie. ¹H-NMR spektrum se shodovalo se spektry uvedenými v literatuře s výjimkou nezobrazení uhlovodíkového řetězce, který je v našem případě deuterovaný.^{22,28} Deuterovaný analog sfingosinu **6** byl získán v 41% výtěžku z obou reakcí, což přibližně odpovídá výtěžku uvedenému v literatuře (Novotný uvádí 43% výtěžek z obou reakcí).²³

K acylaci primární aminoskupiny deuterovaného analogu sfingosinu **6** byla vybrána kyselina lignocerová s deuterovaným řetězcem **7** za předpokladu získání deuterovaného analogu ceramidu NS **8**, který je fyziologicky nejčastěji se vyskytujícím ceramidem v lidské kůži.²³ Z konvenčních metod acylace byla vybrána acylace pomocí karbodiimidu za přítomnosti DMAP. Tato metoda poskytuje selektivní *N*-acylaci v přítomnosti aminoskupiny společně s volnými hydroxylovými skupinami.³² Reakce proběhla za podmínek uvedených v literatuře.²³ Produktem byla špatně dělitelná směs, čistý produkt se nepodařilo získat ani opakovanými separačními pokusy. Přítomnost požadovaného ceramidu **8** byla ověřena na TLC porovnáním *R_f* produktu s *R_f* standardů (ceramidu NS acylovaného kyselinou lignocerovou a standardu ceramidu NS acylovaného deuterovanou kyselinou lignocerovou), hmotnostní spektrometrií a NMR spektroskopií. Charakteristické signály ¹H-NMR spektra se shodovaly s údaji uvedenými v literatuře;²³ spektrum však obsahovalo dva různé signály odpovídající vodíku na C4 [δ 5,42 (dd, *J* = 15,4; 7,0 Hz, 0,6H, H-4) a 5,38 (dd, *J* = 15,4; 6,1 Hz, 0,4H, H-4)] a dva signály odpovídající vodíku na C3 [δ 4,28 (dd, *J* = 6,1; 3,3 Hz, 0,4H, H-3)] a 4,08 (t, *J* = 6,7 Hz, 0,6H, H-3)]. Z informací získaných z charakteru NMR spektra a z hmotnostního spektra, které odpovídalo produktu,

můžeme usuzovat, že nečistotou je zřejmě izomer žádaného ceramidu, pravděpodobně (2*S*, 3*S*, 4*E*) izomer. Při druhém pokusu reakce byla získána látka, která dle TLC neodpovídala požadovanému ceramidu, její struktura však nebyla blíže charakterizována. Při chromatografickém čištění byly vyzkoušeny různé mobilní fáze, nejlepších výsledků bylo dosaženo mobilní fází chloroform/EtOAc 10:1 s postupným snižováním poměru složek na 1:1, kdy docházelo k pomalé separaci. Vhodnou mobilní fází je také chloroform/methanol 100:1. Dále byla vyzkoušena mobilní fáze chloroform/methanol/kyselina octová 190:9:1,5. Tato mobilní fáze byla speciálně vyvinuta pro analýzu ceramidů metodou HPTLC.³³ V našem případě byla použita při separaci na preparativní desce a také k chromatografickému čištění po naředění chloroformem v poměru 1:1, kde však nevykazovala lepší separační vlastnosti než dříve zmiňované mobilní fáze. Separační pokusy byly ukončeny ve chvíli, kdy se množství produktu snížilo natolik, že s ním již nebylo možné dále pracovat (cca 2 mg). Z opakovaných chromatografií se zdá, že příčinou znečištění produktu by mohla být izomerizace na silikagelu.

5 Závěr

Cílem práce byla syntéza ceramidů s deuterovaným řetězcem sfingosinu, které by bylo možno dále využít ke studiu jejich vlastností a chování ve *stratum corneum*. Byl zvolen jeden ze syntetických přístupů běžně využívaných pro syntézu nedeuterovaných analogů ceramidů.

Syntézou se podařilo připravit a charakterizovat deuterovaný sfingosin, jeho acylací jsme získali ceramid s deuterovaným sfingosinovým i acylovým řetězcem. Bohužel se nám nepodařilo tento konečný produkt izolovat ve zcela čisté formě; přestože hmotnostní spektrometrie strukturu potvrdila, NMR spektra stále vykazovala přítomnost nečistoty, zřejmě izomeru. Za hlavní problémy, které se vyskytly během syntézy, považujeme nízké výtěžky jednotlivých reakcí a především nedělitelnost reakční směsi s konečným produktem.

Pro další práci navrhujeme úpravy v jednotlivých krocích syntézy, které by mohly zvýšit výtěžnost reakcí. V první reakci použít větší molární množství (2 ekvivalenty) lithium-acetylidu a prodloužit dobu reakce, aby deuterovaný bromalkan zcela zreagoval. V druhém kroku zvýšit molární poměry Garnerova aldehydu a butyllithia a zachovat reakční teplotu $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ po celou dobu reakce (tzn. nenechat reagovat přes noc za postupného zvyšování teploty na laboratorní teplotu). Redukci podstoupit pouze v případě, že se nám podaří získat aktivovaný roztok lithia (ihned po vzniku tmavomodrého zbarvení).

Ceramidy značené deuteriem by bylo možné v budoucnu využít k získání cenných informací o tom, jakým způsobem se exogenně podané ceramidy začleňují do *stratum corneum* a jak dokáží regenerovat poškozenou kožní bariéru.

6 Seznam použitých zkratek

Boc	<i>tert</i> -butyloxykarbonyl
DMAP	dimethylaminopyridin
DMSO	dimethylsulfoxid
HMPA	hexamethylfosforamid
HPTLC	vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie
NMR	nukleární magnetická rezonance
R_f	retenční faktor
SC	stratum corneum
THF	tetrahydrofuran
TLC	tenkovrstvá chromatografie
WSC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid

7 Literatura

- ¹ Wartewig, S.; Neubert, R.H.H. Properties of Ceramides and Their Impact on the Stratum Corneum Structure: A Review (Part 1: Ceramides). *Skin Pharmacol. Physiol.*, **2007**, *20*, 220-229.
- ² Choi, M. J.; Maibach, H. I. Role of Ceramides in Barrier Function of Healthy and Diseased Skin. *Am. J. Clin. Dermatol.*, **2005**, *6* (4), 215-223.
- ³ Novotný, J.; Hrabálek, A.; Vávrová, K. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Skin Ceramides. *Curr. Med. Chem.*, **2010**, *17*, 2301-2324.
- ⁴ Vávrová, K.; Hrabálek, A. Role ceramidů v kůži. *Prakt. Lékáren.*, **2006**, *2*, 55-58.
- ⁵ Hrabálek, A.; Vávrová, K. Lze překonat kožní bariéru? *Prakt. Lékáren.*, **2005**, *1*, 8-11.
- ⁶ Zbytovská, J.; Vávrová, K. Neutron Scattering in Skin Research. Neutron Scattering Methods and Studies, Lyons MJ, ed. Nova Science Pub, **2011**, ISBN-10: 1611225213, 89-110.
- ⁷ 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.
- ⁸ van Smeden, J.; Hoppel, L.; van der Heijden, R.; Hankemeier, T.; Vreeken, R. J.; Bouwstra, J. A. LC/MS analysis of stratum corneum lipids: ceramide profiling and discovery. *J. Lipid Res.*, **2011**, *52*, 1211-1221.
- ⁹ 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.
- ¹⁰ Maier, O.; Oberle, V.; Hoekstra, D. Fluorescent lipid probes: some properties and applications (a review). *Chem. Phys. Lipids*, **2002**, *116*, 3-18.
- ¹¹ 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.

- ¹² Schroeter, A.; Kiselev, M. A.; Haur, T.; Dante, S.; Neubert, R. H. H. Evidence of free fatty acid interdigitation in stratum corneum model membranes based on ceramide [AP] by deuterium labelling. *Biochim. Biophys. Acta*, **2009**, *1788*, 2194-2203.
- ¹³ Vratislav, S. Aplikace neutronové difrakce [online]. Vystaveno 9. 9. 2005 [cit. 21. 3. 2014]. Dostupné z: <http://kipl.fjfi.cvut.cz/skripta>.
- ¹⁴ Kessner, D.; Ruettinger, A.; Kiselev, M. A.; Wartewig, S.; Neubert, R.H.H. Properties of Ceramides and Their Impact on the Stratum Corneum Structure: A Review (Part 2: Stratum Corneum Lipid Model Systems). *Skin Pharmacol. Physiol.*, **2008**, *21*, 58-74.
- ¹⁵ Moore, D. J.; Rerek, M. E. Insights into the Molecular Organization of Lipids in the Skin Barrier from Infrared Spectroscopy Studies of Stratum Corneum Lipid Models. *Acta Derm. Venereol.*, **2000**, *208*, 16-22.
- ¹⁶ Wegener, M.; Neubert, R.; Rettig, W.; Wartewig, S. Structure of stratum corneum lipids characterized by FT-Raman spectroscopy and DSC. I. Ceramides. *International Journal of Pharmaceutics*, **1996**, *128*, 203-213.
- ¹⁷ Gorcea, M.; Hadgraft, J.; Moore, D. J.; Lane, M. E. Fourier transform infrared spectroscopy studies of lipid domain formation in normal and ceramide deficient stratum corneum lipid models. *International Journal of Pharmaceutics*, **2012**, *435*, 63-68.
- ¹⁸ Fenske, D. B.; Thewalt, J. L.; Bloom, M.; Kitson, N. Models of Stratum Corneum Intercellular Membranes: ²H NMR of Macroscopically Oriented Multilayers. *Biophysical Journal*, **1994**, *67*, 1562-1573.
- ¹⁹ Rowat, A. C.; Kitson, N.; Thewalt, J. L. Interactions of oleic acid and model stratum corneum membranes as seen by ²H NMR. *International Journal of Pharmaceutics*, **2006**, *307*, 225-231.
- ²⁰ Benninghoven, A. Chemical Analysis of Inorganic and Organic Surfaces and Thin Films by Static Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (TOF-SIMS). *Angewandte Chemie International Edition in English*, **1994**, *33*, 1023-1043.

- ²¹ Biesinger, M. C.; Miller, D. J.; Harbottle, R. R.; Possmayer, F.; McIntyre, N. S.; Petersen N. O. Imaging Lipid Distributions in Model Monolayers by ToF-SIMS with Selectively Deuterated Components and Principal Components Analysis. *Applied Surface Science*, **2006**, 252, 6957-6965.
- ²² 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.
- ²³ Novotný, J.; Janůšová, B.; Novotný, M.; Hrabálek, A.; Vávrová, K. Short-Chain Ceramides Decrease Skin Barrier Properties. *Skin Pharmacol. Physiol.*, **2009**, 22, 22-30.
- ²⁴ Herold, P. Synthesis of D-erythro- and D-threo-sphingosine derivatives from L-serine. *Helv. Chim. Acta*, **1988**, 71, 354-363.
- ²⁵ Li, Y.; Hesse, M. The Syntheses of Cyclic Spermine Alkaloids: Analogues of Buchnerine and Budmunchiamine C. *Helv. Chim. Acta*, **2003**, 86, 310-323.
- ²⁶ Makabe, H.; Okajima, M.; Konno, H.; Kamo, T.; Hirota, M. Efficient Synthesis of Akolactone A via Pd-Catalyzed Carbonylation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2003**, 67, 2658-2660.
- ²⁷ 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.
- ²⁸ Van Overmeire, I.; Boldin, S. A.; Dumont, F.; Van Calenbergh, S.; Slegers, G.; De Keukeleire, D.; Futerman, A. H.; Herdewijn, P. Effect of aromatic short-chain analogues of ceramide on axonal growth in hippocampal neurons. *J. Med. Chem.*, **1999**, 42, 2697-2705.
- ²⁹ Wong, L.; Tan, S. S. L.; Lam, Y.; Melendez A. J. Synthesis and Evaluation of Sphingosine Analogues as Inhibitors of Sphingosine Kinases. *J. Med. Chem.*, **2009**, 52, 3618-3626.
- ³⁰ Goretta, S. A.; Kinoshita, M.; Mori, S.; Tsuchikawa, H.; Matsumori, N.; Murata, M. Effects of chemical modification of sphingomyelin ammonium group on formation of liquid-ordered phase. *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, 20, 4012-4019.

³¹ 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.

³² Hammarstrom, S. A convenient procedure for the synthesis of ceramides. *Journal of Lipid Research*, **1971**, *12*, 760-765.

³³ Bleck, O.; Abeck, D.; Ring, J.; Hoppe, U.; Vietzke, J. P.; Wolber, R.; Brandt, O.; Schreiner V. Two Ceramide Subfractions Detectable in Cer(AS) Position by HPTLC in Skin Surface Lipids of Non-Lesional Skin of Atopic Eczema. *J. Invest. Dermatol.*, **1999**, *113*, 894-900.