

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra anorganické a organické chemie



SYNTÉZA A STUDIUM CERAMIDŮ ODVOZENÝCH
OD 6-HYDROXYSFINGOSINU

Diplomová práce

Andrej Kováčik

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

Hradec Králové 2013

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval zejména své školitelce doc. PharmDr. Kateřině Vávrové, Ph.D. za pomoc a cenné rady a taky i ostatním pracovníkům Katedry anorganické a organické chemie za ochotu a vstřícný přístup.

Prohlášení

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.

Andrej Kováčik

V Hradci Králové 2013

Obsah

Abstrakt.....	5
Abstract.....	6
1. Úvod a cíl práce	7
2. Teoretická část.....	8
2.1. Stavba a vlastnosti kůže	8
2.2. <i>Stratum corneum</i> – vlastnosti a význam.....	9
2.3. Ceramidy –struktura a typy.....	9
2.3.1. Ceramidy odvozené od 6-hydroxysfingosinu.....	12
2.3.2. Metody přípravy 6-hydroxysfingosinu.....	13
2.3.2.1. Příprava 6-hydroxysfingosinu podle Yadava a kol.....	13
2.3.2.2. Příprava ceramidu, jehož základem je 6-hydroxysfingosin, podle Chuna a kol.....	15
2.3.2.1. Příprava 6-hydroxysfingosinu podle Masudy a Moriho.....	16
3. Experimentální část.....	17
3.1. Chemikálie, přístroje a pomůcky.....	17
3.2. Schéma syntézy	17
4. Výsledky a diskuze.....	34
5. Závěr.....	37
6. Použité zkratky.....	38
7. Literatura.....	39

Abstrakt

Ceramidy patřící do velké rodiny sfingolipidů hrají důležitou roli v mnoha živých organizmech. Zúčastňují se jak fyziologických, tak patofyziologických procesů (zejména buněčné signalizace). Jejich přítomnost je dále nezbytná v lidské kůži (ve vrstvě zvané *stratum corneum*), kde hrají roli bariéry – podílejí se na udržení stálosti vnitřního prostředí (zabraňují vstupu nežádoucích látek, patogenů a ochraňují tělo před ztrátami vody).

Molekuly ceramidů jsou tvořeny dvěma základními složkami. Každá molekula obsahuje jednu ze čtyř sfingoidních bází, dále pak acyl mastné kyseliny, který je buď nesubstituovaný, nebo nese substituci v poloze α - či ω -. Všemi možnými kombinacemi tak dostáváme různé typy ceramidů, které se vyskytují v kůži.

Tato práce se zaměřuje na ceramidy odvozené od sfingoidní báze obsahující hydroxylovou skupinu v poloze 6: 6-hydroxysfingosin. Ceramidy (acylované báze) tohoto typu byly nalezeny pouze v kůži, nehrají tedy roli v signalizaci buněk. Proto byla zvolena i jejich příprava v této práci. Dalším důvodem, proč se zabývat právě 6-hydroxysfingosinem, byla jeho nedostupnost na trhu chemických substancí, to znamená možnost připravit tuto látku pro její další studium.

Příprava 6-hydroxysfingosinu vycházela z komerčně dostupného tridekanalu, který reagoval s trimethylsilylacetylidem za vzniku (\pm)-1-trimethylsilylpentadec-1-yn-3-olu. Dále následovala specifická enzymatická reakce lipázou, která acetylovou skupinou ochránila pouze (*R*)-izomer; ten pak od nechráněného (*S*)-izomeru byl chromatograficky oddělen. Chránicí skupiny byly odstraněny a vytvořený chirální propargylalkohol byl nejprve silylován na kyslíku a pak jako alkynid reagoval s Garnerovým aldehydem. Poté byla zredukována trojná vazba využitím lithia v ethylaminu a odstraněny chránící skupiny. Připravené izomery 6-hydroxysfingosinu byly acylovány *N*-succinimidylesterem lignocerové kyseliny. Takto vytvořené ceramidy by měly posloužit pro studium jejich role ve funkci kožní bariéry.

Abstract

Ceramides, belonging to large family of sphingolipids, play a significant role in many processes in living systems. They participate in both physiological and pathophysiological processes (cell signalization). In addition, they are essential in the human epidermis (*stratum corneum*), where they act as a barrier – they participate in the maintenance of stable internal environment (preventing the penetration of unwanted substances, pathogens and the loss of body water).

Ceramide molecules consist of two basic components. Each molecule contains one of the four sphingo-like bases, and a fatty acid acyl, which is either non-substituted or substituted at the position α - or ω -. All these possible combinations give different types of ceramides that occur in the skin.

This work focuses on ceramides based on 6-hydroxysphingosin – sphingosine base with a hydroxyl group in the 6-position. Ceramides (acylated bases) of this type were found only in the human epidermis, they do not play roles in cell signalization. Therefore, the preparation of this type of ceramides was studied in this work. Another reason to deal with 6-hydroxysphingosine was its unavailability on the market of chemical substances. Thus, the substance for further study was prepared.

Synthesis of 6-hydroxysphingosine: first, commercially available tridecanal reacted with trimethylsilylacetylide and gave (\pm)-1-trimethylsilylpentadec-1-yn-3-ol. In the next step, an enzymatic reaction with lipase was used. Lipase acetylated only the (*R*)-isomer; thus, it was chromatographically separated from the unreacted (*S*)-alcohol in a single step. Then, the protected groups were deprotected and this chiral propargyl alcohol was silylated on oxygen and then as alkynide reacted with Garner aldehyde. Then, the reduction of triple bond by lithium in ethylamine followed by deprotection was used, to give 6-hydroxysphingosine molecule. The 6-hydroxysphingosine isomers were then acylated by *N*-succinimidylester of lignoceric acid to yield the final ceramide molecule. These ceramides will be further studied with regard to their role in function of the epidermal barrier.

1. Úvod a cíl práce

Stálost vnitřního prostředí lidského organismu neboli homeostázu zabezpečuje kromě jiných regulačních a pomocných orgánů také kůže. Ta představuje ochrannou bariéru před narušením velké části fyziologických funkcí organismu. Kromě jiných funkcí (exkreční, respirační, funkce imunitního systému, ochrana vnitřních orgánů před mechanickým poškozením) má dvě funkce zcela charakteristické – zabraňuje nadměrným ztrátám vody z organismu před dehydratací a chrání lidské tělo před vstupem cizorodých látek (mikrobů, alergenů apod.). Poslední zmiňované funkce jsou typické pro nejsvrchnější kožní vrstvu – a to *stratum corneum* (rohová vrstva).

Hlavní složkou mezibuněčné hmoty rohové vrstvy představují různé druhy sfingolipidových struktur, tzv. ceramidy. Ty mají schopnost utvořit bariéru mezi vnějším a vnitřním prostředím.

Cílem této práce byla syntéza analogů jednoho ze čtyř základních sfingoidních bazí, které tvoří molekulu ceramidu. Pro studium jsem si vybral ceramidy odvozené od 6-hydroxysfingosinu právě proto, že tyto struktury jsou pro epidermis zcela typické a jejich analogy nejsou (na rozdíl od jiných) komerčně dostupné pro další využití.

2. Teoretická část

Kůže (lat. *cutis*, řec. *derma*) je největší orgán lidského těla. Její plocha představuje přibližně 2 m², tloušťka je v rozmezí 0,5 – 4 mm a její hmotnost činí kolem 3 kg. Kůže má dvě základní složky (vrstvy) – pokožku a škáru. Každá z nich má své typické prvky a funkce a společně kůži jako celku udávají její typické vlastnosti¹.

2. 1. Stavba a vlastnosti kůže

První vrstvu kůže (nejsvrchnější část těla) představuje **pokožka** (*epidermis*). Je to povrchová vrstva ektodermálního původu tvořená zrohovatělým vrstevnatým dlaždicovým epitelem. Tento kromě jiných buněk (melanocyty odpovědné za pigmentaci kůže, Langerhansovy buňky imunitního systému, Merkelovy neurosekreční a mechanorecepční buňky) tvoří z největší části keratinocyty.¹ Pokožku tvoří několik vrstev buněk (obr. 1). Odspodu se rozprostírá:

- *stratum germinativum* (zárodečná vrstva); představuje ji *stratum basale* (základní vrstva), *stratum cylindricum* – typická pro buněčné dělení a *stratum spinosum* (trnitá vrstva) – tady je buňkám dodáván jejich typický kopinatý nebo polyedrický tvar,
- *stratum granulosum* (zrnitá vrstva) – zde se buňky diferencují, postupují dále k povrchu a podléhají buněčné smrti (*apoptóze*),
- *stratum lucidum* (světlá vrstva) – vrstva, která ostře přechází v
- *stratum corneum* (rohová vrstva), dále jen jako SC.

K epidermis dále přiléhá **škára** (*dermis, corium*), což je vazivo, které tvoří:

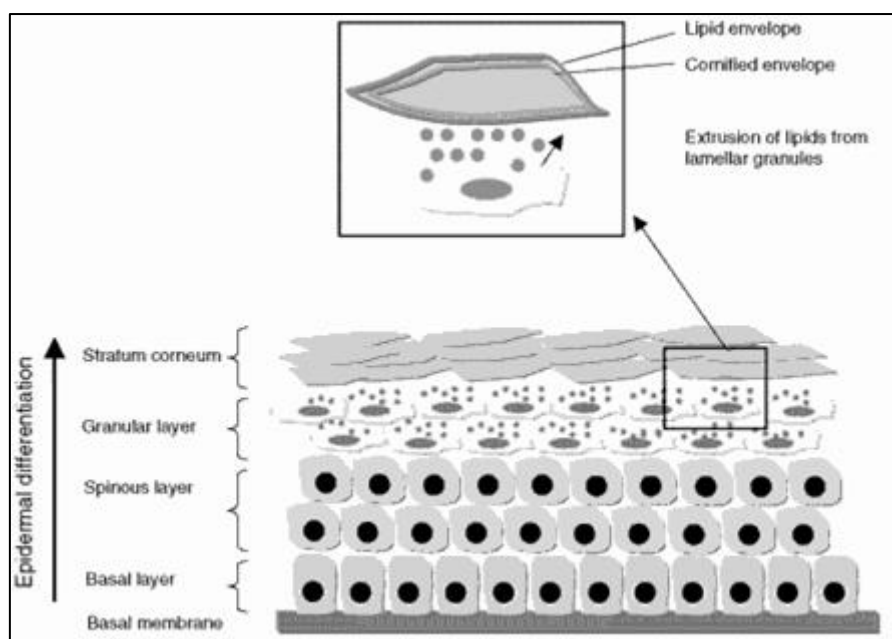
- *stratum papillare* (povrchová vrstva) – vytváří charakteristické papily,
- *stratum reticulare* (síťovaná vrstva) – dodává kůži celkovou mechanickou pevnost.

Pod škárou se pak nalézají podkožní vazivo (*tela subcutanea*).¹

2. 2. *Stratum corneum* – vlastnosti a význam

Vlastní bariéru kůže představuje vrstva zvaná *stratum corneum*.² Je tvořena 18 – 21 vrstvami **korneocytů** (odumřelé, zrohovatělé buňky), mezi kterými se nachází **lipidová matrix**, která činí 20 % celkového objemu SC.³ Tento hydrofobní prostor obsahuje 50 % **ceramidů**, 25 % **cholesterolu** a 15 % **volných mastných kyselin** (hmotnostní %).⁴ Většinu objemu SC tvoří proteinové struktury (až 80%) obsažené v korneocytech (α -keratin a β -keratin)³, zbytek je vyplněn dalšími organickými sloučeninami a vodou.^{1,5}

Právě přítomnost ceramidů v SC a jejich charakteristické uspořádání se podílí na funkci kožní bariéry.³ Význam studování ceramidů v SC má uplatnění při transdermálním podání léčivých látek⁵ a také při terapii dermatologických onemocnění (např. atopická dermatitida, psoriáza).⁶



Obr. 1. Schematické znázornění vrstev kůže⁷

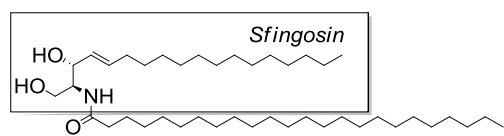
2. 3. Ceramidy – struktura a typy

Molekuly ceramidů patří do velké rodiny sfingolipidů, které tvoří (podobně jako u fosfolipidů) dvě základní části – malá polární hlava (na rozdíl od fosfolipidů)⁸ a dva nepolární (hydrofobní, lipofilní) řetězce. Základem každé molekuly ceramidu je jeden ze čtyř druhů

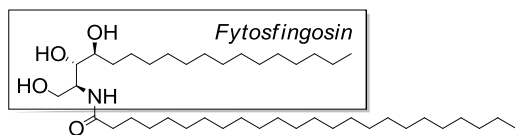
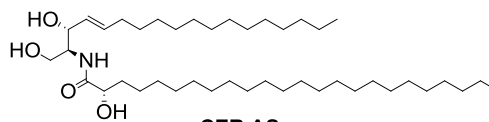
bazických aminoalkoholů, a to buď **sfiningosin** (S), **fytošfingosin** (P), **6-hydroxysfiningosin** (H) nebo **dihydrošfingosin** (DS). Na primární aminoskupině v poloze 2 je amidovou vazbou vázán acyl mastné kyseliny (řetězce s počtem 16-34 uhlíků), který může být buď nesubstituovaný (N) nebo substituován hydroxylovou skupinou v poloze α - (A) nebo ω -hydroxylovou skupinou s esterově vázanou kyselinou linolovou (EO). Nejčastěji zastoupený acyl, který se vyskytuje v molekulách ceramidů, je od **kyseliny behenové** (22C) a **kyseliny lignocerové** (24C).⁹

V lidské kůži se nachází 12 přirozených strukturních typů ceramidů (obr. 2). Ty se dají odvodit kombinací ze čtyř typů šfingoidních aminoalkoholů (S, P, H, DS) a tří možných druhů acylů (N, A, EO). Jejich nomenklatura je různá. Původní klasifikace (označování arabskými číslicemi) vycházela na základě pořadí eluce při chromatografii.^{10,11} Dnes se především uplatňuje tzv. nomenklatura dle Motty, což je kombinace písmen aminoalkoholů a acylů příslušných karboxylových kyselin.¹² Takto se např. *N*-lignoceroylsfiningosin, dříve nazývaný ceramid 2, označuje ceramid NP, apod.

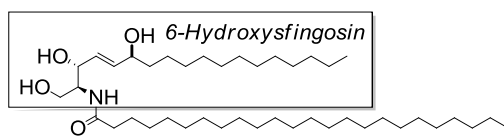
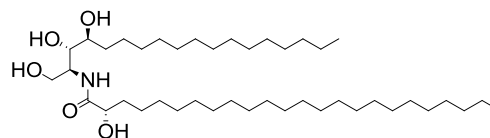
Vztah mezi strukturou a účinkem, respektive funkcí ceramidů v kůži není dodnes zcela objasněn. Polární hlavy mají schopnost tvořit vodíkové můstky, lipofilní konce (řetězce) zase interagují hydrofobními interakcemi. Pro funkci kůže jako bariéry je také klíčová délka těchto řetězců.^{8,13,14}



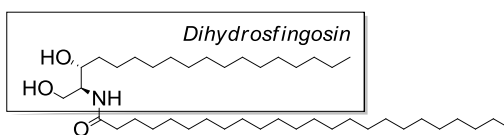
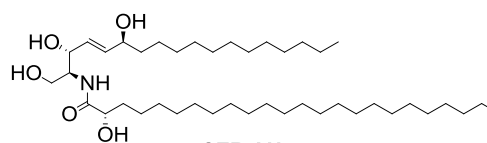
CER NS



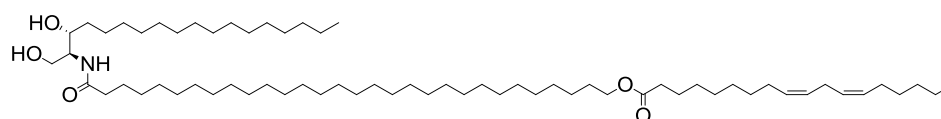
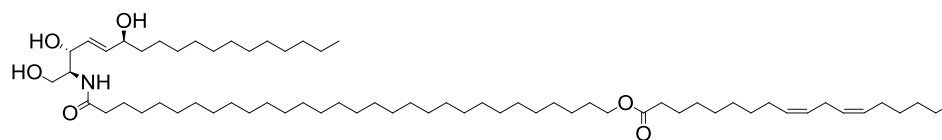
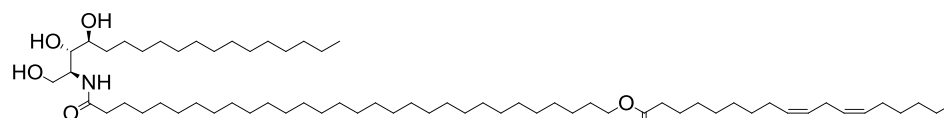
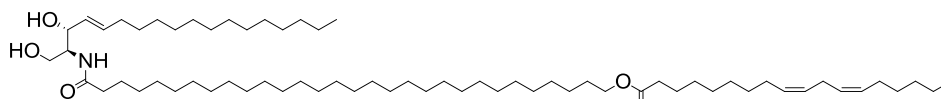
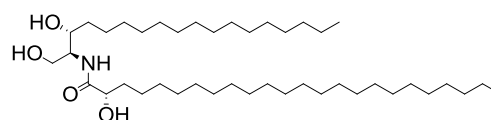
CER NP



CER NH



CER NDS

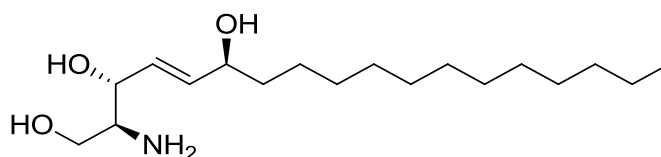


Obr. 2 Struktury ceramidů (CER), Mottova nomenklatura¹²

2. 3. 1. Ceramidy odvozené od 6-hydroxysfingosinu

Ceramidy se dají klasifikovat do dvou skupin – tzv. **volné ceramidy** a **ceramidy vázané na proteiny**¹⁵. Skupina ceramidů odvozených od 6-hydroxysfingosinu se od molekuly sfingosinu odlišuje přítomností jedné hydroxylové skupiny na C-6. (obrázek 3). Ceramidy odvozené od tohoto typu sfingoidní báze se nacházejí pouze v lidské kůži; pravděpodobně nehrají žádnou roli při buněčné signalizaci.¹⁵

V molekule 6-hydroxysfingosinu se přítomností hydroxylové skupiny v poloze 6 objevuje další centrum chiralidy. Teoreticky existují dva diastereoizomery takového aminoalkoholu – a to v absolutní konfiguraci (2*S*,3*R*,4*E*,6*R*) a (2*S*,3*R*,4*E*,6*S*), pro lidskou kůži však typický pouze (2*S*,3*R*,4*E*,6*R*) izomer.¹⁶ (Obr. 3).



Obr. 3 Struktura 6-hydroxysfingosinu v absolutní konfiguraci (2*S*,3*R*,4*E*,6*R*).

Poprvé byly tyto látky popsány v roce 1994 pracovní skupinou na čele s Donaldem T. Downingem.¹⁵ Skupina vědců zjistila, že jeden (tehdy neznámý) druh ceramidu se váže na proteiny v SC. Tento ceramid, který tvořil 25% vázaných lipidů, byl charakteristický tím, že pravděpodobně obsahoval nový typ sfingoidní báze. Downingova hypotéza přítomnosti nových druhů ceramidů byla na základě NMR spektrometrie potvrzena a látky byly popsány jako ceramidy **4** (dle Motty EOH), **7** (AH) (volné ceramidy) a ceramid **B** (ceramid vázaný na proteiny), jejichž základní sfingoidní bazí byl 6-hydroxysfingosin. Jeho pracovní skupina se však nezabývala otázkou absolutní konfigurace na C-6 molekuly ceramidu. Až v roce 2003 Masuda a Mori syntetizovali ceramid **B** a potvrdili jeho absolutní konfiguraci (2*S*,3*R*,4*E*,6*R*).¹⁶

V roce 1995 Stewart a Downing přišli na skutečnost, že 6-hydroxysfingosin se může v lidské kůži nacházet i jako volná báze; není přítomna pouze v podobě ceramidů. Pro studium si zvolili ethanolem extrahované vzorky lipidů obsažených v kůži, které pomocí

preparativní chromatografie oddělili a derivatizovali pomocí 2,4-dinitrofluorbenzenu. Takto vytvořené *N*-dinitrofenylderiváty byly chromatograficky odděleny a nejpolárnější frakce byla acetylována. Poté byly tyto deriváty podrobeny NMR analýze, která potvrdila přítomnost volného 6-hydroxysfingosinu a jeho dalších homoanalogů. Pomocí plynové chromatografie byla taky zjištěna převažující délka řetězce 6-hydroxysfingosinu a to 18 uhlíků.¹⁷ V roce 1999 se stejná pracovní skupina snažila izolovat ceramid, jehož základní bázi je 6-hydroxysfingosin, následně jeho strukturu objasnit pomocí NMR spektroskopie. V této práci se také zabývali otázkou označování ceramidů. Ceramidy obsahující 6-hydroxysfingosin označují jako CER 7 (dnes NH), CER 8 (acylován α -hydroxykyselinou, dnes AH), CER 4 (acylován ω -hydroxykyselinou s esterově vázanou kyselinou linolovou, dnes značen EOH) a nakonec CER B (ceramid vázaný na proteiny, acylován ω -hydroxykyselinou).¹⁸

2. 3. 2. Metody přípravy 6-hydroxysfingosinu

Příprava 6-hydroxysfingosinu byla popsána pouze třemi různými způsoby.^{19,20,21}

2. 3. 2. 1. Příprava 6-hydroxysfingosinu podle Yadava a kol. (Y)¹⁹

Yadav a jeho pracovní skupina vycházela z komerčně dostupného propargylalkoholu (Y-1), který v reakci s docedylbromidem dal vznik pentadecynolu (Y-2). Poté došlo k redukci trojné vazby použitím tetrahydridohlinitanu lithného, produktem se stal pentadec-2-ynol (Y-3). Jako další krok si zvolili Sharplessovu epoxidaci, ve které reaguje (Y-3) s (*S/S*)-diethyltartarátém ((-)-DET) a *tert*-butylhydroperoxidem (TBHP) za vzniku epoxy-alkoholu (Y-4), respektive epoxy-chloridu (Y-5). Vytvoření trojné vazby dosáhli použitím roztoku amidu lithného v amoniaku za vzniku pentadecyn-3-olu (Y-6). Přítomnost nově vzniklé hydroxylové funkční skupiny by byla v dalších krocích pro její reaktivitu nežádoucí, dochází tudíž k jejímu ochránění pomocí *tert*-butylsilyldimethylsilylchloridu, produkt (Y-7). Takto ochráněná sloučenina dále reaguje s Garnerovým aldehydem, produkt (Y-8). Odstranění chránících skupin a redukce trojné vazby použitím LiAlH₄ dává vznik 6-hydroxysfingosinu (H) (schéma 1).

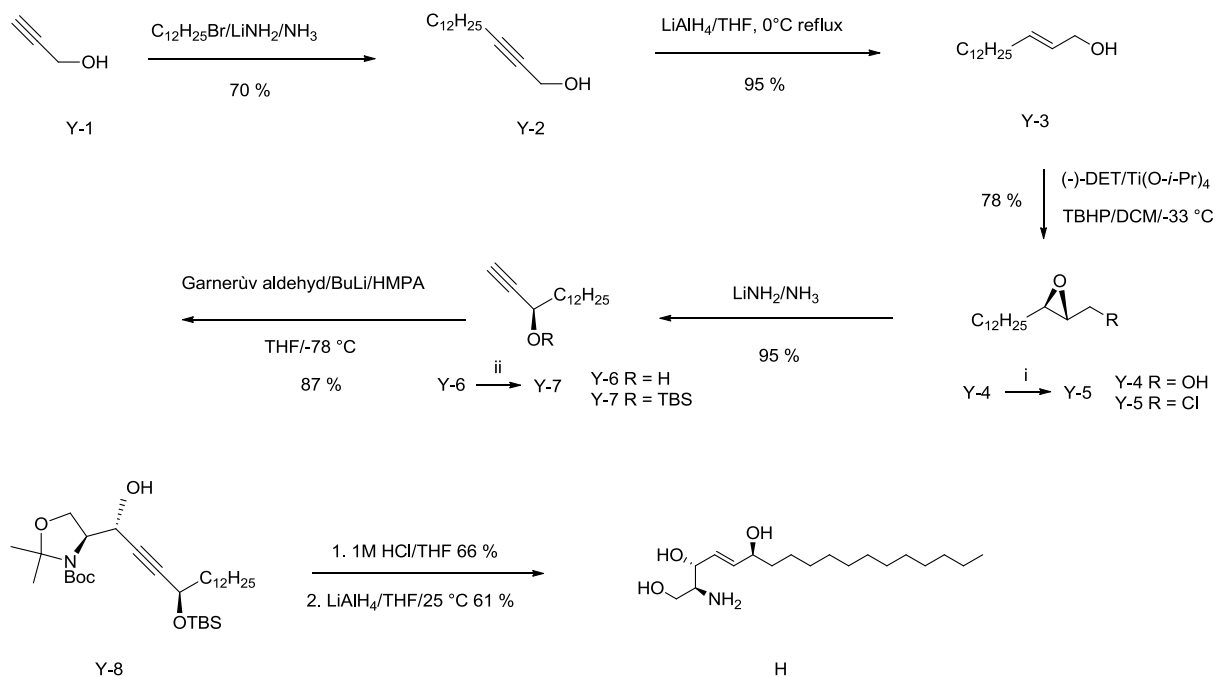


Schéma 1. Příprava 6-hydroxysfingosinu podle Yadava a kol.¹⁹: (i) $\text{PPh}_3/\text{CCl}_4/\text{NaHCO}_3/\text{reflux}$ (90 %); (ii) $\text{TBSCl}/\text{imidazol}/\text{DMAP}$ (4-dimethylaminopyridin)/ DCM (CH_2Cl_2)/0 °C (95 %).

2. 3. 2. 2. Příprava ceramidu, jehož základem je 6-hydroxysfingosin, podle Chuna a kol. (CH)²⁰

Chun a kolektiv použili pro přípravu 6-hydroxyceramidu jako výchozí látku tridekanal (**CH-1**), který v reakční směsi s 2-(diisopropoxyfosforyl)-acetátem, triethylaminem (Et_3N) a bromidem lithným (tzv. Horner-Wadsworth-Emmonsova reakce) dal vznik α,β -nenасыcenému esteru (ethylester kyseliny pentadec-2-enové, **CH-2**); asymetrická dihydroxylace poskytla dihydroxyester (**CH-3**) použitím Sharplessova katalyzátoru (AD-mix- β). Vytvořenému produktu dále ochránili vicinální hydroxylové skupiny za pomoci 2,2-dimethoxypropanu (DMP), produkt (**CH-4**). Esterovou skupinu zredukovali (použitím diisobutylhydridu hlinitého, DIBAL) na alkohol (**CH-5**), který byl převeden na chlorid (**CH-6**). Vytvoření (*R*)-pentadecyn-3-olu (**CH-7**) bylo dosaženo reakční směsí butyllithia a hexamethylfosforamidu (HMPA). Pro další kroky by nebyla vhodná volná hydroxylová skupina, proto došlo k jejímu ochránění *tert*-butylsilyldimethylsilylchloridem v prostředí imidazolu (**CH-8**). Dále následovala reakce alkyridu s Garnerovým aldehydem (**CH-9**), obnovení hydroxylové skupiny (**CH-10**), odstranění chránících skupin povařením v 1M kyselině chlorovodíkové a nakonec asymetrická redukce použitím LiAlH_4 .

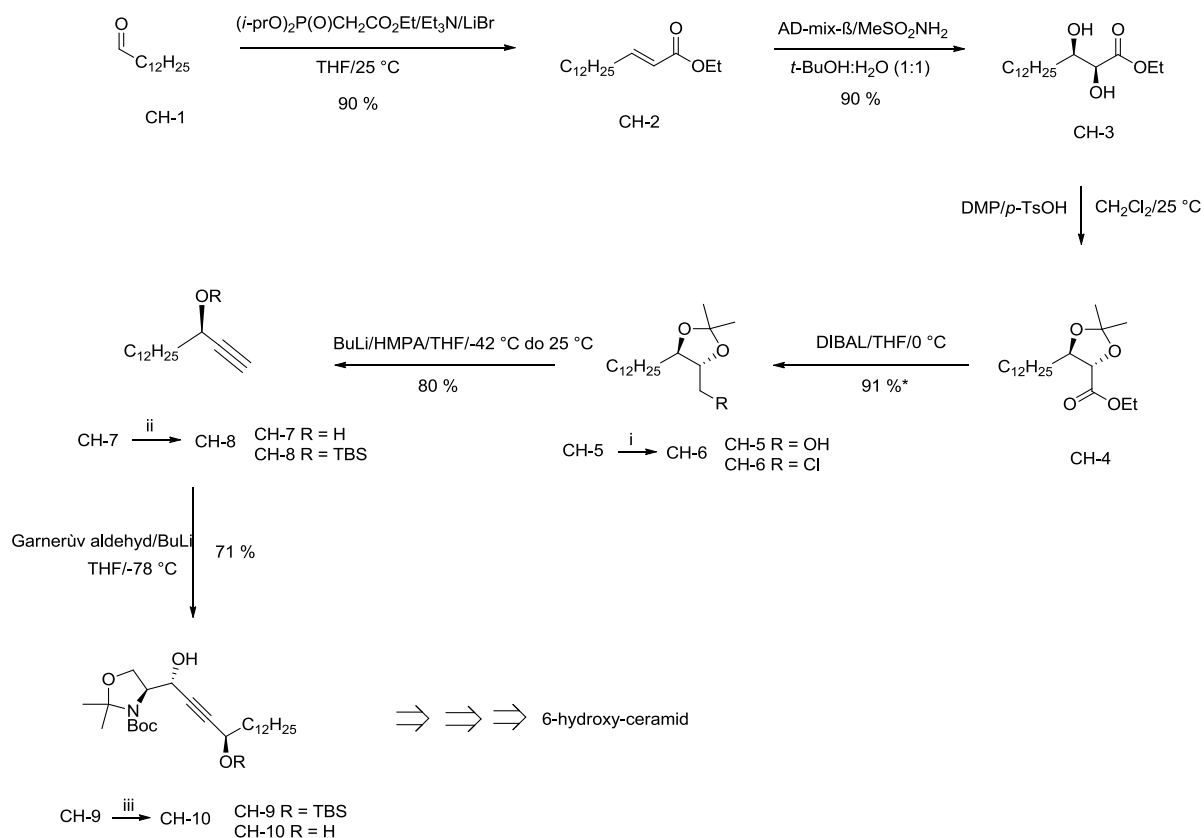


Schéma 2. Příprava 6-hydroxyceramidu, jehož základem je 6-hydroxysfingosin, podle Chuna a kol.²⁰: (i) NCS (*N*-chlorsukcimid)/PhP₃/CH₂Cl₂/0 °C (86 %); (ii) TBSCl (*tert*-butyldimethylsilylchlorid)/imidazol/DMF (dimethylformamid)/25 °C (97 %); (iii) *n*-Bu₄NF (91 %). * - dva kroky.

2. 3. 2. 3. Syntéza 6-hydroxysfingosinu podle Masudy a Moriho²¹

Třetí syntéza využívá stereoselektivní acylaci lipázou pro přípravu chirálního propargylalkoholu a umožňuje izolaci obou izomerů. Tento postup jsme zvolili pro přípravu ceramidů v této diplomové práci a je popsána v experimentální části práce.

3. Experimentální část

3. 1. Chemikálie, přístroje a pomůcky

Výchozí suroviny a další chemikálie byly pořízeny od firmy Sigma-Aldrich. Pro charakterizaci látek byl použitý přístroj Varian Mercury-Vx BB (300 (NMR analýza; $^1\text{H}/300\text{ MHz}$ a $^{13}\text{C}/75\text{ MHz}$), Varian VNMR S500 ($^1\text{H}/500\text{ MHz}$ a $^{13}\text{C}/125\text{ MHz}$), spektrofotometr Nicolet Impact 6700 (IR spektra). Tenkovrstvé chromatografie byly prováděny na TLC deskách Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck). Hodnocení TLC desek bylo prováděno po nanesení detekční směsi, která se skládá z: $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, $\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]$, kyseliny sírové a vody. Pro vyhodnocování NMR spekter byl použit počítačový program MestReNova (verze 7.0.3-8830).

3. 2. Schéma syntézy

Poprvé byla syntéza publikována pracovní skupinou Masuda a Mori. Z komerčně dostupného tridekanalu (**1**) byl nejdříve připraven TMS skupinou chráněný pentadec-1-yn-3-ol (**2**) využitím trimethylsilylacetylidu, který vzniká z trimethylsilylacetylenu a butyllithia. Následovala specifická enzymatická reakce s využitím lipázy, která navázala acetylovou skupinu z vinyl-acetátu na molekulu pentadec-1-yn-3-olu pouze v konfiguraci *R* (**3**) a zbylá část zůstala neochráněná (isomer *S*, **4**). Uvedené reakce popisuje schéma 1.

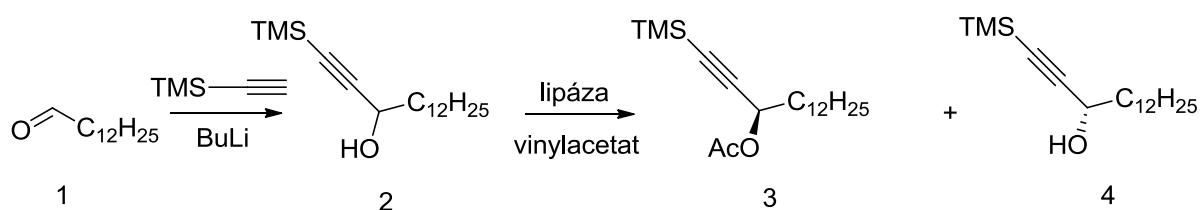


Schéma 1. Reakce tridekanalu (**1**) a trimethylsilylacetylenu s butyllithiem. Enzymatická reakce lipázy s molekulou pentadec-1-yn-3-olu (**2**) s vinyl-acetátem.

Po chromatografickém oddělení dvou stereoisomerů (acetylovaného a druhého nikoliv) následovalo odstranění acetylové skupiny a TMS skupin použitím směsi uhličitanu draselného v methanolu a následné ochránění hydroxylové skupiny jak isomeru *R* (**5**), tak

S (**6**) *tert*-butyldimethylsilylovou skupinou pomocí TBSCl a imidazolu, který sloužil jako báze pro navázání vzniklého protonu (schéma 2).

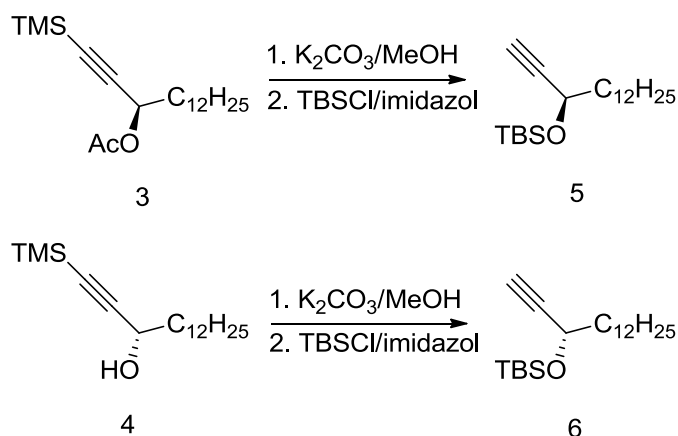


Schéma 2. Odstranění chránících skupin a opětovné ochránění hydroxyskupiny

Vzniklé produkty byly použity do reakcí s Garnerovým aldehydem (**7**), který dal vznik produktů **8** (izomer *R*) a **9** (izomer *S*) jak ukazuje schéma 3.

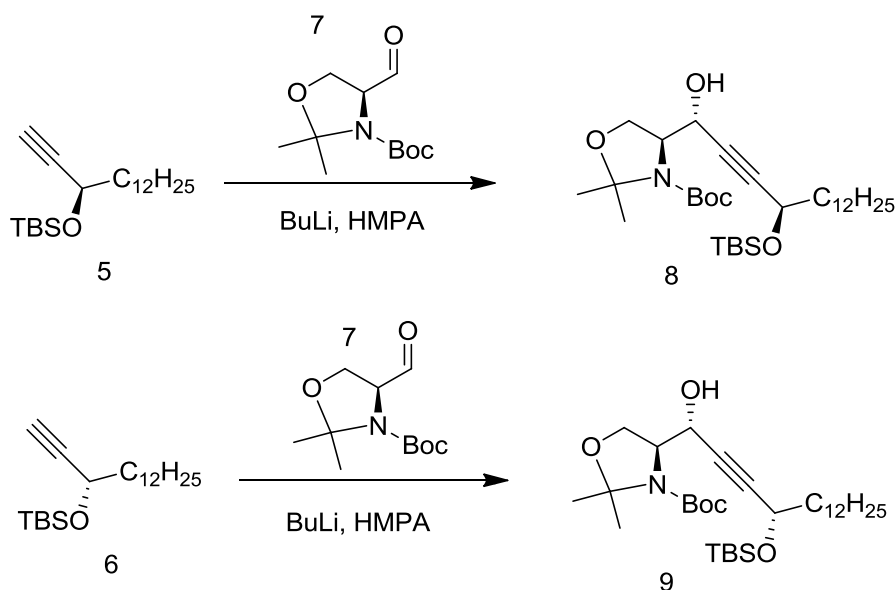


Schéma 3. Reakce s Garnerovým aldehydem a chráněných pentadec-1-yn-3-olů

Poté došlo k redukci trojné vazby použitím roztoku lithia v ethylaminu v suchém THF při velmi nízké teplotě; produkty nyní obsahují dvojnou vazbu v konfiguraci *4E*. Výsledná molekula 6-hydroxysfingosinu byla izolována po odstranění chránících skupin povařením

v kyselině chlorovodíkové v prostředí dioxanu: izomer *R* (**10**) a izomer *S* (**11**). Reakce jsou zobrazeny v schématu 4.

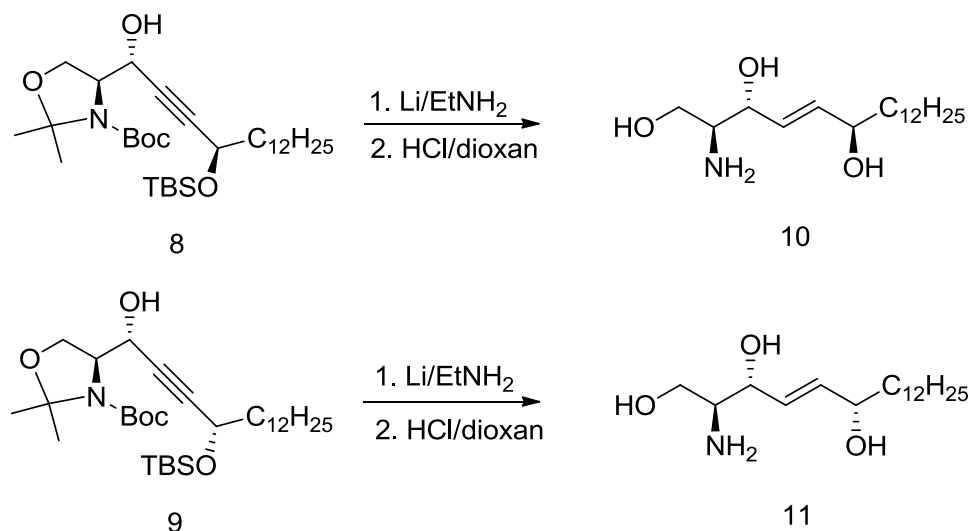
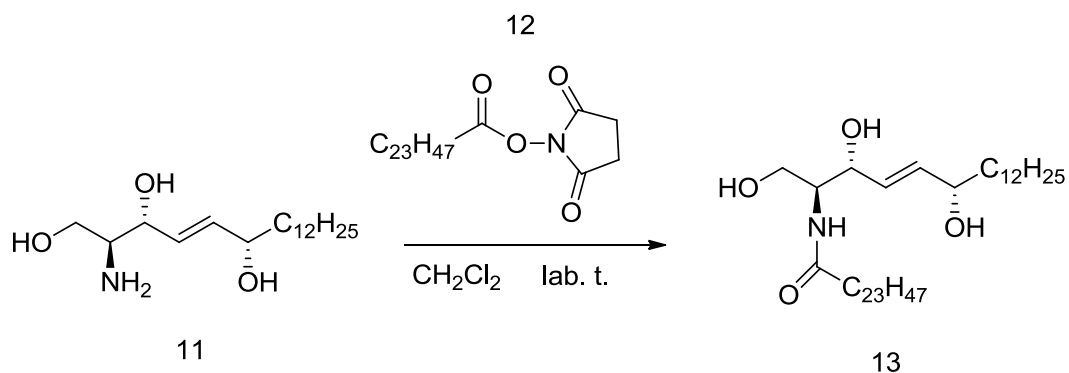


Schéma 4. Redukce trojné vazby a odstranění všech chránících skupin

Dále následovala reakce založená na acylaci aminoskupiny molekuly 6-hydroxysfingosinu pomocí sukcinimidylesteru kyseliny lignocerové (**12**). Nejdřív byl připraven ceramid odvozený od 6-hydroxysfingosinu s délkou řetězce 24 uhlíků v absolutní konfiguraci (*2S*, *3R*, *4E*, *6S*) (**13**), poté v konfiguraci (*2S*, *3R*, *4E*, *6R*) (**14**). Uvedené reakce popisuje schéma 5.



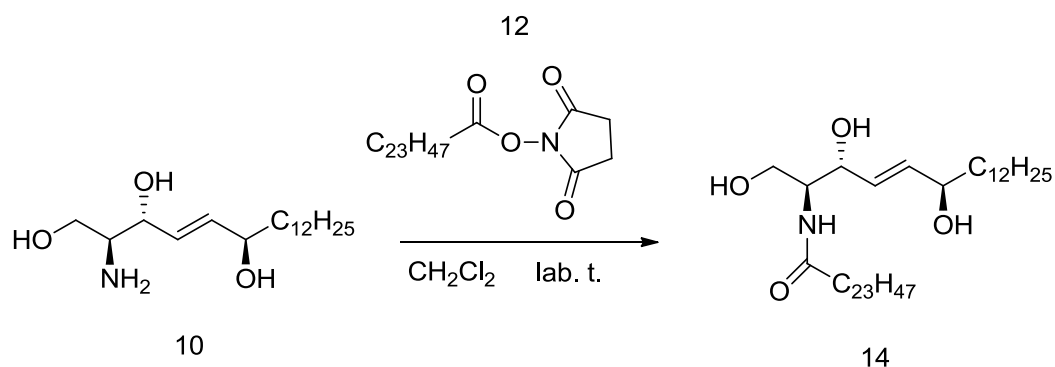
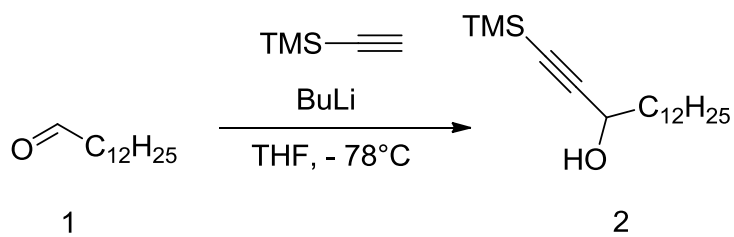


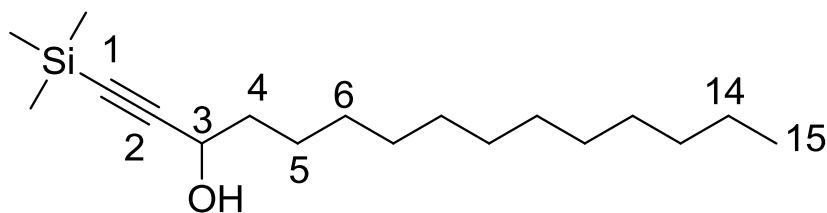
Schéma 5. Acylace analogů 6-hydroxysfingosinu za pomoci sukcinimidylesteru kyseliny lignocerové

3. 2. 1. Příprava (±)-1-trimethylsilylpentadec-1-yn-3-olu (2)



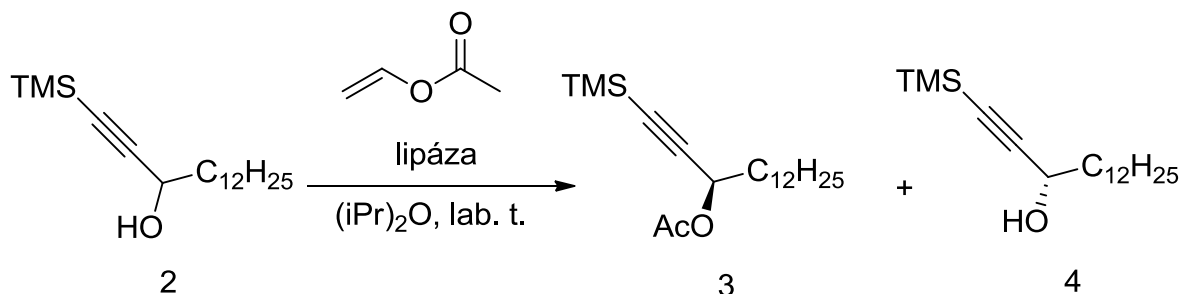
Do roztoku 3,71 g (37,8 mmol) trimethylsilylacetyleny v suchém tetrahydrofuranu (THF, 100 ml) bylo za stálého míchání přidáno po částech butyllithium (1,6M roztok v hexanu, 25 ml) při teplotě -78°C v atmosféře dusíku. Po 1h míchání byl k reakční směsi po kapkách přidán roztok tridekanalu (**1**) (5,0 g, 25,2 mmol), teplota zůstává nezměněná. Po třech hodinách míchání do laboratorní teploty v atmosféře N_2 a průběžného monitorování TLC (mobilní fáze hexan/ethyl-acetát 30:1, R_f 0,12) byla reakce ukončena přikapáváním roztoku NH_4Cl . Směs byla vytřepána 3 x 250 ml etheru a následně organická fáze 1 x 150 ml nasyceným roztokem NaCl (200 ml). Po vysušení Na_2SO_4 byla směs zahuštěna na vakuové odparce a přečištěna sloupcovou chromatografií (mobilní fáze hexan/ethyl-acetát 30:1).

3. 2. 1. 1. 1-(trimethylsilyl)pentadec-1-yn-3-ol (2)



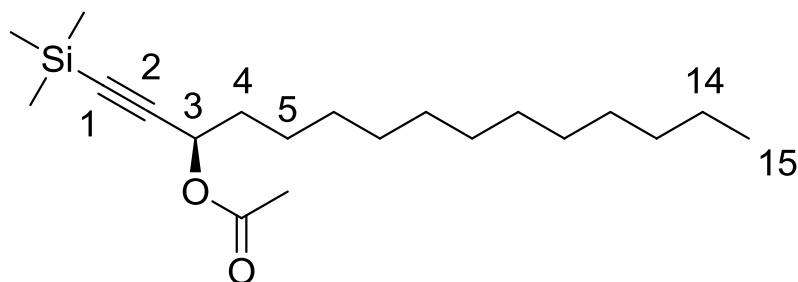
Produktem byla bezbarvá olejovitá kapalina. Výtěžek reakce: 6,63 g, 88 %, což je srovnatelné s výtěžkem podle literatury (85 %) ²¹. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 4,34 (t, J = 6,6 Hz, 1H, 3-CH); 1,78-1,61 (m, 2H, 4-CH₂); 1,49-1,38 (m, 2H, 5-CH₂); 1,34-1,23 (m, 18H, 6-14-CH₂); 0,93-0,83 (m, 3H, 15-CH₃); 0,17 (s, 9H, Si-(CH₃)₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 106,9; 89,3; 62,9; 37,7; 31,9; 29,7; 29,6; 29,5; 29,4; 29,3; 29,2; 25,1; 22,7; 14,1; -0,13 ppm.

3. 2. 2. Příprava (R)-3-acetoxy-1-trimethylsilylpentadec-1-ynu (3) a (S)-1-trimethylsilylpentadec-1-yn-3-olu (4) – využití acylační vlastnosti lipázy



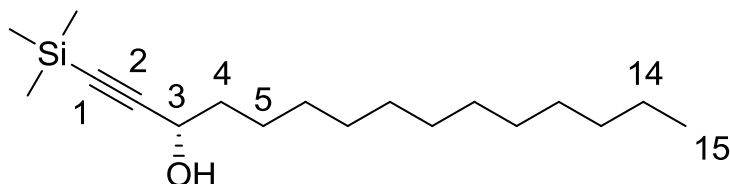
5,6 g práškové lipázy bylo přidáno za stálého míchání a laboratorní teploty do roztoku alkoholu (2) (6,63 g, 22,4 mmol) s vinyl-acetátem (140 ml) a diisopropyletherem (270 ml), který sloužil jako prostředí pro danou reakci. Směs byla za laboratorní teploty míchána nepřetržitě 10 dnů. Poté byla reakční směs zfiltrována přes Hyflo® Super Cel® (Sigma Aldrich) a vrstva Hyflo® promyta diethyletherem (3 x 100 ml). Organická fáze byla nakonec zahuštěna na vakuové odparce. Látka byla přečištěna sloupcovou chromatografií (200 g silikagelu, mobilní fáze hexan/ethyl-acetát 60:1).

3. 2. 2. 1. (*R*)-1-(trimethylsilyl)pentadec-1-yn-3-yl aceát (3)



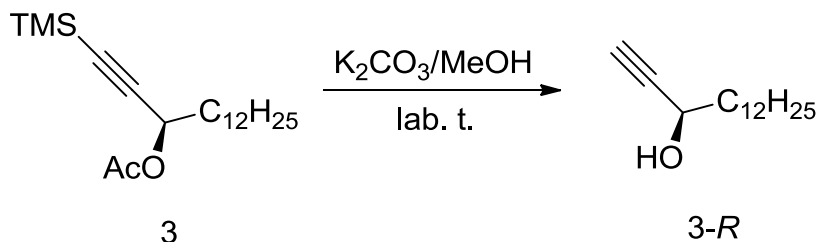
Produktem byl žlutý olej. *R_f* 0,38 (mobilní fáze hexan/ethyl-acetát 30:1). Výtěžek reakce činil (3,2 g), 42 % (literatura uvádí 49 %) ²¹. $[\alpha]_D^{25} = +50,0$ ($c = 1,05$, CHCl_3), literatura uvádí $[\alpha]_D^{25} = +65,4$. ²¹ ¹H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 5,31$ (t, $J = 6,6$ Hz, 1H, 3-CH); 2,11 (s, 3H, OAc); 1,80-1,65 (m, 2H, 4-CH₂); 1,31-1,25 (m, 20H, 5-14-CH₂); 0,88 (m, 3H, 15-CH₃); 0,10 (m, 9H, Si-CH₃) ppm. ¹³C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 169,9$; 102,8; 90,2; 64,4; 34,8; 31,9; 29,7; 29,6; 29,5; 29,4; 29,3; 29,0; 24,9; 22,7; 22,6; 22,6; 21,1; 14,1; -0,1; -0,2 ppm.

3. 2. 2. 2. (*S*)-1-(trimethylsilyl)pentadec-1-yn-3-ol (4)



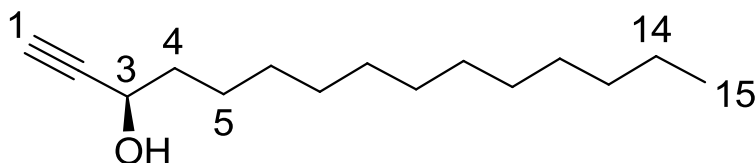
Produkt byl nažloutlý olej o výtěžku 45 % (3,0 g), Masuda a Mori uvádí 48 % ²¹. *R_f* 0,12 (mobilní fáze hexan/ethyl-acetát 30:1). $[\alpha]_D^{22} = +1,0$ ($c = 1,05$, CHCl_3), literatura uvádí $[\alpha]_D^{22} = +1,1$ ($c = 1,10$, CHCl_3) ²¹. NMR spektra byla totožná s látkou (2) v části 3.2.1.

3. 2. 3. Příprava (*R*)-pentadec-1-yn-3-olu (*3-R*) – odstranění chránících skupin



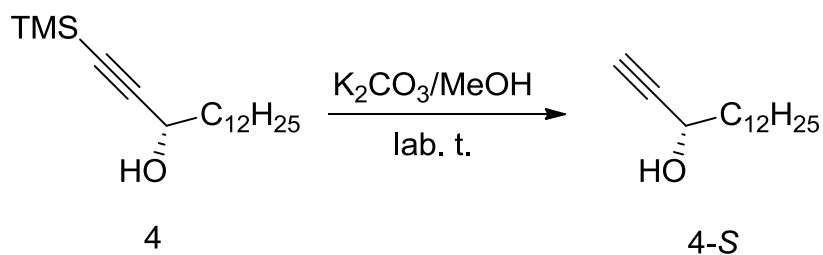
K látce (**3**) (3,2 g, 9,4 mmol) byl přidán methanol (63 ml) a K_2CO_3 (3,9 g, 28,3 mmol). Směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 3 hodin, průběžné kontroly TLC (mobilní fáze hexan/ethyl-acetát 30:1 R_f 0,1). Následně byl produkt zahuštěn na vakuové odparce, poté byl koncentrát promytý vodou (50 ml), vytřepán 3 x 250 ml etheru a organická fáze 1 x 150 ml nasyceným roztokem NaCl. Po vysušení Na_2SO_4 a zahuštěním na vakuové odparce byla směs chromatograficky přečištěna na 100 g silikagelu (mobilní fáze hexan/ethyl-acetát 40:1).

3. 2. 3. 1. (*R*)-pentadec-1-yn-3-ol (*3-R*)



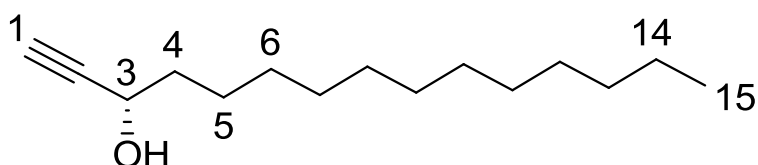
Byla izolována žlutá olejovitá látka o výtěžku 92,8 % (1,95 g), podobný výtěžek uvádí Madusa a Mori (92 %) ²¹. $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = +3,0$ ($c = 1,0$, CHCl_3), hodnota odpovídá literatuře ²¹ ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 4,37$ (td, $J = 6,6$, $J = 2,1$ Hz, 1H, 3-CH); 2,46 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, 1-CH \equiv); 1,84 (d, $J = 5,6$ Hz, 1H, OH); 1,79-1,60 (m, 2H, 4-CH $_2$); 1,54-1,37 (m, 2H, 5-CH $_2$); 1,26 (s, 18H, 6-14-CH $_2$); 0,96-0,79 (m, 3H, 15-CH $_3$) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 85,0$; 72,8; 62,3; 37,6; 31,9; 29,5; 29,6; 29,53; 29,50; 29,3; 29,2; 24,9; 22,7; 14,1 ppm.

3. 2. 4. Příprava (*S*)-pentadec-1-yn-3-olu (4-*S*) – odstranění chránících skupin



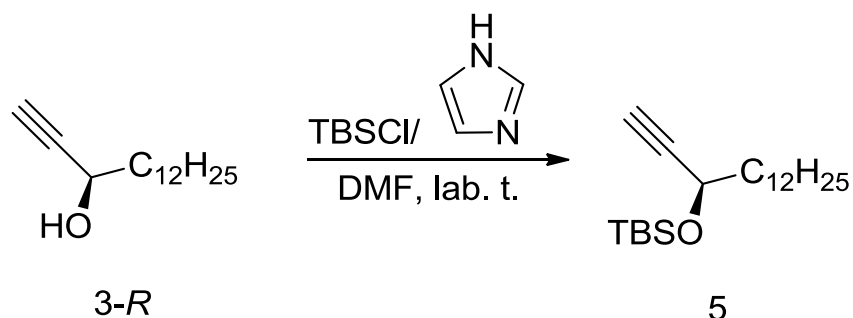
K produktu z kroku 3. 2. 2. – (4) (3,0 g, 10,1 mmol) byl přidán methanol (60 ml) a K_2CO_3 (4,2 g, 30,4 mmol). Další kroky byly stejné jako v části 3. 2. 3.

3. 2. 4. 1. (*S*)-pentadec-1-yn-3-ol (4-*S*)



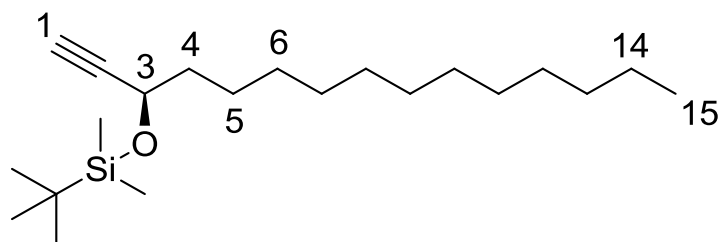
Produktem byl žlutý olej. Výtěžek reakce 92,5 % (2,10 g) odpovídá literatuře²¹. R_f 0,1 (mobilní fáze hexan/ethyl-acetát 30:1). $[\alpha]_D^{25} = -2,10$ ($c = 1,0$, CHCl_3), Masuda a Mori uvádí hodnotu $[\alpha]_D^{25} = -2,59$ ²¹. $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 4,36$ (td, $J = 6,7, 1,9$ Hz, 1H, 3-CH); 3,48 (d, $J = 1,6$ Hz, 1H, OH); 2,48-2,43(m, 1H, 1- $\text{CH}\equiv$); 1,75-1,65 (m, 2H, 4- CH_2); 1,47-1,42 (m, 2H, 5- CH_2); 1,35-1,21 (m, 18H, 6-14- CH_2); 0,89-0,85 (m, 3H, 15- CH_3) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 85,0; 72,7; 62,3; 37,6; 31,9; 29,64; 29,62; 29,5; 29,4; 29,3; 29,2; 24,9; 22,6; 14,1$ ppm.

3. 2. 5. Příprava (*R*)-3-*tert*-butyldimethylsilyloxy-pentadec-1-ynu (**5**) – ochránění hydroxylové skupiny



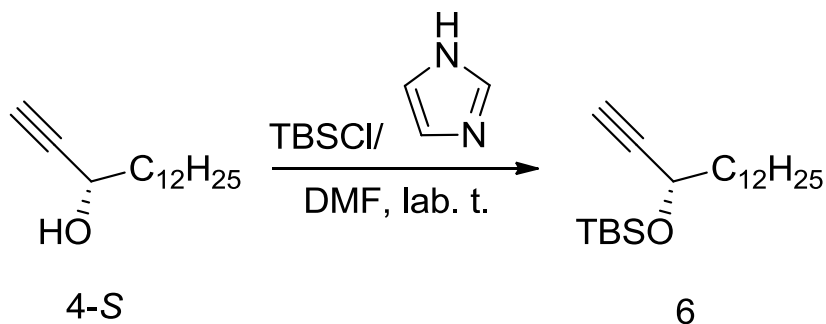
K 1,95 g (8,68 mmol) výchozí látky (**3-R**) v prostředí dimethylformamidu (DMF, 60 ml) byl postupně přidán imidazol (1,18 g, 17,36 mmol) a *tert*-butyldimethylsilylchlorid (1,31 g, 8,68 mmol). Reakční směs byla míchána za laboratorní teploty po dobu 4 hodin a průběžně monitorována pomocí TLC (mobilní fáze hexan/ethyl-acetát 4:1, R_f 0,92). Reakce byla ukončena promytím vodou (3 x 100 ml), vytřepána do diethyletheru (3 x 100 ml), organická frakce nasyceným roztokem NaCl (3 x 50 ml), vysušena Na_2SO_4 a zahuštěna na vakuové odparce. Vzniklá olejovitá kapalina byla přečištěna využitím sloupcové chromatografie na 200 g silikagelu (mobilní fáze hexan/ethyl-acetát 40:1).

3. 2. 5. 1. (*R*)-3-*tert*-butyldimethylsilyloxy-pentadec-1-yn (**5**)



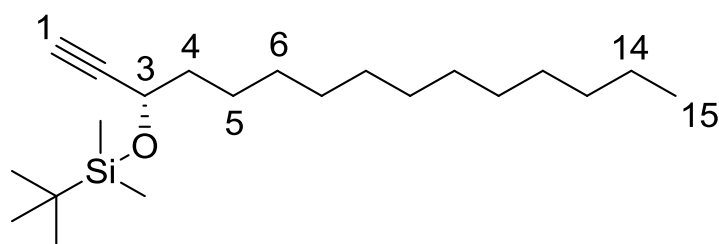
Produktem této reakce byl bezbarvý olej o výtěžku 83% (2,44 g). $[\alpha]_D^{23} = +40,0$ ($c = 1,0$; CHCl_3), literatura uvádí hodnotu $[\alpha]_D^{23} = +32,3^{21}$. $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 4,33$ (td, $J = 6,5, 2,1$ Hz, 1H, 3-CH); 2,37 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, 1-CH \equiv); 1,74-1,6 (m, 2H, 4-CH $_2$); 1,45-1,36 (m, 2H, 5-CH $_2$); 1,34-1,23 (m, 18H, 6-14-CH $_2$); 0,95-0,87 (m, 9H, Si-*t*Bu); 0,87-0,85 (m, 3H, 15-CH $_3$); 0,13 (s, 3H, Si-CH $_3$); 0,11 (s, 3H, Si-CH $_3$) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 85,8; 71,8; 32,7; 38,6; 31,9; 29,7; 29,6; 29,57; 29,54; 29,3; 29,2; 25,8; 25,1; 22,7; 18,2; 14,1; -4,6; -5,1$ ppm.

3. 2. 6. Příprava (*S*)-3-*tert*-butyldimethylsilyloxy-pentadec-1-ynu (**6**) – ochránění hydroxylové skupiny



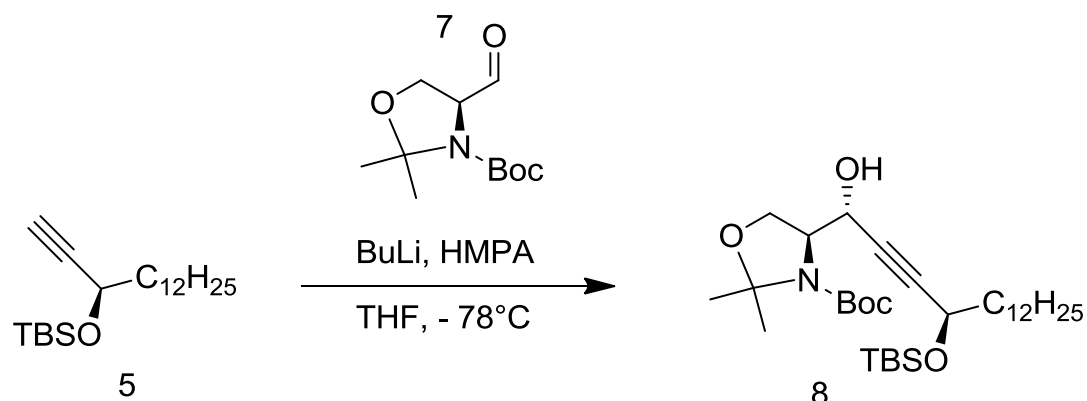
Podobným způsobem jako v kroku 3. 2. 5. proběhla i výše uvedená reakce. Výchozí látkou je však druhý izomer propargylalkoholu (**4-S**, 2,1 g, 9,35 mmol). Do reakce bylo použito 1,27 g (18,71 mmol) imidazolu a 1,40 g (9,35 mmol) TBSCl. Veškeré kroky proběhly jako v části 3. 2. 5.

3. 2. 6. 1. (*S*)-3-*tert*-butyldimethylsilyloxy-pentadec-1-yn (**6**)



R_f 0,92 (mobilní fáze hexan/ethyl-acetát 4:1). Výtežek reakce byl 43 % (1,33 g) – bezbarvý olej. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 4.32 (td, *J* = 6.6, 2.1 Hz, 1H, 3-CH); 2.41 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, 1-CH≡); 1.75 – 1.61 (m, 2H, 4-CH₂); 1.48 – 1.36 (m, 2H, 5-CH₂); 1.25 – 1.20 (m, 18H, 6-14-CH₂); 0.87 – 0.82 (m, 3H, 15-CH₃); 0.05 (s, 6H, Si-CH₃) ppm. ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃): δ = 85,3; 72,4; 62,0; 37,6; 31,8; 29,6; 29,5; 29,4; 29,3; 29,2; 25,6; 24,9; 14,0; -3,7 ppm.

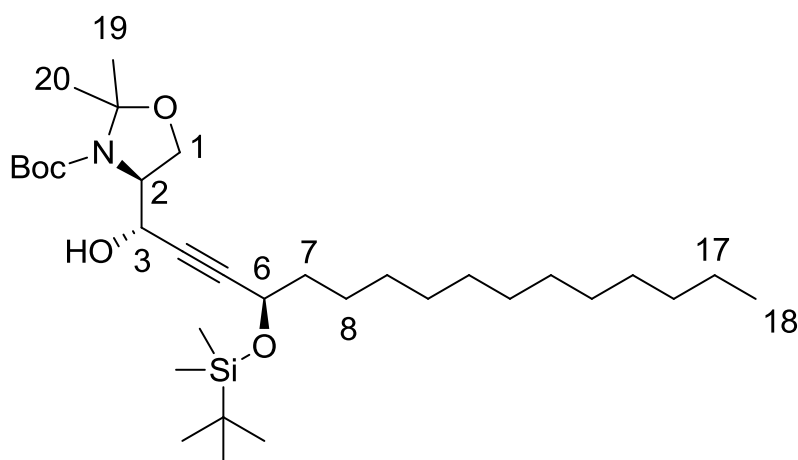
3. 2. 7. Příprava (S)-tert-butyl-4-((1R,4R)-4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-1-hydroxyhexadec-2-yn-1-yl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylátu (8) – alkynylace Garnerova aldehydu I. (7)



Do reakční směsi (5) (1,0 g, 2,95 mmol) a 1,6M roztoku butyllithia v hexanu (2,58 ml, 4,14 mmol) ve 30 ml suchého tetrahydrofuranu při chlazení na $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ a pod atmosférou N₂ bylo po kapkách z injekční stříkačky přidáno 1,06 g (5,91 mmol) hexamethylfosforamidu (HMPA) a následně 1,01 g (4,42 mmol) Garnerova aldehydu (7, (*S*)-*tert*-butyl-4-formyl-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylát) v 5ml suchého THF. Směs byla míchána až na laboratorní teplotu po dobu 1,5 h a následně ukončena přidáním roztoku NH₄Cl. Po ukončení reakce následovalo zahuštění na vakuové odparce, promytí vodou (2 x 50 ml), vytřepání do diethyletheru (3 x 100 ml). Organická fáze byla vytřepána nasyceným roztokem NaCl (100 ml). Pro vysušení byl použit Na₂SO₄; suchá organická frakce byla zahuštěna na vakuové odparce a přečištěna sloupcovou chromatografií (130 g silikagelu, mobilní fáze hexan/ethylacetát 30:1).

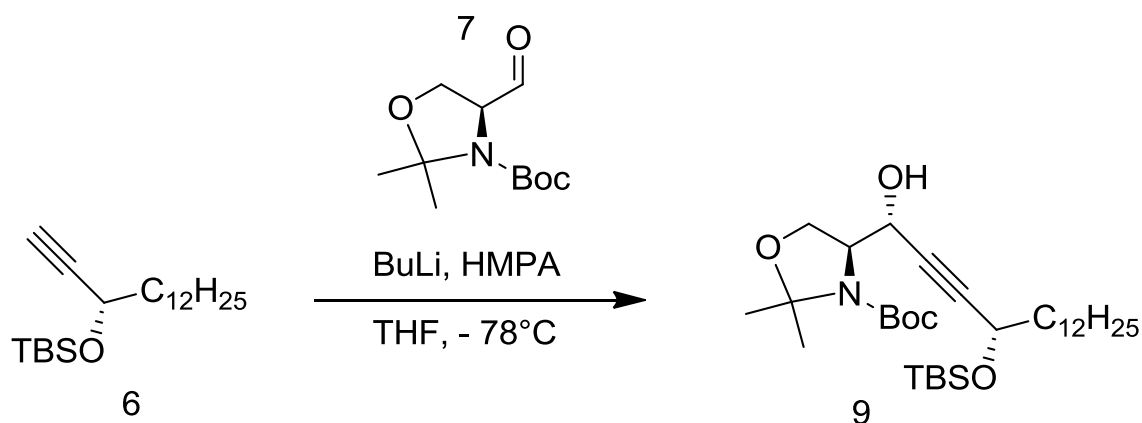
3. 2. 7. 1.

(S)-tert-butyl-4-((1R,4R)-4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-1-hydroxyhexadec-2-yn-1-yl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylát (8)



Produktem byl nažloutlý olej o výtěžku 67 % (1,12 g). R_f 0,58 (mobilní fáze hexan/ethylacetát 4:1). $[\alpha]_D^{25} = +1,0$ ($c = 1,0$; CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3): $\delta = 4.78 - 4.54$ (m, 1H, 3-CH); 4.35 (t, $J = 7.1$, 1H, 6-CH); 4.17 – 3.87 (m, 3H, 1-CH₂, 2-CH); 1.69 – 1.55 (m, 2H, 7-CH₂); 1.59 (s, 1H, 20-CH₃); 1.50 (s, 3H, 19-CH₃); 1.49 (s, 9H, *t*Bu (Boc)); 1.33 – 1.18 (m, 20H, 8-17-CH₂); 0.88 (s, 9H, *t*Bu-Si); 0.87 (s, 3H, 18-CH₃); 0.11 (s, 3H, Si-CH₃); 0.08 (s, 3H, Si-CH₃) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): $\delta = 153,9$; 94,7; 87,9; 81,4; 81,2; 64,9; 63,7; 62,9; 62,4; 38,6; 31,9; 31,4; 29,66; 29,63; 29,60; 29,5; 29,3; 29,2; 28,4; 28,3; 25,9; 25,3; 25,2; 22,7; 18,2; 14,1; -4,5; -5,1 ppm.

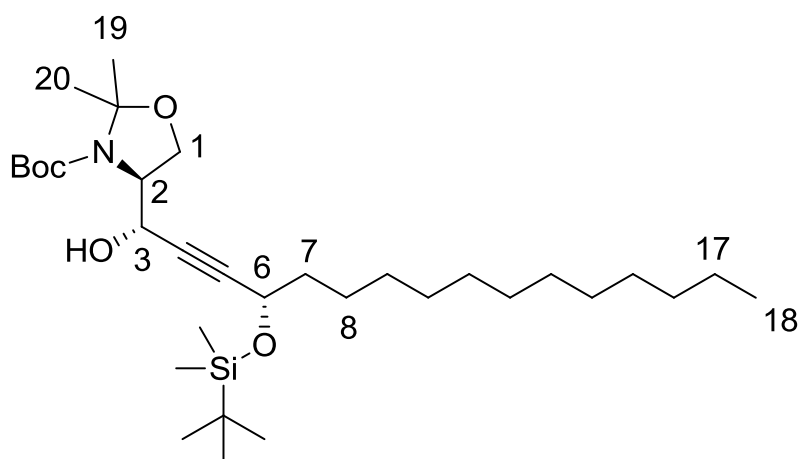
3. 2. 8. Příprava (S)-tert-butyl-4-((1S,4S)-4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-1-hydroxyhexadec-2-yn-1-yl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-karboxylátu (9) – alkynylace Garnerova aldehydu II. (7)



Alkynylace Garnerova aldehydu proběhla analogicky jako v kroku 3. 2. 6. Do reakce byly použity: výchozí látka (6) (1,33 g, 3,93 mmol), *n*-butyllithium (1,6 M v hexanu; 3,4 ml, 5,5 mmol), Garnerův aldehyd (7) (1,35 g, 5,89 mmol).

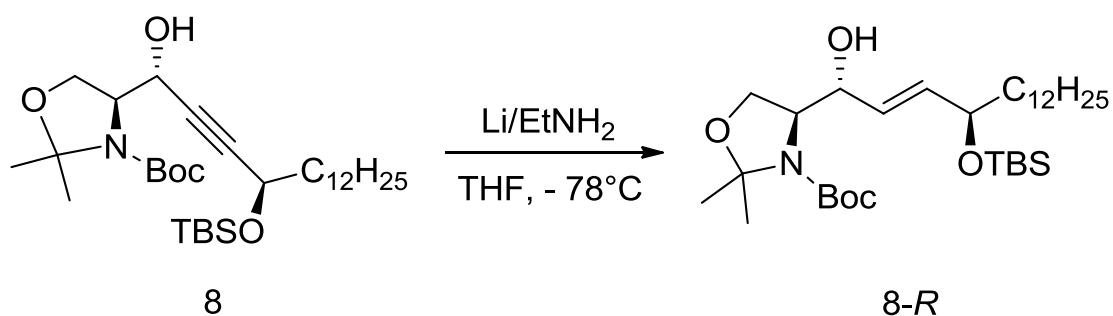
3. 2. 8. 1.

(*S*)-*tert*-butyl-4-((1*S*,4*S*)-4-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-1-hydroxyhexadec-2-yn-1-yl)-2,2-dimethyloxazolidine-3-karboxylát (9)



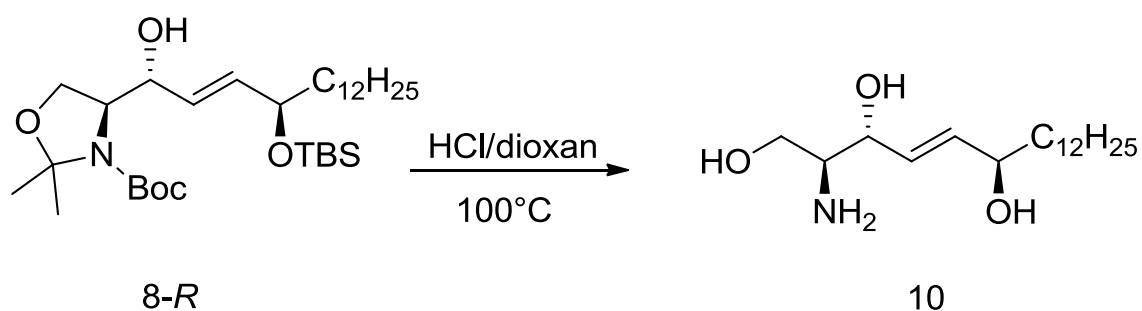
Produkem byla žlutá olejovitá kapalina ve výtěžku 69 % (1,53 g). R_f 0,58 (mobilní fáze hexan/ethyl-acetát 4:1). $[\alpha]_D^{25} = -3,0$ ($c = 1,0$, CHCl_3). $^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 4.79 - 4.54$ (m, 1H, 3-CH); 4.35 (t, $J = 6.5$ Hz, 1H, 6-CH); 4.16 – 3.86 (m, 3H, 1-CH₂, 2-CH); 1.69 – 1.55 (m, 5H, 7-CH₂; 1.59 (s, 1H, 20-CH₃); 1.52 – 1.44 (m, 12H, *t*Bu (Boc); 19-CH₃); 1.33 – 1.18 (m, 20H, 8-17-CH₂); 0.90 (s, 9H, *t*Bu-Si); 0.87 (s, 1H, 18-CH₃); 0.10 (s, 3H, Si-CH₃); 0.08 (s, 3H, Si-CH₃) ppm. $^{13}\text{C NMR}$ (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 153,8$; 94,9; 87,9; 81,6; 81,2; 64,9; 63,7; 62,9; 60,4; 38,6; 31,9; 29,7; 29,7; 29,6; 29,58; 29,53; 29,3; 29,2; 28,4; 25,8; 22,7; 14,1; -4,4; -5,0 ppm.

3. 2. 9. Redukce trojné vazby lithiem v ethylaminu I. – syntéza (8-R)



Na redukci trojné vazby (**8**) bylo potřeba rozpustit 0,3 g (44,26 mmol) pevného lithia ve 20 ml ethylaminu při teplotě $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ v atmosféře N_2 . Po 3 hodinách stálého míchání (vznikl tmavě modrý roztok), bylo do tohto roztoku přidáno 0,84 g (1,47 mmol) (**8**), rozpuštěného v 10 ml suchého THF a míchán další 2 hodiny. Poté byla reakce ukončena přidáním 30% roztoku NH_4Cl . Ethylamin byl odstraněn proudem dusíku, reakční směs byla extrahována 3 x 100 ml diethyletheru a organická fáze byla promyta 100 ml roztoku NaCl. Poté následovalo vysušení pomocí Na_2SO_4 a odstranění rozpouštědla na vakuové odparce. V průběhu reakce pravděpodobně došlo k částečnému odstranění chránících skupin. Produkt proto nebyl čištěn sloupcovou chromatografií a byl použit do další reakce. Bylo získáno 0,51 g žluté olejovité kapaliny.

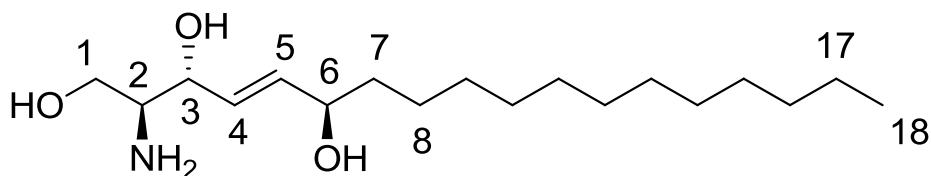
3. 2. 10. Příprava 6(R)-hydroxysfingosinu (**10**) – odstranění chránících skupin



K látce (**8-R**) (0,5 g,) bylo přidáno 70 ml směsi dioxan/1M HCl (1:1) a v atmosféře N_2 byla celá směs míchána pod zpětným chladičem 2 hodiny při teplotě $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po odpaření části objemu dioxanu byla směs nejprve extrahována směsí diethylether/hexan 1:1 (3 x 100 ml), následovala alkalizace vodné fáze 1M roztokem NaOH (pH~10). Poté byla směs extrahována do dichlormethanu (3 x 100 ml). Organické fáze byly spojeny, vysušeny bezvodým Na_2SO_4 .

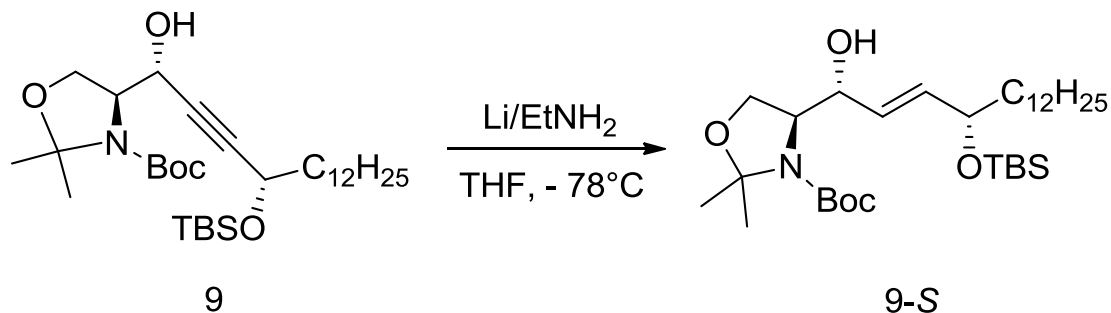
Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (50 g silikagelu) s mobilní fází dichlormethan/methanol/triethylamin 40:10:1.

3. 2. 10. 1. (2*S*,3*R*,6*R*,4*E*)-2-aminooctadec-4-en-1,3,6-triol (10)



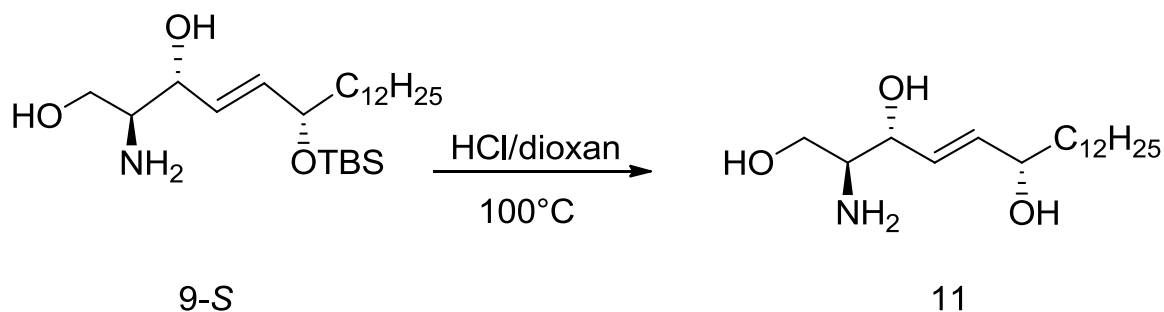
Produktem byla bílá krystalická látka, t.t. 39-41 °C. Výtěžek z této reakce a reakce 3. 2. 9. byl 67 %. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3): $\delta = 5.54 - 5.40$ (m, 1H, 4-CH=); 5.33 – 4.92 (m, 1H, 5-CH=); 3.86 (m, 1H, 1-CH), 3.52 – 3.29 (m, 3H, 1-CH, 3-CH, 6-CH), 2.74 (dd, $J = 4.0$ Hz, 1H, 2-CH), 1.84 – 1.66 (m, 2H, 7- CH_2), 1.13 – 0.82 (m, 20H, 8-17 CH_2), 0.59 – 0.54 (t, 3H, 18- CH_3) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): $\delta = 134,4$; 124,4; 71,2; 70,0; 62,6; 59,9; 29,1; 29,0; 28,9; 28,8; 28,7; 28,67; 28,63; 28,5; 22,9; 13,2 ppm.

3. 2. 11. Redukce trojné vazby lithiem v ethylaminu II. – syntéza (9-S)



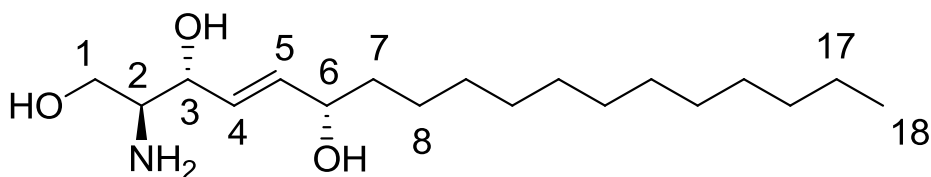
Pro tuto reakci byla použita stejná metodika přípravy jako v kroku 3. 2. 9. Pro přípravu bylo použito 0,5 g (72,0 mmol) pevného lithia ve 20 ml ethylaminu, k němuž bylo přidáno 1,53 g (2,70 mmol) (9), rozpuštěného v 15 ml suchého THF. Reakční podmínky (teplota, atmosféra dusíku) a další kroky syntézy zůstaly stejné jako v předchozí reakci. Bylo získáno 0,71 g žlutého oleje. Rovněž jako v předchozí reakci došlo k částečnému odstranění chránících skupin, proto látka nebyla čištěna a byla použita do další reakce na úplné odstranění chránících skupin.

3. 2. 12. Příprava 6(*S*)-hydroxysfingosinu – odstranění chránících skupin



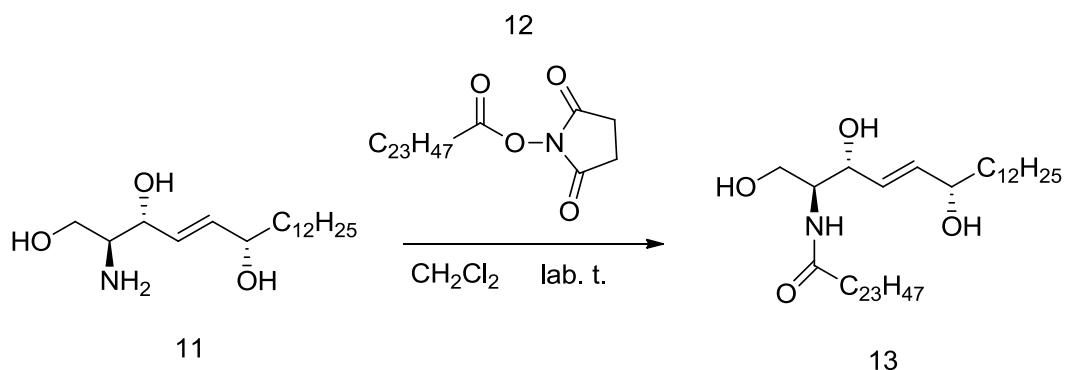
Obdobným způsobem jako v kroku 3. 2. 10. proběhla i syntéza 6(*S*)-hydroxysfingosinu (**11**). Do reakce bylo použito 0,71 g látky (**9-S**), další chemikálie byly ve stejném množství jako v případě syntézy látky (**10**). Kroky reakce byly rovněž stejné.

3. 2. 12. 1. (2*S*,3*R*,6*S*,4*E*)-2-aminooktadec-4-en-1,3,6-triol (**11**)



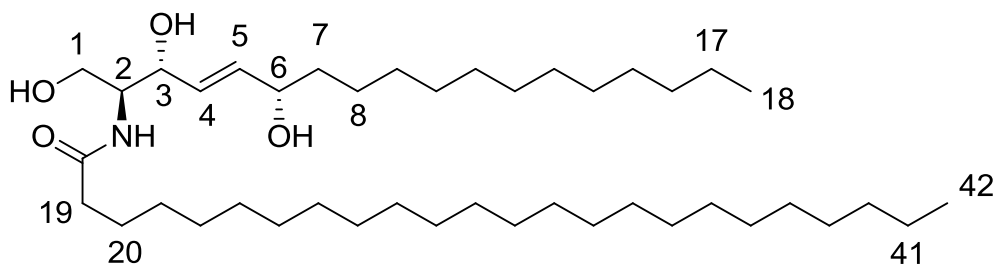
Produktem byla bílá krystalická látka (**11**). Výtěžek této reakce a reakce 3. 2. 11. byl 62 %. ^1H NMR (300 MHz, CDCl_3): δ = 5.75 (dd, J = 15.3, 6.7 Hz, 1H, 4-CH=); 5.60 – 5.33 (m, 1H, 5-CH=); 4.06 (dd, J = 6.4 Hz, 1H, 1-CH); 3.80 – 3.48 (m, 3H, 1-CH, 3-CH, 6-CH); 2.87 (dd, J = 5.1 Hz, 1H, 2-CH); 2.55 (s, 3H, 3 x OH); 2.11 – 1.93 (m, 2H, 7- CH_2); 1.40 – 1.18 (m, 20H, 8-17 CH_2); 0.87 (t, J = 6.5 Hz, 3H, 18- CH_3) ppm. ^{13}C NMR (75 MHz, CDCl_3): δ = 134,7; 125,2; 73,6; 63,7; 56,1; 37,2; 32,7; 31,9; 29,7; 29,6; 29,5; 29,4; 29,3; 29,2; 29,1; 22,7; 14,1 ppm.

3. 2. 13. Acylace 6(*S*)-hydroxysfingosinu pomocí sukcinimidylesteru kyseliny lignocerové



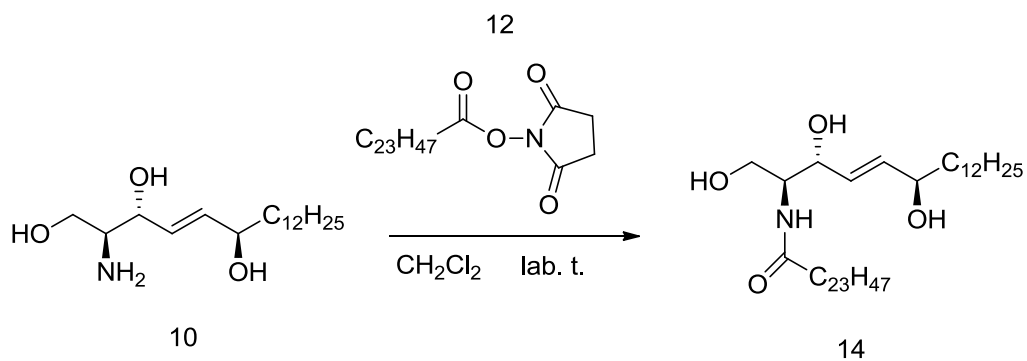
Do reakce bylo použito 52,40 mg (0,166 mmol) látky (**11**) a 154,7 mg (0,332 mmol) v 10 ml suchého dichlormethanu a směs ochlazena na teplotu 0 °C v atmosféře dusíku. Při této teplotě bylo přidáno 154,7 mg (0,332 mmol) sukcinimidylesteru kyseliny lignocerové (**12**) v 10 ml suchého dichlormethanu. Látky byly míchány po dobu 24h v atmosféře dusíku při laboratorní teplotě. Po odpaření rozpouštědla byl produkt přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (5 g silikagelu, mobilní fáze chloroform/methanol 50:1).

3. 2. 13. 1. *N*-((2*S*,3*R*,6*S*,4*E*)-1,3,6-trihydroxyoktadec-4-en-2-yl)tetracosanamide (**13**)



Produktem byla bílá krystalická látka, t.t.= 114 – 118 °C, mol. hm. 666,11 g/mol. Výtěžek reakce činil 40 %. TLC: mobilní fáze chloroform/methanol 10:1, *R_f* 0,43. IR (samotná látka, ATR): ν_{\max} 3301, 2919, 2850, 1647, 1552, 1464, 721. ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 5.92 – 5.67 (m, 1H, 5-CH=); 5.63 – 5.24 (m, 1H, 4-CH=); 4.41 – 4.16 (m, 2H, 3-CH, 6-CH); 3.90 – 3.62 (m, 1H, 1-CH); 3.60 – 3.17 (m, 2H, 1-CH, 2-CH); 2.11 – 1.93 (m, 2H, 19-CH₂); 1.70 – 1.55 (m, 2H, 7-CH₂); 1.42 – 1.15 (m, 62H, 8-17-CH₂, 20-41-CH₂), 0.94 – 0.80 (m, 6H, 18-CH₃, 42-CH₃). ¹³C NMR pro špatnou rozpustnost nebylo změřeno.

3. 2. 14. Acylace 6(*R*)-hydroxysfingosinu pomocí sukcinimidylesteru kyseliny lignocerové



Jako v předchozím případě proběhla i reakce s 6*R*-hydroxysfingosinem. Množství jednotlivých látek a podmínky syntézy byly stejné. V průběhu chromatografického čištění produktu pravděpodobně došlo k rozložení většího množství látky (**14**), množství získané látky bylo zanedbatelné. IR (ATR) nečisté směsi: ν_{\max} 3395, 2918, 2849, 1645, 1557, 1471, 719.

4. Výsledky a diskuze

Cílem této práce byla syntéza ceramidů, jejichž základní sfingoidní bazí je 6-hydroxysfingosin. Tyto ceramidy se nachází pouze v kůži, jejich role zde však není spolehlivě objasněna. Cílem mé práce bylo vyzkoušet syntézu těchto ceramidů podle Masudy a Moriho.²¹ Tento syntetický přístup byl vybrán, protože se zdál být poměrně jednoduchý a navíc umožňuje připravit izomery s hydroxylovou skupinou v konfiguraci *R* i *S*. Tyto ceramidy plánujeme v budoucnu využít ke studiu jejich role v bariérové funkci kůže, zejména ve srovnání s běžnějšími sfingosinovými ceramidy.

Syntéza vycházela z komerčně dostupného tridekanalu (**1**). Trimethylsilylacetylen s butyllithiem za velmi nízké teploty dal vznik acetylidovému aniontu, který se mohl navázat na karbonylový uhlík molekuly tridekanalu. Produktem této reakce byla racemická směs (\pm)-1-trimethylsilylpentadec-1-yn-3-olu (**2**) ve výtěžku 88%, srovnatelným s výtěžkem, který uvádí Masuda a Mori (85%).²¹

Dále bylo potřeba tyto izomery od sebe oddělit, avšak prosté čištění pomocí sloupcové chromatografie by nemělo význam. Pro snadné oddělení a identifikaci dvou izomerů byla použita specifická enzymatická reakce, při které se využilo acetylační vlastnosti lipázy. Lipáza v prostředí diisopropyletheru navázala acetylovou funkční skupinu na isomer v absolutní konfiguraci *R*, isomer v konfiguraci *S* zůstal beze změny. Produkty (**3**) a (**4**) bylo již možné jednoduše oddělit pomocí sloupcové chromatografie. Výtěžky reakcí byly: u produktu (**3**) 42 % (Masuda a Mori uvádí 49 %) a produktu (**4**) 45 % (autoři uvádí 48 %).²¹

Látky (**3**) a (**4**) byly použity do reakce, při které došlo k odstranění všech chránících skupin (trimethylsilylová a acetylová u izomeru *R* a trimethylsilylová u izomeru *S*) pomocí uhličitanu draselného v metanolu v poměrně dobrých výtěžcích – u (**3-R**) 92,8% a u (**4-S**) 92,5%.

Pro poměrně velkou reaktivitu volné hydroxylové skupiny, byla tato ochráněna pomocí *tert*-butyldimethylsilyl chloridu u obou látek. Do reakce byl použit imidazol, u kterého se využila jeho schopnost poutat proton, který se z hydroxylové skupiny po navázání TBS skupiny uvolnil.

Takto ochráněné pentadec-1-yn-3-oly (**5**) a (**6**) mohly být použity do reakce s Garnerovým aldehydem (**7**). Reakce si vyžadovala dokonale bezvodé reakční prostředí a nízkou teplotu (-78 °C). Nejprve došlo pomocí butyllithia k odtržení protonu z terminálního alkynu, který pak reagoval s Garnerovým aldehydem. Přítomnost HMPA zabezpečila, že produkt vzniknul přednostně v konfiguraci 1'*R*. Nejdříve byla reakce provedena u isomeru s absolutní konfigurací *S* s výtěžkem 69%. U druhého izomeru poprvé zmiňovaná reakce neproběhla. Pravděpodobně za to mohly nedokonalé podmínky (nedosažené bezvodé prostředí) a kvalita butyllithia. Podruhé bylo použito nové butyllithium a reakce proběhla s menším výtěžkem (67%), ale pro další krok syntézy bylo toto množství dostačující. Autoři původní syntézy látky pomocí sloupcové chromatografie neizolovali, co odůvodnili tím, že dané látky jsou nestabilní a při čištění by se rozložily.²¹ Avšak při čištění produktů (**8**) a (**9**) k rozkladu látek nedošlo, čemuž odpovídaly spektra NMR.

K redukci trojné vazby u (**8**) a (**9**) byla použita směs kovového lithia rozpuštěného v ethylaminu. Na reakci bylo velmi důležité, aby vznikl tmavě modrý roztok solvatovaných elektronů nutný pro redukci trojné vazby na dvojnou v konfiguraci *E*. Před vytvořením tohoto modrého roztoku bylo potřeba pevné lithium nastříhat na malé kousky, „aktivovat“ v methanolu, opláchnout v diethyletheru a nakonec v hexanu. Avšak poprvé roztok nezmodral, tudíž reakce nemohla být uskutečněna. Obecně lze tedy říci, že kvalita lithia (povrch, lesk a velikost nastříhaných kousků) byla klíčovou v této reakci. Při redukci trojné vazby u látky (**8**) byla vyzkoušena metoda opačného postupu – přidávání modrého roztoku k výchozí látce (**5**). Tento způsob se neosvědčil, reakce nebyla úspěšná.

Při redukci trojné vazby roztokem lithia v ethylaminu došlo pravděpodobně k částečnému odstranění chránících skupin (u obou izomerů), což bylo potvrzeno průběžným monitorováním TLC (mobilní fáze butanol/kyselina octová/voda 4:1:1, *R_f* 0,5). Proto se od čištění tohoto produktu upustilo a látky (**8-R**) a (**9-S**) byly použity do reakce s kyselinou chlorovodíkovou v dioxanu, tj. reakce, pomocí které došlo k úplnému odstranění všech (zbylých) chránících skupin. Trojná vazba byla zredukována, což bylo potvrzeno NMR spektroskopii reakčních směsí. U látky (**8-R**) byla dvojná vazba identifikována pomocí následujících signálů: ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 5.87 – 5.65 (m, 1H); 5.60 – 5.37 (m, 1H) ppm, ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 134,4; 125,1 ppm. Podobně byla dvojná vazba identifikována i u látky (**9-S**); ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ = 5.76 (dt, *J* = 14.1, 6.7 Hz, 1H); 5.63 – 5.32 (m, 1H) ppm, ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ = 134,8; 125,2 ppm.

Odstranění chránících skupin bylo dosaženo využitím směsi dioxanu a 1M kyseliny chlorovodíkové. Byly získány produkty s menším, ale dostačujícím výtěžkem: látka (**10**) s výtěžkem 67% a látka (**11**) s výtěžkem 62%. Masuda a Mori použili do redukce trojné vazby nečistý produkt z předešlé reakce s Garnerovým aldehydem. Při této reakci taky předpokládali, že dojde k odstranění všech chránících skupin. Bez čištění produkt opětovně ochránili pomocí TBSOTf (trimethylsilyltrifluormethansulfonát), lutidinu (2,6-dimethylpyridin) v prostředí suchého dichlormethanu ve výtěžku 15 % ve třech krocích, tj. alkynylace Garnerova aldehydu, redukce trojné vazby a zavedení chránících skupin²¹.

Vzniklý 6-hydroxysfingosin (**11**) byl acylován sukcidimidylesterem kyseliny lignocerové (**12**) v prostředí bezvodého dichlormethanu s výtěžkem 40%. Analogicky byla uskutečněna i reakce s látkou (**10**). Byla provedena IR spektroskopie reakční směsi, která potvrdila přítomnost ceramidu. Avšak v průběhu chromatografického čištění bylo izolováno zanedbatelné množství cílového produktu, a proto nemohla být potvrzena jeho struktura pomocí NMR spektroskopie.

5. Závěr

Kůže je největší orgán lidského těla, jehož základní funkcí je podílet se na stálosti vnitřního prostředí neboli homeostaze.¹ Mezi základní funkce mimo jiné patří i funkce ochranné bariéry³, která organismus chrání před vstupem cizorodých částic z vnějšího prostředí a zabráňuje nadměrným ztrátám vody ze živého organismu. Její důležité součásti – ceramidy, se nacházejí ve vrstvě zvané *stratum corneum*. Právě ceramidy jsou klíčové látky zodpovědné za výše zmiňované vlastnosti kůže.^{3,5}

Ceramidy odvozené od 6-hydroxysfingosinu jsou látky poměrně nedávno objevené v lidské kůži. Tato práce byla zaměřena na přípravu ceramidů, jejichž základní složkou je právě 6-hydroxysfingosin. Podařilo se připravit ceramid v absolutní konfiguraci (**2S,3R,6S,4E**). Druhý ceramid, v absolutní konfiguraci (**2S,3R,6R,4E**) se nepodařilo v posledním kroku izolovat. Proto jsme se rozhodli, že celou syntézu tohoto ceramidu zopakujeme. Tyto látky budou v budoucnu dále použity do pokusů, kde budou hodnoceny jejich vlastnosti důležité pro bariérovou funkci kůže v závislosti na jejich struktuře.

6. Seznam zkratek

AD-mix- β směs $K_2OsO_2(OH)_4$, $K_3Fe(CN)_6$, K_2CO_3 , hydrochinidin-1,4-ftalazindiyl-diether

Boc *tert*-butyloxykarbonyl

BuLi butyllithium

DCM dichlormethan

(-)-DET (*S/S*)-diethyltartarát

DIBAL diisobutylaluminiumhydrid

DMAP 4-dimethylaminopyridin

DMF dimethylformamid

DMP 2,2-dimethoxypropan

CER ceramid

HMPA hexamethylfosforamid

IR infračervené (infrared) spektrum

NCS *N*-chlorsukcinimid

NMR nukleární magnetická rezonance

R_f retenční faktor

SC stratum corneum

TBHP *tert*-butylhydroperoxid

TBSCl *tert*-butyldimethylsilyl-chlorid

THF tetrahydrofuran

TLC tenkovrstevná chromatografie

TBS *tert*-butyldimethylsilyl

TMS trimethylsilyl

TsOH kyselina toluensulfonová

7. Literatura

-
- ¹ ČIHÁK, Radomír. *Anatomie 3*. 1. vydání. Praha 7: Grada Publishing, spol. s r. o., 1997. 672 s. ISBN 80-7169-140-2. Integumentum commune – Kůže a kožní orgány, s. 559, 553-4.
- ² Bouwstra, J. A.; Ponc, M. The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, 1758, 2080-2095.
- ³ Vávrová, K.; Hrabálek, A. Role ceramidů v kůži. *Prakt. Lékař.*, **2006**, 2, 55-58.
- ⁴ Feingold, K. R.; Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. *J. Lipid Res.*, **2007**, 48, 2531-46.
- ⁵ Hrabálek, A.; Vávrová, K. Lze překonat kožní bariéru? *Prakt. Lékař.*, **2005**, 1, 8-11.
- ⁶ Novotný, J.; Hrabálek, A.; Vávrová, K. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Skin Ceramides. *Curr. Med. Chem.*, **2010**, 17, 2301-2324.
- ⁷ Hoffjan S.; Stemmler S. On the Role of the Epidermal Differentiation Complex in Ichthyosis Vulgaris, Atopic Dermatitis and Psoriasis. *Br J Dermatol.*, **2007**, 157(3), 441-449.
- ⁸ Novotný, J.; Janušová, B.; Novotný, M.; Hrabálek, A.; Vávrová, K. Short-Chain Ceramides Decrease Skin Barrier Properties. *Skin Pharmacol. Physiol.*, **2009**, 22, 22-30.
- ⁹ Wertz, P. W.; van den Bergh, B. The physical, chemical and functional properties of lipids in the skin and other biological barriers. *Chem. Phys. Lipids*, **1998**, 91, 85-96.
- ¹⁰ Squier, C. A.; Cox, P.; Wertz, P. W. Lipid content and water permeability of skin and oral mucosa. *J. Invest. Dermatol.*, **1991**, 96, 123-126.
- ¹¹ Wertz, P. W.; Downing, D. T. Ceramides of pig epidermis: structure determination. *J. Lipid Res.*, **1983**, 24, 759-765.
- ¹² Motta, S.; Monti, M.; Sesana, S.; Caputo, R.; Cerelli, S.; Ghidoni, R. Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim. Biophys. Acta*, **1993**, 1182, 147-151.
- ¹³ 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.

-
- ¹⁴ Janůšová, B.; Zbytovská, J.; Lorenc, P.; Vavryšová, H.; Palát, K.; Hrabálek, A.; Vávrová K. Effect of ceramide acyl chain length on skin permeability and thermotropic phase behavior of model stratum corneum lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, **2011**, 1811 (3), 129-137.
- ¹⁵ Robson, K. J.; Stewart, M. E.; Michelsen, S.; Lazo, N. D.; Downing, D. T. 6-Hydroxy-4-sphingenine in human eidermal ceramides. *J. Lipid. Res.*, **1994**, 35, 2060-8.
- ¹⁶ Mori, K.; Masuda, Y. Synthesis and stereochemistry of ceramide B, (2S,3R,4E,6R)-N-(30-hydroxytriacontanoyl)-6-hydroxy-4-sphingenine, a new ceramide in human epidermis. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, 44, 9197-9200.
- ¹⁷ Stewart, M. A.; Downing, D. T. Free sphingosines of human skin include 6-hydroxysphingosine and unusually long-chain dihydrosphingosines. *J. Invest. Dermatol.*, **1995**, 105(4), 613-618.
- ¹⁸ Stewart, M. E.; Downing, D. T. A new 6-hydroxy-4-sphingenine-containing ceramide in human skin. *J. Lipid. Res.*, **1999**, 40, 1434-9.
- ¹⁹ Yadav, J. S.; Geetha, V.; Krishnam, R. A.; Gnaneshwar, D.; Chandrasekhar, S. The first total synthesis of the 6-hydroxy-4E-sphingenines. *Tetrahedron Lett.*, **2003**, 44, 2983-85.
- ²⁰ Chun, J.; Byun, H. S.; Bittman, R. First Asymmetric Synthesis of 6-Hydroxy-4-Sphingenine-Containing Ceramides. Use of Chiral Propargylic Alcohols To Prepare a Lipid Found in Human Skin. *J. Org. Chem.*, **2003**, 68, 348-54.
- ²¹ 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**, 2005, 4789-800.