

**UNIVERZITA KARLOVA**  
**FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ**

**Katedra organické a bioorganické chemie**



**Syntéza modifikovaných a označených acylceramidov**

Diplomová práce

Tomáš Havrišák

Hradec Králové 2022

Vedúci práce: PharmDr. Lukáš Opálka, Ph.D.

## **Pod'akovanie**

Na tomto mieste by som rád poďakoval svojmu školiteľovi PharmDr. Lukášovi Opálkovi, Ph.D. za jeho odborné rady, pomoc a tiež čas ktorý mi venoval. Ďalej by som chcel poďakovať prof. PharmDr. Kateřine Vávrovej za jej odbornú pomoc a rady, prof. Dr. Danielovi Husterovi za pomoc so solid-state NMR analýzou a tiež celej Skin Barrier Research group. V neposlednej rade by som chcel poďakovať svojej rodine a priateľom za veľkú podporu.

## **Prehlásenie**

„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetka literatúra a ďalšie zdroje z ktorých som pri spracovaní čerpal, sú uvedené v zozname literatúry a v práci náležite citované. Táto práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

Tomáš Havrišák

V Hradci Králové 2022

# Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra organické a bioorganické chemie

Kandidát: Tomáš Havrišák

Školiteľ: PharmDr. Lukáš Opálka, Ph.D

Názov diplomovej práce: Syntéza modifikovaných a označených acylceramidov

Najvrchnejšia vrstva kože (stratum corneum) je bariérou, ktorá nás efektívne chráni pred vplyvmi prostredia. Extracelulárne priestory stratum corneum sú vyplnené lipidmi, hlavne ceramidmi, voľnými mastnými kyselinami a cholesterolom. Skôr sa predpokladalo, že tieto lipidy sú vysoko rigidné, čo umožňuje tvorbu dostatočne nepriepustnej bariéry. Avšak v súčasnosti sa ukazuje, že niektoré časti týchto lipidov sú skôr fluidné. Doposiaľ nepreskúmanou časťou lipidov ktoré sú nevyhnutné pre správnu bariérovú funkciu sú ultradlhé ceramidy známe tiež ako acylceramidy. Mobilita sfingozínovej časti a linoleátu už boli študované, avšak o mobilite ultradlhého reťazca sa doposiaľ len špekulovalo.

Získanie informácií o mobilite jednotlivých častí acylceramidov je sťažené ich nedostupnosťou s potrebným značením. Naším cieľom bolo pripraviť acylceramidy s deutériom značenou polovicou ich ultradlhého reťazca medzi uhlíkmi  $C_{17}$  –  $C_{32}$  z komerčne dostupných perdeuterovaných zlúčenín.

Z dostupných látok sme vybrali 1,12-dibromdodekan a  $\gamma$ -butyrolakton, ktoré po ich kondenzácii poskytnú reťazec s celkovým počtom 16 atómov uhlíku, čo je presne polovica ultradlhého reťazca acylceramidov. Tieto látky boli v niekoľkých krokoch premenené do formy fosfóniovej soli a aldehydu ako partneri pre Wittigovú reakciu ktorá poskytla 16C reťazec značený deutériom. Takto značený reťazec bol opäť pomocou Wittigovej reakcie pripojený k šestnásťuhlíkatému neznačenému reťazcu čo viedlo k vzniku 32C reťazcu so selektívnym značením v požadovaných miestach molekuly. Finálna molekula acylceramidu bola pripravená esterifikáciou  $\omega$ -hydroxylovej skupiny kyselinou linolovou a následným pripojením tohto prekursoru k molekule sfingozínu.

## Abstract

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Organic and Bioorganic Chemistry

Candidate: Tomáš Havrišák

Supervisor: PharmDr. Lukáš Opálka, Ph.D

Title of diploma thesis: Synthesis of modified and labeled acylceramides

Upper most layer of skin, stratum corneum is providing effective barrier which protects us from impact of environment. Extracellular lipids of stratum corneum are mostly composed of ceramides, free fatty acids and cholesterol. Earlier it was suggested that these lipids are highly rigid, which enables sufficient barrier function. But presently, it is known that some structural parts of these lipids are more fluid. So far, ultralong ceramides (also known as acylceramides), lipids which are necessary for correct barrier function still remain partly unexplored. Mobility of sphingosine part and linoleic ester have already been studied, but mobility of the ultralong chain is speculative.

Obtaining information about mobility of particular parts of acylceramides is difficult because of their unavailability with required labelling. Our aim was to prepare acylceramides with deuterium-labelled half of their ultralong chain between carbons C<sub>17</sub> – C<sub>32</sub> from commercially available perdeuterated compounds.

From available options we chose 1,12-dibromododecane and  $\gamma$ -butyrolactone, which will after their condensation provide 16 carbon chain. That is exactly half of the ultralong chain in acylceramides. These precursors were converted to phosphonium salt and aldehyde in multiple steps to contribute as partners in Wittig reaction which provided 16 carbon chain labelled with deuterium. This labelled chain was used in another Wittig reaction together with 16 carbon unlabelled chain which resulted in 32 carbon chain with selective labelling in required positions of this molecule. Final molecule of acylceramide was prepared by esterification of the  $\omega$ -hydroxyl group with linoleic acid and subsequent connection of this precursor to the molecule of sphingosine.

## Obsah

Úvod a cieľ práce .....	7
Teoretická časť .....	9
Koža.....	9
Stratum corneum (SC).....	11
Ceramidy .....	12
Acyleramidy .....	15
Nukleárna magnetická rezonancia v pevnej fázy .....	17
Výsledky a diskusia.....	19
Príprava 12-brómdodekan-1-olu (3).....	20
Príprava fosfóniovej soli (8).....	21
Príprava ( <i>E/Z</i> )-16-[(tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)oxy]hexadec-4-enovej kyseliny (9).....	23
Príprava ( <i>E/Z</i> )-32-[(tetrahydro-2 <i>H</i> -pyran-2-yl)oxy]dotriakont-16-enovej kyseliny (13) .....	24
Príprava ceramidu EOS (18).....	25
Zhrnutie syntézy .....	25
Solid state NMR .....	26
Experimentálna časť .....	28
Chemikálie.....	28
Obecné informácie a prístroje.....	28
Syntéza.....	28
Príprava vzorku a meranie ssNMR.....	38
Záver.....	39
Zoznam skratiek .....	40
Použitá literatúra .....	42

## Úvod a cieľ práce

Koža je orgán ľudského tela ktorý poskytuje ochranu organizmu pred vplyvmi vonkajšieho prostredia ako je napríklad bariérová funkcia, ktorá bráni vstupu xenobiotík do organizmu alebo chráni organizmus pred stratami vody. Z veľkej časti za túto bariérovú vlastnosť zodpovedá najvrchnejšia vrstva kože stratum corneum (SC), ktorá sa skladá z buniek korneocytov uložených v intercellulárnej lipidovej matrix zloženej prevažne z ceramidov, cholesterolu a voľných mastných kyselín.

Acylceramidy sú podskupinou ceramidov a aj napriek tomu že ich množstvo je približne 7 – 12% z celkového množstva ceramidov v SC zastupujú významnú úlohu v tvorbe lamelárneho usporiadania lipidovej matrix SC (sú zodpovedné za tvorbu dlhej lamelárnej fáze) a ako viazané na povrch korneocytov tvoria takzvanú korneocytálnu lipidovú obálku. Význam tejto obálky nebol úplne vysvetlený ale predpokladá sa, že slúži k správnej orientácii voľných lipidov v medzibunkových priestoroch SC. Znížené množstvo acylceramidov alebo poruchy ich metabolizmu sú spájané s kožnými ochoreniami ako atopická dermatitída, psoriáza, lamelárna ichthyóza a iné.

Acylceramidy obsahujú ultradlhý *N*-acylový reťazec zložený z najčastejšie 30 alebo 32 C s omega hydroxylovou skupinou, ktorá je esterifikovaná linolovou kyselinou. Mobilita ostatných podtried ceramidov, rovnako ako mobilita sfingoidných častí a esterovo viazaného linoleátu, už boli študované. O mobilite ultradlhého reťazca v lipidových lamelách ľudského SC existuje len veľmi málo informácii, väčšinou sa špekuluje, že tento reťazec je rigidný. Jednou z metód, ktorými je možné tieto informácie získať je nukleárna magnetická rezonancia v pevnej fáze (solid-state NMR, ssNMR). Pre selektívne sledovanie len vybranej komponenty v zložitej lipidovej zmesi je nutné značenie sledovanej časti molekuly deutériom (prípadne iným izotopom napr.  $^{13}\text{C}$  uhlík).

Hlavným cieľom našej práce bolo preskúmať mobilitu ultradlhého reťazca acylceramidov prostredníctvom modelových lipidových membrán s obsahom špecificky deutérových acylceramidov, ktoré svojím zložením napodobujú extracelulárne priestory ľudského SC. Prvou časťou bolo vytvoriť syntézny plán, ktorý by vychádzal z komerčne dostupných deutérových zlúčenín a všetky reakcie optimalizovať s využitím nedeutérových látok, ktoré sú dostupnejšie a lacnejšie. Konkrétne bolo cieľom pripraviť acylceramidy s požadovaným značením ultradlhého reťazca na uhlíkoch  $\text{C}_{17} - \text{C}_{32}$ . Za počiatočne molekuly boli vybrané  $\text{d}_6$ - $\gamma$ -butyrolakton a  $\text{d}_{24}$ -

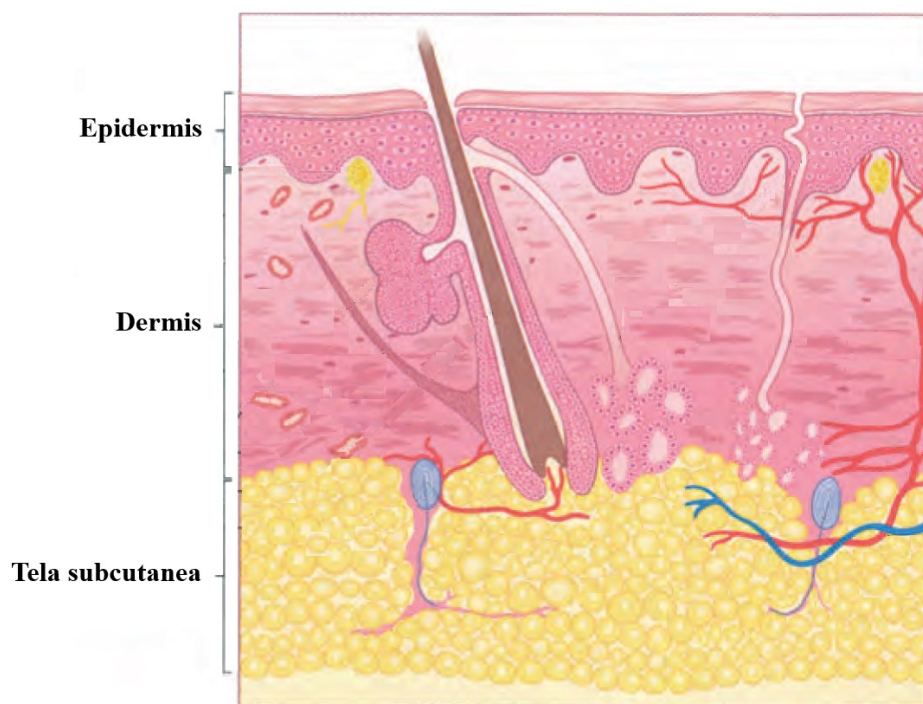
1,12-dibromdodekan. Ďalším cieľom bolo pripraviť požadované značené acylceramidy v čo najlepšom výťažku a v dostatočujúcom množstve pre štúdium ich mobility. Poslednou časťou bolo v spolupráci s univerzitou v Lipsku pomocou ssNMR popísať správanie a mobilitu ultradlhého reťazca acylceramidov.



## Teoretická časť

### Koža

Koža poskytuje človeku ochranu pred vplyvom vonkajšieho prostredia rovnako ako bráni stratám vody z organizmu, čo umožňuje prežitie na súši. Kvôli svojej flexibilita a mechanickej odolnosti poskytuje ochranu proti chemickým aj fyzikálnym vplyvom rovnako bráni aj pred vstupom mikroorganizmov, účastní sa termoregulácie, látkovej výmeny, imunitnej odpovede, syntézy vitamínu D.<sup>1</sup> Skladá sa z vrstiev dermis, epidermis a tela subcutanea (Obrázok 1).<sup>2</sup>



Obrázok 1 Stavba ľudskej kože. Na obrázku je možné vidieť kožu rozdelenú do jej 3 vrstiev. Prevzaté z James WD. et al.<sup>3</sup>

**Tela subcutanea:** podkožné väzivo, je spodnou vrstvou kože, napája sa na ňu dermis. Nachádzajú sa v nej hlavne tukové bunky. Cytoplazma týchto buniek je plná lipidov, a preto slúži ako zásoba živín. Tieto bunky spoločne na tele vytvárajú tukový vankúš ktorý má tiež ochrannú a termoregulačnú funkciu.

**Dermis:** skladá sa z väziva, z kolagenných a elastických vlákien, táto vrstva je husto prekrvená a tiež inervovaná, má 2 vrstvy:

stratum papillare: povrchová vrstva, zložená zo siete vlákien a väzivových buniek ktoré sú popretkávané sieťou kapilár

stratum reticulare: hlbšia vrstva, zložená z hustých zväzkov kolagenných fibríl a elastických vlákien s nižším počtom väzivových buniek

**Epidermis:** je tvorená rohovatejúcim dlaždicovým epitelom. Bunky dozrievajú cestou z bazálnej vrstvy k povrchu. Vrstvy epidermis sú (Obrázok 2):

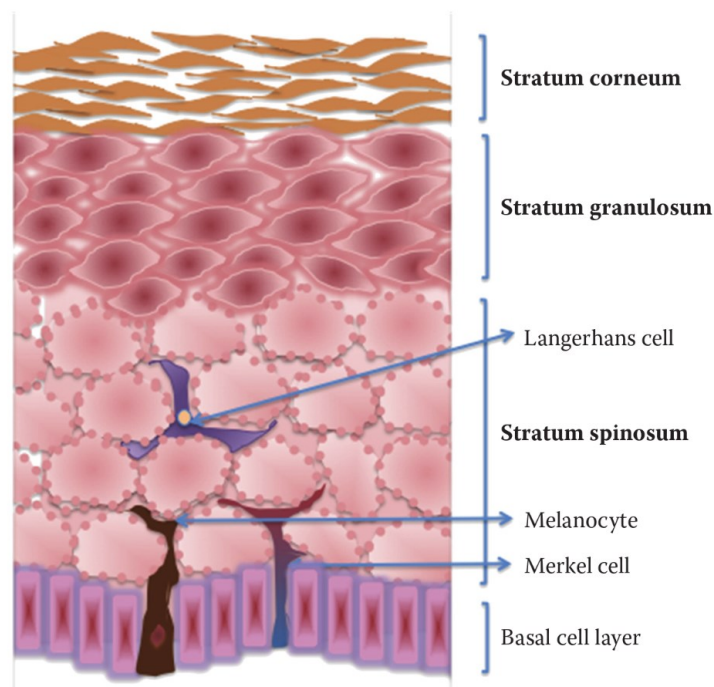
stratum basale: vrstva vyšších buniek v ktorej prebieha delenie a vznik nových buniek

stratum spinosum: nadväzuje na stratum basale, prechodom cez túto vrstvu sa nové korneocyty postupne splošujú

stratum granulosum: v bunkách tejto vrstvy sa vytvárajú prekurzory keratinu, cestou k povrchu sa bunky diferencujú a podliehajú bunkovej smrti

stratum lucidum: vyskytuje sa len v miestach s hrubšou kožou ako sú dlane alebo chodidlá a je zložená z mŕtvych buniek ktoré stratili jadro

stratum corneum: najvyššia vrstva epidermis, zložená z plno zrohovatených buniek korneocytov pevne zostavených vo vrstvách obklopených lipidovou matrix.<sup>4</sup>

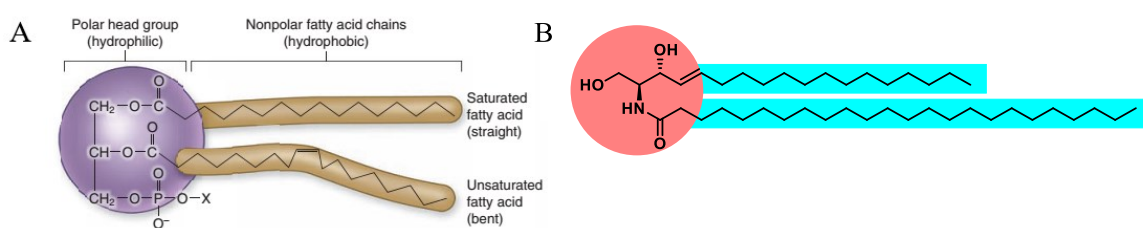


Obrázok 2 Epidermis. Na obrázku je schematicky znázornená epidermis. Prevzaté z Honari G. et al.<sup>5</sup>

## Stratum corneum (SC)

Tvorí bariéru ktorá zabraňuje prestupu cudzorodých látok do organizmu, rovnako ako zabraňuje nadmerným stratám vody z organizmu. Štruktúra SC býva prirovnávaná k *tehlám v malte*, tehly znázorňujú bunky korneocyty a maltu lipidová matrix zložená z voľných mastných kyselín, cholesterolu a ceramidov.<sup>6</sup> SC je väčšinou zložená z 10-25 vrstiev korneocytov obklopených lipidovou matrix. Korneocyty obsahujú vodu, keartín a ďalšie proteíny ako filaggrin, lorincrin a involucrin, ktoré tvoria zrohovatenú schránku na ktorú sa pripája monovrstva lipidov. Táto monovrstva ktorú označujeme ako korneocytálnu lipidovú obálku (CLE) potom pravdepodobne slúži ako základ pre formáciu a usporiadanie voľných intercelulárnych lipidových vrstiev (lamel)<sup>7,8</sup>, avšak CLE môže mať aj iné funkcie ako napríklad hydrofobizácia povrchu korneocytov. Cholesterol, voľné mastné kyseliny a ceramidy sú v týchto vrstvách zastúpené približne v rovnakom molárnom pomere, hmotnostný pomer zložiek je ale Cer  $\approx$  50 %, cholesterol  $\approx$  25 %, voľné mastné kyseliny  $\approx$  15 % kvôli značným rozdielom v molárnej hmotnosti molekúl.<sup>9,10</sup>

Extracelulárna lipidová matrix je zodpovedná za výslednú bariérovú funkciu. Lipidy SC sú organizované do mnohovrstevných štruktúr ktoré sú uložené jednotlivito nad sebou, tieto lipidy teda netvoria klasické dvojvrstvy ktoré tvoria napríklad fosfolipidy. Tie sú tvorené 2 nepolárnymi reťazcami a polárnou hlavou ktorá obsahuje fosfát (Obrázok 3A). Ich štruktúra sa teda líši hlavne vo veľkosti polárnej hlavy a dĺžke reťazcov, a preto je ich priestorové usporiadanie rozlišné (Obrázok 3B).<sup>11</sup>



Obrázok 3A Štruktúra fosfolipidu. Prevzaté z <https://quizlet.com/162066545/biomolekyler-flash-cards/>

Obrázok 3B Štruktúra ceramidu

Experimentálne pomocou elektronového mikroskopu a rentgenovej difrakcie boli v SC nájdené dve laminárne fázy ktoré sa podľa hrúbky rozdeľujeme na dlhú lamelárnu fázu (long periodicity phase, LPP, 13 nm) a krátku lamelárnu fázu (short periodicity phase, SPP, 6 nm).<sup>12</sup> Tvorba LPP je nevyhnutná pre správne fungovanie kože, jej absencia je spájaná s ochoreniami ako ichthyóza alebo atopická dermatitída.<sup>13</sup> Pre tvorbu LPP je nevyhnutná prítomnosť acylceramidov

s ultradlhými reťazcami ktoré sú typické pre epidermis, bez ich prítomnosti bola pozorovaná len SPP.<sup>14</sup>

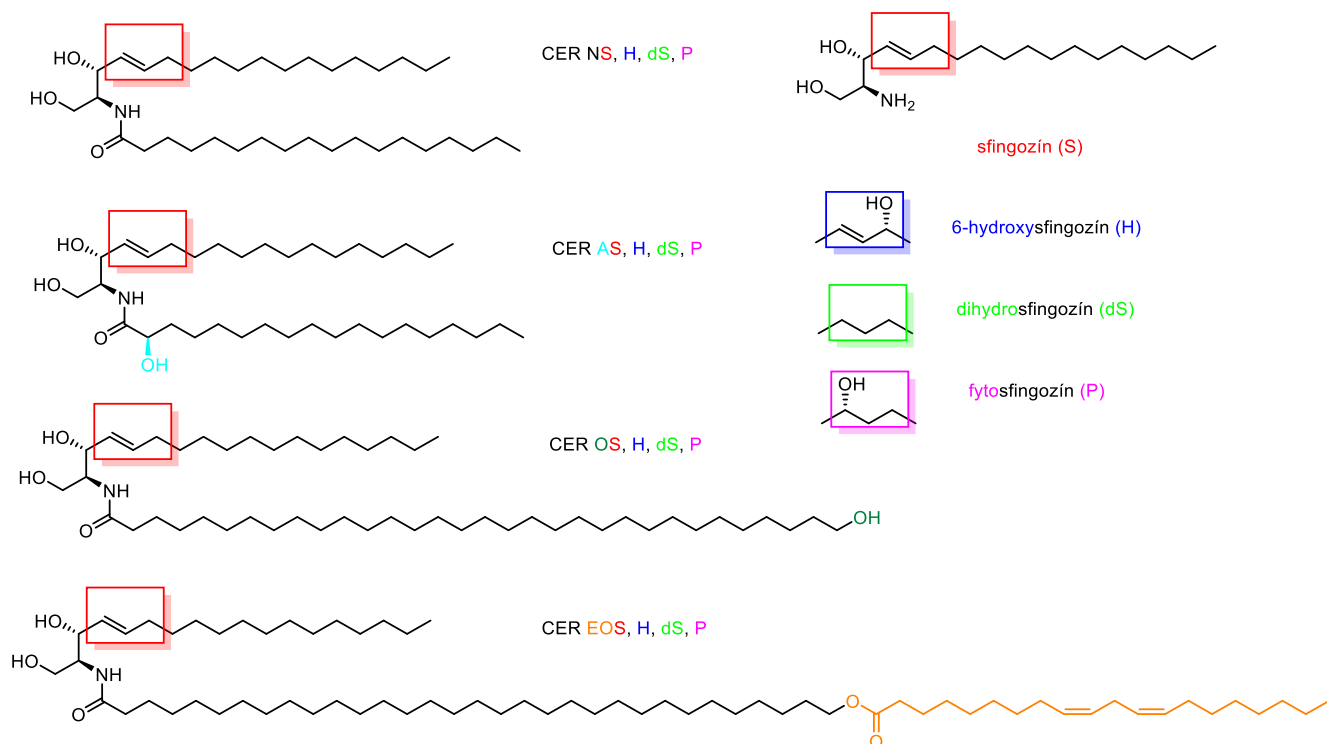
Skupina molekúl tvoriaca tieto lamely je značne heterogénna a rozdielne molekuly sa líšia aj svojou mobilitou v lamelárnej štruktúre. Mobilita týchto molekúl bola zisťovaná v experimentoch na značených molekulách, kde sa využitím <sup>2</sup>H nuklearnej magnetickej rezonancie v pevnej fázi sledovalo správanie značených častí molekúl. Výsledky indikovali, že acylové reťazce ceramidov, voľných mastných kyselín a cholesterol vykazujú správanie rigidné, na druhú stranu reťazce linoleátov u acylceramidov, rovnako ako reťazce sfingoidných bází ceramidov vykazujú správania fluidné.<sup>15–17</sup>

## Ceramidy

Ceramidy sú skupinou sfingolipidov, ktoré v tele zastupujú mnohé funkcie. Okrem toho, že sú súčasťou membrán a lipidovej matrix SC, slúžia ako posli a regulátorne molekuly pri prenose signálov, aktivácii enzýmov. Účastnia sa tiež regulácie bunkových procesov ako je rast, apoptóza, delenie buniek, odpoveď na stresové stimuly.<sup>18–20</sup>

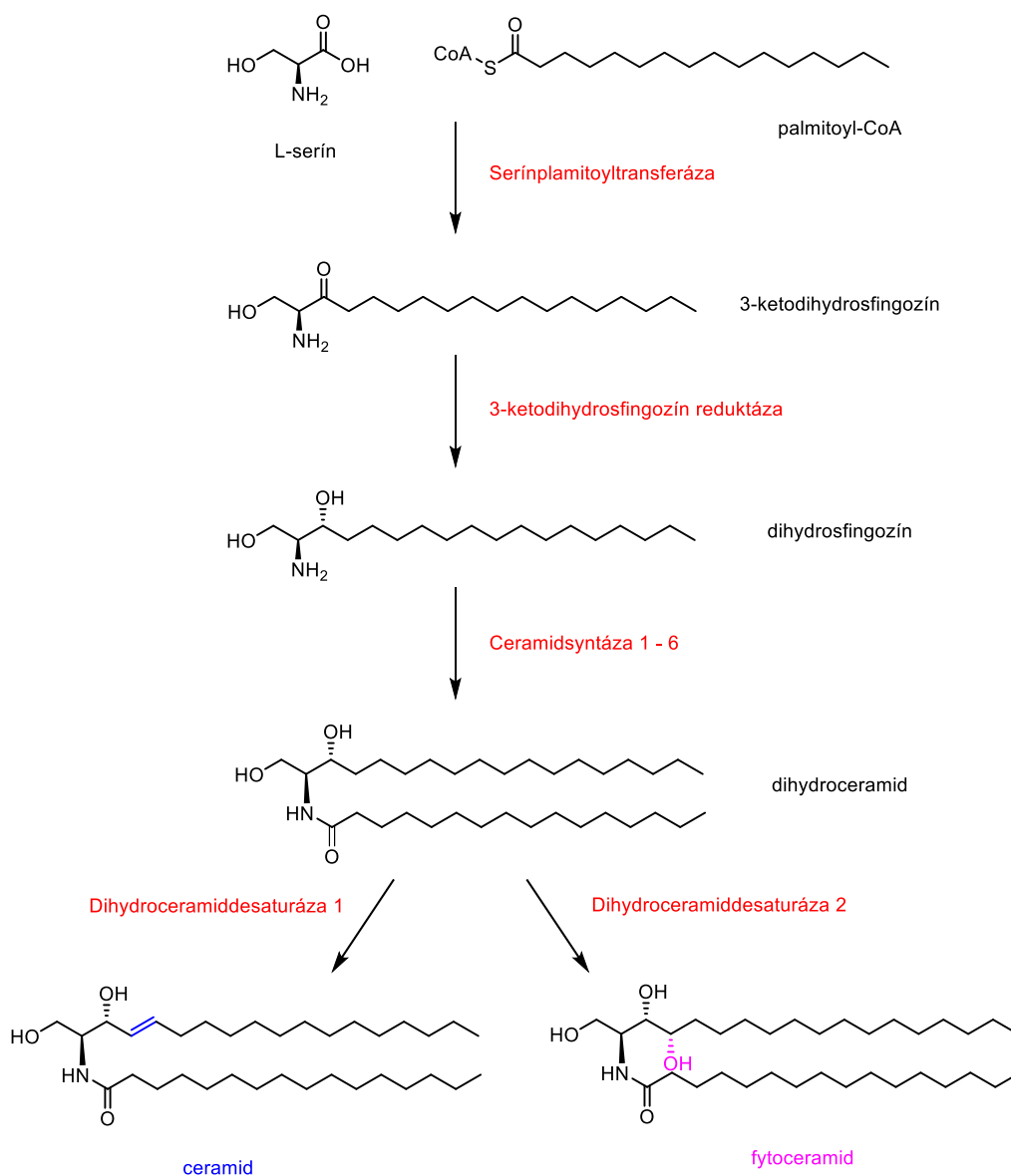
Ceramidy sa skladajú zo sfingoidnej báze a acylového reťazca ktoré sú spojené amidovou väzbou. Sfingoidná báza rovnako ako acyl majú rozdielne dĺžky reťazcov. Pre sfingoidné báze je dominantná dĺžka reťazca C<sub>18</sub>, ale dĺžka sa môže pohybovať od C<sub>12</sub> až do C<sub>26</sub>. Pre acylový reťazec sa dĺžka jeho reťazca pohybuje od C<sub>14</sub> až  $\geq$ C<sub>26</sub>.<sup>21</sup>

Celkovo bolo popísané veľké množstvo sfingoidných bází naprieč živočíšnou ríšou z nich však sme schopní vybrať 4 základné typy a to: sfingozín (S), 6-hydroxysfingozín (H), fytosfingozín (P), dihydrosfingozín (dS). U ceramidov je amino skupina týchto bází acylovaná mastnými kyselinami a to buď nenasýtenou (N),  $\alpha$ -hydroxylovanou (A) alebo  $\omega$ -hydroxylovanou (O) –  $\omega$ -hydroxylová skupina môže byť esterifikovaná kyselinou linolovou (EO).<sup>22</sup> Najpoužívanejšie názvoslovie na popísanie štruktúry ceramidov je upravená nomenklatúra podľa Motty et.al. Pozostáva z kombinácie písmen popisujúcich acyl (N, A, O, EO – E vyjadruje esterifikáciu hydroxyly) a sfingoidnú bázu (S, H, dS, P) ako je vidieť na obrázku 4.<sup>23</sup> K tomuto názvu je možné ešte pridať informáciu o dĺžke reťazcov a počte násobných väzieb v nich, na prvom mieste sa uvádza informácia o sfingoidnej bázi a na druhom o acyle napr.: Cer AS (18:1 /h18:0), popisuje ceramid tvorený sfingozínom o dĺžke C<sub>18</sub> a  $\alpha$ -hydroxylovanou mastnou kyselinou o dĺžke C<sub>18</sub> s nasýtenými väzbami.



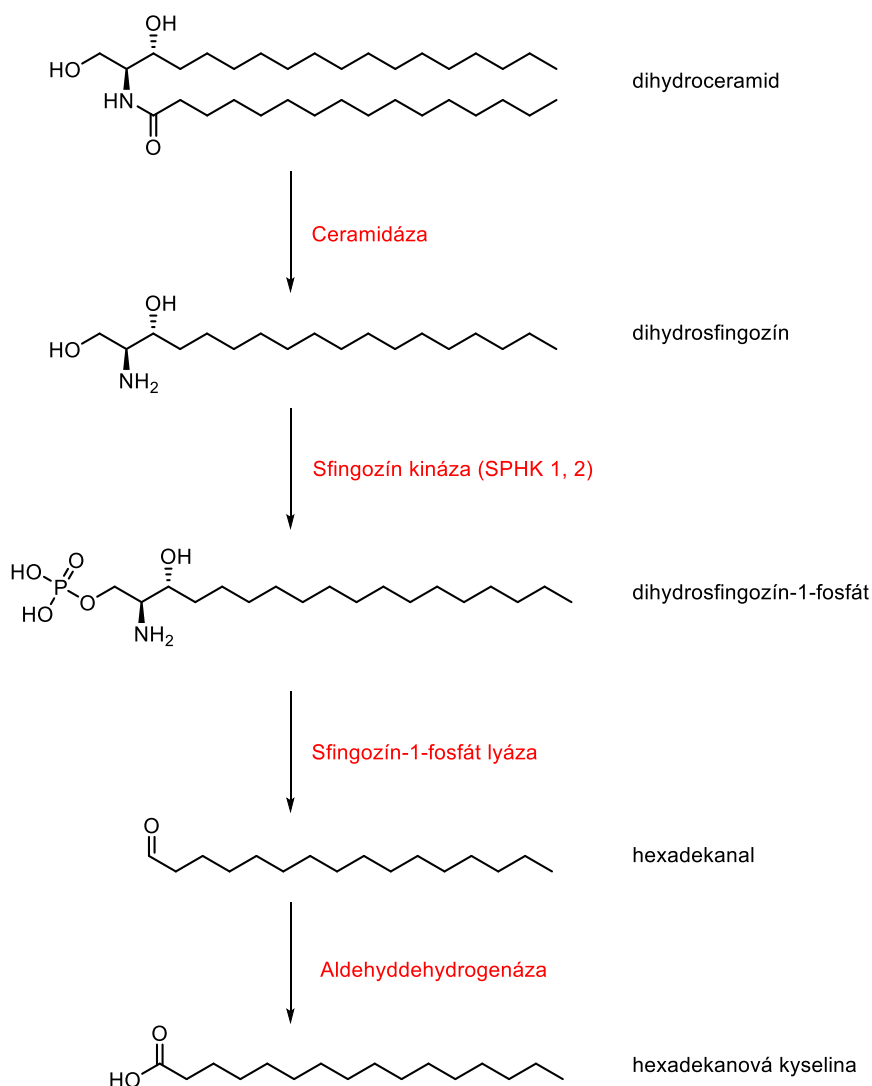
Obrázok 4 Prehľad štruktúr skupiny ceramidov

Biosyntéza ceramidov prebieha v endoplazmatickom retikule, začína kondenzáciou serínu s aktivovanou mastnou kyselinou (acyl-CoA) katalyzovanou enzýmom serinpalmitoyltransferázou (SPT) za vzniku 3-ketodihydrosfingozínu (Obrázok 5). Rýchlosť tohto kroku určuje rýchlosť celej syntézy, a preto je pomocou regulácie SPT možné regulovať hladinu ceramidov (sfingolipidov).<sup>24</sup> V ďalšom kroku je 3-ketodihydrosfingozín zredukovaný na dihydrosfingozín katalyzovaný 3-ketodihydrosfingozín reductázou.<sup>25</sup> Dihydrosfingozín je premenený na dihydroceramid kondenzáciou s acyl-CoA katalyzovanou ceramidsyntázou (CERS 1 – 6). Následne je dihydrosfingozín zredukovaný na sfingozín (dS na S) pomocou enzýmu dihydroceramiddesaturázou (DES1) alebo je premenený na fytosfingozín (dS na P) pomocou DES2.<sup>26,27</sup>



Obrázok 5 Schéma biosyntézy ceramidov

Degradácia ceramidov začína rozdelením na sfingoidnú bázu a mastnú kyselinu katalyzovaným ceramidázami (Obrázok 6).<sup>28</sup> Sfingoidná báza je v ďalšom kroku premenená na fosfát pôsobením sfingozín kinázami (SPHK1, 2).<sup>29</sup> Fosfát sfingoidnej báze je buď defosforylovaný znova na sfingoidnú bázu pomocou sfingozín-1-fosfát fosfatázy alebo je rozštipený na príslušný masný aldehyd a fosfoetanolamín pôsobením sfingozín-1-fosfát lyázy.<sup>30</sup> Masný aldehyd je nakoniec premenený na mastnú kyselinu aldehyddehydrogenázou (ALDH)<sup>31</sup>.

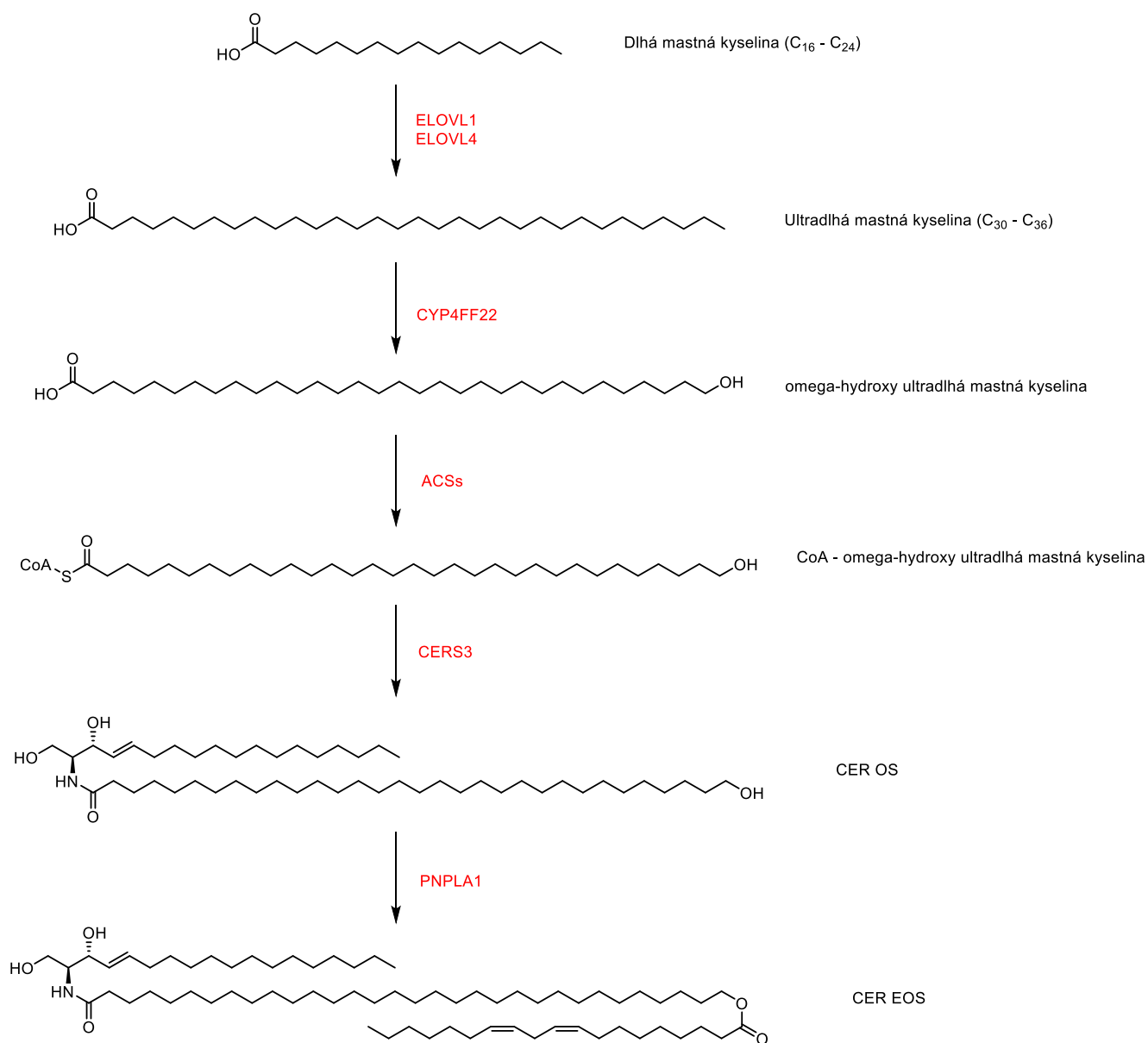


Obrázok 6 Schéma degradácie ceramidov

## Acylceramidy

Narozdiel od veľmi dlhých ceramidov sa na sfingoidnú bázu viaže ultradlhý acylový reťazec ( $C_{28} - C_{36}$ ) ktorého  $\omega$  hydroxylová skupina je esterifikovaná kyselinou linolovou, jedná sa teda o typ ceramidu EO. Acylceramidy tvoria asi 10 % z celkového množstva ceramidov, ich prítomnosť je ale nevyhnutná pre správnu barierovú funkciu kože nakoľko sa aktívne podieľajú na tvorbe CLE a LPP. Poruchy v ich biosyntéze resp. ich znížené hladiny sú spájané s nadmernou transepidermálnou stratou vody a poškodenou bariérovou funkciou kože,<sup>32-34</sup> ich nízke hladiny sa tiež objavujú pri ochoreniach ako atopická dermatitída, psoriáza alebo ichthyóza.<sup>13</sup>

Ultradlhý reťazec potrebný k sformovaniu acylceramidu je vytváraný z mastnej kyseliny pomocou elongáz mastných kyselín ELOVL1 a ELOVL4 (Obrázok 7), ktoré predlžujú mastnú kyselinu vždy o 2 uhliky.<sup>35</sup> Pri dostatočnej dĺžke reťazca nasleduje hydroxylácia  $\omega$  pozície ultradlkej mastnej kyseliny pomocou cytochrómu P450 (CYP4F22).<sup>36</sup> Takto pripravený ultradlhý reťazec je potom premenený na aktívnu formu pripojením CoA pomocou acyl-CoA syntetáz (ACSSs). K tomuto acyl-CoA je pripojená sfingoidná báza pomocou CERS3.<sup>33</sup> Nakoniec je  $\omega$ -hydroxyl esterifikovaný kyselinou linolovou katalyzovaný enzýmom patatin-like phospholipase domaincontaining protein 1 (PNPLA1). Kyselina linolová nutná k esterifikácii pochádza z triglyceridov z ktorých bola odštiepená pomocou lipáz, nepriamo tomu napomáha enzým ABHD5 ktorý ako kofaktor aktivuje lipázu.<sup>7</sup>



Obrázok 7 Schéma syntézy acylceramidov



Acylceramidy sú typické pre epidermis kde sa nachádzajú v dvoch formách, buď ako voľné, alebo sú kovalentne viazané na korneocyty. Mechanizmus ich kovalentného viazania na korneocyt začína peroxidáciou a následnou epoxy-alkohol derivatizáciou pôsobením dvoch lipoxygenáz (ALOX12B, ALOXE3).<sup>37</sup> V ďalšom kroku katalyzovaným SDR9C7 je vzniknutý epoxy-alkohol ďalej oxidovaný za vzniku reaktívneho epoxy-enónu ktorý má schopnosť viazať sa priamo na proteíny korneocytov a tým vzniká CLE.<sup>38</sup>

### **Nukleárna magnetická rezonancia v pevnej fázy**

Nukleárna magnetická rezonancia (NMR) je metóda ktorá využíva interakcii jadier atómov s nenulovým spinom s magnetickým poľom. V základnom stave sú spiny jadier usporiadané náhodne a majú rovnakú energiu, v silnom magnetickom poli sa spiny orientujú a rozdeľujú na dve hladiny s nižšou a vyššou energiou oproti počiatku. Po ožiarení týchto dvoch hladín radiofrekvenčným žiarením najčastejšie vo forme krátkych pulzov dôjde k excitácii jednotlivých spinov a po skončení ožarovania k deexcitácii. Vplyvom radiofrekvenčného pulzu dôjde k vytvoreniu napätia ktorá sa meria. Podľa typu sledovaného atómu sa jedná o spektra prvkov a ich izotopov napr. <sup>1</sup>H, <sup>2</sup>H, <sup>13</sup>C, <sup>19</sup>F, <sup>31</sup>P, atď..<sup>39</sup>

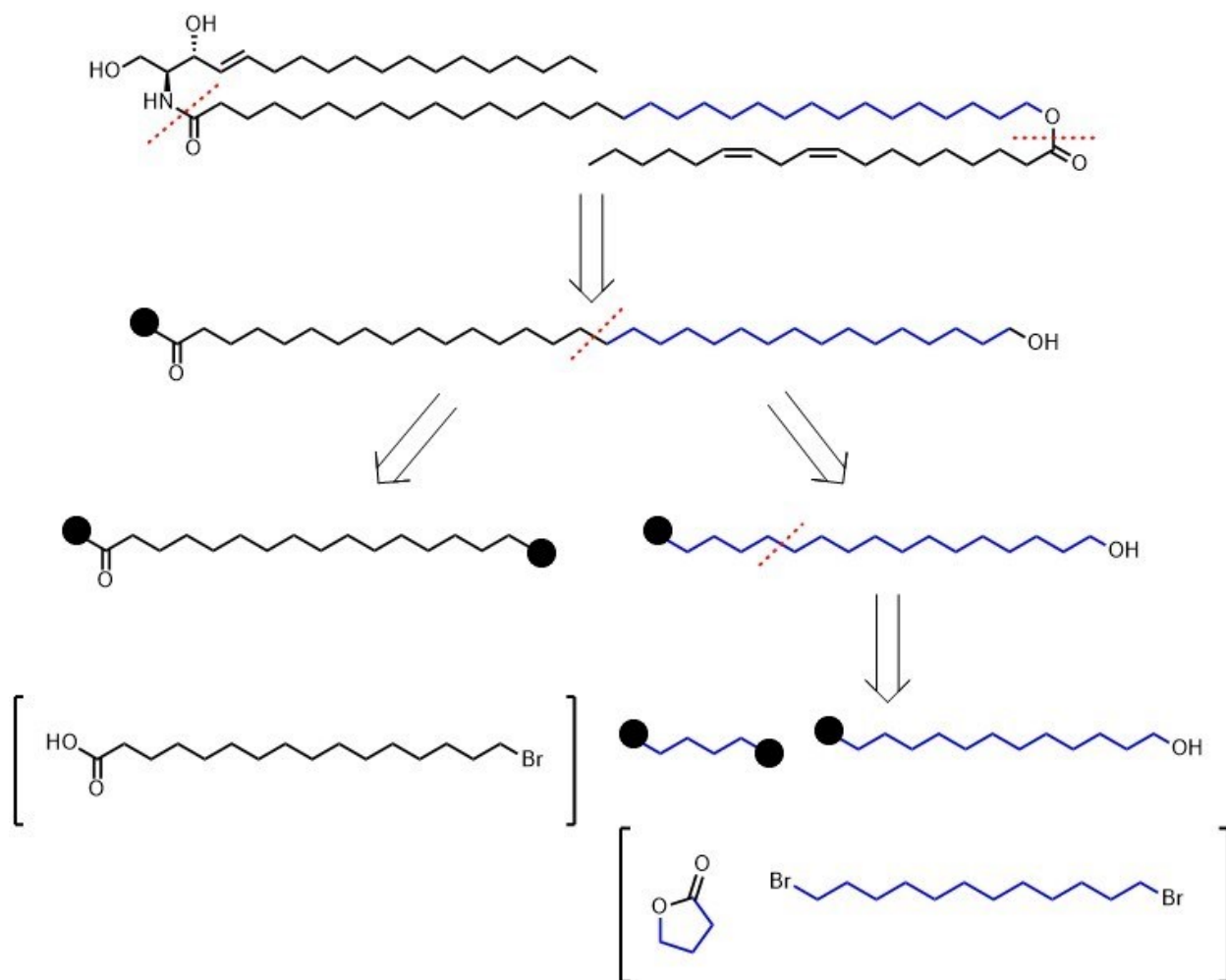
NMR analýza môže prebiehať rovnako v pevnej fázy alebo v roztoku. Tieto dve metódy sa však veľmi líšia svojím rozlíšením v spektrách. Dôvod tejto rozdielnosti je v množstve faktorov, ktoré ovplyvňujú NMR. Hlavným z týchto rozdielov je prítomnosť anizotropických interakcii. Tieto interakcie sú závislé na orientácii a v roztokoch, v ktorých dochádza k voľnému pohybu častíc ich nebudeme pozorovať. Na druhú stranu v pevnej fázy, kde je pohyblivosť značne menšia, všetky tieto interakcie nemôžu byť ignorované, a práve ich prítomnosť vedie k zníženiu rozlíšenia a ťažšej interpretácii spektier. Tieto interakcie nám sú ale tiež schopné poskytnúť potenciálne väčšie množstvo informácií o molekulárnom usporiadaní a mobilite molekúl použitím vhodných techník.<sup>40</sup>

Jednou z techník, ktorá sa používa k zníženiu anizotropických interakcií je takzvaný Magic Angle Spinning (MAS). Táto technika využíva fakt, že fyzickým rotovaním analyzovanej vzorky okolo osy v uhle 54°44' k smeru použitého magnetického poľa dôjde k spriemerovaniu anizotropických interakcií a tým zníži ich vplyv na rozširovanie signálov v spektre. Aj keď tieto interakcie môžu poskytnúť informácie napr. o symetrii molekuly ich prítomnosť v spektre môže v niektorých prípadoch značne komplikovať interpretáciu spektra. Podmienkou účinnosti tejto techniky je, že rýchlosť otáčania musí byť rovnako veľká (alebo väčšia) ako veľkosť vplyvu interakcie.<sup>41</sup>

Pri NMR v pevnej fázi je potrebné myslieť na to, že spektrá sú ovplyvnené aj symetriou kryštalickej štruktúry, ktorá môže mať vplyv na počet signálov ktoré bude v spektre viditeľné. V pevnej fázi totiž NMR reflektuje stav všetkých jadier vo vydelenej jednotke narozdiel od roztoku, kde reflektuje stav jednotlivých molekúl. Preto je pri analýze komplikovaných zmesí vhodné využiť značenie sledovaných častí izotopmi s nízkym prirodzením výskytom, čo zabezpečí lepšiu prehľadnosť spektra.<sup>42</sup>

## Výsledky a diskusia

Najprv bolo potrebné vytvoriť plán syntézy. Retrosyntetický postup z ktorého vychádzala naša syntéza je vidieť na Obrázku 8. Vo všetkých schémach bude vždy časť nesúca značenie deutériom znázornená modro. Rozbor začína molekulou acylceramidu, z ktorého je odštiepená sfingoidná báza a kyselina linolová. Tým sme sa dostali k základnému skeletu 32 uhlíkatému reťazcu, ktorý je v jednej svojej polovici deutérovanej. Tento reťazec sme potom rozdelili v polovici na deutérovajú a nedeutérovajú časť. Deutérovajú časť bola ďalej rozdelená na 4 a 12 uhlíkatý fragment kvôli komerčnej dostupnosti východných látok (1,16-disubstituovaná šestnásťuhlíkatá perdeuterovaná zlúčenina nie je komerčne dostupná). Analogicky by fungovalo rozdelenie na 8 + 8 uhlíkaté fragmenty, ale táto varianta by bolo finančne náročnejšia.



Obrázok 8 Retrosyntetický rozbor acylceramidu selektívne deuterovaného v ultradlhom reťazci

Z možností deuterovaných látok boli vybrané 1,12-dibromdodekan a  $\gamma$ -butyrolakton. Syntéza bola najprv optimalizovaná na ich nedeuterovaných formách z finančných dôvodov – deuterované látky sú násobne drahšie. Reakcie, ktoré boli využité pri optimalizácii syntézy nie sú

v experimentálnej časti prezentované, budú len diskutované v diskusii a v experimentálnej časti bude uvedená len finálna syntéza.

### **Príprava 12-brómdodekan-1-olu (3)**

Plán bol 1,12-dibrómdodekan acetylovať na 12-brómdodecyl acetát, ten ďalej bazicky štiepiť na 12-brómdodekanol (3). Náš prvý postup (1A, Obrázok 9) bol dibrómdodekan rozpustiť v *N,N*-dimetylformamide (DMF) a nechať ho reagovať s octanom sodným (0,95 ekv) pri 90 °C. Substitúcia brómu však nie je selektívna (východzia látka je symetrická), a preto sme získali kombináciu nezreagovaného dibrómdodekanu, mono a diacetátu. Znížením množstva octanu sme boli schopní zlepšiť pomer medzi požadovaným mono-acetátom a vedľajším produktom diacetátom. Výťažok tejto reakcie bol približne 50%. Reakciu by ale bolo potrebné viac krát opakovať, keďže takmer 30 % z použitého dibrómdodekanu nebolo zreagovaných. Tento postup nebol ideálny pre našu syntézu, keďže po reakcii sa nám nepodarilo vždy kvantitatívne izolovať východziu látku, čím by došlo k ďalšiemu zníženiu celkového výťažku po viacerých opakovaníach reakcie.

Nasledovalo štiepenie acetylu za vzniku 12-brómdodekanolu (3). Pre túto reakciu sme použili kyslé podmienky namiesto pôvodne zamýšľaných bazických ( $\text{LiAlH}_4$ ), keďže by pri nich došlo k substitúcii brómu za nukleofil. Kyslé štiepenie acetylu prebiehalo v metanole s prídavkom katalytického množstva  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pod refluxom 2,5 hodiny. Po skončení reakcie bolo nutné reakčnú zmes extrahovať a čistiť stĺpcovou chromatografiou. Výťažok tejto reakcie bol 65-75%.

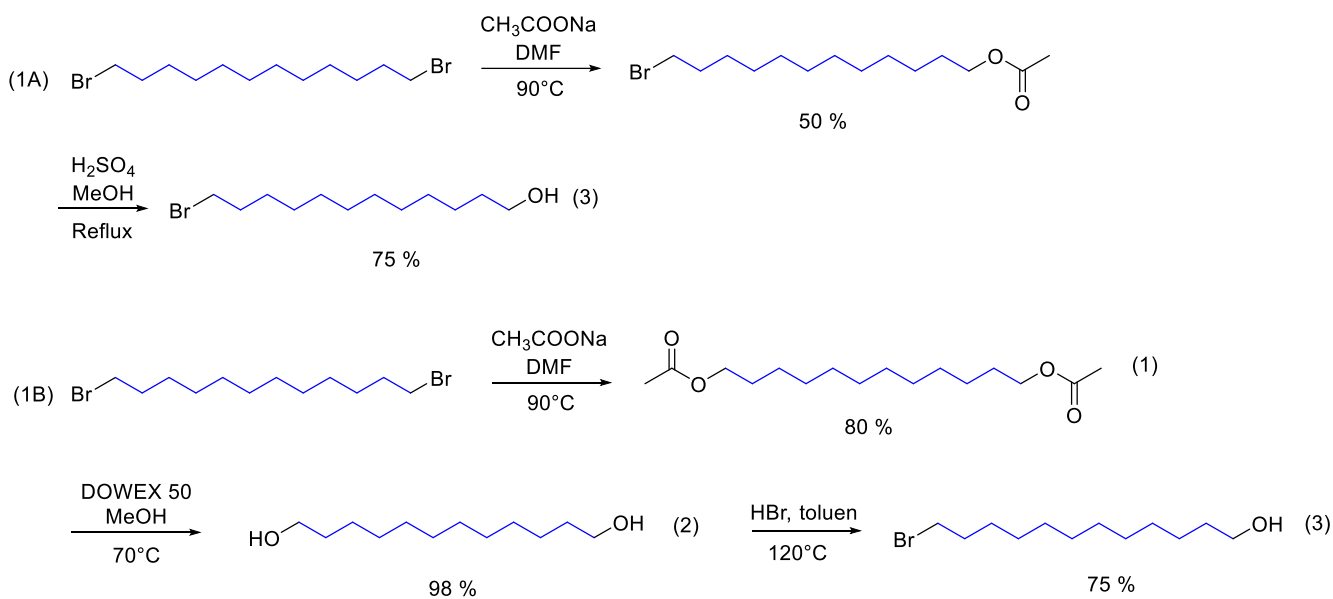
Postup ktorý sme nakoniec zvolili (1B) vychádza z relatívne selektívnej reakcie dodekan-1,12-diolu s kyselinou bromovodíkovou v toluéne. Dôvodom selektivity tejto reakcie sú rozdielne rozpustnosti možných produktov. Dodekan-1,12-diol sme schopní získať úplnou substitúciou brómov za acetylové skupiny a ich následným štiepením.

Substitúcia brómov prebiehala v DMF s nadbytkom octanu sodného za zvýšenej teploty, výťažok tejto reakcie dosahoval 80 %.

Pre štiepenie acetylov sme sa rozhodli namiesto  $\text{H}_2\text{SO}_4$  použiť kyslý DOWEX 50, jedná sa o živicu s naviazanými kyslými skupinami. Reakcia prebiehala v metanole, v ktorom bol DOWEX rozsuspendovaný. Čas nutný k úplnému zreagovaniu bol dlhší ale bolo ho možné skrátiť zvýšením teploty, keďže za laboratornej teploty reakcia mohla prebiehať aj 4 dni, pri teplote 70 °C bol reakčný čas 10 hodín dostačujúci. Výhodou použitia DOWEXu bola jednoduchosť spracovania reakcie, nakoľko DOWEX bol po skončení reakcie odfiltrovaný

a zbytok bol odparený bez nutnosti ďalšieho čistenia. Týmto spôsobom sme boli schopní dosiahnuť takmer kvantitatívne výtťažky.

Reakcia dodekan-1,12-diolu (2) s konc. HBr v toluéne bola pre nás kľúčová, keďže sme s jej pomocou boli schopní získať zo symetrickej molekuly asymetrickú. Dodekan-1,12-diol bol rozpustený v toluéne a zohraity až do refluxu, potom bola pridaná konc. HBr v miernom nadbytku (1,2 ekv.). Reakčný čas tejto reakcie bol 72 hodín, po tomto čase bolo stále veľká časť nezreagovaná a na TLC už bolo možné vidieť vznikajúci dibrómdodekan. Preto sme sa rozhodli reakciu zopakovať, no za týchto podmienok sme opakovane získavali výtťažky okolo 60 %. Kvôli tomu sme sa rozhodli u ďalších pokusoch častejšie kontrolovať reakčnú zmes. Po 2 hodinách na TLC bolo zreteľne vidieť, že len malá časť dodekandiolu nebola zreagovaná, preto sme sa rozhodli reakciu zastaviť a spracovať. Po 2 hodinách reakcie sme získali výtťažok 12-bromdodekanolu (3) okolo 75 % a len malé množstvo dodekan-1,12-diolu (2) ktoré mohlo podstúpiť reakciu znova čím by sme boli schopní výtťažok ešte zvýšiť.



Obrázok 9 Schéma prípravy 12-brómdodekan-1-olu (3)

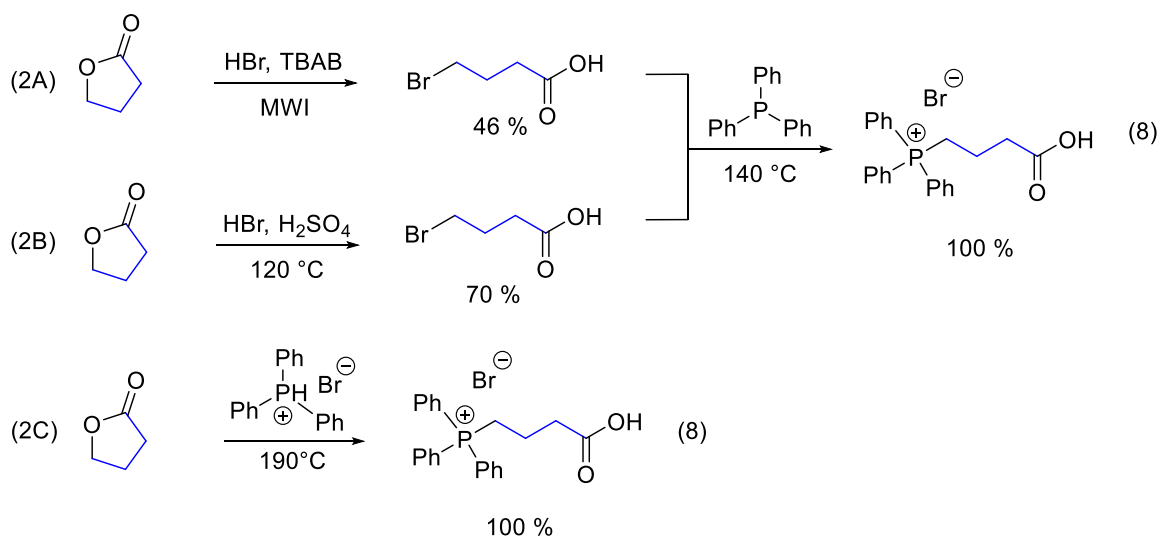
### Príprava fosfóniovej soli (8)

Náš plán bol premeniť butyrolakton na 4-brommaslovú kyselinu. Tá by sa v ďalšom kroku premieňala na fosfoniovú soľ reakciou s trifenyfosfinom. Problematickým krokom bolo otvorenie laktonového kruhu, pravdepodobne z dôvodu jeho vysokej stability.

Prvým prístupom (2A, Obrázok 10) ktorý sme skúšali bolo rozpustenie laktonu v konc. HBr s pridaním tetrabutylamónium bromidu ako fázového katalyzátora. Táto zmes bola potom podrobená mikrovlnnému ožarovaniu. Skúšali sme rôzne dĺžky reakčných časov (5 – 60 minút) a tiež rôzne energie, nepodarilo sa nám však dosiahnuť požadovaný výtťažok (vzhľadom k tomu, že sa jedná o viackrokovú syntézu s použitím finančne náročných prekursorov, každý jednotlivý výtťažok je dôležitý). Týmto postupom sme dosiahli maximálny výtťažok 46 %.

Alternatívnym postupom (2B) ktorý sme vyskúšali bolo rozpustenie laktónu v zmesi konc. HBr a konc. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, táto zmes sa potom zahrievala až do varu (približne 120 °C). Táto reakcia prebiehala 12 – 48 hodín pod refluxom. Výtťažky tohto postupu boli vyššie ale nepresahovali 70 %.

Nakoniec sme zvolili postup (2C) ktorým sme sa pokúsili obísť problematické otvorenie laktonového kruhu a to reakciou butyrolaktonu s trifenyľfosfín hydrobromidom. Táto reakcia prebiehala v tavenine pri teplote 190 °C. Zahrievaním reakčnej zmesi sa trifenyľfosfín hydrobromid postupne topil až bola celá reakčná zmes tekutá, po čase však začala reakčná zmes tuhnúť. Úplne stuhnutie indikovalo skončenie reakcie keďže vzniknutá fosfóniová soľ má teplotu topenia vyššiu než bola teplota reakčnej zmesi. Po vychladnutí bola zmes rozpustená v minimálnom možnom množstve CHCl<sub>3</sub> s malým prídavkom MeOH a následne bola precipitovaná dietyléterom. Po opakovanej precipitácii bolo možné získať až takmer kvantitatívne množstvo produktu.

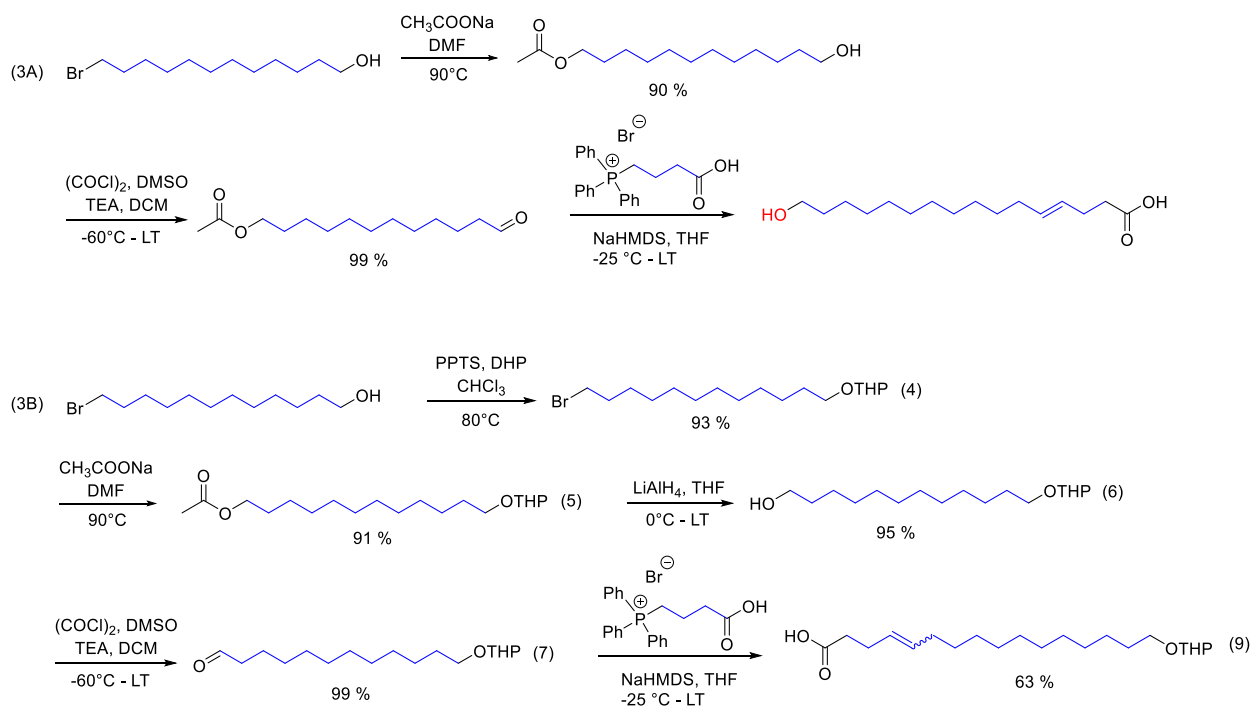


Obrázok 10 Schéma prípravy fosfóniovej soli (8)

## Príprava (*E/Z*)-16-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]hexadec-4-enevej kyseliny (9)

Najprv bolo nutné zabezpečiť aby sme pripravili aldehyd, ktorý bude mať na druhom konci reťazca chránenú hydroxylovú skupinu nutnú pre ďalšie kroky syntézy. Rozhodli sme sa preto substituovať bróm v 12-bromdodekanole za acetyl reakciou s octanom sodným v DMF (3A, Obrázok 11). Takto pripravený 12-hydroxydodecyl acetát sa oxidoval Swernovou oxidáciou na aldehyd. Aldehyd po pripravení vstupoval do Wittigovej reakcie s fosfóniovou soľou. Fosfóniová soľ bola pôsobením báze premenená na yllid (typická tmavo oranžová farba), ku ktorému bol po čase pridaný aldehyd. Táto Wittigova reakcia však neposkytla požadovaný produkt, z tejto reakčnej zmesi sa nám podarilo izolovať nechcený produkt s ochránenou acetylovou skupinou čo nám signalizovalo že je potrebné použiť iné chránenie pre hydroxylovú skupinu.

Najprv sme hydroxylovú skupinu 12-bromdodekanolu ochránili pomocou dihydropyranu a následne sme substituovali bróm za acetyl, ktorý sme potom bazicky štiepili využitím  $\text{LiAlH}_4$ . Takto sme získali dodekan na jednej strane s voľnou a na druhej strane s ochránenou hydroxylovou skupinou (6). Voľná hydroxylová skupina bola Swernovou oxidáciou premenená na aldehyd (7) a ten vstupoval do Wittigovej reakcie s fosfóniovou soľou (8). Pri tejto Wittigovej reakcii bolo nutné optimalizovať podmienky, keďže prvé pokusy neposkytovali požadované výťažky. Predĺžením dĺžky tvorby yllidu z 30 minút na 60 minút pri teplote  $-25^\circ\text{C}$  sme dosiahli výťažok 63 % ktorý bol pre náš plán dostačujúci.



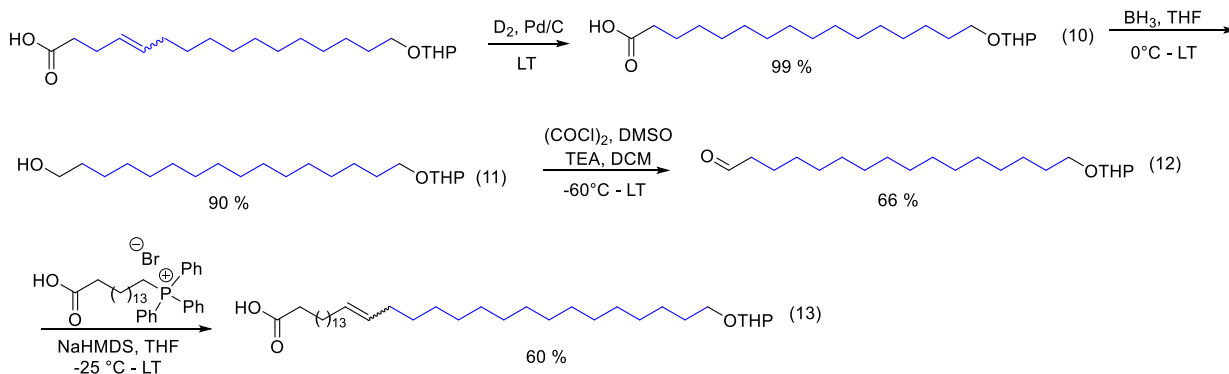
Obrázok 11 Schéma prípravy (*E/Z*)-16-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]hexadec-4-enevej kyseliny (9)

### Príprava (*E/Z*)-32-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]dotriakont-16-enevej kyseliny (13)

Po Wittigovej reakcii sme teda získali (*E/Z*)-16-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]hexadec-4-enovú kyselinu (9). Pre ďalšiu Wittigovú reakciu sme potrebovali premeniť karboxylovú skupinu na aldehyd. Rozhodli sme sa pre úplnú redukciu na alkohol použitím  $\text{BH}_3$  v tetrahydrofuráne a potom následnú oxidáciu na aldehyd Swernovou oxidáciou (Obrázok 12). Priama redukcia karboxylovej kyseliny na aldehyd je náročnejšia než tento dvojkrokový postup, ktorý navyše prebiehal s vysokými výťažkami.

Pred redukciou boranom bolo nutné najprv nasýtiť dvojité väzbu ktorá vznikla po Wittigovej reakcii inak by prebehla jej hydroborácia. Pre nasýtenie dvojitej väzby sme sa rozhodli vykonať redukciu pomocou prístroja H-CUBE, ktorá dokáže využiť  $\text{D}_2\text{O}$  ako zdroj  $\text{D}_2$  na redukciu dvojitých väzieb. Nenasýtenú kyselinu bolo nutné rozpustiť v EtOAc a preniesť do valca, z ktorého sa roztok nasával do H-CUBE. Celkový výťažok tejto redukcie bol 72 %. Je to nižší výťažok ako pri klasickej deuterácii na Pd katalyzátore, ktorá prebieha takmer kvantitatívne. Nižší výťažok sa dá vysvetliť horšou rozpustnosťou našej kyseliny v požadovanom rozpúšťadle a jej precipitáciou.

Po nasýtení dvojitej väzby bola karboxylová skupina zredukovaná na hydroxylovú využitím komplexu  $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$  (11). Táto redukcia prebiehala s výťažkom okolo 90 %. Následne bol vzniknutý alkohol zoxidovaný Swernovou oxidáciou na aldehyd a tým bol pripravený na ďalšiu Wittigovu reakciu s fosfóniovou soľou s 16 uhlíkatým reťazcom (v tomto prípade nedeutérovaným, ktorého syntéza bola optimalizovaná v rámci iného projektu). Táto Wittigova reakcia prebiehala bez problémov a jej podmienky nebolo nutné optimalizovať. Po tejto reakcii sme získali (*E/Z*)-32-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]dotriakont-16-enu kyselinu (13), čo je 32 uhlíkatý reťazec, ktorý je základom nami pripravovaného acylceramidu.

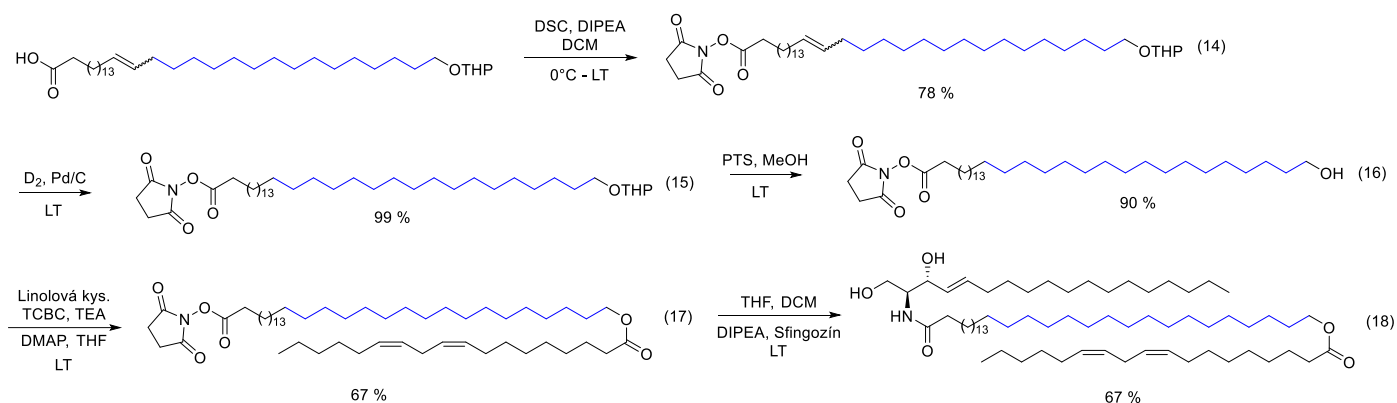


Obrázok 12 Schéma prípravy (*E/Z*)-32-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]dotriakont-16-enevej kyseliny (13)



## Príprava ceramidu EOS (18)

Po príprave 32 uhlíkatého reťazca bolo potrebné modifikovať substituenty (Obrázok 18). Najprv bola reakciou s disukcínimidyl karbonátom aktivovaná karboxylová skupina (čo viedlo aj k zlepšeniu rozpustnosti látky), táto reakcia prebiehala s výťažkom 80 % (Obrázok 13). Po aktivácii sme nasýtili dvojitú väzbu ktorá vznikla pri Wittigovej reakcii (15). Reakcia prebiehala v atmosfére  $D_2$  na Pd katalyzátore za intenzívneho miešania a poskytla takmer kvantitatívny výťažok. Po potvrdení nasýtenia dvojitej väzby pomocou NMR, produkt pokračoval do ďalšej reakcie bez dodatočného čistenia. V ďalšej reakcii bola pomocou *p*-toluensulfónovej kyseliny ochránená hydroxylová skupina, táto reakcia poskytovala výťažky okolo 85 % (16). Voľný hydroxyl po ochránení bol esterifikovaný kyselinou linolovou využitím Yamaguchiho esterifikácie ktorej výťažok bol 80 % (17). Posledným krokom syntézy bolo naviazanie sfingodinej báze. Sfingoidná báza sa v prítomnosti *N,N*-diisopropyletylamínu naviazala na aktivovanú kyselinu, s ktorou sa spojila vytvorením amidovej väzby a finálneho produktu, selektívne deuterovaného acylceramidu (18).



Obrázok 13 Schéma prípravy finálneho ceramidu (18)

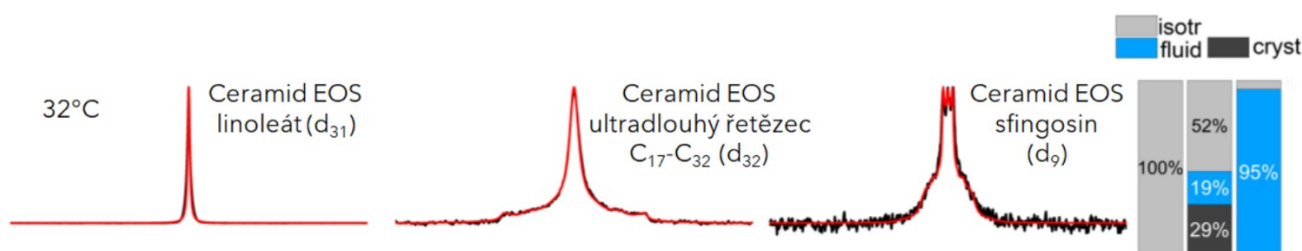
## Zhrnutie syntézy

Finálnu syntézu sme začali s 1000 mg g  $d_{24}$ -1,12-dibromdodekanu a 500 mg  $d_6$ - $\gamma$ -butyrolaktónu. Butyrolaktón bol prevedný na 1700 mg fosfóniovej soli, 1,12-dibromdodekan bol prevedený na 460 mg 12-bromdodekan-1-olu. Ten bol ďalej premenený na aldehyd a po Wittigovej reakcii s fosfóniovou soľou poskytol 281 mg  $d_{28}$ -(*E/Z*)-16-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]hexadec-4-eneovej kyseliny, ktorá tvorí deuterovanú časť nášho acylceramidu. Náš deuterovaný reťazec bol premenený na aldehyd a podstúpil druhú Wittigovú reakciu ktorej produktom bolo 65 mg  $d_{32}$ -(*E/Z*)-32-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]dotriakont-16-eneovej kyseliny. Táto kyselina bola ďalej modifikovaná a v piatich krokoch premenená na acylceramid s požadovaným značením

v ultradlhom reťazci. Finálneho produktu bolo nakoniec získaných 12 mg. Syntéza celkovo sčíta 18 krokov s celkovým výťažkom 2 %.

### Solid state NMR

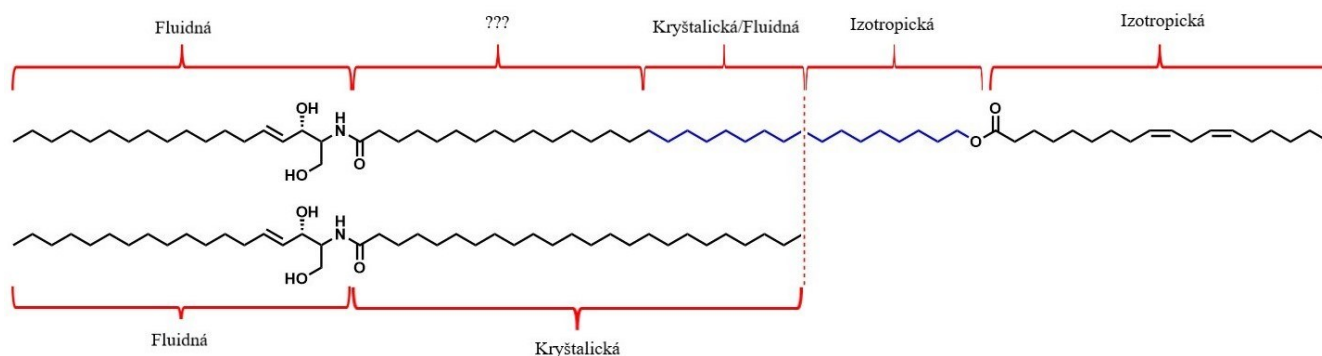
Výstupom tejto syntézy bol acylceramid použitý k vytvoreniu lipidovej zmesi simulujúcej zloženie lipidov extracelulárnych priestorov SC. Konkrétne prípravu vzorku a samotné meranie ssNMR mali na starosť spolupracovníci z Univerzity v Lipsku, menovite Ferdinand Fandrei a Daniel Huster. Následne bola pomocou solid state  $^2\text{H}$  NMR analýzy v tejto zmesi pozorovaná mobilita značenej časti acylceramidu pri rozdielnych teplotách (na Obrázku 14 ukázané za fyziologickej teploty kože). Výsledky sú interpretované z tvaru spektra ktoré meranie poskytlo. Ako je vidieť na Obrázku 14 mobilita v ľavej časti, ktorá je venovaná chovaniu linoleátu v acylceramidoch (merané v rámci iného projektu), táto časť je plne izotropická, čo znamená vysoko neusporiadaná a mobilná. Mobilita sfingozínového reťazca v acylceramidoch bola rovnako meraná v rámci iného projektu a z tvaru spektra vyplýva, že tento reťazec sa chová fluidne, stále s pomerne značnou mobilitou. Mobilita značenej časti (medzi  $\text{C}_{17}$  –  $\text{C}_{32}$ ) ultradlného reťazca je zobrazená v prostrednej časti Obrázku 14 a ma dvojitý charakter. Časť ultradlného reťazca bližšie k linoleátu vykazuje rovnako ako on izotropické správanie. Druhá polovica tohto reťazca prechádza cez fluidný stav až k rigidnému kryštalickému. Doplňujúcou informáciou k tomuto experimentu bude analýza mobility druhej polovice ultradlného reťazca ktorú sme v tejto práci neskúmali, ale budeme sa jej venovať v budúcnosti.



Obrázok 14 ssNMR spektra pre deuteriom značený linoleát (vľavo), značený ultradlhý reťazec medzi  $\text{C}_{17}$  –  $\text{C}_{32}$  (uprostred) a reťazec sfingozínu (vpravo).

Na obrázku 15 je potom vysvetlené, akým spôsobom si predstavujeme usporiadanie jednotlivých reťazcov acylceramidov v medzibunkových priestoroch SC. Reťazec sfingodinej báze ceramidu spoločne s reťazcami sfingoidných bázi ostatných ceramidov smerujú na jednu stranu a sú fluidné. Reťazec linoleátu je potom izotropický, teda veľmi neusporiadaný a mobilný

(pravdepodobne kvôli prítomnosti dvoch násobných väzieb v reťazci). Ultradlhý reťazec je až po úroveň dĺžky veľmidlhých reťazcov ceramidov stále neusporiadaný, avšak od tohto bodu je ďalej už lepšie usporiadaný, z malej časti fluidný a ďalej kryštalický s minimálnou mobilitou, čo odpovedá zisteniam u veľmidlhých ceramidov, ktorých acylový reťazec je praktický úplne kryštalický.



Obrázok 15 Usporiadanie a mobilita reťazcov ceramidov

## Experimentálna časť

### Chemikálie

Všetky chemikálie, rozpúšťadlá a východzie látky použité pri syntéze pochádzali od zaužívaných dodávateľov: Penta chemicals (Praha, ČR) a MERCK (Darmstadt, Nemecko) a boli použité bez ďalšieho čistenia. Perdeuterované zlúčeniny  $d_{24}$ -1,12-dibromdodekan a  $d_6$ - $\gamma$ -butyrolakton boli zakúpené od CDN Isotopes (Pointe-Claire, Kanada)

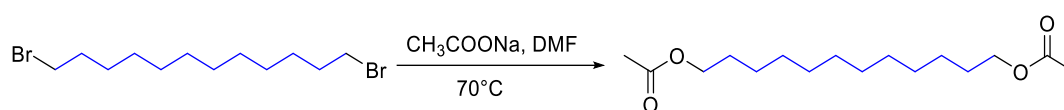
### Obecné informácie a prístroje

Na kontrolu čistoty produktov a priebehu reakcií bola použitá TLC na hlinikových doskách so silika-gelom 60 F254, Kieselgel 60 od firmy MERCK. Na detekciu bol použitý roztok  $Ce(SO_4)_2$  s  $H_3[P(Mo_3O_{10})_4]$  v kyseline sírovej.

$^1H$  a  $^{13}C$  NMR spektrá boli merané v roztokoch  $CDCl_3$  a MeOD na prístroji VARIAN VNMR S500 (Palo Alto, CA, USA) alebo Jeol JNM-ECZ600R (Tokio, Japonsko), IR spektrá boli získané za pomoci prístroja NICOLET 6700 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) s ATR sondou, teploty topenia boli zmerané za použitia Koflerovho bloku, deuterácia bola prevedená pomocou prístroja H-CUBE Pro (ThalesNano, Budapešť, Maďarsko)

### Syntéza

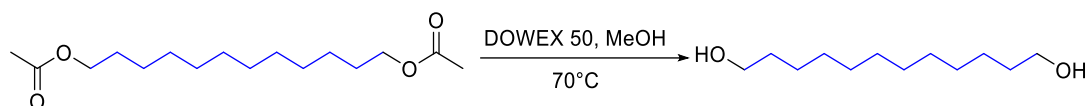
#### $d_{24}$ -1,12-diacetoxydodekan (1)



1,0 g  $d_{24}$ -1,12-dibromdodekanu (2,85 mmol) a 1,0 g octanu sodného (12,1 mmol) boli rozpustené v 60 ml DMF a za stáleho miešania pri teplote 100 °C reakcia prebiehala 3 hodiny. Po skončení bolo DMF odparené za zníženého tlaku vytvorením azeotropnej zmesi s toluénom a produkt bol čistený stĺpcovou chromatografiou (hexan/EtOAc 30:1). Bolo izolovaných 680 mg produktu ako biela kryštalická látka čo odpovedá 77 % výťažku.

Charakterizácia:  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  2.05 (s, 6H).  $^{13}C$  NMR (126 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  171.24, 20.99. IR 2193, 2089, 1729, 1372, 1270, 1225. Teplota topenia 32 – 34 °C.

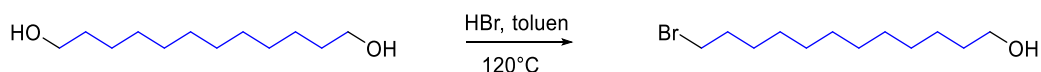
### **d<sub>24</sub>-dodekan-1,12-diol (2)**



677 mg produktu (1) (2,18 mmol) bolo rozpustených v 40 ml MeOH, v tomto roztoku bolo rozsuspendovaných 360 mg DOWEX 50 (53 % w/w). Reakcia prebiehala cez noc za stáleho miešania za refluxu. Po skončení reakcie bol DOWEX 50 odfiltrovaný, rozpúšťadlo bolo odparené a produkt bol čistený stĺpcovou chromatografiou (hexan/EtOAc 2:1). Bolo izolovaných 463 mg produktu ako biela kryštalická látka čo odpovedá 94 % výťažku.

Charakterizácia: <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, MeOD) δ 4.82 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, MeOD) žiadne signály. IR 3403, 3337, 2199, 2089, 1745. Teplota topenia: 77 – 78 °C.

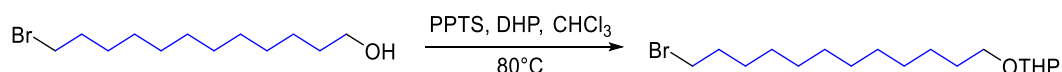
### **d<sub>24</sub>-12-bromododekan-1-ol (3)**



457 mg produktu (2) (2,02 mmol) bolo rozpustených v 15 ml toluenu a zahriatých do varu. Potom sa po kvapkách pridalo 0,3 ml konc. HBr 48 % (2,62 mmol) a reakcia prebiehala za refluxu 90 minút. Po vychladnutí bola reakčná zmes zriedená dietyleterom a premytá 1 M roztokom NaOH a nasýteným roztokom NaCl. Organická fáza bola odparená za zníženého tlaku a produkt bol ďalej čistený stĺpcovou chromatografiou (hexan/EtOAc 15:1). Nezreagovaná východzia látka bola znova rozpustená v 10 ml toluenu a znova zreagovaná s 0,1 ml konc. HBr. Celkovo po oboch cykloch reakcie bolo izolovaných 465 mg produktu ako žltý olej čo odpovedá 80 % výťažku.

Charakterizácia: <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) žiadne signály. <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) žiadne signály. IR 3391, 3325, 2195, 2090, 1745

### **2-[(d<sub>24</sub>-12-bromododecyl)oxy]tetrahydro-2H-pyran (4)**

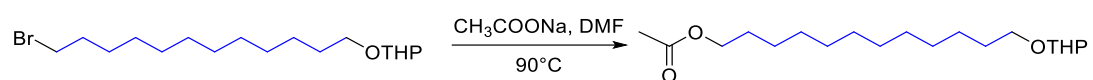


435 mg produktu (3) (1,5 mmol) bolo spolu s 152 mg (0,6 mmol) pyridinium p-tolueonsulfonátu vysušené na hlbokom vákuu a v banke uzavreté pod atmosféru Ar. Do banky bolo cez septum

pridaných 7 ml suchého  $\text{CHCl}_3$  a 280  $\mu\text{l}$  (3,0 mmol) dihydropyranu. Po 3 hodinách miešania reakčnej zmesi pri refluxe bola reakcia zastavená pridaním vody. Reakčná zmes bola 3× extrahovaná 15 ml  $\text{CHCl}_3$  a po odparení organickej fáze bol produkt čistený stĺpcovou chromatografiou (hexan/EtOAc 50:1). Bolo izolovaných 524 mg produktu ako žltý olej čo odpovedá 94 % výťažku.

Charakterizácia:  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.66 – 4.50 (m, 1H), 3.97 – 3.81 (m, 1H), 3.58 – 3.44 (m, 1H), 1.93 – 1.77 (m, 1H), 1.78 – 1.66 (m, 1H), 1.65 – 1.46 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  98.80, 62.35, 30.79, 25.50, 19.71. IR 2941, 2197, 2096

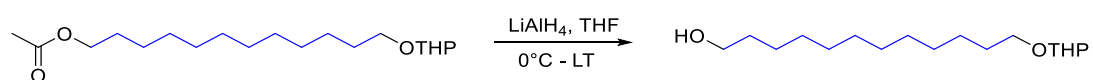
### **d<sub>24</sub>-12-[(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]dodecyl acetát (5)**



512 mg produktu (4) (1,4 mmol) bolo spolu s 225 mg (2,8 mmol) octanu sodného rozpustené v 12 ml DMF a za stáleho miešania pri teplote 100 °C reakcia prebiehala 3 hodiny. Po skončení bol DMF odparený za zníženého tlaku vytvorením azeotropnej zmesi s toluenom a produkt bol čistený stĺpcovou chromatografiou (hexan/EtOAc 30:1). Bolo izolovaných 444 mg produktu ako bezfarebný olej čo odpovedá 91 % výťažku.

Charakterizácia:  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.59 – 4.51 (m, 1H), 3.92 – 3.79 (m, 1H), 3.53 – 3.44 (m, 1H), 2.02 (s, 3H), 1.88 – 1.76 (m, 1H), 1.73 – 1.65 (m, 1H), 1.61 – 1.46 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  171.35, 98.90, 62.44, 30.89, 25.60, 21.10, 19.81. IR 2941, 2199, 2097, 1739.

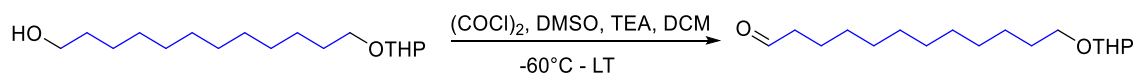
### **d<sub>24</sub>-12-[(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]dodekan-1-ol (6)**



431 mg produktu (5) (1,2 mmol) bolo vysušené na hlbokom vákuu, rozpustené v 9 ml suchého THF a ochladené v kúpeli s ľadom na približne 0 °C. Potom boli po kvapkách pridané 3 ml (3,0 mmol) 1 M roztoku  $\text{LiAlH}_4$  v THF, banka bola vybratá z kúpeľa a reakcia prebiehala pri laboratórnej teplote (LT) cez noc. Reakcia bola zastavená pomalým pridávaním vody a bola extrahovaná 3× 15 ml  $\text{CHCl}_3$ , organická fáza bola odparená za zníženého tlaku a produkt bol čistený stĺpcovou chromatografiou (hexan/EtOAc 6:1). Bolo izolovaných 361 mg produktu ako slabožltý olej, čo odpovedá 95 % výťažku.

Charakterizácia:  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.57 – 4.53 (m, 1H), 3.90 – 3.81 (m, 1H), 3.51 – 3.44 (m, 1H), 1.86 – 1.76 (m, 1H), 1.74 – 1.65 (m, 1H), 1.62 – 1.43 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  98.90, 62.43, 30.88, 25.59, 19.79. IR 3356, 2941, 2197, 2094.

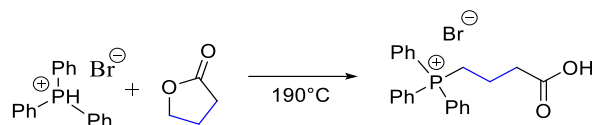
### **d<sub>23</sub>-12-[(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]dodekanal (7)**



Do uzavretej, vyžíhanej banky s atmosférou Ar bolo vložených 185  $\mu\text{l}$  (2,1 mmol) oxalylchloridu a 10 ml suchého DCM. Táto banka bola ochladená na  $-60\text{ }^\circ\text{C}$  a bolo pridaných 350  $\mu\text{l}$  (4,6 mmol) suchého DMSO v 5 ml suchého DCM. Po 10 minútach miešania bolo pridaných 355 mg (1,2 mmol) produktu (6) (ktorý bol vopred vysušený na hlbokom vákuu) v 5 ml suchého DCM a reakčná zmes bola ponechaná za stáleho miešania pri teplote  $-60\text{ }^\circ\text{C}$  90 minút. Po 90 minútach bolo pridaných 450  $\mu\text{l}$  (4,6 mmol) suchého trietylamínu, chladenie bolo vypnuté a reakcia prebiehala cez noc pri LT. Reakcia bola zastavená pridaním nasýteného roztoku NaCl a extrahovaná  $3 \times 15\text{ ml}$   $\text{CHCl}_3$ . Organická fáza bola odparená za zníženého tlaku a produkt bol ďalej čistený stĺpcovou chromatografiou (hexan/EtOAc 15:1). Bolo izolovaných 238 mg produktu ako bezfarebný olej čo odpovedá 68 % výt'ážku.

Charakterizácia:  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.60 – 4.55 (m, 1H), 3.92 – 3.84 (m, 1H), 3.55 – 3.45 (m, 1H), 1.89 – 1.77 (m, 1H), 1.77 – 1.66 (m, 1H), 1.63 – 1.44 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  98.80, 62.34, 30.79, 25.49, 19.71. IR 2941, 2198, 2095, 1712.

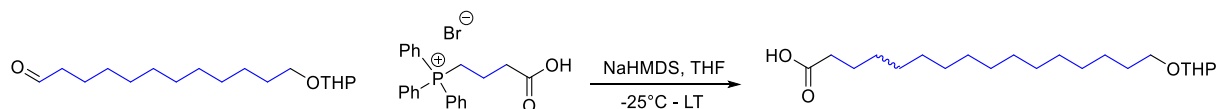
### **d<sub>6</sub>-(3-karboxypropyl)trifenylfosfónium bromid (8)**



1416 mg (4,1 mmol) trifenyfosfónium bromidu bolo spolu s 401 mg (4,3 mmol)  $d_6$ - $\gamma$ -butyrolaktonu vložených do banky a zmes sa zahrievala 3 hodiny na  $190\text{ }^\circ\text{C}$  až kým sa nevytvorila tavenina ktorá postupne stuhla. Po skončení reakcie bola reakčná zmes rozpustená v minimálnom množstve  $\text{CHCl}_3$  s prídavkom MeOH a následne precipitovaná vopred vychladeným diethyletherom. Z roztoku precipitovaný produkt bol vysušený a zvážený. Bolo izolovaných 1470 mg produktu ako biela kryštalická látka čo odpovedá 82 % výt'ážku.

Charakterizácia:  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz, MeOD)  $\delta$  7.91 – 7.85 (m, 3H), 7.85 – 7.79 (m, 6H), 7.78 – 7.71 (m, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz, MeOD)  $\delta$  174.37, 135.04, 133.56, 133.49, 130.30, 130.21, 118.69, 118.13.

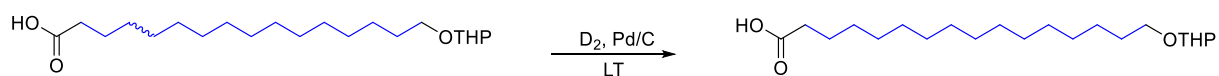
### **d<sub>28</sub>-(E/Z)-16-[(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]hexadec-4-enoja kyselina (9)**



1040 mg (2,4 mmol) produktu (8) bolo vysušených na hlbokom vákuu, rozpusednovaných v 5 ml suchého THF a ochladených na  $-30\text{ }^\circ\text{C}$ . Po ochladiení bolo pridaných 5,5 (5,5 mmol) ml 1 M NaHMDS a 60 minút prebiehalo tvorenie yllidu. Po hodine bolo pridaných 227 mg (0,7 mmol) produktu (7) v 5 ml suchého THF. Po 30 minútach bolo vypnuté chladienie a reakcia prebiehala cez noc za LT. Reakcia bola zastavená pridaním 20 ml nasýteného roztoku  $\text{NH}_4\text{Cl}$  a po okyslení HCl na  $\text{pH}=1$  extrahovaná  $3 \times 50$  ml  $\text{CHCl}_3$ . Produkt bol ďalej čistený stĺpcovou chromatografiou (hexan/EtOAc 15:1 + 0,5 % kyseliny octovej). Bolo izolovaných 180 mg produktu ako biely olej čo odpovedá 63 % výt'azku.

Charakterizácia:  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.59 – 4.55 (m, 1H), 3.90 – 3.83 (m, 1H), 3.52 – 3.45 (m, 1H), 1.87 – 1.76 (m, 1H), 1.74 – 1.65 (m, 1H), 1.63 – 1.44 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  178.67, 126.90, 98.90, 62.43, 30.86, 25.57, 19.77. IR 2941, 2197, 2095, 1737, 1709.

### **d<sub>30</sub>-16-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)hexadekanova kyselina (10)**

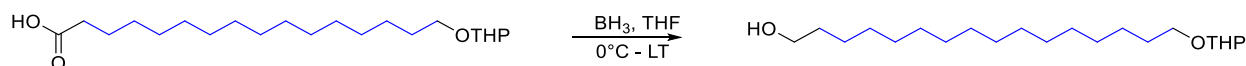


160 mg (0,4 mmol) produktu (9) bolo rozpustených v 20 ml EtOAc a zmiešaných s 13 mg (0,0012 mmol) 10 % Pd/C v dvojhrdlej banke. Na jedno hrdlo banky bol napojený balónik s  $\text{D}_2$ , na druhé membránová výveva, pomocou ktorej došlo k výmene atmosféry za  $\text{D}_2$  (opakované trikrát). Reakcia prebiehala za stáleho intenzívneho miešania cez noc pri LT. Po skončení reakcie bolo Pd odfiltrované, rozpúšťadlo odparené a produkt bol ďalej čistený stĺpcovou chromatografiou (hexan/EtOAc 6:1 + 0,5 % kyseliny octovej). Bolo izolovaných 142 mg produktu ako biela kryštalická látka, čo odpovedá 88% výt'azku.



Charakterizácia:  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.62 – 4.56 (m, 1H), 3.92 – 3.84 (m, 1H), 3.55 – 3.47 (m, 1H), 1.90 – 1.78 (m, 1H), 1.78 – 1.66 (m, 1H), 1.66 – 1.46 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  179.41, 98.78, 62.31, 30.77, 25.49, 19.66. IR 2944, 2194, 2089, 1700. Teplota topenia 43 – 44,5 °C.

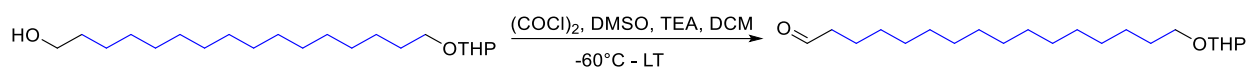
### **d<sub>30</sub>-16-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)hexadekan-1-ol (11)**



48 mg (0,12 mmol) produktu (10) bolo vysušených na hlbokom vákuu, rozpustených v 3 ml suchého THF a v kúpeli s ľadom ochladených na približne 0 °C. Potom bolo pomaly pridávaných 260  $\mu\text{l}$  (0,26 mmol) 1M  $\text{BH}_3$  v THF, banka bola vybratá z kúpele a reakcia prebiehala pri LT cez noc. Po skončení reakcie bola reakčná zmes odparená a zvyšky  $\text{BH}_3$  boli odstránené odparením s MeOH celkom 3x. Produkt bol ďalej čistený stĺpcovou chromatografiou (hexan/EtOAc 2:1 + 0,5 % trietylaminu). Bolo izolovaných 42 mg produktu ako biela kryštalická látka čo odpovedá 90% výťažku. Táto reakcia bola zopakovaná rovnakým postupom zo 70 mg produktu (10) za zisku 60 mg produktu čo odpovedá 90% výťažku. Celkovo bolo teda získaných 112 mg produktu.

Charakterizácia:  $^1\text{H}$  NMR (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  4.58 – 4.53 (m, 1H), 3.90 – 3.82 (m, 1H), 3.61 (d,  $J = 6.1$  Hz, 2H), 3.52 – 3.45 (m, 1H), 1.87 – 1.76 (m, 1H), 1.74 – 1.66 (m, 1H), 1.61 – 1.46 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  98.90, 63.04, 62.43, 30.89, 25.60, 19.80. IR 3424, 2899, 2195, 2088, 1441.

### **d<sub>30</sub>-16-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)hexadekanal (12)**

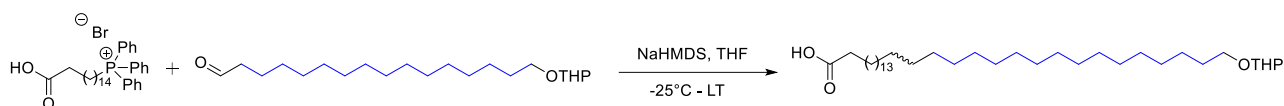


Do uzavretej, vyžihanej banky s atmosférou Ar bolo vložených 33  $\mu\text{l}$  (0,38 mmol) oxalylchloridu a 2 ml suchého DCM. Táto banka bola ochladená -55 °C a bolo pridávaných 60  $\mu\text{l}$  (0,84 mmol) suchého DMSO v 1 ml suchého DCM. Po 10 minútach miešania bolo pridávaných 101 mg (0,27 mmol) produktu (11) ktorý bol vopred vysušený na hlbokom vákuu v 1 ml suchého DCM a reakčná zmes bola ponechaná za stáleho miešania pri teplote -55 °C 90 minút. Po 90 minútach bolo pridávaných 117  $\mu\text{l}$  (0,84 mmol) trietylaminu, chladenie bolo vypnuté a reakcia prebiehala cez

noc pri LT. Reakcia bola zastavená pridaním nasýteného roztoku NaCl a extrahovaná 3× 15 ml CHCl<sub>3</sub>. Organická fáza bola odparená za zníženého tlaku a produkt bol ďalej čistený stĺpcovou chromatografiou (hexan/EtOAc 15:1). Bolo izolovaných 66 mg produktu ako bezfarebný olej, čo odpovedá 66 % výt'azku.

Charakterizácia: <sup>1</sup>H NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 9.75 (t, J = 1.9 Hz, 1H), 4.58 – 4.54 (m, 1H), 3.89 – 3.83 (m, 1H), 3.52 – 3.45 (m, 1H), 1.86 – 1.78 (m, 1H), 1.74 – 1.66 (m, 1H), 1.63 – 1.43 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (151 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 203.12, 98.91, 62.45, 30.90, 25.60, 19.82. IR 2940, 2196, 2094, 1727.

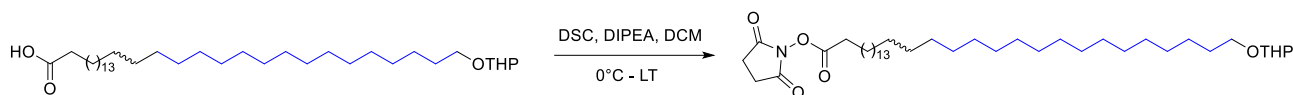
### **d<sub>30</sub>-(E/Z)-32-[(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy]dotriakont-16-enová kyselina (13)**



195 mg (0,33 mmol) fosfoniovej soli (pripravenej v rámci iného projektu) bolo vysušených na hlbokom vákuu, rozsuspendovaných v 5 ml suchého THF a ochladených na -20 °C. Po ochladení bolo postupne pridaných 750 µl (0,75 mmol) 1 M NaHMDS a 3 hodiny prebiehala tvorba yllidu. Po 3 hodinách bolo pridaných 66 mg (0,18 mmol) produktu (12) v 3 ml suchého THF. Po 30 minútach bolo vypnuté chladenie a reakcia prebiehala za stáleho miešania cez noc pri LT. Reakcia bola zastavená pridaním 20 ml nasýteného roztoku NH<sub>4</sub>Cl a po okyslení konc. HCl na pH = 1 extrahovaná 3× 20 ml CHCl<sub>3</sub>. Produkt bol ďalej čistený stĺpcovou chromatografiou (hexan/ EtOAc 15:1 + 0,5 % kyseliny octovej). Bolo izolovaných 65 mg produktu ako biela kryštalická látka, čo odpovedá 60 % výt'azku.

Charakterizácia: <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.41 – 5.31 (m, 2H), 4.62 – 4.57 (m, 1H), 3.93 – 3.85 (m, 1H), 3.56 – 3.48 (m, 1H), 2.35 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.06 – 1.93 (m, 4H), 1.90 – 1.79 (m, 1H), 1.78 – 1.69 (m, 1H), 1.69 – 1.46 (m, 4H), 1.46 – 1.08 (m, 22H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 179.16, 129.91, 129.86, 98.77, 62.31, 33.92, 30.76, 29.76, 29.66, 29.64, 29.59, 29.55, 29.44, 29.30, 29.24, 29.06, 27.19, 26.97, 25.48, 24.69, 19.66. IR 2917, 2849, 2193, 2089, 1694, 1490. Teplota topenia 43,5 – 45 °C

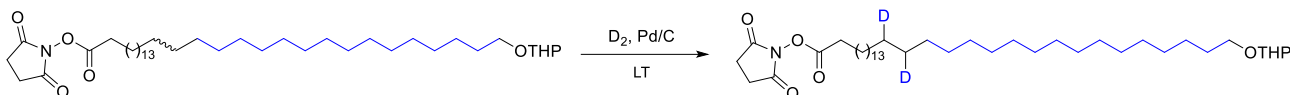
### d<sub>30</sub>-sukcínimid-1-yl (*E/Z*)-32-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]dotriakont-16-enoát (14)



63 mg (0,10 mmol) produktu (13) bolo vysušených na hlbokom vákuu a zmiešaných s 67 mg (0,20 mmol) disukcinimidyl karbonátu. V ľadovej kúpeli pri teplote 0 °C boli reaktanty rozpustené v 15 ml suchého DCM. Potom bolo pridaných 50 µl (0,20 mmol) suchého *N,N*-diizopropyletylamínu, banka bola vybratá z kúpeľa a reakcia prebiehala pri LT cez noc. Po skončení reakcie bolo rozpúšťadlo odparené za zníženého tlaku a produkt bol ďalej čistený stĺpcovou chromatografiou (hexan/EtOAc 6:1 + 0,5 % kyseliny octovej). Celkovo bolo izolovaných 57 mg produktu ako biela kryštalická látka, čo odpovedá 78 % výťažku.

Charakterizácia: <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 5.41 – 5.30 (m, 2H), 4.60 – 4.55 (m, 1H), 3.92 – 3.84 (m, 1H), 3.55 – 3.47 (m, 1H), 2.84 (s, 4H), 2.61 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 2.07 – 1.98 (m, 4H), 1.90 – 1.66 (m, 4H), 1.63 – 1.47 (m, 4H), 1.45 – 1.18 (m, 20H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 169.15, 168.67, 129.90, 129.86, 98.79, 62.33, 30.93, 30.79, 29.77, 29.69, 29.67, 29.65, 29.62, 29.57, 29.55, 29.35, 29.32, 29.08, 28.79, 27.20, 27.00, 26.97, 25.57, 25.50, 24.56, 19.71. IR 2922, 2850, 2195, 2089, 1820, 1788, 1742, 1726, 1464, 1371. Teplota topenia 56 – 57 °C.

### d<sub>32</sub>-sukcínimid-1-yl 32-[(tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy]dotriakontanoát (15)

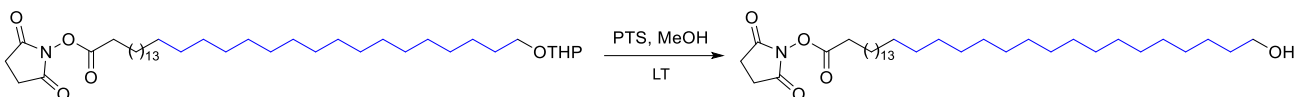


55 mg (0,078 mmol) produktu (14) bolo rozpustených v 15 ml EtOAc a zmiešaných s 6,5 mg (0,007 mmol) 10% Pd/C v dvojhrdlej banke. Na jedno hrdlo banky bol napojený balónik s D<sub>2</sub>, na druhé membránová výveva, pomocou ktorej došlo k výmene atmosféry za D<sub>2</sub> (opakované trikrát). Reakcia prebiehala za stáleho miešania cez noc pri LT. Po skončení reakcie bolo Pd odfiltrované a reakčná zmes pokračovala do ďalšej reakcie bez dodatočného čistenia (redukcia dvojitej väzby bola potvrdená pomocou NMR).

Charakterizácia: <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>:MeOD 5:1) δ 4.61 – 4.55 (m, 1H), 3.92 – 3.84 (m, 1H), 3.55 – 3.47 (m, 1H), 2.84 (s, 4H), 2.61 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.89 – 1.79 (m, 1H), 1.79 – 1.66 (m, 3H), 1.64 – 1.47 (m, 4H), 1.46 – 1.36 (m, 2H), 1.36 – 1.07 (m, 24H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 169.15, 168.67, 98.79, 62.33, 30.93, 30.79, 29.70, 29.68, 29.66, 29.62, 29.58, 29.55,

29.45, 29.34, 29.08, 28.78, 25.57, 25.50, 24.56, 19.70. IR 2920, 2850, 2194, 2088, 1820, 1788, 1725, 1466, 1372. Teplota topenia 95 – 97 °C

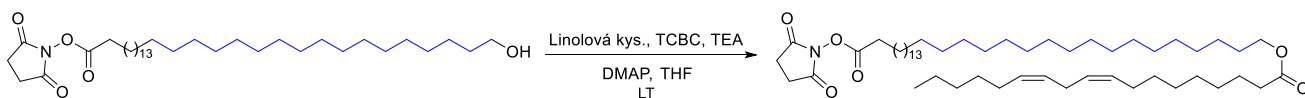
### d<sub>32</sub>-sukcínimid-1-yl 32-hydroxydotriakontanoát (16)



25 mg (0,035 mmol) produktu (15) bolo rozpustených v 2 ml metanolu a potom bolo pridaných 20 mg (0,105 mmol) monohydrátu kyseliny p-toluensulfonovej. Reakcia prebiehala za stáleho miešania pri LT cez noc. Po skončení reakcie bolo rozpúšťadlo odparené za zníženého tlaku a produkt bol ďalej čistený stĺpcovou chromatografiou (chloroform/metanol 100:1). Týmto spôsobom bolo izolovaných 22 mg produktu ako biela kryštalická látka čo odpovedá približne kvantitatívnemu výťažku. Táto reakcia bola zopakovaná za rovnakých podmienok s rovnakými navážkami za zisku 17 mg produktu, čo odpovedá 80 % výťažku. Celkovo bolo izolovaných 39 mg produktu čo odpovedá 90 % priemernému výťažku.

Charakterizácia: <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 2.76 (s, 4H), 2.51 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.69 – 1.60 (m, 2H), 1.36 – 1.26 (m, 2H), 1.26 – 0.97 (m, 24H). <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 173.70, 172.85, 34.75, 33.55, 33.52, 33.48, 33.41, 33.21, 32.95, 32.95, 32.64, 29.44, 28.41. IR 3587, 2920, 2850, 2194, 2089, 1818, 1786, 1717, 1470, 1374. Teplota topenia: 110 – 112 °C

### d<sub>32</sub>-sukcínimid-1-yl 32-(linoleoyloxy)dotriakontanoát (17)

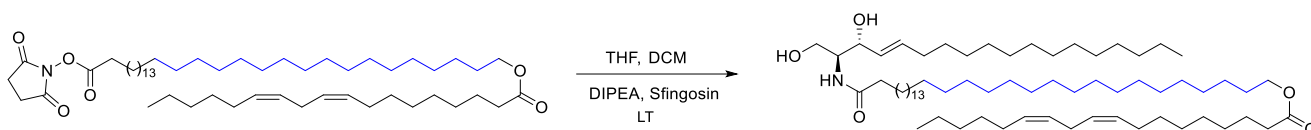


17 mg (0,0272 mmol) produktu (16) bolo vysušených na hlbokom vákuu. 8 mg (0,03 mmol) kyseliny linolovej bolo pridaných v 3,5 ml suchého THF, reakčná zmes bola potom zriedená pridaním ďalších 3,5 ml suchého THF. Ďalej bolo pridaných 5 μl (0,03 mmol) 2,4,6-trichlorbenzoyl chloridu, 10 μl (0,07 mmol) suchého trietylaminu. Po 2 minútach boli pridané 2 mg (0,016 mmol) 4-(dimetylamo)pyridínu a reakcia prebiehala cez noc za stáleho miešania pri LT. Po skončení reakcie bolo rozpúšťadlo odparené a reakcia bola čistená stĺpcovou

chromatografiou (chloroform/metanol 100:1). Celkovo bolo získaných 16 mg produktu ako biela kryštalická látka, čo odpovedá 67 % výt'azku.

Charakterizácia:  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  5.44 – 5.29 (m, 4H), 2.84 (s, 4H), 2.78 (t,  $J = 6.7$  Hz, 2H), 2.63 – 2.58 (m, 2H), 2.34 – 2.26 (m, 2H), 2.06 (q,  $J = 7.0$  Hz, 4H), 1.80 – 1.70 (m, 2H), 1.68 – 1.54 (m, 4H), 1.49 – 1.11 (m, 38H), 0.93 – 0.87 (m, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174.00, 169.16, 168.68, 130.20, 130.04, 128.02, 127.89, 34.39, 31.51, 30.93, 29.69, 29.66, 29.62, 29.58, 29.55, 29.34, 29.16, 29.11, 29.08, 28.78, 27.18, 25.61, 25.58, 25.00, 24.56, 22.56, 14.06. IR 2919, 2850, 2193, 2088, 1824, 1787, 1742, 1725, 1469, 1379. Teplota topenia 80 – 83  $^\circ\text{C}$

### ***d*<sub>32</sub>-*N*-[(2*S*, 3*R*, *E*)-1,3-dihydroxyoctadec-4-en-2-yl]-32-(linoleoyloxy)dotriakontanamid (18)**



15 mg (0,0169 mmol) produktu (17) bolo zmiešaných s 7 mg (0,0244 mmol) sfingozínu a spoločne vysušených na hlbokom vákuu. Potom bola reakčná zmes rozpustená v 3 ml suchého THF a 1,5 ml suchého DCM. Do reakčnej zmesi bolo potom pridaných 9  $\mu\text{l}$  (0,0507 mmol) suchého *N,N*-diizopropyletylamínu a reakcia prebiehala za stáleho miešania pri LT cez noc. Po skončení reakcie boli rozpúšťadlá odparené za zníženého tlaku a produkt bol ďalej čistený stĺpcovou chromatografiou (chloroform/metanol 50:1). Celkovo bolo získaných 12 mg produktu ako biela kryštalická látka, čo odpovedá 67 % výt'azku.

Charakterizácia:  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.25 (d,  $J = 7.5$  Hz, 1H), 5.92 – 5.67 (m, 1H), 5.65 – 5.48 (m, 1H), 5.48 – 5.24 (m, 4H), 4.47 – 4.25 (m, 1H), 4.00 – 3.88 (m, 2H), 3.76 – 3.63 (m, 1H), 2.81 – 2.72 (m, 4H), 2.29 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H), 2.27 – 2.16 (m, 2H), 2.11 – 2.02 (m, 6H), 1.70 – 1.58 (m, 4H), 1.44 – 1.15 (m, 60H), 0.95 – 0.82 (m, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174.03, 173.88, 134.28, 130.20, 130.04, 128.81, 128.03, 128.00, 127.90, 74.70, 62.52, 54.47, 36.84, 34.40, 32.27, 31.91, 31.52, 29.71, 29.69, 29.67, 29.65, 29.62, 29.59, 29.56, 29.51, 29.48, 29.37, 29.35, 29.34, 29.28, 29.21, 29.16, 29.13, 29.11, 27.19, 25.75, 25.62, 25.01, 22.68, 22.56, 14.10, 14.05. IR 3305, 2919, 2851, 2194, 2089, 1733, 1647, 1558, 1467, 1378. Teplota topenia 79 – 81  $^\circ\text{C}$

### **Príprava vzorku a meranie ssNMR**

Meraná lipidová zmes bola pripravená rozpustením zmesi voľnej mastnej kyseliny, cholesterolu a zmesi ceramidov (NS a EOS-acyl-d<sub>32</sub> v pomere 9:1) v molárnom pomere 1:1:1 v zmesi rozpúšťadiel chloroform/MeOH 2:1. Organická fáza bola následne odparená za zníženého tlaku, potom nasledovalo rozpustenie v cyklohexáne a zmrazenie pomocou tekutého dusíka. Nasledovala lyofilizácia, ktorej produktom bol nadýchaný prášok. Ten bol pred meraním hydratovaný na 50 hm% vodným pufrom o pH 5,4 (voda k príprave pufru bola zbavená stôp deutéria). Vzorka bola potom ekvilibrovaná opakovaným ohrievaním a mrazením v tekutom dusíku.

Samotné meranie prebiehalo na prístroji Bruker Avance 750 MHz operujúcom pri frekvencii 115,1 MHz, pri rôznych teplotách (25, 32, 50, 65 a 80 °C). Spektrum bolo získané využitím takzvanej kvadrupólovej ozvenovej sekvencie s využitím dvoch za sebou idúcich pulzov v rozostupe 30 μs.

## Záver

Cieľom tejto práce bolo syntetizovať acylceramid, značený deutériom vo svojom acylovom reťazci na C<sub>17</sub>– C<sub>32</sub> a následne pomocou ssNMR analyzovať jeho mobilitu v lipidovej zmesi simulujúcej zloženie lipidov SC.

Najprv bol vytvorený syntézny plán, ktorý bol následne optimalizovaný využitím nedeutérovaných zlúčenín ktoré sú lacnejšie a dostupnejšie ako ich deuterované formy. Po optimalizácii bola syntéza prevedená už s deutérovanými východzími látkami. Vychádzali sme z d<sub>24</sub>-1,12-dibromdodekanu a d<sub>6</sub>- $\gamma$ -butyrolaktónu. 1,12-dibromdodekan bol najprv v niekoľkých krokoch premenený na 12-bromdodekan-1-ol s celkovým výťažkom okolo 59 %. Ten po premene na aldehyd spoločne s fosfóniovou soľou pripravenou z butyrolaktonu vstupoval do Wittigovej reakcie čím sme pripravili 16C deutériom značený reťazec s celkovým výťažkom týchto krokov 43 %. S týmto deuterovaným reťazcom (po niekoľkých modifikáciach) bola následne pomocou Wittigovej reakcie spojená 16C nedeutérovaná časť reťazca vo forme fosfóniovej soli, ktorá bola pripravená v rámci iného projektu. Týmto spôsobom sme získali z polovice deutérovaný 32C reťazec vo výťažku 53 %. Posledné modifikácie tohto reťazca zahŕňali aktiváciu karboxylovej skupiny, nasýtenie dvojitej väzby ktorá vznikla po Wittigovej reakcii deutériom, ochránenie hydroxylovej skupiny a jej následnú esterifikáciu kyselinou linolovou. Posledným krokom bolo pripojenie sfingoidnej báze na aktivovanú karboxylovú skupinu, výťažok týchto krokov bol 19 %. Celkovo syntéza sčítala 18 krokov, s celkovým výťažkom 12 mg čo odpovedá 2 % celkovému výťažku.

Po syntéze nasledovala ssNMR analýza, ktorú mali na starosti spolupracovníci z Univerzity v Lipsku. Deutériom značený acylceramid bol spoločne s cholesterolom, voľnou mastnou kyselinou a nedeutérovaným ceramidom prevedený do lipidovej zmesi, ktorá mala zloženie imitujúce zloženie lipidov v SC. Táto zmes bola potom podrobená ssNMR analýze pri rôznych teplotách. Podľa výsledných tvarov spektier sme boli schopní zistiť, že ultradlhý reťazec je na svojom konci v blízkosti linoleátu neusporiadaný, a teda vysoko mobilný. Táto časť približne odpovedá rozdielu dĺžky medzi veľmidlhými a ultradlhými ceramidmi. Od toho bodu je potom ďalej, smerom k polárnej hlave acylceramidu, reťazec lepšie usporiadaný a postupne prechádza až do stavu kryštalického, nemobilného.

## Zoznam skratiek

ACSS – acyl-CoA syntetázy

ALDH – aldehyddehydrogenáza

C – uhlík, počet atómov uhlíka

Cer – ceramid(y)

CERS – ceramid syntáza(y)

CHCl<sub>3</sub> – chloroform

CLE – korneocytálna lipidová obálka

CoA – koenzym A

(COCl)<sub>2</sub> – oxalylchlorid

DCM – dichlormetán

DES – dihydroceramiddesaturáza

DIPEA – *N,N*-diizopropyletylamín

DMAP – *N,N*-dimetylamino-pyridín

DMF – *N,N*-dimetylformamid

DMSO – *N,N*-dimetylsulfoxid

dS – dihydrofingozín

DSC – disukcínimidylkarbonát

EtOAc – etylacetát

ELOVL – elongáza(y) mastných kyselín

H – 6-hydroxyfingozín

LPP – dlhá lamelárna fáza

LT – laboratórna teplota

MAS – magic angle spinning



MeOH – metanol

NaHMDS – bis(trimetylsilyl)amid sodný

NMR – nukleárna magnetická rezonancia

P – fytofingozín

PNPLA1 - patatin-like phospholipase domaincontaining protein 1

PTS – p-toluensulfónová kyselina

S - sfingozín

SC – stratum corneum

ssNMR – nukleárna magnetická rezonancia v pevnej fázi

SPHK – sfingozín kináza(y)

SPP – krátka lamelárna fáza

SPT – serínpalmitoyltransferáza

TCBC – 2,4,6-trichlórbenzoyl chlorid

TEA – trietylamín

THF – tetrahydrofurán

TLC – tenkovrstvá chromatografia

## Použitá literatura

1. Čihák R. Anatomie 3: Třetí, upravené a doplněné vydání. Grada Publishing as; 2016.
2. Kolarsick PA, Kolarsick MA, Goodwin C. Anatomy and physiology of the skin. *J Dermatol Nurses Assoc.* 2011;3:203–13.
3. James WD, Berger TG, Elston DM, Odom RB. *Andrews' diseases of the skin: clinical dermatology.* Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006.
4. Chu DH. Chapter 7. Development and Structure of Skin. V: Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrist BA, Paller AS, Leffell DJ, Wolff K, editori. *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine.* 8th vyd. New York, NY: The McGraw-Hill Companies; 2012.
5. Honari G, Andersen RM, Maibach HI. *Sensitive skin syndrome.* Second edition. Boca Raton, Florida ; CRC Press; 2017.
6. Janssens M, van Smeden J, Gooris GS, Bras W, Portale G, Caspers PJ, et al. Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients[S]. *J Lipid Res.* 2012;53:2755–66.
7. Akiyama M. Corneocyte lipid envelope (CLE), the key structure for skin barrier function and ichthyosis pathogenesis. *J Dermatol Sci.* 2017;88:3–9.
8. Wertz PW, Swartzendruber DC, Kitko DJ, Madison KC, Downing DT. The role of the corneocyte lipid envelopes in cohesion of the stratum corneum. *J Invest Dermatol.* 1989;93:169–72.
9. Feingold KR, Elias PM. Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier. *Biochim Biophys Acta BBA-Mol Cell Biol Lipids.* 2014;1841:280–94.
10. Downing DT. Lipid and protein structures in the permeability barrier of mammalian epidermis. *J Lipid Res.* 1992;33:301–13.
11. Menon GK. New insights into skin structure: scratching the surface. *Adv Drug Deliv Rev.* 2002;54:S3–17.
12. Bouwstra JA, Gooris GS, van der Spek JA, Bras W. Structural investigations of human stratum corneum by small-angle X-ray scattering. *J Invest Dermatol.* 1991;97:1005–12.
13. Van Smeden J, Janssens M, Gooris GS, Bouwstra J. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochim Biophys Acta BBA-Mol Cell Biol Lipids.* 2014;1841:295–313.
14. Opálka L, Kováčik A, Maixner J, Vávrová K. Omega-O-acylceramides in skin lipid membranes: effects of concentration, sphingoid base, and model complexity on microstructure and permeability. *Langmuir.* 2016;32:12894–904.
15. Brief E, Kwak S, Cheng JT, Kitson N, Thewalt J, Lafleur M. Phase behavior of an equimolar mixture of N-palmitoyl-D-erythro-sphingosine, cholesterol, and palmitic acid, a mixture with optimized hydrophobic matching. *Langmuir.* 2009;25:7523–32.

16. Stahlberg S, Školová B, Madhu PK, Vogel A, Vávrová K, Huster D. Probing the role of the ceramide acyl chain length and sphingosine unsaturation in model skin barrier lipid mixtures by 2H solid-state NMR spectroscopy. *Langmuir*. 2015;31:4906–15.
17. Pham QD, Mojumdar EH, Gooris GS, Bouwstra JA, Sparr E, Topgaard D. Solid and fluid segments within the same molecule of stratum corneum ceramide lipid. *Q Rev Biophys*. 2018;51.
18. Hannun YA, Luberto C. Ceramide in the eukaryotic stress response. *Trends Cell Biol*. 2000;10:73–80.
19. Maceyka M, Payne SG, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochim Biophys Acta BBA-Mol Cell Biol Lipids*. 2002;1585:193–201.
20. Levade T, Jaffrézou JP. Signalling sphingomyelinases: which, where, how and why? *Biochim Biophys Acta BBA-Mol Cell Biol Lipids*. 1999;1438:1–17.
21. Pruett ST, Bushnev A, Hagedorn K, Adiga M, Haynes CA, Sullards MC, et al. Thematic Review Series: Sphingolipids. Biodiversity of sphingoid bases (“sphingosines”) and related amino alcohols. *J Lipid Res*. 2008;49:1621–39.
22. Kováčik A, Roh J, Vávrová K. The Chemistry and Biology of 6-Hydroxyceramide, the Youngest Member of the Human Sphingolipid Family. *ChemBioChem*. 2014;15:1555–62.
23. Motta S, Monti M, Sesana S, Caputo R, Carelli S, Ghidoni R. Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 1993;1182:147–51.
24. Hanada K. Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochim Biophys Acta BBA-Mol Cell Biol Lipids*. 2003;1632:16–30.
25. Kihara A, Igarashi Y. FVT-1 is a mammalian 3-ketodihydrosphingosine reductase with an active site that faces the cytosolic side of the endoplasmic reticulum membrane. *J Biol Chem*. 2004;279:49243–50.
26. Ternes P, Franke S, Zähringer U, Sperling P, Heinz E. Identification and characterization of a sphingolipid  $\Delta^4$ -desaturase family. *J Biol Chem*. 2002;277:25512–8.
27. Kihara A. Synthesis and degradation pathways, functions, and pathology of ceramides and epidermal acylceramides. *Prog Lipid Res*. 2016;63:50–69.
28. Mao C, Obeid LM. Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate. *Biochim Biophys Acta BBA-Mol Cell Biol Lipids*. 2008;1781:424–34.
29. Kohama T, Olivera A, Edsall L, Nagiec MM, Dickson R, Spiegel S. Molecular cloning and functional characterization of murine sphingosine kinase. *J Biol Chem*. 1998;273:23722–8.
30. Kihara A, Mitsutake S, Mizutani Y, Igarashi Y. Metabolism and biological functions of two phosphorylated sphingolipids, sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate. *Prog Lipid Res*. 2007;46:126–44.

31. Jackson B, Brocker C, Thompson DC, Black W, Vasiliou K, Nebert DW, et al. Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily. *Hum Genomics*. 2011;5:1–21.
32. Crumrine D, Khnykin D, Krieg P, Man MQ, Celli A, Mauro TM, et al. Mutations in recessive congenital ichthyoses illuminate the origin and functions of the corneocyte lipid envelope. *J Invest Dermatol*. 2019;139:760–8.
33. Jennemann R, Rabionet M, Gorgas K, Epstein S, Dalpke A, Rothmel U, et al. Loss of ceramide synthase 3 causes lethal skin barrier disruption. *Hum Mol Genet*. 2012;21:586–608.
34. Uchida Y, Holleran WM. Omega-O-acylceramide, a lipid essential for mammalian survival. *J Dermatol Sci*. 2008;51:77–87.
35. Jakobsson A, Westerberg R, Jacobsson A. Fatty acid elongases in mammals: their regulation and roles in metabolism. *Prog Lipid Res*. 2006;45:237–49.
36. Behne M, Uchida Y, Seki T, de Montellano PO, Elias PM, Holleran WM. Omega-hydroxyceramides are required for corneocyte lipid envelope (CLE) formation and normal epidermal permeability barrier function. *J Invest Dermatol*. 2000;114:185–92.
37. Jobard F, Lefèvre C, Karaduman A, Blanchet-Bardon C, Emre S, Weissenbach J, et al. Lipoxygenase-3 (ALOXE3) and 12 (R)-lipoxygenase (ALOX12B) are mutated in non-bullous congenital ichthyosiform erythroderma (NCIE) linked to chromosome 17p13. 1. *Hum Mol Genet*. 2002;11:107–13.
38. Takeichi T, Hirabayashi T, Miyasaka Y, Kawamoto A, Okuno Y, Taguchi S, et al. SDR9C7 catalyzes critical dehydrogenation of acylceramides for skin barrier formation. *J Clin Invest*. 2020;130:890–903.
39. Hore PJ. Nuclear magnetic resonance. Oxford University Press, USA; 2015.
40. Ashbrook SE, McKay D. Combining solid-state NMR spectroscopy with first-principles calculations—a guide to NMR crystallography. *Chem Commun*. 2016;52:7186–204.
41. Laws DD, Bitter HML, Jerschow A. Solid-state NMR spectroscopic methods in chemistry. *Angew Chem Int Ed*. 2002;41:3096–129.
42. Apperley DC, Harris RK, Hodgkinson P. Solid-state NMR: Basic principles and practice. Momentum Press; 2012.