

**Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra anorganické a organické chemie**



**Mgr. Jana Klimentová**

**Strukturní obměny transkarbamů – syntéza a sledování  
vlastností a biologické aktivity se zaměřením na  
objasnění mechanismu účinku**

Doktorská disertační práce

Hradec Králové

srpen 2006

## PODĚKOVÁNÍ

Děkuji Doc. PharmDr. Alexandru Hrabálkovi, CSc., svému školiteli, za odborné vedení, pomoc, cenné rady a připomínky, které mi poskytoval během celého studia.

Děkuji svým spolupracovníkům PharmDr. Kateřině Vávrové PhD., PharmDr. Tomáši Holasovi PhD, PharmDr. Jarmile Zbytovské PhD. a Mgr. Jakobovi Novotnému za odbornou spolupráci a přínosné rady při sestavování publikací. Ing. Petru Kosákovi děkuji za praktickou pomoc při některých syntézách.

Děkuji pracovníkům Katedry anorganické a organické chemie, jmenovitě: Ivě Vencovské za měření IČ spekter, Doc. RNDr. Milanu Pourovi, CSc., Doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. a Petru Jančárkovi za měření NMR spekter. Za měření termogravimetrických analýz děkuji RNDr. Janě Ederové, CSc. z Laboratoře termické analýzy Vysoké školy chemicko-technologické v Praze.

Děkuji své rodině za podporu poskytovanou během celého studia.

Za finanční podporu děkuji Ministerstvu školství a tělovýchovy České republiky (projekty FRVŠ: 964/G6/2004 a 715/G6/2005 a výzkumné záměry MSM 111600001 a MSM 0021620822).

# OBSAH

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>7</b>
1.1. Transdermální podání léčiv .....	7
1.2. Kožní bariéra .....	7
1.3. Cesty průniku látek přes kůži .....	9
1.4. Akceleranty transdermální permeace .....	10
1.4.1. Přehled akceleračních látek transdermální permeace podle chemické struktury .....	10
1.4.2. Mechanismus účinku akceleračních látek transdermální permeace .....	11
1.5. Transkarbam 12 .....	15
<b>2. CÍL: HLEDÁNÍ MECHANISMU ÚČINKU TRANSKARBAMU 12..</b>	<b>17</b>
<b>3. VÝSLEDKY .....</b>	<b>18</b>
3.1. Analogy T12 .....	18
3.1.1. Obměny polární hlavy .....	18
3.1.2. Obměny lipidového řetězce T12 .....	22
3.2. Popis rozkladu T12 v mírně kyselém prostředí .....	25
3.2.1. Časový vývoj IČ spekter směsi T12 a PK .....	25
3.2.2. Časový vývoj IČ spekter směsi T12 a extrahovaných lipidů SC .....	26
3.2.3. Thermogravimetrická analýza (TGA) .....	27
3.3. Vliv T12 na rozpustnost modelového léčiva ve vehikulu a na jeho rozdělování z vehikula do SC .....	27
<b>4. DISKUZE .....</b>	<b>28</b>
4.1. Syntéza analogů T12 .....	28
4.1.1. Syntéza prekurzorů pro přípravu analogů T12 s kovalentně vázaným CO <sub>2</sub> (12-15 a DDEAK) .....	28
4.1.2. Syntéza analogů T12 s kovalentně vázaným CO <sub>2</sub> .....	29
4.1.3. Syntéza rozvětvených alkoholů 16-17 a kyselin 18-19 .....	30
4.1.4. Syntéza rozvětvených karbamátů .....	31
4.2. Transdermálně akcelerační aktivita analogů T12 .....	31
4.2.1. Analogy T12 s kovalentně vázaným CO <sub>2</sub> .....	31
4.2.2. Analogy T12 s koncovým rozvětvením .....	32
4.2.3. Analogy T12 – vztahy mezi strukturou a účinkem .....	36
4.3. Chování T12 v mírně kyselém prostředí .....	37
4.3.1. Časový vývoj IČ spekter směsi T12 a PK .....	37
4.3.2. Časový vývoj IČ spekter směsi T12 a lipidů SC .....	39
4.3.3. TGA .....	40
4.4. Vliv T12 na rozpustnost modelového léčiva ve vehikulu a na jeho rozdělování z vehikula do SC .....	40
<b>5. ZÁVĚR .....</b>	<b>42</b>
<b>6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>43</b>
6.1. Chemikálie a přístrojové vybavení .....	43
6.2. Syntéza analogů T12 s kovalentně vázaným CO <sub>2</sub> .....	43
6.2.1. Příprava amidů hydroxykyselin 12a-12c a 13 .....	43
6.2.2. Příprava 5-hydroxypentylamidu dekanové kyseliny 14 .....	44
6.2.3. Příprava esterů hydroxykyselin 15a-15b .....	44
6.2.4. Příprava laktonu 7-hydroxyheptanové kyseliny (komerčně nedostupný) .....	45
6.2.5. Příprava esterů kyseliny uhličitě 1a-1d, 2a-2d, 3, 4a-4d, 5a-5b .....	45
6.2.6. Příprava symetrických esterů kyseliny uhličitě 6a, 7 .....	49

6.2.7. Příprava esteru kyseliny uhličitě 6b .....	49
6.2.8. Příprava esterů kyseliny karbamové 8a-8d .....	50
6.2.9. Příprava esterů kyseliny karbamové 9a-9b .....	51
6.2.10. Příprava esterů kyseliny šťavelové 10, 11 .....	52
6.3. Syntéza rozvětvených analogů T12 .....	52
6.3.1. Příprava ω-bromkyselin 22a-22b .....	52
6.3.2. Příprava sodných solí ω-bromkyselin 23a-23b .....	53
6.3.3. Příprava katalyzátoru $\text{Li}_2\text{CuCl}_4$ .....	53
6.3.4. Příprava alkoholů 16a-16e a 17a-17b .....	53
6.3.5. Příprava kyselin 18a-18e a 19a-19b.....	55
6.3.6. Příprava hydrochloridů aminoesterů 26a-26e a 27a-27b .....	56
6.3.7. Příprava rozvětvených karbamátů 20a-20e a 21a-21b.....	58
6.4. Hodnocení transdermálně akcelerační účinnosti.....	59
6.4.1. Příprava kůže.....	59
6.4.2. Příprava donorových vzorků.....	59
6.4.3. Permeační experiment.....	60
6.4.4. Stanovení theofylinu v donorovém médiu .....	60
6.4.5. Výpočet fluxů a akceleračních poměrů.....	60
6.5. Popis rozkladu T12 v mírně kyselém prostředí .....	61
6.5.1. Časový vývoj IČ spekter směsi T12 a PK nebo T12 a extrahovaných lipidů SC.....	61
6.5.2. Extrakce lipidů SC .....	61
6.5.3. TGA .....	61
6.6. Stanovení rozpustnosti theofylinu.....	61
6.7. Rozdělování theofylinu do SC .....	62
6.7.1. Izolace SC .....	62
6.7.2. Hydratace SC .....	62
6.7.3. Stanovení rozdělovacího koeficientu .....	62
<b>7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ .....</b>	<b>63</b>
<b>8. LITERATURA .....</b>	<b>64</b>

## 1. SOUHRN

Mezi úkoly řešené dlouhodobě na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy patří mimo jiné také syntéza a testování účinnosti látek s potenciální aktivitou akceleračních transdermálních permeací. V posledním desetiletí zde byly připraveny estery kyseliny 6-aminohexanové a jejich analogy s vysokou akcelerační účinností. V současnosti jsou hledány bližší vztahy mezi jejich strukturou a účinkem. Příspěvkem k této problematice je i tato práce, která se týká hledání mechanismu účinku jednoho z neúčinnějších připravených derivátů, transkarbam 12 (T12).

Akceleranty transdermální permeace jsou látky usnadňující vstup léčiva přes kůži. Jejich možné mechanismy účinku zahrnují narušení uspořádané struktury stratum corneum, zvýšení rozpustnosti léčiva ve vehikulu nebo zvýšení jeho rozdělování do stratum corneum. Přesný mechanismus většinou není znám.

T12 je sůl karbamové kyseliny odvozená od dvou molekul dodecylesteru kyseliny 6-aminohexanové. V mírně kyselém prostředí (jaké se nachází například ve stratum corneum, jeho místě účinku) se snadno rozkládá za uvolnění  $\text{CO}_2$  a volného aminoesteru. S cílem zjistit, zda tato schopnost souvisí s vysokou aktivitou, byla připravena série látek s  $\text{CO}_2$  kovalentně vázaným v polární hlavě (estery kyseliny uhličitě, karbamové a šřavelové). Jejich aktivita byla ve srovnání s předlohovým T12 zanedbatelná.

Dále byla připravena série analogů se symetrickým methylovým nebo ethylovým rozvětvením v koncové části lipofilních řetězců se záměrem zvýšit akcelerační aktivitu. Zavedení methylového rozvětvení aktivitu nezměnilo, ethylové ji mírně snížilo. Rozvětvení v koncové části molekuly tedy patrně snížilo schopnost akcelerační látky začlenit se mezi lipidy stratum corneum.

U T12 byla také studována jeho schopnost uvolnit  $\text{CO}_2$  v mírně kyselém prostředí a to dvěma metodami. Pomocí IČ spektroskopie jeho směsi s kyselinou palmitovou nebo s lipidy extrahovanými ze stratum corneum (obsahují cca 10 % mastných kyselin) byla popsána pravděpodobná interakce vedoucí k rozkladu molekuly za uvolnění  $\text{CO}_2$ . Thermogravimetrická analýza podobné směsi vedla k závěru, že mírně kyselé prostředí urychluje tento rozklad ve srovnání s rozkladem vyvolaným pouze zvýšenou teplotou.

Teorie o specifickém mechanismu účinku T12 byla podpořena také zjištěním, že tento akcelerační nemá významný vliv na rozpustnost modelového léčiva ve vehikulu ani na jeho rozdělování z vehikulu do stratum corneum.

Závěrem lze říct, že mechanismus účinku T12 se odvíjí z jedinečné struktury jeho polární hlavy tvořené solí karbamové kyseliny, která má schopnost se v mírně kyselém prostředí stratum corneum rozkládat za uvolnění  $\text{CO}_2$ . Rozpad nejspíš vede ke konformačním změnám v molekule T12. Tyto změny společně s uvolněným  $\text{CO}_2$  velmi pravděpodobně narušují uspořádanou strukturu lipidů SC a tím usnadňují průchod léčiva kůží. Mechanismus účinku tohoto typu nebyl dosud v literatuře popsán

## 1. Úvod

### 2. SUMMARY

One of the subjects studied in the Department of Inorganic and Organic Chemistry of the Faculty of Pharmacy focuses on the synthesis and biological evaluation of potential transdermal permeation enhancers. Over the past few years, series of esters of 6-aminohexanoic acid of high enhancing activity and their analogues have been prepared. Presently, the structure-activity relationships are being studied. This work contributes to this problem by searching for the mechanism of action of one of the most active compounds, transkarbam 12 (T12).

Transdermal permeation enhancers facilitate drug absorption through the skin. Generally, their mechanisms of action include the disturbance of highly ordered structure of stratum corneum, promotion of drug solubility in the vehicle or enhancing the partitioning of drug from the vehicle into stratum corneum. Nevertheless, the exact mechanism is usually unclear.

T12 is a carbamic acid salt derived from two molecules of 6-aminohexanoic acid dodecyl ester. In slightly acidic environment (as in stratum corneum, its target place) it decomposes easily releasing a molecule of CO<sub>2</sub> and free amino ester. To find out whether this ability contributes to its high activity, a series of T12 analogues with CO<sub>2</sub> covalently bound in the polar head was prepared (esters of carbonic, carbamic and oxalic acid). Their enhancing activities were negligible when compared to that of T12.

Another series of T12 analogues with symmetrical terminal methyl or ethyl branching was synthesized with the purpose to improve the enhancing activity. But the introduction of methyl branching didn't change the activity, furthermore, ethyl branching increased it slightly. Thus we hypothesize that terminal branching probably decreased the ability of enhancer to incorporate into the stratum corneum lipids.

The ability of T12 to release CO<sub>2</sub> in slightly acidic environment was studied by two different methods. The IR spectroscopy of the mixture of T12 with palmitic acid or with lipids extracted from stratum corneum (they contain ca 10 % of fatty acids) enabled us to describe the proposed interaction leading to T12 decomposition and CO<sub>2</sub> release. Thermogravimetric analysis of similar mixture proved that slightly acidic environment leads to faster T12 decomposition in comparison with the decomposition caused only by elevated temperature.

The theory about specific mechanism of action of T12 was supported also by the fact that this enhancer didn't influence the model drug solubility neither its partitioning into stratum corneum.

Finally, we can conclude that the mechanism of action of T12 arises from the exceptional structure of its polar head formed by carbamic acid salt and from the ability of such structure to decompose in slightly acidic environment releasing a molecule of CO<sub>2</sub>. The decomposition very probably leads to the conformational changes in T12 molecule. Such changes together with the released CO<sub>2</sub> disturb the highly ordered lipid structure in stratum corneum and thus facilitate the drug absorption through the skin. The mechanism of action of such type hasn't been described before.

# 1. ÚVOD

Mezi úkoly řešené dlouhodobě na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy patří mimo jiné také syntéza a testování účinnosti látek s potenciální aktivitou akceleračních transdermálních permeací. V posledním desetiletí zde byly připraveny estery kyseliny 6-aminohexanové a jejich analoga s vysokou akcelerační účinností. V současnosti jsou hledány bližší vztahy mezi jejich strukturou a účinkem.

Příspěvkem k této problematice by měla být i tato práce, která se týká hledání mechanismu účinku jednoho z neúčinnějších připravených derivátů, transkarbamu 12.

## 1.1. Transdermální podání léčiv

Transdermální podání léčiv (transdermal drug delivery, TDD) spočívá v jejich aplikaci na kůži s cílem dosáhnout jejich systémového účinku, případně účinku v přilehlých hlubších tkáních. Výhody transdermální aplikace oproti některým běžnějším cestám (například perorální nebo intravenózní) zahrnují například vyloučení first-pass metabolismu v játrech a zažívacím traktu, menší interakce s jinými léčivy nebo s potravou, omezení vedlejších účinků, stabilnější lékové hladiny nebo možnost snadného a rychlého přerušení přívodu látky do těla v případě výskytu nežádoucích účinků.<sup>1</sup> Tyto výhody spolu s velmi snadnou aplikací a minimální traumatizací pacienta (ve srovnání například s intravenózním podáním) vedou k lepší compliance.

Pro většinu látek je však průchod kožní bariérou poměrně obtížný, což výrazně omezuje širší použití TDD. V současné době se transdermálně podávají například: klonidin, fentanyl, lidokain, nikotin, nitroglycerin, estradiol, ethinylestradiol, norelgestromin, norethindron, oxybutynin, skopolamin nebo testosteron.<sup>2</sup> Pro snadný průnik kůží by léčivo mělo splňovat poměrně náročnou kombinaci následujících fyzikálně-chemických vlastností:<sup>3</sup> molekulová hmotnost do 400 g/mol, vyvážená lipofilita a hydrofilita, nízká teplota tání. Pokud je denní terapeutická dávka léčiva více než 10 mg, může být transdermální podání obtížné, vhodnější jsou dávky nižší než 5 mg.<sup>1</sup> Většina léčiv však tyto požadavky nespĺňuje, je tedy potřeba nějakým způsobem uměle usnadnit jejich průchod kožní bariérou.

## 1.2. Kožní bariéra

Kůže je největším lidským orgánem a jako bariéra oddělující vnější a vnitřní prostor chrání organismus před nežádoucím vstupem xenobiotik dovnitř a zároveň před nežádoucím únikem endogenních látek.

Kůže<sup>4</sup> je tvořena dvěma základními vrstvami: vnější, nevaskularizovaná (epidermis) a vnitřní (dermis). Dermis je tvořena fibroblasty uloženými v pojivové tkáni, je bohatá na krevní kapiláry, nervy a nervová zakončení, vlasové folikuly, potní a mazové žlázy a vyživuje svrchní epidermis. Epidermis obsahuje keratinocyty (95 %), melanocyty, Langerhansovy a Merkelovy buňky. Může být podrobněji rozdělena na

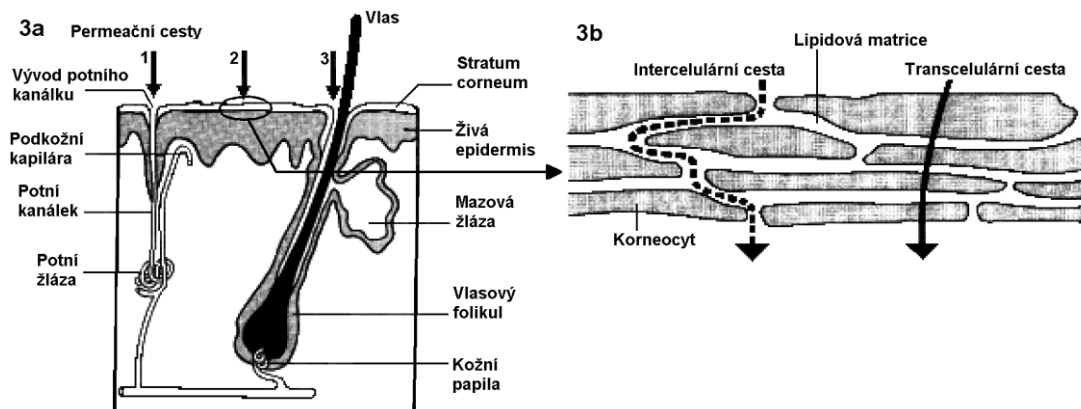




### 1.3. Cesty průniku látek přes kůži

Molekuly léčiva mohou kůží prostupovat třemi cestami<sup>10,11</sup> (obr. 3a):

- potními žlázkami,
- vlasovými folikuly a mazovými žlázkami,
- přímo přes SC.



Obr. 3a. Cesty prostupu látek přes kůži: 1) potními žlázkami, 2) přes SC (3b: intercelulárně nebo transcelulárně), 3) přes vlasový folikul a s ním spojenou mazovou žlázku.

Plocha poskytovaná potními kanálky a vlasovými folikuly tvoří jen asi 0,1 % celkové plochy pro transport léčiva, tím pádem se na jeho fluxu podílí jen zanedbatelně. Tato cesta se stává důležitou v případě látek s velkou molekulou nebo iontů. Adnexa (folikuly a mazové a potní žlázky) zároveň představují jakousi „zkratku“, která se projevuje ve fluxu léčiva před nastavením rovnovážného stavu.

Hlavní bariéru pro vstup léčiva tedy představuje intaktní SC. Jím mohou látky prostupovat buď intercelulárně, tedy difundovat lipidovou maticí mezi korneocyty, nebo transcelulárně (či intracelulárně), tedy přes keratinocyty (obr. 3b). Obecně je uváděno, že lipofilní látky procházejí přednostně intercelulárně zatímco hydrofilní transcelulárně.<sup>12</sup> Toto zjednodušení je však poněkud nepřesné, zejména co se týče transcelulární cesty. Při ní totiž permeant sice prostupuje korneocytem, kde je hydrofilní prostředí, ale aby se mohl dostat do dalšího korneocytu, je nutné, aby překonal několik lipidových lamel mezi jednotlivými korneocyty. Pro většinu léčiv je toto několikanásobné rozdělování mezi hydrofilním a lipofilním prostředím nevýhodné. Z toho vyplývá, že pro většinu léčiv je hlavní cestou prostupu cesta intercelulární. Tím se dráha, kterou musí léčivo absolvovat, prodlužuje z cca 20  $\mu\text{m}$  (tloušťka SC kolmo k povrchu) až na cca 500  $\mu\text{m}$ .<sup>13</sup>

Prostup léčiva přes kůži může být usnadněn různými způsoby, které zahrnují například fyzikální metody (iontoforéza, fonoforéza, elektroporace, použití mikrojehel), formulační metody (mikroemulze, lipozómy), biochemické metody (podání ve formě proléčiva, inhibice či aktivace kožních enzymů) a chemické metody (použití akceleračních transdermálních permeací).

### 1.4. Akceleranty transdermální permeace

Tyto látky usnadňují prostup léčiva kůží do hlubších tkání, případně do krevního nebo lymfatického řečiště. Jejich působení může být vyvoláno jednak samotným složením přípravku, ale také specifickým působením na kožní bariéru. U přípravku mohou měnit jeho termodynamické vlastnosti, rozpustnost léčiva nebo jeho vstup do SC. V kůži mohou interagovat s jejími součástmi a tím reverzibilně zvyšovat její propustnost pro léčivo.

Akceleranty transdermální permeace jsou řazeny mezi pomocné farmaceutické látky a jsou na ně tedy kladeny vysoké nároky.<sup>14</sup> Vlastnosti, které by měl ideální akcelerant splňovat, zahrnují následující požadavky:<sup>15</sup>

- měly by být netoxické, nedráždivé a nealergizující,
- nástup účinku by měl být rychlý, délka a průběh působení by měly být předvídatelné,
- neměly by mít vlastní farmakologický účinek,
- měly by účinkovat jen v jednom směru (tzn. usnadňovat vstup léčiv do těla, ale nedovolovat ztrátu endogenních látek),
- po jejich odstranění z kůže by měla nastat co nejrychlejší obnova bariérových funkcí,
- měly by být kompatibilní se všemi složkami přípravku,
- měly by být „kosmeticky přijatelné“ (bez zápachu, chuti či barvy).

V neposlední řadě by se mělo jednat také o látky snadno dostupné a levné. Nalézt akcelerant, který by vyhovoval všem kritériím a zároveň si zachoval potřebnou účinnost je nesnadné. Při volbě akcelerantu pro transdermální systém je potřeba vycházet z požadavků konkrétní lékové formy. U akcelerantů, které se používají ve velmi nízkých koncentracích, je eventuelně možno od některých z požadovaných bodů zcela ustoupit.

Rozdělení akcelerantů lze provést podle různých kritérií. Co se týče chemické struktury, jedná se o skupinu velmi různorodou. Velmi hrubě je lze rozdělit na malá polární rozpouštědla (např. ethanol, propylenglykol, dimethylsulfoxid, ethyl-acetát atd.) a na amfifilní látky obsahující polární hlavu a hydrofobní řetězec (např. mastné kyseliny a alkoholy, Azon<sup>®</sup> a jeho deriváty atd.). Dále mohou být klasifikovány do skupin podle předpokládaného mechanismu účinku, chemické struktury či polarity.<sup>16</sup>

#### 1.4.1. Přehled akcelerantů transdermální permeace podle chemické struktury

Nejpřirozenějším akcelerantem je patrně **voda**.<sup>15</sup> Použití vody k urychlení průniku látek kůží se prakticky provádí pomocí okluze, ať už nějakou okluzivní masťou či náplastí. Nevýhodou je zde nebezpečí lokálního podráždění a bakteriální infekce.

Jedním z nejdéle studovaných akcelerantů je **dimethylsulfoxid** (DMSO), který můžeme řadit do skupiny **aprotických rozpouštědel**. Slabinou je u něj to, že se musí používat ve vysokých koncentracích (nad 60 %), pak ale způsobuje vznik erytému a denaturaci proteinů SC.<sup>17</sup> Nepříjemnou je také jeho metabolizace na dimethylsulfid,

který způsobuje nesnesitelný zápach. Do stejné skupiny lze zařadit také další podobné akceleranty: **dimethylformamid** a **dimethylacetamid**.

První látkou, jejíž struktura byla specificky navržena s cílem připravit akcelerační transdermální permeace byl **Azon<sup>®</sup>** (1-dodecylazacykloheptan-2-on).<sup>18,19</sup> Do dnešní doby se také stal nejstudovanějším akceleračním standardem pro porovnávání aktivit jiných látek.

**Pyrrolidin-2-on** nebo **1-methylpyrrolidin-2-on** byly popsány jako akceleranty pro poměrně široké spektrum léčiv.<sup>15</sup> Jsou to vynikající rozpouštědla, jejich širšímu použití však brání dráždivý efekt.

Další často zmiňovanou skupinou jsou **vyšší mastné kyseliny**,<sup>20</sup> u nichž byly podrobně studovány vztahy mezi strukturou a účinkem se zaměřením na délku řetězce, přítomnost násobných vazeb a konfiguraci na nich, případně rozvětvení. Nejpopsanější látkou z této skupiny je **kyselina olejová**.

Rozmanitou skupinou jsou také **alkoholy**. Z nižších se např. **ethanol** používá poměrně často jako rozpouštědlo, nejvyšších akceleračních aktivit je u něj dosaženo v koncentracích 40-60 %.<sup>21</sup> Jeho nevýhodou je to, že v těchto koncentracích způsobuje dehydrataci kůže vedoucí většinou k jejímu podráždění. **Vyšší mastné alkoholy**<sup>22</sup> se často používají v kombinaci **propylenglykolem** (PG) a jejich účinek se vzájemně potencuje.

**Povrchově aktivní látky**,<sup>15</sup> jako například laurylsulfát sodný, nejsou příliš vhodné, protože způsobují poškození kůže. Menší poškození, ale také nižší aktivitu, vykazují neionogenní tenzidy, například tweeny.

**Močovina** se používá jako hydratační a keratolytické činidlo při léčbě lupénky, sama má však také mírné akcelerační schopnosti.<sup>23</sup> Její cyklické analogy vykazovaly dokonce podobnou aktivitu jako Azon.<sup>24</sup>

Rostlinné **silice a terpeny** se dlouhodobě používají jako přísady do kosmetických i farmaceutických přípravků zlepšující jejich organoleptické vlastnosti. Představují poměrně širokou skupinu látek urychlující velké množství léčiv a vykazující různé mechanismy účinku.<sup>15</sup>

Zajímavou skupinu akceleračních činidel tvoří také **fosfolipidy**, které se používají jak ve formě liposomů tak „volné“. Známe je např. použití sójového nebo vaječného fosfatidylcholinu.<sup>25</sup>

Výběr vhodného akceleračního činidla představuje poměrně složitý problém. Aktivita jednotlivých akceleračních činidel je specifická podle použitého léčiva, vehikula či druhu kůže. Některé akcelerační činidla je také vhodné použít v kombinaci, protože působí synergisticky (např. PG, ethanol, Azon, kyselina olejová).

#### 1.4.2. Mechanismus účinku akceleračních činidel transdermální permeace

Průchod látky přes kožní bariéru je možno popsat pomocí Fickova zákona<sup>10,11,15</sup> (rovnice 1). Flux v rovnovážném stavu ( $J$ ,  $\mu\text{gcm}^{-2}\text{h}^{-1}$ ) je podle něj přímo úměrný difúznímu koeficientu ( $D$ ), rozdělovacímu koeficientu mezi vehikulem a SC ( $P$ ) a výchozí koncentraci léčiva ve vehikulu ( $C_0$ ). Nepřímě úměrný je pak tloušťce membrány;

$$J = \frac{DPC_0}{h}$$

Rovnice 1.  
Fickův zákon.

## 1. Úvod

v případě SC je to cca 20  $\mu\text{m}$ , pokud však bereme v úvahu dráhu, kterou musí látka podstoupit, pokud prochází intercelulární cestou, je potřeba uvažovat až 500  $\mu\text{m}$ .

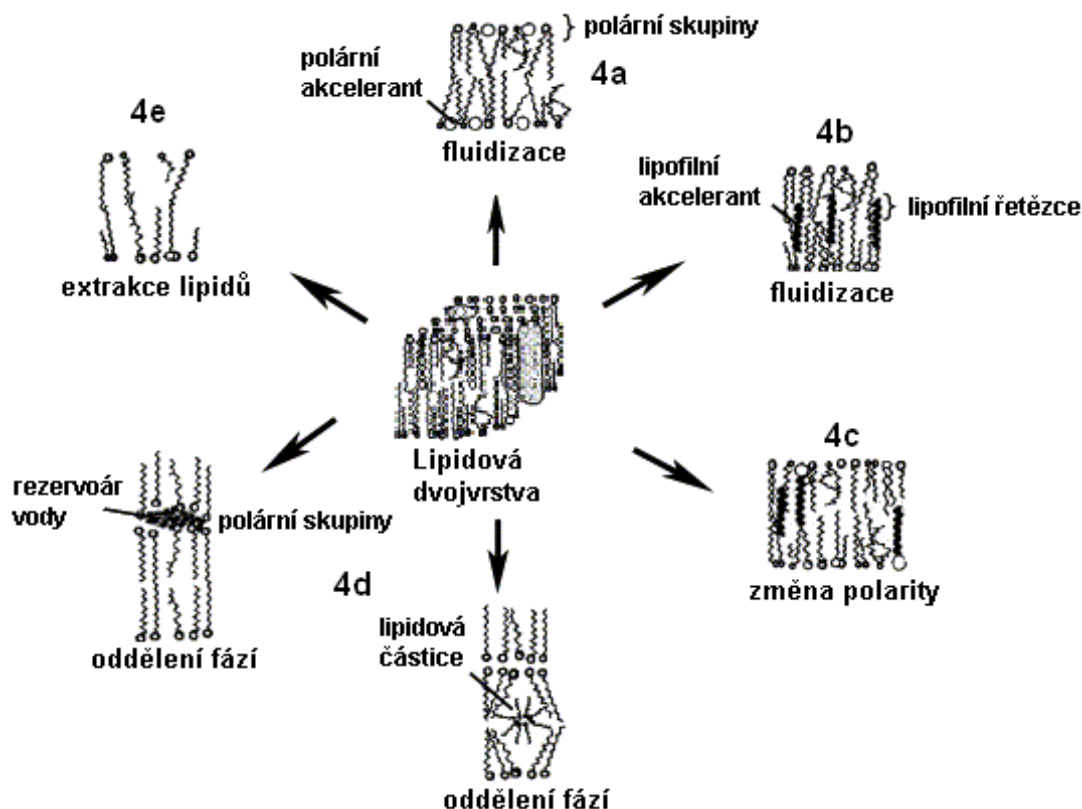
Aktivita akceleračtů transdermální permeace se dá číselně vyjádřit různými způsoby. Jedním z nejpoužívanějších je akcelerační poměr (AP), což je poměr mezi fluxem léčiva v přítomnosti akceleračtů ku fluxu bez akceleračtů. AP roven 1 má tedy kontrolní (slepý) vzorek bez přídavku akceleračtů, menší než 1 mají látky zpomalující průchod léčiv přes kůži (transdermální retardanty).

Z Fickova zákona vyplývají některé způsoby, jak flux léčiva zvýšit, tedy možné mechanismy účinku akceleračtů transdermální permeace. Patří mezi ně:

- 1) zvýšení difúzního koeficientu  $D$  (tzn. narušení bariérové struktury SC),
- 2) zvýšení rozdělovacího koeficientu  $P$  (tzn. zlepšení rozdělování léčiva ve prospěch SC),
- 3) zvýšení efektivní koncentrace léčiva  $C_0$  (tzn. zvýšení rozpustnosti léčiva ve vehikulu),
- 4) snížení tloušťky bariéry  $h$  (tento mechanismus se týká chemických akceleračtů pouze okrajově, jedná se spíše o tvorbu nějakých „zkratek“ vedoucích přes SC),
- 5) velmi pravděpodobná je také kombinace různých mechanismů.

### ad 1) Zvýšení difúzního koeficientu

Narušení vysoce uspořádané struktury SC může být docíleno interakcí s intercelulárními lipidy nebo intracelulárními proteiny. Interakce s lipidy a změny struktury lipidových dvojvrstev z toho vyplývající jsou shrnuty na obr. 4.<sup>15</sup>



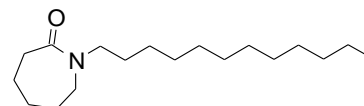
Obr. 4. Možné účinky akceleračtů transdermální permeace na lipidovou matici SC.

Na lipidových dvojvrstvách mohou akceleranty působit jak v oblasti polárních skupin lipidů, tak mezi jejich hydrofobními řetězci.<sup>10</sup> V oblasti polárních skupin ceramidů („polar heads“) dochází k narušení jejich vzájemných vodíkových a iontových vazeb akcelerantem, což může narušit celou hydratační sféru lipidů. Takto většinou působí malé polární molekuly (obr. 4a). Narušení hydratační sféry dále vede k dezorganizaci celé polární mezivrstvy a v konečném důsledku k narušení lamelární struktury a její fluidizaci. V druhém případě se může lipofilní akcelerant začlenit mezi hydrofobní řetězce („hydrophobic tails“), čímž se také zvýší jejich fluidita (obr. 4b).

Většinou nelze tyto dva děje od sebe přesně oddělit, protože dochází k interakci na obou místech zároveň. Z toho vychází společné rysy řady akcelerantů: polární skupina a dlouhý uhlovodíkový řetězec (případně řetězce). Amfifilní akceleranty se začleňují mezi lamely tak, že jejich polární hlava je orientována k polárním skupinám ceramidů a hydrofobní řetězce mezi řetězci lipidů SC, což vede k narušení jejich organizace a k fluidizaci lamel<sup>4</sup> (obr. 4c).

Optimální délka lipofilního řetězce u nejúčinnějších akcelerantů se pohybuje mezi 10 a 12 uhlíky, což odpovídá délce steroidního jádra cholesterolu. Možný mechanismus z toho vyplývající je tedy také narušení interakcí ceramid-cholesterol nebo cholesterol-cholesterol.<sup>1</sup> U nenasycených řetězců je pak optimální délka 18 uhlíků s dvojnou vazbou umístěnou uprostřed a s *cis* konformací<sup>15</sup> (např. u kyseliny olejové).

Jedním z nejlépe prostudovaných amfifilních akcelerantů je Azon<sup>®</sup> (obr. 5),<sup>18,19</sup> který může ve SC zaujmout konformaci „naběračky“ („soup spoon“), kdy sedmičlenný laktamový kruh je orientován přibližně kolmo k alkylovému řetězci. Kruh je pak zakotven v polární mezivrstvě a alkyl se začleňuje mezi hydrofobní řetězce. Dochází tak k narušení celého intercelulárního prostoru a k usnadnění průchodu látek hydrofilních i hydrofobních. Jiná teorie o mechanismu účinku Azonu tvrdí, že jeho působení spočívá zejména v narušení vodíkových vazeb mezi polárními hlavami uspořádaných ceramidů.<sup>26</sup>



Obr. 5. Azon.

Některé akceleranty (např. kyselina olejová nebo terpeny) mohou ve vyšších koncentracích tvořit oddělenou fázi mezi lamelami. Tyto „rezervoáry“ představují jakési póry propustnější pro polární látky, které je možné chápat také jako „zkratky“ zmenšující „h“, jak vyplývá z Fickova zákona (obr. 4d).

Existují také akceleranty, které zároveň fungují jako dobrá rozpouštědla (např. ethanol nebo DMSO) a mohou tak fungovat i díky extrakci lipidů<sup>11</sup> (obr. 4e). Tento mechanismus je však spíše nežádoucí, protože vede k nebezpečí poškození kůže.

Dalším účinkem akcelerantů vedoucím ke zvýšení *D* může být interakce s intracelulárními proteiny korneocytů, zejména keratinem způsobující změnu jejich konformace. Podobným mechanismem působí například ethanol nebo DMSO, které mají schopnost nahrazovat molekuly vody v polárních regionech proteinu a tím způsobit změnu jeho konformace z  $\alpha$ -helixu na  $\beta$ -skládaný list.<sup>1,6</sup> Jiným příkladem může být např. dithiothreitol, který redukuje disulfidické můstky v keratinu a tím opět mění jeho konformaci a urychluje průchod některých hydrofilních látek.<sup>4</sup>

Nicméně ve srovnání s akceleranty, které přednostně ovlivňují lipidy SC, je vliv látek působících pouze v oblasti proteinů zanedbatelný. To je způsobeno přítomností

## 1. Úvod

souvislé lipidové matrice, kterou musí molekula léčiva tak jako tak překonat. Navíc ireverzibilní změny v konformacích proteinů vedou k poškození nebo podráždění kůže.

### **ad 2) Zvýšení rozdělovacího koeficientu léčiva mezi vehikulem a SC**

Některá rozpouštědla vstupují ve velké míře do SC, tam mění jeho rozpouštěcí vlastnosti a tím usnadňují vstup další molekuly do SC – tzn. zvyšují její koncentraci ve SC na úkor donorového vehikula (zvyšují P ve Fickově rovnici). Tou molekulou může být jak léčivo, tak jiný akcelerační s odlišným mechanismem účinku.<sup>10</sup> Tímto mechanismem mohou působit akceleranty s dobrými rozpouštěcími vlastnostmi, např. ethanol, PG nebo pyrrolidin-2-ony, které v přípravku mohou plnit obě funkce, tedy jak rozpouštědla, tak akcelerační, případně v kombinaci s jiným akceleračním, například zvyšujícím D.

Teoreticky mohou zvyšovat rozdělování léčiva do SC i akceleranty, které primárně zvyšují difúzní koeficient interakcí s lipidovými dvojvrstvami. Tím, že narušují jejich uspořádanou strukturu, zvyšují volný objem přístupný pro vstup rozpouštědla s léčivem.

### **ad 3) Zvýšení rozpustnosti léčiva ve vehikulu**

Do kůže může vstupovat pouze léčivo ve formě roztoku, což vyplývá z Fickova zákona, kde  $C_0$  představuje výchozí koncentraci rozpuštěného léčiva. U velmi málo rozpustných léčiv (příkladem mohou být steroidy) může solubilizace v donorovém vehikulu vést k výraznému zvýšení fluxu a také prodloužení doby permeace.

Mezi látky zvyšující rozpustnost léčiv mohou být zařazeny už výše zmíněné akceleranty jako ethanol, PG nebo pyrrolidony. Dále sem patří také velká skupina tenzidů.

### **ad 4) Snížení tloušťky bariéry**

Toto téma je spíše okrajové, protože se netýká přímo použití chemických akceleračních transdermální permeace. Dají se sem zařadit například metody, kdy je část vrstvy SC odstraněna mechanicky (abrazivně) nebo fyzikálně (laserem).<sup>10</sup> Tyto metody však většinou vyžadují nákladná zařízení a jsou nevhodná pro širší použití při podávání léčiv. Jiný způsob, tzv. stripování (tape-stripping), využívá opakovaného stržení vždy několika vrstev SC pomocí adhezivní náplasti. Tato metoda se však nepoužívá běžně k podávání léčiv, ale spíše v permeačních experimentech pro stanovení léčiva nebo akcelerační absorbovaného v různých vrstvách SC nebo k modelovému poškození kožní bariéry.

Za zkratku při průchodu léčiva kůží lze považovat i absorpci vlasovými folikuly a mazovými žlázkami. Úplně obejít kožní bariéru lze použitím tzv. mikrojehel, které vpraví léčivo skrz SC přímo pod epidermis.

### **ad 5) Kombinace mechanismů účinku**

Jak již bylo uvedeno u jednotlivých předešlých příkladů, některé akceleranty mohou působit více mechanismy najednou. Například DMSO ve vyšších koncentracích (nad

60 %) způsobuje rozrušení lipidové dvojvrstvy, extrahuje lipidy ze SC, interaguje s intracelulárním keratinem a zvyšuje rozdělování léčiva do SC i jeho rozpustnost.<sup>10</sup> Podobně také PG zvyšuje difúzní koeficient SC, rozpustnost i rozdělování.

Na kombinaci mechanismů účinku se lze dívat i z jiného pohledu, tedy jako na kombinaci více látek o různém mechanismu účinku použitých současně v jednom přípravku. Velmi často popisované je synergistické působení PG s Azonem, mastnými kyselinami nebo terpeny.<sup>11</sup> Finální topický přípravek tak nakonec může obsahovat PG jako vehikulum, vhodný tenzid pro zvýšení rozpustnosti léčiva a terpen nebo silici pro zlepšení organoleptických vlastností. Všechny tyto složky se tak mohou podílet na zvýšeném fluxu léčiva přes kožní bariéru, přestože nejsou přímo deklarovány jako akceleranty transdermální permeace.

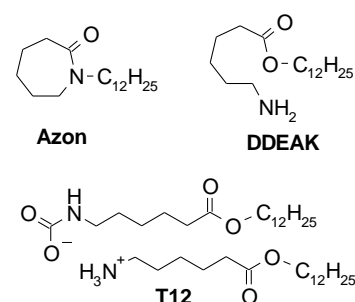
Přesný mechanismus účinku u většiny popisovaných akceleračních transdermální permeace není znám, což představuje výraznou překážku v použití TDD a zužuje tak škálu léčiv, které by mohly být podávány kůží. Popsaný mechanismus účinku by měl naopak přispět ke snazšímu procesu registrace nových látek jako akceleračních transdermální permeace a zjednodušit jejich použití ve farmaceutických nebo kosmetických přípravcích. Dále může vést k efektivnějšímu navrhování nových struktur s vyšší aktivitou nebo lepšími farmakodynamickými a farmakokinetickými vlastnostmi.

## 1.5. Transkarbam 12

Transkarbam 12 (**T12**) je akcelerační transdermální permeace připravený na našem pracovišti,<sup>27</sup> vykazující vysokou akcelerační aktivitu vzhledem k řadě různých léčiv. Tyto vlastnosti jej řadí mezi potenciálně perspektivní látky, u nichž se vyplatí hledat vztahy mezi strukturou a účinkem, případně pátrat po mechanismu akceleračního účinku.

Struktura **T12** původně vycházela z Azonu. Ze začátku byla připravena série esterů kyseliny 6-aminohexanové jako otevřené analogy Azonu (obr. 6).<sup>28,29</sup> U těchto analogů se předpokládalo, že flexibilnější struktura bude moci lépe zaujmout optimální konformaci ve SC vedoucí k lepší interakci s lipidy. Další předpokládanou výhodou oproti Azonu bylo to, že degradací esterové vazby kožními esterázami by vznikaly netoxické metabolity, což je také považováno za jednu z podmínek potenciálního použití akceleračního. Tyto látky, zejména dodecylester kyseliny 6-aminohexanové (**DDEAK**, obr. 6), překvapivě vykazovaly výrazně vyšší aktivitu ve srovnání s předlohou Azonem a to při aplikaci z hydrofilního i lipofilního prostředí. Také jejich akutní toxicita byla nižší a dermální dráždivost nulová.

Později bylo zjištěno, že za vysokou akcelerační aktivitu nezodpovídá samotná molekula **DDEAK**, ale sůl karbamové kyseliny, která z něj vzniká samovolně reakcí volné aminoskupiny s oxidem uhličitým – **T12** (5-(dodecyloxykarbonyl)pentylammonium 5-(dodecyloxykarbonyl)pentylkarbamát).<sup>30,31</sup> K léčivům, u kterých bylo při použití **T12** zaznamenáno významné zvýšení průniku kůží, patří látky polární



Obr. 6. Azon, jeho otevřený analog **DDEAK** a odpovídající karbamát **T12**.

## 1. Úvod

Tabulka 1. Akcelerační aktivita **T12** (a **DDEAK**) pro některá léčiva, vzorky obsahovaly 1 % akceleraantu.<sup>29</sup>

léčivo	AP
theofylin <sup>a</sup>	43,3
(theofylin/ <b>DDEAK</b> <sup>a</sup>	0,9)
klotrimazol <sup>b</sup>	7,0
flobufen <sup>c</sup>	5,0
griseofulvin <sup>d</sup>	>24

vehikula: <sup>a</sup>voda; <sup>b</sup>tris pufr pH 7,3/PG/ethanol 5:4:1; <sup>c</sup>tris pufr pH 7,0/PG 1:1; <sup>d</sup>voda/PG 2:3.

(např. 5-fluorouracil), látky střední polaritý (aciklovir, flobufen, theofylin) i nepolární (griseofulvin). Jeho akcelerační aktivita (vyjádřená ve formě AP) pro některá studovaná léčiva je uvedena v tabulce 1.<sup>29</sup>

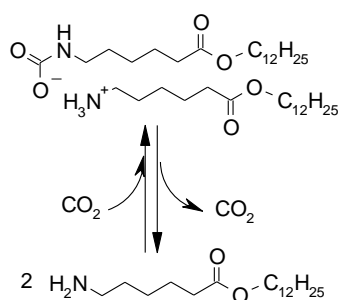
Jakožto sůl karbamové kyseliny se **T12** velmi snadno rozkládá v mírně kyselém prostředí za uvolnění molekuly oxidu uhličitého a dvou molekul volného aminoesteru **DDEAK** (obr. 7). K opačnému procesu, tedy tvorbě ammonium-karbamátu, dochází samovolně absorpcí např. vzdušného CO<sub>2</sub>. K rozkladu dochází již stopovým množstvím protonů přítomných ve vehikulu.

Ve SC, kde mastné kyseliny tvoří přibližně 10 % obsažených lipidů a pH se pohybuje kolem 5,5, předpokládáme, že se jeho polární hlava bude rozkládat podle navržené rovnice (obr. 7). Rozpad polární hlavy **T12** v prostředí SC by měl způsobit narušení uspořádané struktury lipidových lamel

- změnou nekovalentních vazeb (např. vodíkových) mezi polárními hlavami ceramidů a/nebo
- změnou konformace v molekule **T12**, ke které dojde při uvolnění CO<sub>2</sub>.

Tuto teorii dále podporuje zjištění, že samotný **DDEAK** nevykazuje žádnou akcelerační aktivitu<sup>29</sup> (permeační pokus byl v tomto případě prováděn pod argonovou atmosférou, aby se zamezilo samovolnému vzniku **T12** reakcí se vzdušným CO<sub>2</sub>, viz tabulka 1).

Rozpad polární hlavy **T12** může být kromě kyselého prostředí zapříčiněn také zahříváním, ultrazvukem nebo mechanickým namáháním (např. v molekulovém mlýnu). Konformační změny a fázové chování **T12** a jiných solí kyseliny karbamové spojené s tepelným rozkladem byly popsány v pracích Zbytovské<sup>31</sup> a Holase.<sup>32</sup> Za laboratorní teploty se však jedná o stabilní krystalickou látku. V silně bazickém vodném



Obr. 7. Rozklad **T12** v kyselém prostředí za uvolnění CO<sub>2</sub> a **DDEAK** a interakce **DDEAK** s CO<sub>2</sub> za vzniku **T12**.

roztoku dochází také k rozkladu a CO<sub>2</sub> zůstává přítomný ve formě uhličitanu. Naproti tomu ve slabě bazických roztocích (pH~9) se ustavuje rovnováha mezi karbamátem, uhličitanem a hydrogenuhličitanem.

Zároveň s rozkladem polární hlavy a uvolněním volného **DDEAK** ve SC dále očekáváme, že vlivem kožních esteráz, které jsou přítomny také v epidermis,<sup>33</sup> dojde k jeho hydrolýze. Tato hydrolýza by měla chránit živé buňky před působením akceleraantu, protože metabolity (tzn. kyselina 6-aminohexanová a dodekanol) jsou látky s velmi nízkou toxicitou. Hydrolýza byla prokázána s použitím prasečí esterázy a byla popsána pomocí rovnice kinetiky druhého řádu.<sup>29</sup>



## 2. CÍL: HLEDÁNÍ MECHANISMU ÚČINKU TRANSKARBAMU 12

Tato práce byla prováděna s hlavním cílem ověřit námi vyslovenou teorii o mechanismus transdermálně-akceleračního účinku **T12**. Pro tento účel byly využity následující metody:

### 1. Příprava analogů **T12** a hodnocení jejich akcelerační účinnosti *in vitro*.

V rámci této práce byly obměny struktury zaměřeny na polární hlavu a koncovou část lipofilního řetězce molekuly **T12**. Obměny polární hlavy spočívaly v syntéze sloučenin, které díky kovalentní vazbě  $\text{CO}_2$  nebyly schopny jej uvolnit (estery kyseliny uhličitě, karbamové a šřavelové) s cílem zjistit, jakou roli hraje tato vlastnost v aktivitě **T12**. Dále byly připraveny látky se symetrickým methylovým nebo ethylovým rozvětvením v koncové části lipofilních řetězců s předpokladem, že rozvětvení by mělo vést k výraznějšímu rozrušení uspořádané struktury SC a tím ke zvýšení aktivity. V rámci tohoto úkolu byly v diskusi také shrnuty výsledky získané v dřívějších studiích zahrnující další skupiny analogů **T12** a vedoucí k řešení vztahů mezi strukturou a účinkem.

### 2. Popis rozkladu **T12** v mírně kyselém prostředí za uvolnění $\text{CO}_2$ .

Úkolem této části práce bylo vyvinout metodu vhodnou pro studium zmíněného děje a použít ji k popsání chování **T12** v mírně kyselém prostředí, jaké se vyskytuje v místě jeho účinku (SC). Rozklad **T12** byl sledován dvěma metodami: časovým vývojem IČ spekter a thermogravimetrickou analýzou (TGA). Cílem bylo následně nalézt vztah mezi stabilitou (v tomto případě schopností uvolnit  $\text{CO}_2$ ) a transdermálně-akcelerační aktivitou.

### 3. Sledování vlivu **T12** na rozpustnost modelového léčiva ve vehikulu a na jeho rozdělování z vehikula do SC.

Jak již bylo řečeno v kapitole (1.4.2.) týkající se možných mechanismů účinku akceleračních transdermálních permeací, jsou tyto dva vlivy velmi častými mechanismy u akceleračních látek popsáných v literatuře. Pro ověření, zda vysoká účinnost **T12** nesouvisí také s jeho působením na rozpustnost modelového léčiva nebo na jeho rozdělování do SC, byly tyto vlastnosti také studovány.

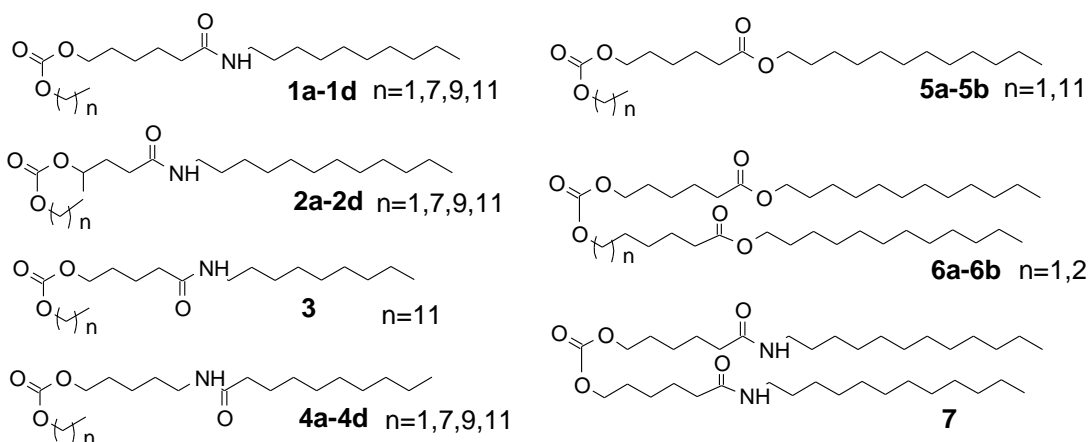
### 3. VÝSLEDKY

#### 3.1. Analogy T12

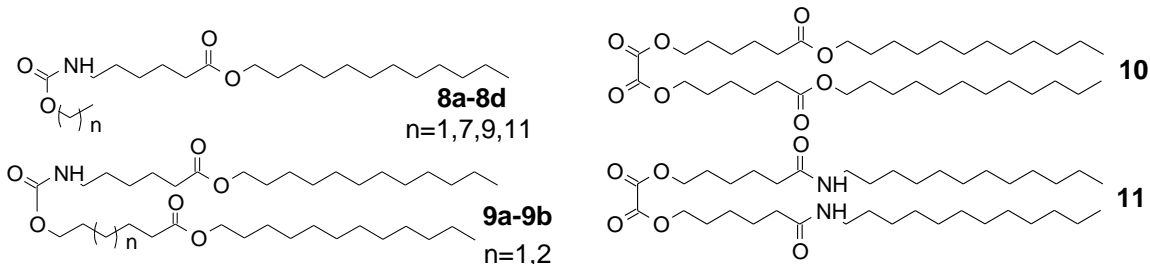
V rámci této práce byly připraveny látky obměňující molekulu **T12** na dvou místech: na polární hlavě (látky s kovalentně vázaným CO<sub>2</sub>) a v koncové části lipofilních řetězců (rozvětvené karbamáty, alkoholy a kyseliny).

##### 3.1.1. Obměny polární hlavy\*

V molekule **T12** byla nahrazena jeho unikátní polární hlava za funkční skupiny neschopné snadno uvolňovat CO<sub>2</sub>. Jedná se o sérii esterů kyseliny uhličitě, karbamové a šťavelové. Přehled připravených analogů je uveden na obrázcích 8-10. Ve většině připravených látek byla změna provedena také na úrovni postranních řetězců a to náhradou esteru za amid, změnou délky řetězce, rozvětvením v blízkosti polární hlavy či náhradou jednoho esterového postranního řetězce za jednoduchý alkyl o různé délce. Cílem bylo porovnat akcelerační účinnost připravených látek s **T12** a dále porovnat jejich účinnost navzájem s přihlédnutím ke stupni jejich podobnosti s **T12**. Za strukturálně nejbližší látky lze považovat deriváty **6a**, **6b**, **9a** a **9b**.



Obr. 8. Připravené estery kyseliny uhličitě.



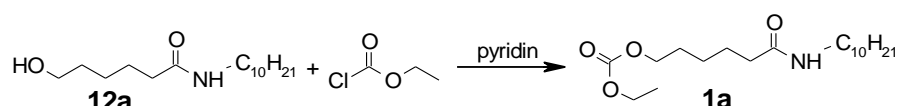
Obr. 9. Připravené estery kyseliny karbamové.

Obr. 10. Připravené estery kyseliny šťavelové.

\* viz příloha 1

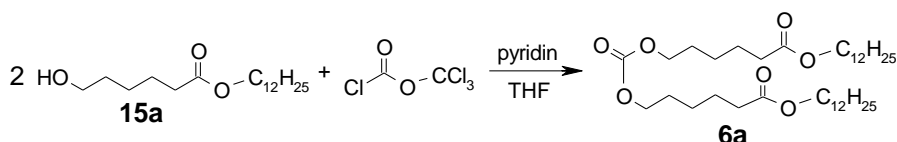
### 3.1.1.1. Syntéza analogů T12 s kovalentně vázaným CO<sub>2</sub>

Estery kyseliny uhličitě a karbamové byly obecně připravovány reakcí příslušných alkyl-chlorformiátů s odpovídajícím hydroxyesterem, hydroxyamidem případně aminoesterem. V případě látek s jedním jednoduchým alkylovým řetězcem (**1-5** a **8**) bylo možno vycházet z komerčně dostupných alkyl-chlorformiátů. Syntéza je znázorněna na příkladu látky **1a** (obr. 11). Výtěžek byl 47-80 % u esterů kyseliny uhličitě **1-5** a 78-92 % u esterů kyseliny karbamové **8**. Příprava prekurzorů (**12-15** a **DDEAK**) je popsána dále.

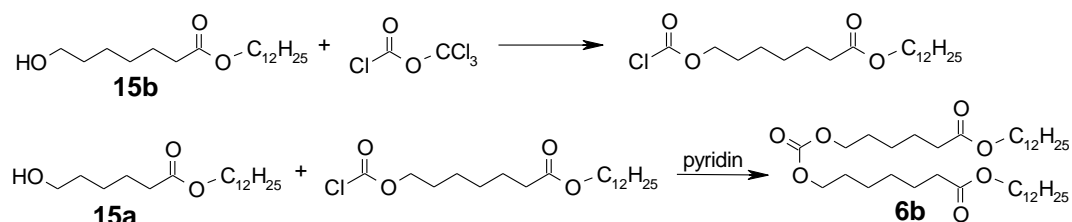


Obr. 11. Schéma přípravy látky **1a**. Ostatní estery kyseliny uhličitě a karbamové s jedním jednoduchým alkylovým řetězcem (**1-5** a **8**) byly připraveny analogicky.

Komerčně nedostupné chlorformiáty odvozené od hydroxyesterů nebo hydroxyamidů (potřebné k přípravě látek **6**, **7** a **9**) byly připravovány ze zmíněných hydroxysloučenin reakcí s trichlormethyl-chlorformiátem (difosgenem).<sup>34</sup> Takto připravený chlorformiát dále reagoval s příslušnou hydroxy- nebo aminosloučeninou stejně jako v předchozím případě. V případě symetrických esterů (**6a** a **7**) reagovalo dvojnásobné množství hydroxysloučeniny s difosgenem (obr. 12), výtěžky byly 63-66 %. Nesymetrické estery **6b** a **9** byly připraveny ve dvou krocích (obr. 13). Výtěžek: 20-47 %.



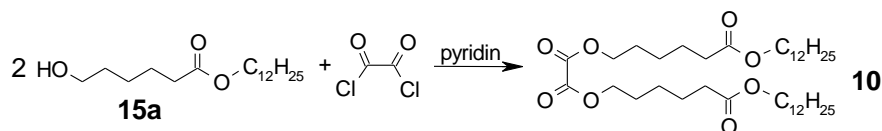
Obr. 12. Schéma přípravy symetrického esteru kyseliny uhličitě **6a**. Látka **7** byla připravena analogicky.



Obr. 13. Schéma přípravy nesymetrického esteru kyseliny uhličitě **6b**. Estery kyseliny karbamové **9a** a **9b** byly připraveny analogicky.

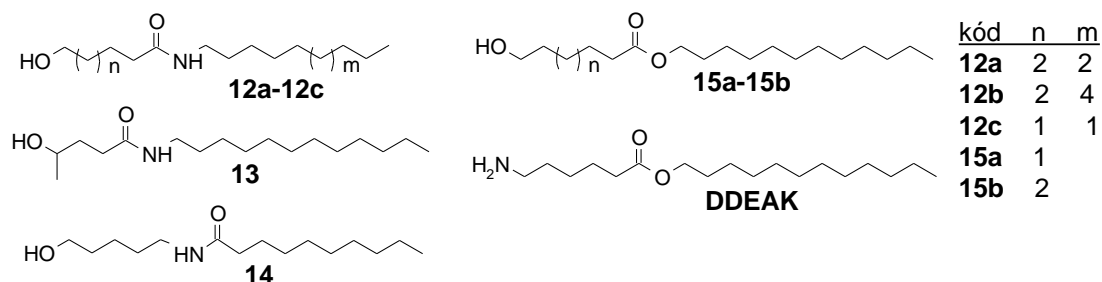
Estery kyseliny šťavelové (**10** a **11**) byly připraveny reakcí hydroxyesteru nebo hydroxyamidu s oxalyldichloridem v přítomnosti pyridinu (obr. 14). Výtěžek byl 45-52 %.

### 3. Výsledky



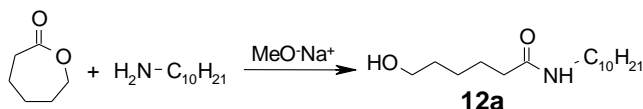
Obr. 14. Schéma přípravy esteru kyseliny šťavelové **10**, látka **11** byla připravena analogicky.

Těmto reakcím předcházely přípravy prekurzorů: hydroxyamidů **12** a **13**, „převráceného“ hydroxyamidu **14**, hydroxyesterů **15** a aminoesteru **DDEAK** (obr. 15).



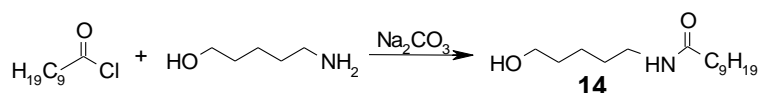
Obr. 15. Prekurzory **12-15** a **DDEAK**.

Amidy hydroxykyselin **12** a **13** byly připraveny aminolýzou odpovídajících laktonů za katalýzy methoxidem sodným<sup>35</sup> (obr. 16). Výtěžek: 80-93 %.



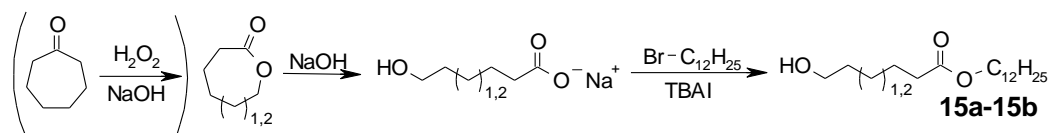
Obr. 16. Schéma přípravy hydroxyamidu **12a**.

„Převrácený“ hydroxyamid **14** byl připraven reakcí dekanoylchloridu s aminopentanolem v prostředí vodného uhlčitanu sodného<sup>36</sup> (obr. 17). Výtěžek: 72 %.



Obr. 17. Schéma přípravy hydroxyamidu **14**.

Estery hydroxykyselin **15** byly připraveny reakcí sodných solí  $\omega$ -hydroxykyselin s dodecylbromidem v přítomnosti tetrabutylammonium-jodidu (TBAI) jako katalyzátoru fázového přenosu<sup>37</sup> (obr. 18). Sodné soli  $\omega$ -hydroxykyselin byly připravovány hydrolýzou jejich laktonů. Komerčně nedostupný lakton kyseliny 7-hydroxyheptanové byl připraven oxidací cykloheptanonu peroxidem vodíku.<sup>38</sup> Výtěžek: 32-51 %.



Obr. 18. Schéma přípravy hydroxyesterů **15**.

Dodecylester kyseliny 6-aminohexanové **DDEAK** byl v čase potřeby připravován rozpuštěním **T12** v chloroformu, čímž došlo k rozkladu karbamátové skupiny a uvolnění dvou molekul volného aminoesteru.

### 3.1.1.2. Transdermálně akcelerační aktivita analogů T12 s kovalentně vázaným CO<sub>2</sub>

Transdermálně akcelerační účinnost vybraných připravených látek byla testována *in vitro* s použitím modifikované Franzovy difúzní cely. Jako modelová membrána byla použita prasečí kůže plné tloušťky a modelovým léčivem byl theofylin. Aktivita byla sledována ve třech donorových médiích s různou polaritou: voda (V), směs propylenglykol/voda 3:2 (PGV) a isopropyl-myristát (IPM). Stejným způsobem byly hodnoceny i dvě srovnávané látky: **T12** a Azon.

Akcelerační aktivity připravených a srovnávaných látek jsou shrnuty v tabulce 2 a jsou vyjádřeny ve formě akceleračního poměru (AP) ± směrodatná odchylka (SO). Testovány byly z praktických důvodů pouze některé látky, většinou se jednalo o nejkratší a nejdelší homolog z připravené řady.

Tabulka 2. Akcelerační aktivita některých látek.

látka	AP±SO			
	V	PGV	IPM	
Estery kyseliny uhlíčné	<b>1a</b>	3,37±0,66 <sup>a,b</sup>	1,36±0,31	1,75±0,91
	<b>1d</b>	1,13±0,14	2,66±0,74 <sup>a</sup>	1,48±0,22 <sup>a</sup>
	<b>2a</b>	1,48±0,50	1,45±0,89	1,77±0,54
	<b>2d</b>	1,70±0,48 <sup>a</sup>	1,11±0,19	1,15±0,17
	<b>5a</b>	2,40±1,15 <sup>b</sup>	2,13±0,03 <sup>a</sup>	1,07±0,37
	<b>5b</b>	2,49±1,13 <sup>ab</sup>	1,13±0,36	1,29±0,57
	<b>6a</b>	1,76±0,63	3,70±1,14 <sup>a</sup>	1,39±0,38
	<b>6b</b>	0,80±0,03	1,24±0,81	1,49±0,68
	<b>7</b>	0,91±0,24	3,29±1,24 <sup>a</sup>	1,23±0,36
	Estery kyseliny karbamové	<b>8a</b>	1,83±0,37 <sup>a</sup>	1,52±0,50
<b>8d</b>		0,77±0,16	0,47±0,10	0,57±0,20
<b>9a</b>		2,27±0,36 <sup>ab</sup>	2,63±0,06 <sup>a</sup>	1,29±0,56
<b>9b</b>		1,22±0,72	1,02±0,46	1,07±0,47
Estery kyseliny šťavelové	<b>10</b>	0,66±0,26	0,73±0,60	1,02±0,29
	<b>11</b>	0,89±0,19	1,43±0,25	2,77±0,77
Azon		1,04±0,31	27,97±1,98 <sup>a</sup>	1,20±0,31
<b>T12</b>		1,90±0,27 <sup>a</sup>	22,80±1,08 <sup>a</sup>	6,56±0,52 <sup>a</sup>

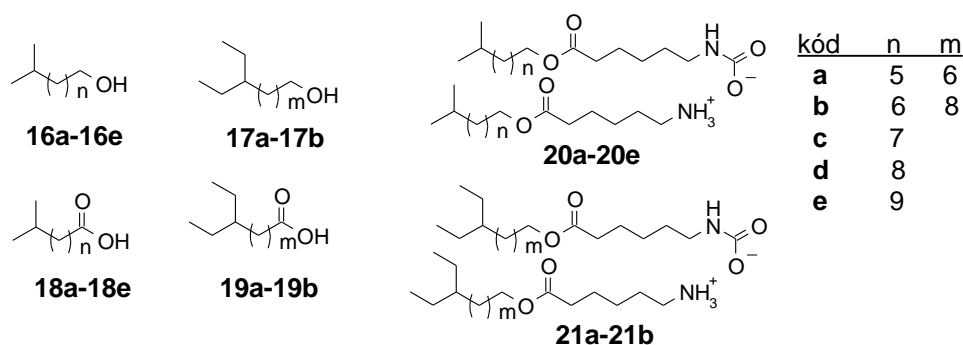
n=4-9, vzorky kůže ze 2-3 zvířat pro každou látku

<sup>a</sup> p<0,05 proti slepému vzorku, <sup>b</sup> p<0,05 proti **T12**

### 3. Výsledky

#### 3.1.2. Obměny lipidového řetězce T12\*

Do koncové části lipidového řetězce **T12** bylo zavedeno symetrické methylové nebo ethylové rozvětvení s cílem zjistit, zda rozměrnější skupina povede k většímu rozrušení uspořádané struktury SC a tím ke zvýšení akcelerační aktivity ve srovnání s lineárním **T12**. Při syntéze rozvětvených analogů **T12** bylo nejprve potřeba připravit příslušné rozvětvené mastné alkoholy a kyseliny. Tyto látky byly také otestovány na akcelerační aktivitu, abychom mohli sledovat, zda zavedení stejné strukturní obměny povede ke stejným změnám v aktivitách u látek různého typu. Připravené rozvětvené alkoholy, kyseliny a karbamáty jsou shrnuty na obr. 19.

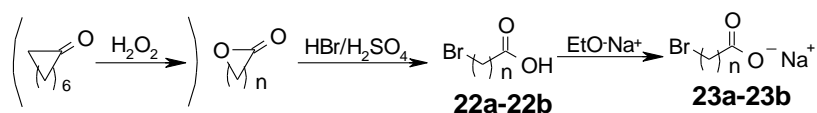


Obr. 19. Přehled připravených rozvětvených mastných alkoholů, kyselin a karbamátů.

##### 3.1.2.1. Syntéza rozvětvených analogů T12

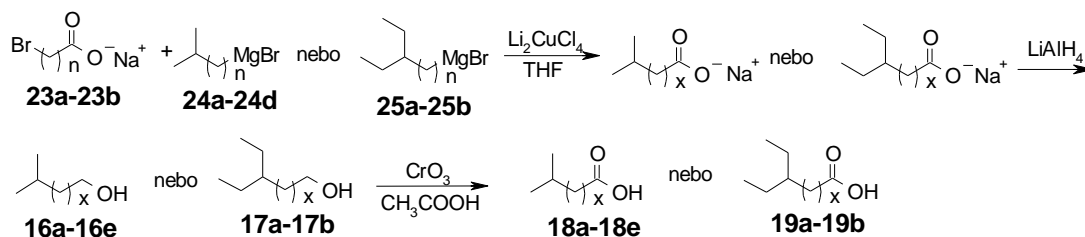
Z požadovaných látek byly pouze kyseliny **18b**, **18d** a **18e** komerčně dostupné, nicméně jejich cena byla příliš vysoká, proto byla celá série připravována. Následující schémata 20-21 a tabulka 3 popisují nejúspěšnější z vyzkoušených syntetických cest.

Rozvětvené alkoholy **16-17** byly připravovány spojením sodné soli  $\omega$ -bromkyseliny **23** s odpovídajícím alkylmagnesiumbromidem **24-25** za katalýzy  $\text{Li}_2\text{CuCl}_4$ <sup>39,40</sup> a následnou redukcí komplexním hydridem (obr. 21). Sodné soli  $\omega$ -bromkyselin **23** byly připravovány z příslušných  $\omega$ -laktonů, v případě kyseliny 8-bromoktanové z cyklooktanonu (obr. 20). Grignardovy sloučeniny byly připravovány v čase potřeby z odpovídajících krátkých rozvětvených alkylbromidů. Komerčně nedostupný 4-ethylhexylbromid byl připraven malonesterovou syntézou z 2-ethylbutylbromidu. Kyseliny **18-19** byly připraveny oxidací alkoholů oxidem chromovým v kyselině octové.<sup>41</sup> Přehled látek včetně kódů je uveden v tabulce 3.



Obr. 20. Příprava sodných solí  $\omega$ -bromkyselin **23**.

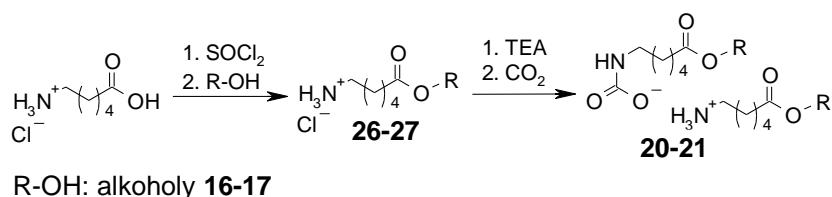
\* viz přílohy 2 a 3

Obr. 21. Příprava rozvětvených alkoholů **16-17** a kyselin **18-19**.

Tabulka 3. Přehled připravených rozvětvených alkoholů a kyselin včetně meziproduktů a kombinace reaktantů.

látka	n	alkoholy	kyseliny	x	reaktanty
<b>22a, 23a</b>	5	<b>16a</b>	<b>18a</b>	5	23a+24a
<b>22b, 23b</b>	7	<b>16b</b>	<b>18b</b>	6	23a+24b
<b>24a</b>	0	<b>16c</b>	<b>18c</b>	7	23a+24c
<b>24b</b>	1	<b>16d</b>	<b>18d</b>	8	23a+24d
<b>24c</b>	2	<b>16e</b>	<b>18e</b>	9	23b+24c
<b>24d</b>	3	<b>17a</b>	<b>19a</b>	6	23a+25a
<b>25a</b>	1	<b>17b</b>	<b>19b</b>	8	23a+25b
<b>25b</b>	3				

Rozvětvené karbamáty **20-21** byly připravovány podle postupu popsaného dříve<sup>28</sup> pro syntézu lineárních karbamátů (obr. 22). Z hydrochloridu kyseliny 6-aminohexanové byl působením thionylchloridu připraven její chlorid a ten následně reagoval s příslušným rozvětveným alkoholem za vzniku hydrochloridu esteru (**26-27**). Hydrochlorid byl pomocí triethylaminu (TEA) převeden na volný aminoester, který následně reagoval s oxidem uhličitým za vzniku cílového karbamátu **20-21**.

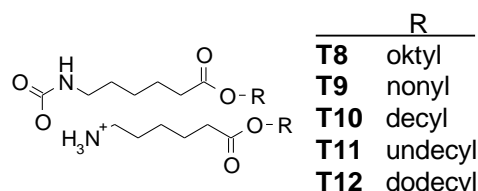
Obr. 22. Příprava rozvětvených karbamátů **20-21**.

### 3.1.2.2. Transdermálně akcelerační aktivita rozvětvených alkoholů, kyselin a karbamátů

Akcelerační aktivita připravených látek byla testována stejným způsobem jako aktivita analogů s kovalentně vázaným CO<sub>2</sub> v soustavě PGV. Vedle připravených látek byly stejným způsobem otestovány také lineární analogy: oktanol, dekanol, dodekanol,

### 3. Výsledky

kyselina oktanová, dekanová a dodekanová. V případě karbamátů se jednalo o řadu lineárních transkarbamátů (**T8-T12**, obr. 23) stejné délky řetězce jako studované rozvětvené karbamáty. Tyto lineární transkarbamáty byly připraveny dříve na našem pracovišti.<sup>28,42</sup> Aktivity jsou shrnuty v tabulkách 4-5.



Obr. 23. Lineární transkarbamáty **T8-T12** testované pro srovnání s rozvětvenými.

Tabulka 4. Akcelerační aktivita připravených rozvětvených alkoholů a kyselin.

Alkoholy	AP±SO	Kyseliny	AP±SO
<b>16a</b>	36,01±9,84 <sup>a</sup>	<b>18a</b>	2,49±1,24 <sup>a</sup>
<b>16b</b>	28,12±3,94 <sup>a</sup>	<b>18b</b>	4,10±1,20 <sup>a</sup>
<b>16c</b>	19,93±5,45 <sup>a,b</sup>	<b>18c</b>	5,49±2,97 <sup>a</sup>
<b>16d</b>	14,32±3,76 <sup>a</sup>	<b>18d</b>	4,08±1,41 <sup>a</sup>
<b>16e</b>	11,92±4,97 <sup>a</sup>	<b>18e</b>	4,10±2,34 <sup>a,b</sup>
<b>17a</b>	32,55±7,16 <sup>a,b</sup>	<b>19a</b>	13,18±3,93 <sup>a,b</sup>
<b>17b</b>	18,13±6,27 <sup>a,b</sup>	<b>19b</b>	11,45±3,92 <sup>a,b</sup>
oktanol	34,77±13,28 <sup>a</sup>	kys. oktanová	2.15±1.06 <sup>a</sup>
dekanol	72,61±9,75 <sup>a</sup>	kys. dekanová	6.23±1.35 <sup>a</sup>
dodekanol	12,16±3,09 <sup>a</sup>	kys. dodekanová	2,43±0,94 <sup>a</sup>

n=6-11 (vzorky kůží ze 3-8 zvířat pro každou látku)

<sup>a</sup> p<0,05 srovnání se slepým vzorkem, <sup>b</sup> p<0,05 srovnání se stejně dlouhým lineárním analogem.

Tabulka 5. Akcelerační aktivita lineárních a rozvětvených karbamátů.

lineární	AP±SO	methyl	AP±SO	ethyl	AP±SO
<b>T8</b>	10.35±4.95 <sup>a</sup>	<b>20a</b>	11.41±5.86 <sup>a</sup>		
<b>T9</b>	16.28±5.70 <sup>a</sup>	<b>20b</b>	23.28±8.77 <sup>a</sup>		
<b>T10</b>	33.60±3.38 <sup>a</sup>	<b>20c</b>	26.34±11.95 <sup>a</sup>	<b>21a</b>	23.19±4.17 <sup>a</sup>
<b>T11</b>	28.86±9.80 <sup>a</sup>	<b>20d</b>	26.12±9.93 <sup>a</sup>		
<b>T12</b>	20.02±3.69 <sup>a</sup>	<b>20e</b>	18.97±10.15 <sup>a</sup>	<b>21b</b>	18.08±6.12 <sup>a</sup>

n=6-14 (vzorky kůží ze 4-8 zvířat pro každou látku)

<sup>a</sup> p<0,05 srovnání se slepým vzorkem.



### 3.2. Popis rozkladu T12 v mírně kyselém prostředí

Schopnost **T12** rozkládat se za uvolnění  $\text{CO}_2$  v mírně kyselém prostředí byla studována pomocí IČ spektroskopie a TGA. V těchto pokusech byla jako látka simulující acidobazické vlastnosti SC používána palmitová kyselina (PK), případně extrahované lipidy SC obsahující asi 10 % mastných kyselin.

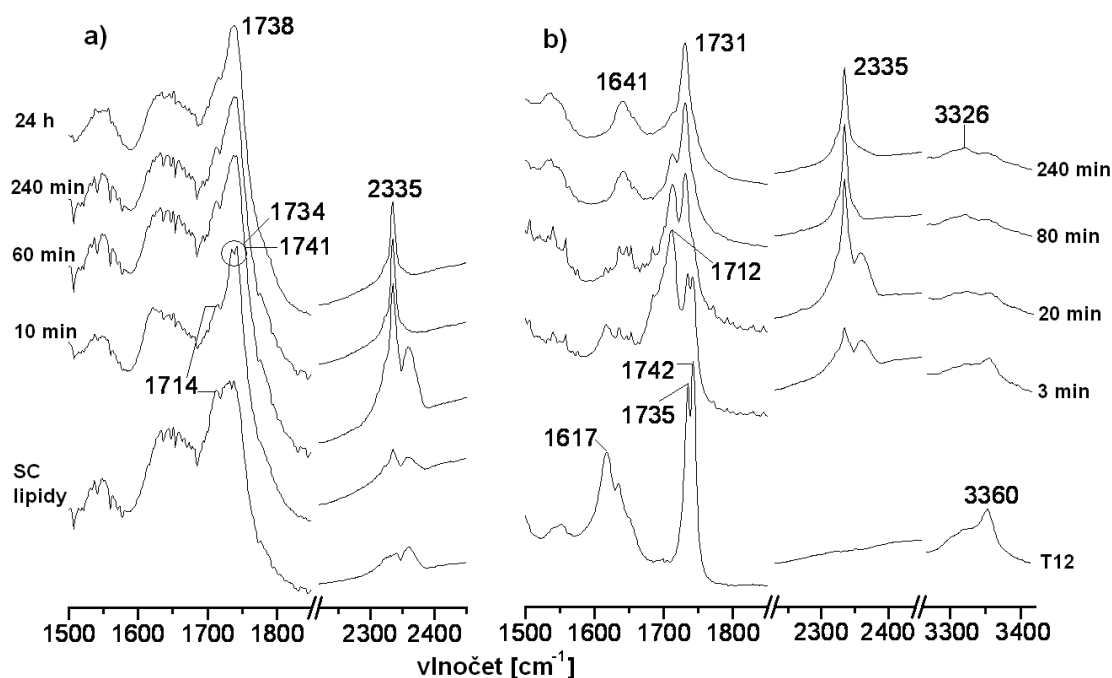
#### 3.2.1. Časový vývoj IČ spekter směsi T12 a PK

V tomto pokusu byla snímána IČ spektra dané směsi v nujolu v určitých časových intervalech od jejího smíchání. Poměr **T12** a PK byl přibližně 1:1 (molárně). Oblasti spekter, kde docházelo k nejvýraznějším změnám jsou znázorněny na obrázku 24b, jejich popis je v tabulce 6.

Tabulka 6. Popis vývoje nejvýraznějších změn pozorovaných ve spektrech směsi **T12** a PK.

vlnočet [ $\text{cm}^{-1}$ ]	přiřazení a popis vývoje daného pásu
3360	NH vibrace karbamátu, postupně mizí (nevymizí zcela, po 4 hod zůstává stále jako méně intenzivní pás vedle 3326)
3326	mírně narůstá
2335	valenční vibrace $\text{CO}_2$ , ostrý a výrazný, vzniká po několika minutách od smíchání, postupně narůstá, nejedná se o vzdušný $\text{CO}_2$
1742 a 1735	oddělené pásy odpovídající jednotlivým karbonylům ve dvou esterových vazbách <b>T12</b> , postupně se spojují a posunují k nižší frekvenci (po 4 hod: $1731 \text{ cm}^{-1}$ )
1712	valenční vibrace karboxylu PK, postupně mizí
1641	vzniká po několika minutách (kolem 1647), narůstá a posunuje se až k 1641 (asym. deformace $\text{NH}_3^+$ soli palmitátu)
1617	valenční vibrace karbonylu v polární hlavě <b>T12</b> (karbamátu), postupně mizí

### 3. Výsledky



Obr. 24. Časový vývoj sledovaných pásů v IČ spektrech směsi a) **T12** a lipidů SC, b) **T12** a PK.

#### 3.2.2. Časový vývoj IČ spekter směsi T12 a extrahovaných lipidů SC

Podobný experiment jako v minulé kapitole byl následně proveden také s použitím lipidů SC extrahovaných z prasečí kůže místo samotné PK. Tato spektra nebyla tak jednoznačně čitelná (obr. 24a). Nicméně rozhodující pásy procházely podobnými změnami jako v předešlém pokusu (tabulka 7).

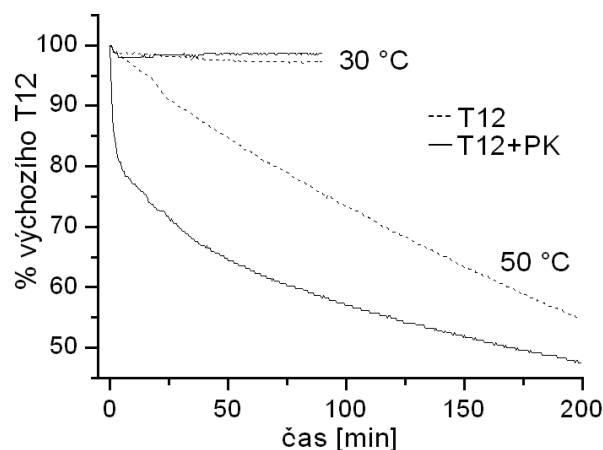
Tabulka 7. Popis vývoje nejvýraznějších změn pozorovaných ve spektrech směsi **T12** a lipidů SC.

vlnočet [ $\text{cm}^{-1}$ ]	přiřazení a popis vývoje daného pásu
2335	valenční vibrace $\text{CO}_2$ , ostrý a výrazný, vzniká po několika minutách od smíchání, postupně narůstá
1741 a 1734	oddělené pásy odpovídající jednotlivým karbonylům ve dvou esterových vazbách <b>T12</b> , postupně se spojují a posunují k nižší frekvenci (po 24 hod $1738 \text{ cm}^{-1}$ )
1714	valenční vibrace karboxylů mastných kyselin SC, postupně se zmenšuje jeho intenzita

### 3.2.3. Thermogravimetrická analýza (TGA)

V tomto pokusu byl měřen úbytek hmotnosti vzorku v závislosti na čase (úbytek hmotnosti způsobený únikem plynného CO<sub>2</sub> po rozkladu **T12**). Měření byla provedena při dvou konstantních teplotách: 50 a 30 °C. Vzorek tvořil buď samotný **T12** nebo jeho směs s PK. Na grafu na obr. 25 je vyneseno úbytek hmotnosti (vyjádřený v procentech původního molárního množství **T12**) proti času při obou teplotách pro oba vzorky.

Při 30 °C nebyl pozorován úbytek hmotnosti u žádného ze vzorků. Pokus byl tedy přerušen po 90 min. Naopak při 50 °C byl úbytek v obou případech pozorován a dokonce probíhal u každého vzorku podle jiné závislosti. Samotný **T12** se při 50 °C rozpadal lineárně ( $R^2=0,9913$ ), zatímco u směsi s PK se jednalo zjevně o nelineární závislost a nástup rozpadu byl signifikantně rychlejší (prudší sklon křivky) než u samotného **T12**.



Obr. 25. TGA **T12** a jeho směsi s PK.

### 3.3. Vliv **T12** na rozpustnost modelového léčiva ve vehikulu a na jeho rozdělování z vehikula do SC

Jako modelové léčivo byl pro tyto pokusy používán theofylin, donorovými médii byly V, PGV a IPM. Pro stanovení rozdělování bylo použito hydratované SC izolované z prasečí kůže. Rozpustnosti, rozdělovací koeficienty a fluxy (J) theofylinu v přítomnosti a nepřítomnosti **T12** jsou shrnuty v tabulce 8. Rozdělování theofylinu je vyjádřeno ve formě rozdělovacího koeficientu  $P_{sc/rozp.}$ , což je poměr množství theofylinu vázaného v 10 mg SC ku množství rozpuštěnému v 1 ml vehikula po 24 hod inkubace.

Tabulka 8. Rozpustnosti, rozdělovací koeficienty a fluxy theofylinu – vliv **T12**.

		V	PGV	IPM
rozpustnost theofylinu <sup>a</sup>	bez <b>T12</b>	708,0±16,6	2407,8±68,7	36,3±14,1
	s <b>T12</b>	802,3±30,5*	2941,2±56,2*	26,9±3,2
$P_{sc/rozp.}$ <sup>b</sup>	bez <b>T12</b>	0,11±0,03	0,02±0,01	3,03±1,08
	s <b>T12</b>	0,22±0,02*	0,02±0,01	0,69±0,17*
J±SD <sup>c</sup>	bez <b>T12</b>	10,0±2,2	1,3±0,9	4,3±1,4
	s <b>T12</b>	18,9±3,9*	27,7±1,7*	26,6±7,0*
	AP±SD	1,90±0,27	22,80±1,08	6,56±0,52

<sup>a</sup> n=6-8, [mg/100 ml]; <sup>b</sup> n=3; <sup>c</sup> n=6-9, 5% theofylin, 1% **T12**

\* p<0,05 ve srovnání se slepým vzorkem (bez **T12**).

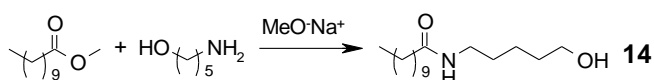
## 4. DISKUZE

### 4.1. Syntéza analogů T12

#### 4.1.1. Syntéza prekurzorů pro přípravu analogů T12 s kovalentně vázaným CO<sub>2</sub> (12-15 a DDEAK)

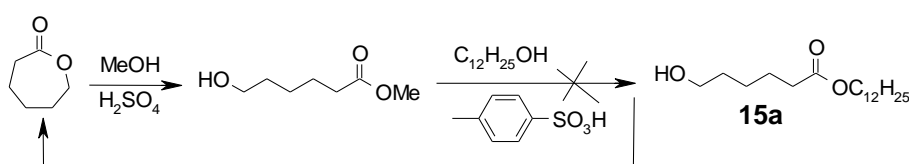
**Amidy hydroxykyselin 12 a 13** byly připravovány podle schématu na obr. 16 (kapitola 3.1.1.1.), bez použití rozpouštědla. Pro zvýšení výtěžku reakce bylo potřeba použít mírného přebytku alkylaminu (10 % proti odpovídajícímu laktonu).

Pro syntézu **převráceného hydroxyamidu 14** (5-hydroxypentylamid kyseliny dekanové) byla původně použita reakce methyl-dekanoátu s 5-aminopentanolem katalyzovaná methoxidem sodným (obr. 26). Tato reakce však probíhala s nízkým výtěžkem (<20 %). Protože měla tato látka sloužit jako prekurzor pro přípravu několika dalších látek a bylo jí tedy potřeba větší množství, byla nalezena druhá, výhodnější, syntéza (obr. 17, kapitola 3.1.1.1.), která probíhala se 72% výtěžkem.



Obr. 26. Syntéza převráceného hydroxyamidu **14** z methyl-dekanoátu.

Původní pokus o přípravu **esteru hydroxykyseliny 15a** vycházel z reesterifikace methylesteru kyseliny 6-hydroxyhexanové dodekanolem katalyzované kyselinou *p*-toluensulfonovou (obr. 27). Při této reakci však docházelo pouze ke zpětné cyklizaci na kaprolakton. Úspěšná byla až druhá cesta využívající reakci sodné soli kyseliny 6-hydroxyhexanové s dodecylbromidem bez rozpouštědla za katalýzy TBAI (obr. 18, kapitola 3.1.1.1.). Tato reakce proběhla s 51% výtěžkem.



Obr. 27. Pokus o přípravu hydroxyesteru **15a** z methylesteru kyseliny 6-hydroxyhexanové.

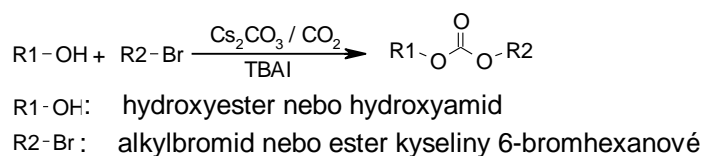
Analogicky jako ester **15a** byl připravován i o jeden uhlík delší homolog **15b**, dodecylester kyseliny 7-hydroxyheptanové. Tady bylo pro přípravu sodné soli kyseliny 7-hydroxyheptanové potřeba vycházet z cykloheptanonu a jeho oxidací peroxidem vodíku připravit komerčně nedostupný lakton kyseliny 7-hydroxyheptanové. Oxidaci bylo potřeba provádět při teplotě v rozmezí 40-45 °C, při nižší teplotě byl rapidně snížen výtěžek, při teplotě kolem 55 °C je popisováno nebezpečí vzniku organických peroxidů a výbuchu. Získaný lakton, obsahující malé množství necyklizované hydroxykyseliny, byl bez rozdělení směsi použit pro přípravu sodné soli kyseliny a následně esteru. Výtěžek této reakce (32 %) byl tedy pouze orientační a byl vztažen na výchozí cykloheptanon, ne na lakton jako v případě látky **15a**.

**Aminoester DDEAK** je možné připravit v čase potřeby velmi jednoduše rozkladem **T12**, k němuž dochází pouhým rozpuštěním v chloroformu (přítomností stopových množství  $H^+$ ).

#### 4.1.2. Syntéza analogů **T12** s kovalentně vázaným $CO_2$

**Estery kyseliny uhličitě 1-7** měly být původně připravovány působením příslušné hydroxysloučeniny (hydroxyamidu nebo hydroxyesteru) a alkylbromidu na uhličitán cesný v přítomnosti TBAI jako katalyzátoru fázového přechodu a za probublávání  $CO_2$  (obr. 28).<sup>43,44</sup> Tato reakce však neprobíhala při použití reaktantů s delším alkylovým řetězcem (pro naši potřebu kolem 12-18 uhlíků). Reakce byla pro ověření úspěšně provedena pouze s jednoduchými lineárními alkyly R1 a R2 do 6-8 uhlíků s výtěžkem kolem 75 %.

Proto byla pro přípravu esterů kyseliny uhličitě použita metoda využívající alkyl-chlorformiáty (schémata 11-13, kapitola 3.1.1.1.). K přípravě látek s jedním alkylovým řetězcem **1-5** byly použity komerčně dostupné alkyl-chlorformiáty o délce řetězce 2, 8, 10 a 12 uhlíků. Reakce byla prováděna při  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  v prostředí bezvodého pyridinu, který sloužil zároveň jako rozpouštědlo a činidlo vázající vznikající HCl.



Obr. 28. Původně navržené schéma přípravy esterů kyseliny uhličitě působením hydroxysloučeniny a alkylbromidu na uhličitán cesný a  $CO_2$ .

Při přípravě esterů kyseliny uhličitě, které měly v obou řetězcích esterovou nebo amidovou vazbu (látky **6** a **7**), bylo potřeba nejprve jednu z těchto látek převést na alkyl-chlorformiát. To bylo provedeno reesterifikací trichlormethyl-chlorformiátu (difosgen). V případě symetrických esterů kyseliny uhličitě **6a** a **7** byla reakce provedena v jednom kroku, protože na difosgen bylo působeno dvojnásobným přebytkem příslušné hydroxysloučeniny. V případě nesymetrického esteru **6b**, kde jeden spojovací řetězec je o 1 uhlík delší, byla reakce provedena ve dvou krocích. Nejprve reagoval jeden hydroxyester s 15% přebytkem difosgenu. Přebytek difosgenu byl nutný proto, aby se zabránilo vzniku symetrického karbonátu. Ze stejného důvodu bylo také nutné provádět první krok v poměrně velkém zředění a přikapávat roztok hydroxyesteru k roztoku difosgenu velmi pomalu. Připravený chlorformiát bylo nutné spotřebovat okamžitě ve druhém kroku, protože byl značně nestabilní. Proto byl patrně také snížen výtěžek této reakce na 20 %.

**Estery kyseliny karbamové 8-9** byly připravovány velmi podobně jako estery kyseliny uhličitě. Jako prekurzor byl používán **T12**, který byl v čase potřeby rozložen chloroformem na **DDEAK**. Příprava esterů **8** s jedním alkylovým řetězcem probíhala

#### 4. Diskuze

stejnou metodou jako u látek **1-5**. Narozdíl od nich však reakce probíhala za laboratorní teploty. Látky **9a** a **9b** byly syntetizovány stejným způsobem jako látka **6b**, přičemž druhý krok opět probíhal za laboratorní teploty.

##### 4.1.3. Syntéza rozvětvených alkoholů 16-17 a kyselin 18-19

Syntéze těchto látek se na našem pracovišti podrobně věnoval ing. Petr Kosák, který zkoumal řadu syntetických přístupů a vyvinul metodu laboratorní přípravy rozvětvených alkoholů a kyselin v potřebných množstvích. Tato metoda spočívala ve spojení sodné soli  $\omega$ -bromkyseliny s odpovídající rozvětvenou Grignardovou sloučeninou za katalýzy  $\text{Li}_2\text{CuCl}_4$ .

Nejprve byly syntetizovány  **$\omega$ -bromkyseliny 22a** a **22b**. Ty byly připraveny reakcí laktonu odpovídající  $\omega$ -hydroxykyseliny se směsí kyseliny sírové a bromovodíkové. V případě kyseliny **22b** (8-bromoktanová) bylo potřeba nejprve připravit lakton, který je komerčně nedostupný. Ten byl připraven oxidací cyklooktanonu peroxidem vodíku, stejně jako lakton kyseliny 7-hydroxyheptanové při přípravě látky **15b**, a byl použit bez čištění na přípravu  $\omega$ -bromkyseliny. Výtěžek reakce byl počítán na výchozí cyklooktanon a je tedy pouze orientační.

**Sodné soli  $\omega$ -bromkyselin 23a** a **23b** byly připraveny reakcí s ethoxidem sodným. Tento způsob byl výhodnější než reakce s vodným NaOH, protože sůl byla získána rovnou jako bezvodá. V námi používaných množstvích (řádově desítky gramů) by byla izolace z vodného roztoku a její následné sušení náročnější.

**Grignardovy sloučeniny 24** a **25** byly připravovány vždy v čase potřeby reakcí komerčně dostupného kratšího rozvětveného alkylbromidu s hořčíkem v tetrahydrofuranu (THF) a připravený roztok byl bez izolace rovnou použit k přípravě alkoholů. Komerčně nedostupný 4-ethylhexylbromid byl připraven z 2-ethylbutylbromidu prodloužením o 2 uhlíky malonesterovou syntézou (postup není uveden v experimentální části).

**Katalyzátor  $\text{Li}_2\text{CuCl}_4$**  byl připravován vždy v čas potřeby a to opatrným žiháním stechiometrických množství  $\text{LiCl}\cdot\text{H}_2\text{O}$  a  $\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ . Při zahřívání reakční směsi bylo potřeba dbát na to, aby bylo dosaženo hnědého zbarvení směsi, ne však černého (vznik oxidu měďnatého). Katalyzátor je možné také připravit do zásoby, avšak musí být uchovávan v suchu a pod inertní atmosférou.

Při přípravě **alkoholů 16-17** byl používán přibližně 50% nadbytek Grignardovy sloučeniny oproti soli  $\omega$ -bromkyseliny. Teplota reakční směsi byla během přidávání roztoku Grignardovy sloučeniny k suspenzi soli udržována na  $-5\text{ }^\circ\text{C}$ . Přikapávání tedy probíhalo takovou rychlostí, aby se směs příliš nezahřívala, ale zároveň aby Grignardova sloučenina netuhla v přikapávací nádobě. Bylo také nutné zajistit dokonalé promíchávání reakční směsi, aby nedocházelo k jejímu tuhnutí. Reakční směs byla bez izolace podrobena redukci komplexním hydridem a izolován byl teprve výsledný rozvětvený alkohol.

Rozvětvené **kyseliny 18-19** byly připravovány oxidací získaných alkoholů, přestože bylo možné získat je již v předchozím kroku před redukcí z jejich sodných solí. Nicméně jejich izolace z dané reakční směsi se ukázala jako neekonomická (nízký výtěžek) a zbytečně složitá. Oxidace čistých alkoholů oxidem chromovým v kyselině

octové vedla jednoznačně k odpovídajícím karboxylovým kyselinám. Teplota reakční směsi při oxidaci byla udržována na +5 °C a přikapávání muselo být pozvolné, protože směs se samovolně prudce zahřívala. Chlazení pod 0 °C také nebylo žádoucí, protože v tom případě směs tuhla na stěnách baňky a dramaticky se snižoval výtěžek.

#### 4.1.4. Syntéza rozvětvených karbamátů

Nejprve byly obvyklou reakcí připraveny **chráněné estery 26-27** rozvětvených alkoholů s hydrochloridem kyseliny 6-aminohexanové. Estery (ve formě hydrochloridů) byly přečištěny sloupcovou chromatografií na mikrokrystalické celulóze, na které se zachytil produkt, ale výchozí látky bylo možné vymýt hexanem. Po odstranění nečistot byl hydrochlorid esteru vymyt z celulózy přidáním chloroformu do mobilní fáze.

Odstranění chránící skupiny (hydrochloridu) proběhlo reakcí vodného roztoku esteru s TEA. Volný aminoester byl extrahován do diethyletheru a vysušen síranem sodným. V tomto kroku bylo důležité propláchnout sušidlo důkladně chloroformem, protože volný aminoester mohl se vzdušným CO<sub>2</sub> vytvořit předčasně amonium-karbamát ve formě krystalické látky a být tak odfiltrován zároveň se sušidlem. Promytím chloroformem došlo k jeho rozkladu zpět na volný aminoester.

Volné aminoestery byly získány ve formě nažloutlých olejů, případně polotuhých látek. **Karbamáty 20-21** z nich mohly být připraveny prostým stáním na vzduchu (vážou vzdušný CO<sub>2</sub>). Takto však vznikaly žluté až hnědé mazlavé látky nejednotného složení. Proto byly karbamáty připravovány zaváděním CO<sub>2</sub> do etherických roztoků aminoesterů, kde vznikaly ve formě bílé krystalické látky.

Struktura karbamátů byla hodnocena pomocí IČ spekter v nujolu a v chloroformu. V nujolu byly potvrzeny charakteristické pásy odpovídající soli karbamové kyseliny, v chloroformu naopak došlo k rozkladu a byla potvrzena struktura volného aminoesteru. Navíc, pokud bylo spektrum chloroformového roztoku změřeno dostatečně rychle, byl pozorován výrazný pás uvolněného CO<sub>2</sub> při 2335 cm<sup>-1</sup>.

## 4.2. Transdermálně akcelerační aktivita analogů T12

V této práci byly sledovány obměny struktury **T12** na dvou místech v molekule: na polární hlavě a v koncové části lipidových řetězců. Závěrem kapitoly bylo také provedeno stručné shrnutí týkající se příspěvků jednotlivých strukturních fragmentů k aktivitě **T12** získané srovnáním akceleračních aktivit mnoha látek připravených a testovaných dříve na našem pracovišti.

### 4.2.1. Analogy T12 s kovalentně vázaným CO<sub>2</sub>

Podobné látky nebyly dosud v literatuře popisovány jako akceleranty transdermální permeace.

Přehled připravených látek je ve schématech 8-10 (kapitola 3.1.1.) a jejich transdermálně akcelerační aktivity jsou shrnuty v tabulce 2 (kapitola 3.1.1.2.).

## 4. Diskuze

Z praktických důvodů nebyly otestovány všechny připravené látky, ale vzhledem k obecně nízké aktivitě byly z každé skupiny vybrány vždy pouze nejkratší a nejdelší homology.

Jak je patrné z tabulky 2, samotný **T12** byl z vody na prasečí kůži téměř neaktivní. Naproti tomu při použití PGV jako vehikula byl AP řádově vyšší než u všech připravených látek. Tak velký rozdíl v aktivitách mezi těmito dvěma vehikuly byl poměrně překvapující, protože na lidské kůži byly AP srovnatelné (39,3 z vody a 35,0 z PGV).<sup>28</sup> Látky **1a**, **5a**, **5b** a **9a** byly z vody dokonce statisticky významně účinnější než **T12** ( $p < 0,05$ ).

Nicméně z PGV i z IPM byly na prasečí kůži aktivity připravených látek výrazně nižší než u **T12**. PG i IPM jsou poměrně často používány v dermatologických přípravcích jako rozpouštědla pro širokou paletu léčiv a je o nich známo, že dokážou ovlivnit aktivitu akceleraantu<sup>45</sup> (viz kapitola 1.4.2.). Tento vliv u připravených látek, narozdíl od **T12**, nebyl pozorován. Jejich nízké aktivity z IPM a řádově nižší aktivity z PGV podporují naši hypotézu o nezbytnosti labilní polární hlavy tvořené solí karbamové kyseliny pro účinnost **T12**.

AP připravených látek se pohybovaly v rozmezí od 0,66 do 3,37 ve vodě a od 0,47 do 3,70 v PGV. U IPM nebyla zjištěna téměř žádná aktivita (AP se pohyboval kolem 1). Z důvodu takto nízkých aktivit a zanedbatelných rozdílů mezi jednotlivými látkami nebyly nalezeny žádné relevantní vztahy mezi jejich strukturou a účinkem. Nicméně lze říct, že nejvyšší AP byly pozorovány u látek, kde oba řetězce obsahovaly esterovou nebo amidovou skupinu, narozdíl od látek s jedním jednoduchým alkylem a to jak u esterů kyseliny uhličitě (např. látky **6a** a **7**) tak u esterů kyseliny karbamové (např. látka **9a**).

Na druhou stranu nejnižších aktivit dosáhla látka **8d** (ester kyseliny karbamové s jednou esterovou skupinou a jedním dodecylovým řetězcem), která ve všech použitých donorových médiích vykázala  $AP < 1$ , tedy dokonce zpomalila průchod theofylinu oproti kontrolnímu slepému vzorku. Mechanismus tohoto účinku nebyl dále zkoumán a pro jeho objasnění by bylo potřeba jej ověřit pro větší skupinu podobných látek.

Velmi nízkých aktivit dosáhly také oba připravené estery kyseliny šťavelové (**10** a **11**), u kterých předpokládáme kromě neschopnosti uvolnit  $CO_2$  také výrazně odlišné konformační uspořádání molekuly.

Závěrem tohoto srovnání lze říci, že vysoká akcelerační aktivita **T12** je velmi pravděpodobně vázána na strukturu a labilitu jeho polární hlavy. Ani látky s největší strukturální podobností (**6a**, **6b**, **9a** a **9b**) nedosáhly jeho účinnosti.

### 4.2.2. Analogy T12 s koncovým rozvětvením

Vyšší alifatické alkoholy (mastné alkoholy, MA) a kyseliny (MK) byly studovány jako akcelery transdermální permeace pro mnoho typů léčiv.<sup>20,22</sup> Obecně jsou popisovány dva mechanismy účinku, jimiž tyto látky působí. Jedním z nich je zvýšení rozpustnosti léčiva ve vehikulu a zvýšení jeho rozdělování do kůže. Druhým je narušení vysoce uspořádané struktury extracelulárních lipidů ve SC.<sup>46,47</sup> Tyto dva efekty se někdy v literatuře nazývají „push-pull“ mechanismus.<sup>48</sup> U alkoholů obecně je dále popisováno, že ty s kratším řetězcem převážně zvyšují rozpustnost léčiva v lipidech SC, zatímco



delší alkoholy spíše extrahují lipidy a proteiny ze SC a tím podporují difúzi léčiva nepolární cestou. Druhý efekt, jenž byl prokázán prostřednictvím IČ spekter,<sup>49</sup> vzrůstá s délkou uhlíkového řetězce.

Vliv koncového rozvětvení ve skupině MA dosud nebyl studován. Jediná práce týkající se rozvětvených alkoholů hodnotí vliv rozvětvení bezprostředně v blízkosti hydroxylové skupiny a potvrzuje, že alkoholy s takovýmto rozvětvením jsou méně účinné než lineární alkoholy se stejnou délkou řetězce.<sup>50</sup>

Rozvětvené MK byly studovány poněkud podrobněji než odpovídající alkoholy. Důvodem může být mimo jiné to, že se vyskytují v poměrně široké škále v různých přírodních zdrojích (zejména v tucích živočišného nebo bakteriálního původu). *Iso* a *anteiso* kyseliny jsou přítomny například v tuku z ovčí vlny, případně jako součást povrchových kožních lipidů.<sup>51</sup> Různé rozvětvené MK byly nalezeny také ve formě esterů v triglyceridech obsažených v povrchových lipidech lidské kůže.<sup>52</sup>

Prací, které se věnují obecně MK jako akcelerantům transdermální permeace je poměrně hodně, a to i takových, které zkoumají vztahy mezi strukturou a účinkem (s přihlédnutím k délce řetězce, přítomnosti a nepřítomnosti násobné vazby, její polohy a konfigurace na ní). Naproti tomu byl zatím jen málo popsán vliv rozvětvení, zejména na konci řetězce. V práci Schneidera<sup>53</sup> je například porovnávána účinnost kyseliny 10-methylpalmitové (rozvětvení je situováno uprostřed řetězce) a kyseliny 10-methylhexadec-9-enové (navíc ještě dvojná vazba) a bylo zjištěno, že jsou srovnatelné s nerozvětvenou kyselinou olejovou.

Další zajímavou prací je studie Aungsta,<sup>54</sup> která srovnává účinek různých rozvětvených kyselin s jejich lineárními izomery a uvádí, že v případě kratších kyselin se tyto izomery od sebe významně neliší. Výjimku tvořila kyselina isostearová, která zvýšila flux sledovaného léčiva přibližně 3,5krát ve srovnání s odpovídající kyselinou stearovou. Autoři to zde vysvětlovali tím, že nerozvětvené kyseliny s kratším řetězcem již samy o sobě maximálně narušují uspořádání lipidů SC, takže rozvětvení už dále nezvyšuje jejich účinek. Na druhou stranu kyselina stearová, která má podobnou délku řetězce jako mají lipidy SC, patrně jejich uspořádanou strukturu nenarušuje, což může být důvodem, proč se u této dvojice projevilo zvýšení průchodu léčiva v důsledku rozvětvení.

Vliv rozvětvení ve skupině analogů **T12** byl sledován ve studii Hrabálka,<sup>55</sup> která se zabývala skupinou esterů kyseliny 6-aminohexanové s různými rozvětvenými nebo cyklickými alkoholy (látky podobné **T12**). Rozvětvení se v tomto případě nacházelo v těsném sousedství esterové skupiny a ve všech případech vedlo ke snížení aktivity. To mohlo být způsobeno jednak horším průnikem takovýchto látek mezi lipidy SC ale také tím, že rozvětvení blíže k polární hlavě snižovalo schopnost odpovídajících aminoesterů vytvořit dostatečně stabilní sůl karbamové kyseliny.

Přehled připravených rozvětvených alkoholů, kyselin a karbamátů je uveden na obr. 19 (kapitola 3.1.2.) a jejich transdermálně akcelerační aktivity současně s aktivitami lineárních analogů jsou shrnuty v tabulkách 4-5 (kapitola 3.1.2.2.).

Z tabulky 4 je vidět, že akcelerační účinnost alkoholů byla podstatně vyšší než účinnost stejně dlouhých kyselin. Při srovnání stejně dlouhých alkoholů je vidět, že

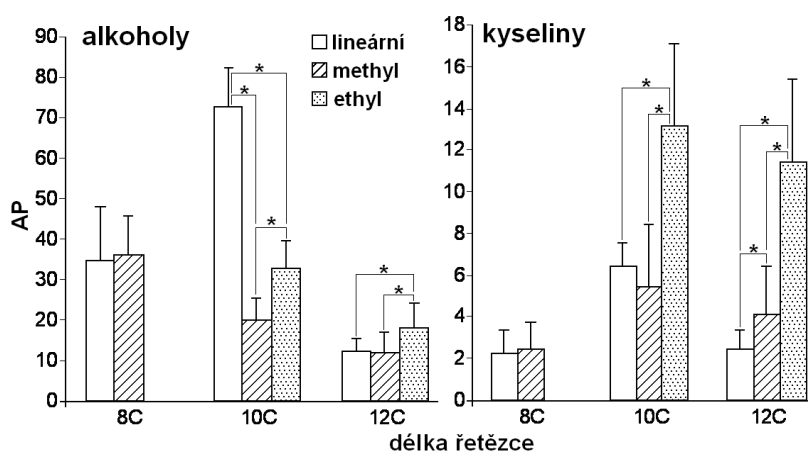
#### 4. Diskuze

methylové rozvětvení nezvýšilo aktivitu. AP dodekanolu byl srovnatelný s AP alkoholů **16d** (se stejným počtem uhlíků) a **16e** (o stejné délce řetězce). Naopak větší rozvětvení (ethyl) zvýšilo aktivitu, což je vidět na příkladu alkoholů **17a** a **17b**, které byly oba významně aktivnější než dodekanol i alkoholy s methylovým rozvětvením o stejné délce **16c** a **16e**. Poměr aktivit mezi dvojicemi odpovídajících látek **17a/16c**, **17b/16e** a **17b/dodekanol** se pohyboval kolem 1,5 (obr. 29).

Odlíšný výsledek však byl pozorován u dekanolu, který vykázal výjimečně vysokou akcelerační aktivitu a zavedení koncového rozvětvení vedlo k výraznému snížení aktivity u methylových i ethylových analogů. To mohlo být způsobeno odlišným mechanismem účinku. U připravených rozvětvených alkoholů se aktivita snižovala s prodlužujícím se řetězcem. Naproti tomu lineární alkoholy vykazovaly parabolickou závislost s maximem právě u 10 uhlíků, což je běžně uváděno v publikovaných studiích.<sup>56</sup> Optimální délka řetězce 10 uhlíků u alkoholů souvisí nejspíše s jejich schopností rozrušovat uspořádanou strukturu lipidů SC. Druhým zmíněným mechanismem účinku je u nich změna rozpouštěcích vlastností SC a tím zlepšení rozdělování léčiva do SC.

To, že byla pozorována odlišná závislost mezi délkou řetězce a aktivitou u lineárních a rozvětvených alkoholů nás vede k domněnce, že zavedením koncového rozvětvení došlo ke změně mechanismu účinku. Jedno z možných vysvětlení spočívá v omezeném začlenění takových alkoholů mezi lipidy SC. Sledovaná aktivita mohla tedy být důsledkem zvýšeného rozdělování theofylinu. To podporuje nepřímá úměra mezi délkou řetězce a aktivitou, tedy to, že kratší rozvětvené alkoholy byly účinnější.

U připravených kyselin aktivita odpovídala parabolické závislosti na délce řetězce jak u lineárních tak u rozvětvených. Zavedení methylového rozvětvení opět nevedlo k výrazným změnám aktivit. Pouze u 12uhlíkatých kyselin došlo



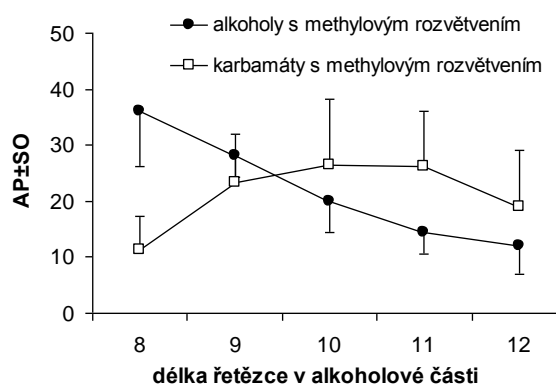
Obr. 29. Srovnání AP některých nerozvětvených a rozvětvených alkoholů a kyselin se stejnou délkou řetězce. \*významně se liší ( $p < 0,05$ ).

zvýšen cca 2krát ve srovnání s lineárním methylovým analogem. U 12uhlíkatých byl nárůst dokonce ještě vyšší, cca 2,5násobný ve srovnání s methylovým a 4,7násobný ve srovnání s lineárním analogem (obr. 29).

k 1,5násobnému zvýšení účinku. Výsledek se shoduje se závěrem zjištěným ve studii Aungsta et al.<sup>54</sup> Ethylové rozvětvení mělo u kyselin větší vliv na aktivitu než tomu bylo ve skupině alkoholů. U 10uhlíkatých kyselin byl AP

Tabulka 5 (kapitola 3.1.2.2.) srovnává akcelerační aktivitu lineárních a rozvětvených transkarbamů. Aktivity v obou skupinách odpovídaly parabolické závislosti na délce řetězce s maximem kolem 10 uhlíků v alkoholové části (AP 33,60 u **T10** a 26,34 u **20c**). Nicméně mezi lineární skupinou a skupinou s methylovým rozvětvením nebyl nalezen významný rozdíl. Ethylové rozvětvení dokonce způsobilo mírný pokles aktivity (viz látky **T10** a **21a** se stejnou délkou řetězce,  $p < 0,05$ ). Při srovnání látek **T12** a **21b** byla aktivita téměř stejná. Tato zjištění jsou v rozporu se závěry získanými u rozvětvených alkoholů, kde naopak u 12uhlíkatých ethylové rozvětvení aktivitu zvýšilo 1,5krát proti lineárním. Tento výsledek může znamenat, že mechanismus účinku transkarbamů se zásadním způsobem liší od mechanismu účinku MA, kde nejspíš velkou roli hraje zvýšení rozpustnosti léčiva, případně zvýšení jeho rozdělování do SC.

Transkarbamy, jako estery, podléhají hydrolýze způsobené esterázami přítomnými v lidské epidermis. U **T12** byl tento rozklad sledován *in vitro* s použitím prasečí esterázy a bylo zjištěno, že probíhá podle kinetiky druhého řádu.<sup>29</sup> Z tohoto zjištění vyplývá další možná hypotéza, že totiž vysoká aktivita **T12** by vlastně mohla být způsobena aktivitou dodekanolu uvolněného po hydrolýze. Získané výsledky však tuto teorii příliš nepodporují. Stejná strukturní obměna (zavedení ethylového rozvětvení) totiž způsobila u 12C alkoholů zvýšení aktivity, u transkarbamů naopak její snížení. Navíc byla pozorována odlišná závislost mezi délkou řetězce a aktivitou u alkoholů a transkarbamů s methylovým rozvětvením (obr. 30).

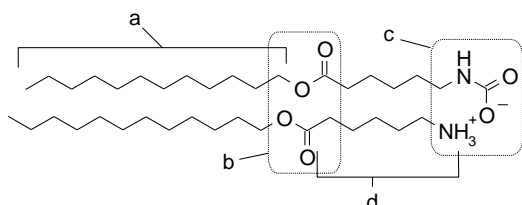


Obr. 30. Závislost mezi délkou řetězce a akcelerační aktivitou u rozvětvených alkoholů a transkarbamů.

Od zavedení rozvětvení do terminální části molekuly akcelerační jsme očekávali zvýšení akcelerační aktivity. Prostorově objemnější skupina by měla logicky způsobit výraznější dezorganizaci lipidových lamel SC vedoucí k většímu narušení bariérových funkcí SC. Na druhou stranu však je třeba počítat s tím, že rozvětvení může mít také negativní účinek na aktivitu kvůli horšímu pronikání takového akcelerační mezi lipidy SC. Tyto dva efekty patrně ovlivňují akcelerační aktivitu opačným směrem a pravděpodobně závisí také na dalších okolnostech, který z nich převládne. Ve skupině připravených alkoholů a transkarbamů s methylovým rozvětvením byly oba vlivy patrně vyrovnané, u kyselin mírně převládal pozitivní. U alkoholů navíc odlišná závislost mezi délkou řetězce a aktivitou u lineárních a rozvětvených může ukazovat na změnu (převažujícího) mechanismu účinku.

### 4.2.3. Analogy T12 – vztahy mezi strukturou a účinkem

Dosud připravené analogy **T12** můžeme rozdělit do čtyř skupin podle části molekuly, která byla modifikována. Jedná se o obměny lipidového řetězce (obr. 31a), esterové skupiny ve středu molekuly (31b), polární hlavy (31c) a spojovacího řetězce mezi esterovou skupinou a dusíkem polární hlavy (31d). Obrázek 31 shrnuje nalezené strukturální požadavky důležité pro aktivitu **T12**.



Obr. 31. Požadavky na strukturu **T12** důležité pro jeho aktivitu: a) lineární alkylový řetězec o optimální délce 8-12 uhlíků; b) polární skupina ve středu molekuly s vyváženými donor-akceptorovými vlastnostmi; c) polární hlava schopná rozkládat se v mírně kyselém prostředí za uvolnění CO<sub>2</sub>; d) flexibilní uhlovodíkový řetězec s optimální délkou 5 uhlíků.

#### 4.2.3.1. Obměny lipidového řetězce

Jak již bylo řečeno dříve, terminální methylové a ethylové rozvětvení mírně snižuje aktivitu transkarbamů patrně kvůli horšímu rozdělování akcelarantu do SC. Naproti tomu rozvětvení v bezprostřední blízkosti esterové skupiny nebo cyklizace alkoholické části vedly k podstatnému snížení až ztrátě aktivity.<sup>55</sup> Jedním z důvodů pro tak velké snížení aktivity může být to, že sterická zábrana poblíž polární hlavy znemožnila uspořádání lipidových řetězců vedle sebe a tím zabránila tvorbě stabilní krystalické soli karbamové kyseliny. Analogy s rozvětvením v blízkosti esterové vazby vykazovaly nižší teploty tání nebo byly připraveny jako oleje a podle IČ spekter tvořily karbamát jen v omezeném množství.

U karbamových solí tohoto typu je jejich tání úzce spjato s uvolněním CO<sub>2</sub> z polární hlavy.<sup>32</sup> Domníváme se tedy, že stabilita polární hlavy byla v důsledku rozvětvení snížena. Příliš nízká teplota tání karbamátů může vést k jejich rozkladu ještě před aplikací na kůži při běžné manipulaci. Na druhou stranu, výrazně vyšší teplota tání než u **T12** ukazuje na vyšší stabilitu karbamové soli, což zase může vyústit v obtížnější rozklad ve SC a opět ve snížení akcelerační aktivity.

Optimální délka alkoholové části byla nalezena mezi 8-12 uhlíky.<sup>42</sup>

#### 4.2.3.2. Náhrady esterové skupiny

Esterová skupina byla nahrazena skupinou methylenovou, ketonickou, amidovou,<sup>57</sup> karbonátovou nebo karbamátovou.<sup>58</sup> Z aktivit bylo zřejmé, že mimo jiné i přítomnost a typ polární skupiny uprostřed řetězce jsou velmi důležité jak pro stabilitu soli karbamové kyseliny tak pro aktivitu akcelarantu.<sup>59</sup> Záměnou esterové skupiny došlo vždy k podstatnému snížení až vymizení akcelerační aktivity.

Stanovení rozpustnosti všech těchto analogů v PGV ukázalo na lineární závislost mezi jejich rozpustností a akcelerační aktivitou. Jedinou výjimku představoval právě vysoce účinný **T12**, což vedlo k závěru, že esterová skupina je spojena s nějakým odlišným mechanismem účinku.

IČ spektra **T12** vykazují dublet karbonylu esterové vazby (viz kap. 3.2.1., obr. 24 a kap. 4.3.1.), z čehož vyplývá, že pravděpodobně jeden karbonyl tvoří vodíkovou vazbu s NH skupinou polární hlavy. Tato vodíková vazba má patrně velký význam pro sterické uspořádání molekuly, což má nejspíš také vliv na způsob, jakým akcelerant proniká do SC.

#### 4.2.3.3. *Obměny polární hlavy*

Do této skupiny se řadí látky s CO<sub>2</sub> kovalentně vázaným v polární hlavě (tedy látky stabilnější) připravované v této práci, které ve srovnání s **T12** postrádají akcelerační aktivitu. Jiný analog byl připraven náhradou kyslíku v polární hlavě za síru, která netvoří vodíkové vazby jako kyslík (dithiokarbamat).<sup>59</sup> Tato sloučenina neschopná rozkladu polární hlavy byla rovněž neaktivní.

#### 4.2.3.4. *Obměny spojovacího řetězce mezi esterovou skupinou a dusíkem*

Nejvyšších aktivit bylo dosaženo u esterů kyseliny 6-aminohexanové. Jak prodloužení na 7-aminoheptanoáty nebo 8-aminooktanoáty tak zkrácení vedlo ke snížení aktivity.<sup>42</sup> Střední aktivity bylo dosaženo u esterů tranexamové kyseliny (lineární řetězec byl nahrazen cyklohexanem). Tyto látky byly původně navrženy jako biodegradabilní akceleranty, které po své hydrolýze v kůži uvolňují kyselinu tranexamovou. Tento metabolit byl popsán v literatuře jako látka schopná regenerovat kožní bariéru po jejím narušení při TDD. Nicméně aktivita těchto látek byla řádově nižší než u **T12**, patrně kvůli snížené flexibilitě a vyšší sterické zábraně spojovacího řetězce.

### 4.3. Chování **T12** v mírně kyselém prostředí

V těchto pokusech byla používána PK pro zajištění mírně kyselého prostředí podobného tomu, které je ve SC. Abychom zjistili, zda je PK vhodným modelem pro popis rozkladu **T12**, byl IČ experiment proveden také s použitím extrahovaných lipidů SC, které obsahují cca 10 % vyšších mastných kyselin.

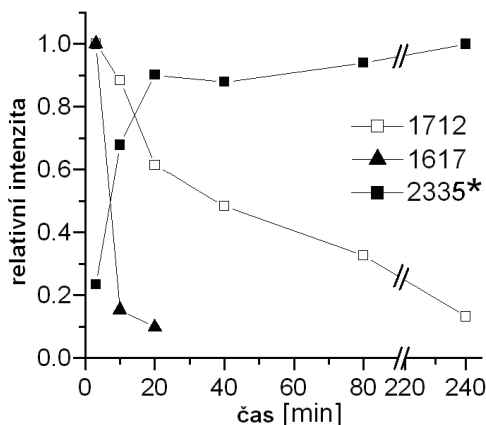
#### 4.3.1. Časový vývoj IČ spekter směsi **T12** a PK

Popis hlavních změn u této směsi je uveden v tabulce 6 a na obrázku 24b (kapitola 3.2.1.), vývoj intenzit některých pásů je uveden na obrázku 32. Před tímto experimentem byl také připraven potenciální produkt interakce: amoniová sůl PK

#### 4. Diskuze

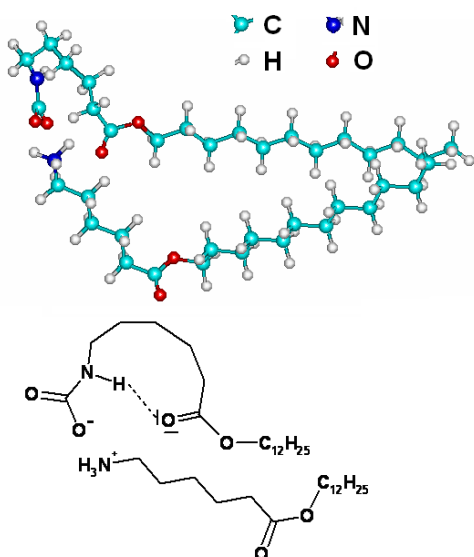
s **DDEAK** a její IČ spektrum bylo změřeno v nujolu, abychom mohli porovnat některé její pásy s těmi, které vznikaly během sledování časového vývoje.

Pás při  $3360\text{ cm}^{-1}$  byl přiřazen valenční vibraci N-H v karbamátu. Jeho intenzita se postupně zmenšovala, ale ani po 4 hod nevymizel úplně. Vedle něj však vznikl druhý pás při  $3326\text{ cm}^{-1}$ , který naopak narůstal a na konci byl intenzivnější než původní při  $3360\text{ cm}^{-1}$ .



Obr. 32. Časový vývoj intenzit některých sledovaných pásů. \*U pásu 2335 (narůstající) byla hodnota 1 přiřazena intenzitě na konci měření.

pásech esterových karbonylů. U samotného **T12** je vibrace esterového karbonylu rozštěpena na dva dobře rozdělené pásy ( $1742$  a  $1735\text{ cm}^{-1}$ ). To je s velkou pravděpodobností způsobeno vodíkovou vazbou jednoho esterového karbonylu na N-H vazbu polární hlavy. Na obrázku 33 je znázorněn vypočítaný model molekuly **T12**, kde je vidět zalomení molekuly způsobené touto H-vazbou.\*



Obr. 33. Molekulový model **T12** se zalomenou molekulou, dole je znázorněna H-vazba mezi polární hlavou a jedním esterovým karbonylem.

Prakticky ihned po smíchání se objevil ostrý a výrazný pás při  $2335\text{ cm}^{-1}$ , který odpovídá uvolněnému  $\text{CO}_2$ . Intenzita tohoto pásu narůstala přibližně 30 min a pak zůstávala konstantní (obr. 32). V tomto případě se nejednalo o vzdušný  $\text{CO}_2$  (pokusy byly pro vyloučení vzdušného  $\text{CO}_2$  prováděny pod dusíkovou atmosférou), ale o  $\text{CO}_2$  rozpuštěný v nujolu. Shodný pás byl pozorován také u nujolu, do kterého byl po několik minut zaváděn  $\text{CO}_2$  z tlakové láhve.

Další změna se odehrála na pásech esterových karbonylů. Po přidání PK se tyto dva pásy postupně spojovaly a posouvaly k nižší frekvenci ( $1731\text{ cm}^{-1}$ ). Tento jev podporoval naši hypotézu, že ze dvou různých esterových karbonylů v **T12** vznikly dva rovnocenné, tedy že došlo k rozkladu dvouřetězcové molekuly na jednořetězcovou. Výsledná frekvence esterového karbonylu ( $1731\text{ cm}^{-1}$ ) odpovídala vibraci  $1730\text{ cm}^{-1}$  zjištěné u připravené soli PK s **DDEAK**.

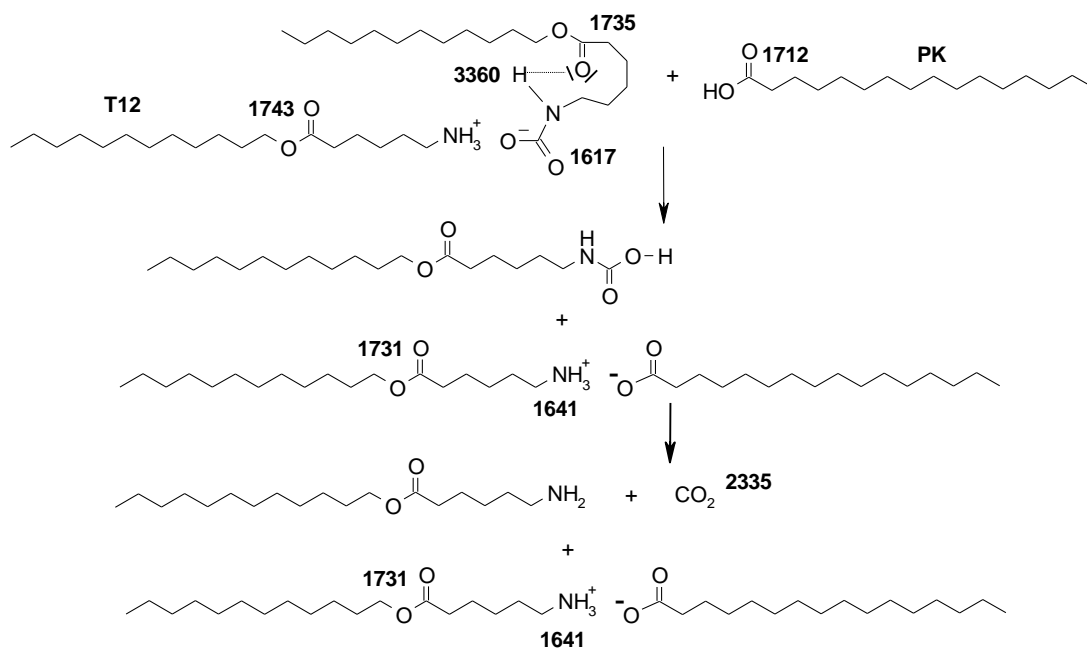
Třetí významnou změnu představovalo vymizení pásu při  $1617\text{ cm}^{-1}$ , který odpovídá valenční vibraci C=O v polární hlavě. Tento fakt potvrzuje rozpad polární hlavy (obr. 33). Výsledný pás při  $1641\text{ cm}^{-1}$  (byl pozorován asi od 80. minuty) byl přiřazen deformaci  $\text{NH}_3^+$  skupiny soli PK a **DDEAK**, kde bylo naměřeno  $1640\text{ cm}^{-1}$ .

V poslední řadě je potřeba popsat

\* Molekulový model **T12** byl vypočítán s použitím programu HyperChem 5.1, jednotlivé ionty byly modelovány na semi-empirické AM1 úrovni, vlastní model soli byl vytvořen v silovém poli AMBER.

také postupné vymizení pásu při  $1712\text{ cm}^{-1}$ , který odpovídá valenční vibraci karboxylu PK. Jeho intenzita postupně klesá tak, jak je kyselina spotřebovávána k reakci s **T12** (obr. 32 a 34). Po 4 hod tento pás buď vymizí úplně nebo zůstává jako různě výrazné ramínko podle použitého poměru mezi **T12** a PK.

Na závěr tohoto pokusu lze uvést rovnici popisující rozklad **T12** a následující reakci s PK (obr. 34). PK patrně interaguje s amoniovou skupinou za vzniku soli s jednou polovinou **T12**. Druhá polovina molekuly **T12**, která se pak vyskytuje ve formě nestálé kyseliny karbamové, se následně rozkládá za uvolnění  $\text{CO}_2$  a volného **DDEAK**.



Obr. 34. Navržený mechanismus interakce PK a **T12**. Čísla znamenají frekvence přiřazených vazeb v IČ spektru. Přerušovaná čára vyznačuje předpokládanou vodíkovou vazbu.

#### 4.3.2. Časový vývoj IČ spekter směsi **T12** a lipidů SC

Tato spektra nebyla tak jednoznačná na interpretaci jako v předešlém pokusu. Oblasti mezi  $1685\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$  a  $1575\text{--}1510\text{ cm}^{-1}$  byly překryty silnými složitými pásy látek obsažených v lipidech SC (obr. 24a). Nebylo tedy možno pozorovat rozpad polární hlavy znázorněný vymizením pásu při  $1617\text{ cm}^{-1}$  ani vznik deformačního pásu  $\text{NH}_3^+$  při  $1641\text{ cm}^{-1}$ . Byly však velmi dobře patrné další změny, jako vznik  $\text{CO}_2$ , sjednocení esterových karbonylů a úbytek karboxylu mastných kyselin. Tímto pokusem bylo prokázáno, že PK je vhodným modelem pro sledování rozpadu **T12**, protože změny, které způsobila, probíhaly velmi podobně také v přítomnosti extrahovaných lipidů SC.

Rozdíl od předešlého pokusu je v posunu spojeného pásu esterových karbonylů. Zatímco při interakci s PK byl výsledný posun  $1731\text{ cm}^{-1}$ , což odpovídalo výše zmíněné soli **DDEAK** s PK, v tomto pokusu zůstala frekvence spojeného pásu při  $1738\text{ cm}^{-1}$ . Z toho lze usuzovat, že v podmínkách SC možná až ke vzniku soli s MK nedochází.

### 4.3.3. TGA

Provedení tohoto pokusu bylo navrženo podle dřívějších výsledků T. Holase,<sup>32</sup> který kombinací dvou metod: diferenciální skenovací kalorimetrií (DSC) a TGA potvrdil, že při postupném zahřívání samotného **T12** dochází k uvolnění CO<sub>2</sub> (v tomto případě byl měřen úbytek hmotnosti vzorku v závislosti na teplotě). TGA v našem případě byla měřena při dvou konstantních teplotách v závislosti na čase. První teplota, 50 °C, byla vybrána proto, že je při ní na DSC křivce **T12** patrná první tranzice. Druhá teplota, 30 °C, byla vybrána jako teplota nejbližší laboratorní, při které byly prováděny IČ experimenty a při které bylo uvolnění CO<sub>2</sub> v přítomnosti kyseliny prokázáno.

Podle obr. 25 (kapitola 3.2.3.) nebyl při 30 °C pozorován úbytek hmotnosti u **T12** ani u jeho směsi s PK. Tento výsledek však nemusí znamenat, že nedošlo k rozkladu. Jelikož víme, že k uvolnění CO<sub>2</sub> prokazatelně došlo podle IČ experimentu, domníváme se, že uvolněný CO<sub>2</sub> zůstal ve směsi vázán buď nějakou formou nekovalentní vazby, případně byl adsorbován na jejím povrchu.

Při 50 °C byl úbytek zjištěn v obou vzorcích a probíhal podle různých závislostí. U samotného **T12** byl pozorován lineární rozpad, zatímco u směsi byl průběh složitější. Nástup úbytku hmotnosti byl výrazně prudší a po prvních cca 20 min se stal postupně pozvolnějším až došlo k linearizaci. Tento výsledek naznačuje, že rozpad v obou případech probíhal podle různých typů reakční kinetiky. Rozklad byl dále významně urychlen přítomností mírně kyselého prostředí.

## 4.4. Vliv **T12** na rozpustnost modelového léčiva ve vehikulu a na jeho rozdělování z vehikula do SC

Podmínky použité v těchto pokusech byly vybrány tak, aby se co nejvíce podobaly podmínkám použitým při stanovení transdermálně akceleračních aktivit (theofylin jako modelové léčivo, tři donorová média o různé polaritě: V, PGV a IPM, prasečí kůže k izolaci SC).

Jak je vidět z hodnot v tabulce 8 (kapitola 3.3.), přídavek **T12** mírně zvýšil rozpustnost theofylinu ve vodě a v PGV, ale naopak ji snížil v IPM. V PGV byla rozpustnost přibližně 3krát vyšší než ve vodě, což mohlo být způsobeno solubilizačními schopnostmi PG. Naopak vysoce lipofilní IPM rozpustil cca 20krát méně theofylinu než voda.

Při porovnání AP a rozpustností v jednotlivých vehikulech bylo zjevné, že mezi nimi není jednoznačná závislost. Dá se odvodit pouze to, že vysoká rozpustnost v PGV odpovídala vysokému AP. Naproti tomu v IPM, kde se rozpustilo jen velmi malé množství theofylinu, byl AP signifikantně vyšší než ve vodě.

Nicméně je potřeba dodat, že AP a J uvedené v tabulce 8 byly získány na prasečí kůži. Stejný permeační pokus provedený dříve na kůži lidské poskytl poněkud jiné výsledky: AP byly 39,3 z vody a 35,0 z PGV,<sup>28</sup> nebyl zde tedy tak velký rozdíl mezi těmito dvěma vehikuly. Avšak ani tento výsledek neukazuje na souvislost aktivity s rozpustností theofylinu. Téměř stejný AP z vody a PGV tady byl dosažen i přesto, že



rozpustnost ve vodě byla 3krát nižší. Závěrem lze říci, že **T12** výrazně neovlivňuje rozpustnost theofylinu ve studovaných vehikulech.

V literatuře bylo popsáno, že theofylin dosahuje maximum své absorpce do práškového SC po 6 hod.<sup>60</sup> Stanovení rozdělovacího koeficientu bylo prováděno s použitím plátek izolovaného SC (ne práškového). Z tohoto důvodu byla doba inkubace prodloužena na 24 hod.

Z hodnot v tabulce 8 je vidět, že při použití vody bylo množství theofylinu absorbovaného do SC řádově vyšší než při použití PGV. Důvodem mohla být dobrá rozpustnost theofylinu v PG a tím pádem jeho menší ochota přecházet do vysoce hydrofobního SC. Ve vodě způsobil přídatek **T12** dvojnásobný nárůst rozdělovacího koeficientu, zatímco v PGV zůstal poměr stejný nezávisle na přídatku **T12**. V IPM, což bylo nejlipofilnější z použitých vehikul, byl rozdělovací koeficient nejvyšší a velmi překvapivě byl naopak snížen přidáním **T12**.

Mezi rozpustností theofylinu a jeho rozdělovacími koeficienty byla nalezena nepřímá úměrná závislost (čím vyšší rozpustnost ve vehikulu, tím menší ochota prostupovat do SC). Na druhou stranu nebyla nalezena významnější souvislost mezi rozpustností nebo rozdělovacím koeficientem theofylinu a aktivitou **T12**. Z toho vyplývá, že ani zvýšení rozpustnosti modelového léčiva ani zvýšení jeho rozdělování do SC se v případě **T12** nepodílejí větší měrou na mechanismu účinku.

PG i IPM se často používají v dermatologických přípravcích jako rozpouštědla pro řadu léčiv. Časté je také využití jejich schopnosti zvýšit aktivitu akcelerantu právě tím, že zvyšují rozpustnost a rozdělování jak léčiva tak samotného akcelerantu.<sup>45</sup> Podobný jev byl pozorován i na příkladu **T12**.

## 5. ZÁVĚR

Tato práce se podrobně zabývala problematikou akceleračních transdermálních permeací. Hlavní studovanou látkou byl transkarbam 12, akcelerační přípravek připravený dříve na našem pracovišti vykazující vysokou aktivitu. V rámci této práce byly připraveny jeho analogy obměňující strukturu v místě polární hlavy (látky s kovalentně vázaným CO<sub>2</sub>: estery kyseliny karbamové, uhličitě a šťavelové) a na konci lipidových řetězců (analogy s koncovým symetrickým methylovým nebo ethylovým rozvětvením). Bylo připraveno celkem 65 látek (18 prekurzorů a 47 finálních látek), z toho 50 v literatuře nepopsaných. Struktura připravených derivátů byla ověřena pomocí <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR a IČ spektroskopie. 42 látek bylo otestováno na transdermálně akcelerační aktivitu v různých donorových médiích s použitím prasečí kůže jako modelové membrány a theofylinu jako modelového léčiva.

Ve velké skupině analogů **T12**, které zahrnovaly jak látky připravené v rámci této práce, tak látky připravené dříve na našem pracovišti, byly hledány obecné vztahy mezi strukturou a účinkem. Byly tak shrnuty základní požadavky na strukturu **T12** vedoucí k jeho vysoké aktivitě.

Za účelem ověřit navržený mechanismus účinku **T12** byly jednak syntetizovány výše uvedené analogy a dále byly provedeny experimenty, pomocí nichž byl popsán rozklad polární hlavy **T12** v mírně kyselém prostředí. Časový vývoj IČ spekter směsi **T12** s kyselinou palmitovou nebo s lipidy extrahovanými z kůže vedl k popisu interakcí, ke kterým patrně dochází mezi molekulou **T12** a mastnými kyselinami ve SC, místě jeho zásahu. TGA podobné směsi zase potvrdilo, že mírně kyselé prostředí urychluje rozpad **T12** za uvolnění CO<sub>2</sub>.

Pro doplnění teorie o mechanismu účinku bylo studováno také ovlivnění rozpustnosti modelového léčiva ve vehikulech a jeho rozdělování mezi vehikuly a SC. U **T12** nebyl nalezen vztah mezi ovlivněním těchto dvou parametrů a akcelerační aktivitou, tudíž mechanismus účinku **T12** vyplývá z nějakého jiného, specifitějšího, děje.

Závěrem můžeme říct, že mechanismus účinku **T12** se odvíjí z jedinečné struktury jeho polární hlavy tvořené solí karbamové kyseliny, která má schopnost se v mírně kyselém prostředí SC rozkládat za uvolnění CO<sub>2</sub>. Další strukturní prvky v jeho molekule optimalizují stabilitu polární hlavy tak, aby k jejímu rozpadu nedocházelo příliš snadno ale aby k němu došlo ve SC. Rozpad ve SC a uvolnění CO<sub>2</sub> nejspíš vede ke konformačním změnám v molekule **T12**. Tyto změny společně s uvolněným CO<sub>2</sub> velmi pravděpodobně narušují uspořádanou strukturu lipidů SC a tím usnadňují průchod léčiva kůží. Mechanismus účinku tohoto typu nebyl dosud v literatuře popsán. V budoucnosti bude potřeba zjistit, co se děje s uvolněným CO<sub>2</sub> ve SC, v jaké formě se tam vyskytuje a co způsobuje.

Výsledky získané v této práci byly prezentovány na pěti domácích a jedné zahraniční vědecké konferenci. Dále byly zahrnuty do publikací v odborných časopisech (viz přílohy 1-3).

## 6. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 6.1. Chemikálie a přístrojové vybavení

Všechny chemikálie včetně trypsinu (z prasečího pankreatu) byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich. Pro sloupcovou chromatografii byl použit Silikagel 60 (230–400 mesh) nebo mikrokrytalická celulóza (délka vláken 0,02-0,15 mm) a pro tenkovrstvou chromatografii byly použity TLC desky (Silikagel 60 F<sub>254</sub>) od firmy Merck. Struktura a čistota syntetizovaných sloučenin byla ověřena pomocí IČ (Nicolet Impact 400 spectrophotometer) a <sup>1</sup>H a <sup>13</sup>C NMR spekter (Varian Mercury-Vx BB 300 instrument, pracující při 300 MHz u <sup>1</sup>H, 75 MHz u <sup>13</sup>C). Teploty tání byly měřeny na Kofflerově přístroji bez korekce. TGA byla provedena v laboratoři termické analýzy VŠCHT v Praze na přístroji Stanton Redcroft TG 750.

### 6.2. Syntéza analogů T12 s kovalentně vázaným CO<sub>2</sub>

#### 6.2.1. Příprava amidů hydroxykyselin 12a-12c a 13

Lakton příslušné hydroxykyseliny (17,5 mmol) byl smíchán s alkylaminem (19,3 mmol) a k této směsi bylo přidáno 0,1-0,2 ml roztoku methoxidu sodného (připraveného z 3,3 g sodíku a 100 ml methanolu). Směs byla zahřívána na 120 °C po dobu 1 hod. Po ochlazení na laboratorní teplotu směs ztuhla, produkty byly čištěny srážením ethanolického nebo methanolického roztoku zředěnou kyselinou chlorovodíkovou.

**(12a) decylamid 6-hydroxyhexanové kyseliny;** C<sub>16</sub>H<sub>33</sub>NO<sub>2</sub>; M=271,44 g mol<sup>-1</sup>; výtěžek: 93 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná; t<sub>f</sub>=68-70 °C; IČ (CHCl<sub>3</sub>): ν<sub>max</sub> 3629, 3448, 3343, 3006, 2929, 2857, 1660, 1519, 1466, 1378 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5,68 (1H, bs, NH); 3,62 (2H, t (J=6,7), CH<sub>2</sub>OH); 3,26-3,14 (2H, m, CH<sub>2</sub>NHCO); 2,25 (1H, bs, OH); 2,16 (2H, t (J=7,4), NHCOCH<sub>2</sub>); 1,72-1,13 (24H, m, 12CH<sub>2</sub>); 0,92-0,79 (3H, m, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 173,0; 62,4; 39,5; 36,6; 32,2; 31,8; 29,6; 29,5; 29,2; 26,9; 25,3; 22,6; 14,1.

**(12b) dodecylamid 6-hydroxyhexanové kyseliny;** C<sub>18</sub>H<sub>37</sub>NO<sub>2</sub>; M=299,49 g mol<sup>-1</sup>; výtěžek: 90 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná; t<sub>f</sub>=80-83 °C; IČ (CHCl<sub>3</sub>): ν<sub>max</sub> 3623, 3448, 3350, 3006, 2928, 2856, 1660, 1519, 1466, 1378 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5,55 (1H, bs, NH); 3,63 (2H, t (J=6,3), CH<sub>2</sub>OH); 3,26-3,15 (2H, m, CH<sub>2</sub>NHCO); 2,20-2,11 (2H, m, NHCOCH<sub>2</sub>); 2,00 (1H, bs, OH); 1,71-1,10 (28H, m, 14CH<sub>2</sub>); 0,90-0,82 (3H, m, CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 172,9; 62,5; 39,5; 36,7; 32,3; 31,9; 29,64; 29,58; 29,55; 29,34; 29,30; 26,9; 25,4; 25,3; 22,7; 14,1.

**(12c) nonylamid 5-hydroxypentanové kyseliny;** C<sub>14</sub>H<sub>29</sub>NO<sub>2</sub>; M=243,39 g mol<sup>-1</sup>; výtěžek: 86 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná; t<sub>f</sub>=65-66 °C; IČ (CHCl<sub>3</sub>): ν<sub>max</sub> 3627, 3447, 3338, 3005, 2929, 2857, 1659, 1520, 1466, 1378 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5,80 (1H, bs, NH); 3,62 (2H, t (J=6,1), CH<sub>2</sub>OH); 3,27-3,15 (2H, m,

## 6. Experimentální část

$\text{CH}_2\text{NHCO}$ ); 2,63 (1H, bs, OH); 2,20 (2H, t ( $J=7,2$ ),  $\text{NHCOCH}_2$ ); 1,79-1,65 (2H, m,  $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$ ); 1,63-1,39 (4H, m, 2 $\text{CH}_2$ ); 1,35-1,14 (12H, m, 6 $\text{CH}_2$ ); 0,86 (3H, t ( $J=6,7$ ),  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 173,1; 61,9; 39,6; 36,0; 31,9; 31,8; 29,6; 29,4; 29,3; 29,2; 26,9; 22,6; 21,7; 14,1.

**(13) dodecylamid 4-hydroxypentanové kyseliny**;  $\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{NO}_2$ ;  $M=285,42 \text{ gmol}^{-1}$ ; výtěžek: 80 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=68,5-70,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\text{max}}$  3617, 3447, 3338, 3005, 2927, 2855, 1655, 1523, 1466, 1377  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 5,99 (1H, bs, NH); 3,90-3,74 (1H, m,  $\text{CHOH}$ ); 3,25-3,14 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{NHCO}$ ); 2,39-2,26 (2H, m,  $\text{NHCOCH}_2$ ); 1,89-1,57 (2H, m,  $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$ ); 1,53-1,10 (23H, m, 10 $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ); 0,86 (3H, t ( $J=6,6$ ),  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 173,7; 67,4; 39,7; 34,3; 33,3; 31,9; 29,6; 29,55; 29,51; 29,30; 29,26; 26,9; 23,6; 22,6; 14,1.

### 6.2.2. Příprava 5-hydroxypentylamidu dekanové kyseliny 14

Roztok kyseliny dekanové (2,9 mmol) v bezvodém toluenu (10 ml) s thionylchloridem (14,5 mmol) byl 2 hod zahříván k varu pod zpětným chladičem. Pak byl za sníženého tlaku oddestilován toluen s přebytečným thionylchloridem. Po ochlazení byl vzniklý dekanoylchlorid rozpuštěn v čerstvě vysušeném THF (50 ml) a tento roztok byl pomalu za intenzivního míchání při laboratorní teplotě přikapán k roztoku 5-aminopentanolu (2,9 mmol) v 1% vodném uhličitanu sodném (40 ml). Ihned se začaly vylučovat bílé krystalky. Směs byla míchána ještě přes noc. Poté byla naředěna 100 ml vody, což způsobilo vyloučení dalších krystalů, a nechána krystalizovat v lednici několik hodin. Vyloučené mírně nahnědlé krystaly byly odfiltrovány. Produkt byl čištěn odbarvením pomocí aktivního uhlí v methanolu, krystalizací z vodného methanolu a následnou chromatografií na sloupci silikagelu směsí hexan/acetone 3:2.

**(14) 5-hydroxypentylamid dekanové kyseliny**;  $\text{C}_{15}\text{H}_{31}\text{NO}_2$ ;  $M=257,42 \text{ gmol}^{-1}$ ; výtěžek: 72 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=71-73 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\text{max}}$  3625, 3449, 3338, 3006, 2929, 2857, 1660, 1519, 1466, 1378  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 5,72 (1H, bs, NH); 3,66-3,58 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 3,28-3,18 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{NHCO}$ ); 2,13 (2H, t ( $J=7,6$ ),  $\text{NHCOCH}_2$ ); 1,66-1,15 (20H, m, 10 $\text{CH}_2$ ); 0,90-0,80 (3H, m,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 173,3; 62,4; 39,2; 36,8; 32,1; 31,8; 29,4; 29,34; 29,32; 29,27; 29,22; 25,8; 23,0; 22,6; 14,1.

### 6.2.3. Příprava esterů hydroxykyselin 15a-15b

Příslušný lakton (43,8 mmol) byl 2 hod zahříván k varu pod zpětným chladičem v 1M roztoku hydroxidu sodného (40 ml). Poté byla voda vakuově oddestilována, vzniklé krystaly byly rozsuspendovány v diethyletheru, odfiltrovány a po upráškování sušeny 3 hodiny ve vakuu při  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  nad hydroxidem sodným.

Takto připravená sůl (6,5 mmol) a TBAI (0,65 mmol) byly rozsuspendovány v dodecylbromidu (8,3 mmol) a za intenzivního míchání zahřívány 2 hod na  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ . Po

ochlazení na laboratorní teplotu byla směs naředěna diethyletherem (10 ml) a krystaly byly odfiltrvány. Filtrát byl vysušen síranem sodným, zahuštěn a vzniklý nažloutlý olej byl čištěn chromatografií na sloupci silikagelu směsí hexan/acetone 3:2.

**(15a) dodecylester 6-hydroxyhexanové kyseliny;**  $C_{18}H_{36}O_3$ ;  $M=300,49 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 51 %; bílá polotuhá látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=21-22 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\text{max}}$  3624, 3015, 2927, 2856, 1724, 1466  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 4,09 (2H, t ( $J=6,6$ ),  $\text{COOCH}_2$ ); 3,62 (2H, t ( $J=6,6$ ),  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 2,32 (2H, t ( $J=7,4$ ),  $\text{CH}_2\text{COO}$ ); 1,72-1,20 (26H, m,  $13\text{CH}_2$ ); 0,92-0,82 (3H, m,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 173,8; 64,5; 62,6; 34,2; 32,3; 31,9; 29,60; 29,59; 29,54; 29,49; 29,3; 29,2; 28,6; 25,9; 25,2; 24,6; 22,7; 14,1.

**(15b) dodecylester 7-hydroxyheptanové kyseliny;**  $C_{19}H_{38}O_3$ ;  $M=314,52 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 32 %; bílá polotuhá látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=24,5-26 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\text{max}}$  3620, 3019, 2927, 2856, 1724, 1466  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 4,04 (2H, t ( $J=6,6$ ),  $\text{COOCH}_2$ ); 3,62 (2H, t ( $J=6,6$ ),  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 2,29 (2H, t ( $J=7,4$ ),  $\text{CH}_2\text{COO}$ ); 1,68-1,17 (28H, m,  $14\text{CH}_2$ ); 0,90-0,82 (3H, m,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 173,9; 64,4; 62,8; 34,2; 32,5; 31,9; 29,6; 29,54; 29,49; 29,3; 29,2; 28,9; 28,6; 25,9; 25,4; 24,9; 22,6; 14,1.

#### 6.2.4. Příprava laktonu 7-hydroxyheptanové kyseliny (komerčně nedostupný)

Ke směsi cykloheptanonu (85 mmol) a 20% roztoku hydroxidu sodného (17 ml) byl opatrně přikapán za intenzivního míchání 30% roztok peroxidu vodíku (15 ml) takovou rychlostí, aby se teplota směsi pohybovala v rozmezí 40-45  $^\circ\text{C}$  a hlavně nedosáhla 55  $^\circ\text{C}$  (nebezpečí vzniku organických peroxidů a jejich následné exploze). Směs pak byla míchána přes noc při laboratorní teplotě a poté byla třikrát extrahována chloroformem. Vodná vrstva byla okyselená kyselinou chlorovodíkovou, nasycena chloridem sodným a extrahována třikrát chloroformem. Spojené organické extrakty byly vysušeny síranem sodným, zahuštěny a surový lakton (obsahující malé množství volné kyseliny 7-hydroxyheptanové) byl bez dalšího čištění použit pro přípravu sodné soli kyseliny 7-hydroxyheptanové a následně jejího esteru (kap. 6.2.3.).

#### 6.2.5. Příprava esterů kyseliny uhličitě 1a-1d, 2a-2d, 3, 4a-4d, 5a-5b

Reakce byla prováděna v dusíkové atmosféře. Hydroxyamid **12**, **13**, **14** nebo hydroxyester **15a** (1 mmol) byl rozpuštěn v bezvodém pyridinu (5 ml), ochlazen na -20  $^\circ\text{C}$  a postupně byl přikapán příslušný alkyl-chlorformiát (1,25 mmol). Teplota -20  $^\circ\text{C}$  byla udržována ještě 1 hod, poté byla směs ponechána stát při laboratorní teplotě přes noc. Pak byla naředěna 10 ml chloroformu, třikrát promyta 5 ml vody a organická vrstva byla vysušena síranem sodným. Po zahuštění byl odstraněn pyridin azeotropicky destilací se suchým toluenem a následným ponecháním v exsikatoru nad kyselinou sírovou ve vakuu 1-2 dny. Produkty byly čištěny chromatografií na sloupci silikagelu směsí hexan/ethyl-acetát.

## 6. Experimentální část

**(1a) (5-Decylaminokarbonylpentyl)ethylester kyseliny uhličité;**  $C_{19}H_{37}NO_4$ ;  $M=343,51 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 78 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=37\text{--}39 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\text{max}}$  3449, 2929, 2856, 1742, 1662, 1518, 1466, 1369  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 5,51 (1H, bs, NH); 4,21–4,00 (4H, m,  $\text{CH}_2\text{OCOOCH}_2$ ); 3,25–3,15 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{NHCO}$ ); 2,14 (2H, t ( $J=7,7$ ),  $\text{NHCOCH}_2$ ); 1,73–1,16 (25H, m, 11 $\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ); 0,90–0,81 (3H, m,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 172,5; 155,1; 67,6; 63,8; 39,5; 36,5; 34,0; 31,8; 29,6; 29,5; 29,2; 28,4; 26,9; 25,4; 25,3; 22,6; 14,2; 14,1.

**(1b) (5-Decylaminokarbonylpentyl)oktylester kyseliny uhličité;**  $C_{25}H_{49}NO_4$ ;  $M=427,68 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 75%; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=44\text{--}46 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\text{max}}$  3449, 2929, 2857, 1740, 1662, 1518, 1467, 1404, 1378  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 5,47 (1H, bs, NH); 4,15–4,06 (4H, m,  $\text{CH}_2\text{OCOOCH}_2$ ); 3,27–3,14 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{NHCO}$ ); 2,15 (2H, t ( $J=7,6$ ),  $\text{NHCOCH}_2$ ); 1,74–1,17 (32H, m, 16 $\text{CH}_2$ ); 0,91–0,82 (6H, m, 2 $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 172,5; 155,3; 68,1; 67,6; 39,5; 36,5; 31,8; 31,7; 29,6; 29,5; 29,2; 29,13; 29,10; 28,6; 28,4; 26,9; 25,6; 25,4; 25,3; 22,63; 22,57; 14,1; 14,0.

**(1c) (5-Decylaminokarbonylpentyl)decylester kyseliny uhličité;**  $C_{27}H_{53}NO_4$ ;  $M=455,73 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 67%; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=50,5\text{--}52 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\text{max}}$  3449, 2928, 2856, 1740, 1662, 1518, 1467, 1404, 1378  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 5,47 (1H, bs, NH); 4,13–4,07 (4H, m,  $\text{CH}_2\text{OCOOCH}_2$ ); 3,26–3,17 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{NHCO}$ ); 2,15 (2H, t ( $J=7,4$ ),  $\text{NHCOCH}_2$ ); 1,73–1,17 (36H, m, 18 $\text{CH}_2$ ); 0,90–0,82 (6H, m, 2 $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 172,5; 155,3; 68,1; 67,6; 39,5; 36,5; 31,8; 29,6; 29,49; 29,46; 29,44; 29,25; 29,17; 28,6; 28,4; 26,9; 25,6; 25,4; 25,3; 22,6; 14,1.

**(1d) (5-Decylaminokarbonylpentyl)dodecylester kyseliny uhličité;**  $C_{29}H_{57}NO_4$ ;  $M=483,78 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 71 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=56,5\text{--}58,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\text{max}}$  3449, 2927, 2856, 1740, 1662, 1518, 1467, 1404, 1378  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 5,46 (1H, bs, NH); 4,19–4,03 (4H, m,  $\text{CH}_2\text{OCOOCH}_2$ ); 3,29–3,13 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{NHCO}$ ); 2,15 (2H, t ( $J=7,4$ ),  $\text{NHCOCH}_2$ ); 1,74–1,12 (40H, m, 20 $\text{CH}_2$ ); 0,90–0,82 (6H, m, 2 $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 172,5; 155,3; 68,1; 67,6; 39,5; 36,6; 31,9; 29,62; 29,58; 29,5; 29,4; 29,29; 29,25; 29,19; 28,6; 28,4; 26,9; 25,7; 25,4; 25,3; 22,6; 14,1.

**(2a) (4-Dodecylaminokarbonylbutan-2-yl)ethylester kyseliny uhličité;**  $C_{20}H_{39}NO_4$ ;  $M=357,48 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 77 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=37,5\text{--}39,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\text{max}}$  3447, 2927, 2855, 1739, 1664, 1519, 1466, 1375, 1351  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 5,62 (1H, bs, NH); 4,84–4,70 (1H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OCOO}$ ); 4,22–4,11 (2H, m,  $\text{OCOOCH}_2\text{CH}_3$ ); 3,27–3,11 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{NHCO}$ ); 2,33–2,11 (2H, m,  $\text{NHCOCH}_2$ ); 2,04–1,83 (2H, m,  $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$ ); 1,54–1,13 (26H, m, 10 $\text{CH}_2$ , 2 $\text{CH}_3$ ); 0,91–0,81 (3H, m,  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 171,8; 154,8; 74,4; 63,8; 39,6; 32,4; 31,9; 31,7; 29,6; 29,54; 29,50; 29,3; 29,2; 26,9; 22,6; 20,0; 14,2; 14,1.

**(2b) (4-Dodecylaminokarbonylbutan-2-yl)oktylester kyseliny uhličitě;**  $C_{26}H_{51}NO_4$ ;  $M=441,70 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 79 %; bezbarvý olej; látka v literatuře nepopsaná; IČ ( $CHCl_3$ ):  $\nu_{\max}$  3447, 2927, 2856, 1736, 1664, 1519, 1466, 1396, 1355  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ): 5,63 (1H, bs, NH); 4,84-4,70 (1H, m,  $CH_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OCOO}$ ); 4,18-4,03 (2H, m,  $\text{OCOOCH}_2$ ); 3,27-3,16 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{NHCO}$ ); 2,36-2,16 (2H, m,  $\text{NHCOCH}_2$ ); 2,05-1,78 (2H, m,  $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$ ); 1,78-1,11 (32H, m, 16 $\text{CH}_2$ ); 0,94-0,79 (9H, m, 3 $\text{CH}_3$ );  $^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ ): 171,8; 155,0; 74,4; 68,0; 39,6; 32,5; 31,9; 31,74; 31,71; 29,6; 29,55; 29,51; 29,30; 29,26; 29,14; 29,11; 28,6; 26,9; 26,7; 22,64; 22,58; 20,0; 14,1; 14,0.

**(2c) (4-Dodecylaminokarbonylbutan-2-yl)decylester kyseliny uhličitě;**  $C_{28}H_{55}NO_4$ ;  $M=469,75 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 74 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=31-34 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ ( $CHCl_3$ ):  $\nu_{\max}$  3447, 2927, 2856, 1736, 1664, 1519, 1466, 1396, 1354  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ): 5,61 (1H, bs, NH); 4,85-4,70 (1H, m,  $CH_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OCOO}$ ); 4,14-4,06 (2H, m,  $\text{OCOOCH}_2$ ); 3,26-3,17 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{NHCO}$ ); 2,31-2,11 (2H, m,  $\text{NHCOCH}_2$ ); 2,00-1,84 (2H, m,  $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$ ); 1,72-1,13 (36H, m, 18 $\text{CH}_2$ ); 0,90-0,82 (9H, m, 3 $\text{CH}_3$ );  $^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ ): 171,8; 155,0; 74,4; 68,0; 39,6; 32,5; 31,9; 31,8; 31,7; 29,60; 29,58; 29,54; 29,51; 29,45; 29,3; 29,25; 29,19; 28,6; 26,9; 25,7; 22,6; 20,0; 14,1.

**(2d) (4-Dodecylaminokarbonylbutan-2-yl)dodecylester kyseliny uhličitě;**  $C_{30}H_{59}NO_4$ ;  $M=497,81 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 71 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=34,5-36,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ ( $CHCl_3$ ):  $\nu_{\max}$  3447, 2927, 2855, 1736, 1664, 1519, 1466, 1396, 1354  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ): 5,61 (1H, bs, NH); 4,84-4,71 (1H, m,  $CH_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{OCOO}$ ); 4,17-4,03 (2H, m,  $\text{OCOOCH}_2$ ); 3,27-3,16 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{NHCO}$ ); 2,32-2,11 (2H, m,  $\text{NHCOCH}_2$ ); 2,04-1,81 (2H, m,  $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_2$ ); 1,71-1,15 (40H, m, 20 $\text{CH}_2$ ); 0,86 (9H, t ( $J=6,6$ ), 3 $\text{CH}_3$ );  $^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ ): 171,8; 155,0; 74,4; 68,1; 39,6; 32,5; 31,9; 31,8; 29,60; 29,56; 29,52; 29,47; 29,31; 29,27; 29,21; 28,6; 26,9; 25,7; 22,7; 20,0; 14,1.

**(3) (4-Nonylaminokarbonylbutyl)ethylester kyseliny uhličitě;**  $C_{17}H_{33}NO_4$ ;  $M=315,45 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 78 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=35-37 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ ( $CHCl_3$ ):  $\nu_{\max}$  3448, 2929, 2856, 1742, 1663, 1518, 1467, 1369  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ): 5,53 (1H, bs, NH); 4,22-4,08 (4H, m,  $\text{CH}_2\text{OCOOCH}_2$ ); 3,26-3,14 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{NHCO}$ ); 2,18 (2H, t ( $J=7,1$ ),  $\text{NHCOCH}_2$ ); 1,80-1,15 (21H, m, 9 $\text{CH}_2$ , 3 $\text{CH}_3$ ); 0,91-0,79 (3H, m, 3 $\text{CH}_3$ );  $^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ ): 172,2; 155,1; 67,4; 63,9; 39,5; 36,0; 31,8; 29,6; 29,4; 29,24; 29,18; 28,1; 26,9; 22,6; 22,0; 14,2; 14,1.

**(4a) (5-Dekanoylaminopentyl)ethylester kyseliny uhličitě;**  $C_{18}H_{35}NO_4$ ;  $M=329,48 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 85 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=42-44 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ ( $CHCl_3$ ):  $\nu_{\max}$  3450, 2929, 2857, 1742, 1662, 1518, 1467, 1369  $cm^{-1}$ ;  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ): 5,55 (1H, bs, NH); 4,22-4,06 (4H, m,  $\text{CH}_2\text{OCOOCH}_2$ ); 3,29-3,15 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{NHCO}$ ); 2,18-2,06 (2H, m,  $\text{NHCOCH}_2$ ); 1,74-1,15 (23H, m, 10 $\text{CH}_2$ , 3 $\text{CH}_3$ ); 0,90-0,80 (3H, m, 3 $\text{CH}_3$ );  $^{13}C$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ ): 173,1; 155,2; 67,5; 63,8; 39,2; 36,8; 31,8; 29,4; 29,30; 29,27; 29,21; 28,3; 25,8; 23,1; 22,6; 14,2; 14,1.

## 6. Experimentální část

**(4b) (5-Dekanoylaminopentyl)oktylester kyseliny uhličité;**  $C_{24}H_{47}NO_4$ ;  $M=413,65 \text{ gmol}^{-1}$ ; výtěžek: 59 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=34-37 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ ( $CHCl_3$ ):  $\nu_{\max}$  3450, 2930, 2857, 1740, 1662, 1518, 1467, 1404, 1378  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ): 5,52 (1H, bs, NH); 4,16-4,05 (4H, m,  $\underline{CH_2OCOOCH_2}$ ); 3,29-3,18 (2H, m,  $\underline{CH_2NHCO}$ ); 2,19-2,07 (2H, m,  $\underline{NHCOCH_2}$ ); 1,75-1,13 (32H, m, 16 $CH_2$ ); 0,92-0,79 (6H, m, 2 $CH_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ ): 173,1; 155,3; 68,1; 67,6; 39,2; 36,8; 31,8; 31,7; 29,4; 29,32; 29,27; 29,23; 29,14; 29,11; 28,6; 28,3; 25,8; 25,7; 23,1; 22,62; 22,59; 14,1; 14,0.

**(4c) (5-Dekanoylaminopentyl)decylester kyseliny uhličité;**  $C_{26}H_{51}NO_4$ ;  $M=441,70 \text{ gmol}^{-1}$ ; výtěžek: 47 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=42-45 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ ( $CHCl_3$ ):  $\nu_{\max}$  3450, 2928, 2856, 1740, 1662, 1518, 1467, 1404, 1378  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ): 5,51 (1H, bs, NH); 4,17-4,07 (4H, m,  $\underline{CH_2OCOOCH_2}$ ); 3,30-3,18 (2H, m,  $\underline{CH_2NHCO}$ ); 2,20-2,09 (2H, m,  $\underline{NHCOCH_2}$ ); 1,75-1,14 (36H, m, 18 $CH_2$ ); 0,92-0,80 (6H, m, 2 $CH_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ ): 173,2; 155,3; 68,1; 67,6; 39,2; 36,9; 32,8; 31,8; 29,59; 29,53; 29,46; 29,42; 29,33; 29,30; 29,25; 29,20; 28,6; 28,3; 25,8; 25,71; 25,68; 23,1; 22,6; 14,1.

**(4d) (5-Dekanoylaminopentyl)dodecylester kyseliny uhličité;**  $C_{28}H_{55}NO_4$ ;  $M=469,75 \text{ gmol}^{-1}$ ; výtěžek: 75 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=56,5-60 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ ( $CHCl_3$ ):  $\nu_{\max}$  3450, 2927, 2856, 1740, 1662, 1518, 1467, 1404, 1378  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ): 5,49 (1H, bs, NH); 4,15-4,07 (4H, m,  $\underline{CH_2OCOOCH_2}$ ); 3,29-3,18 (2H, m,  $\underline{CH_2NHCO}$ ); 2,18-2,09 (2H, m,  $\underline{NHCOCH_2}$ ); 1,78-1,15 (40H, m, 20 $CH_2$ ); 0,91-0,82 (6H, m, 2 $CH_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ ): 173,1; 155,3; 68,1; 67,6; 39,2; 36,9; 31,9; 31,8; 29,6; 29,53; 29,46; 29,42; 29,31; 29,29; 29,24; 29,20; 28,6; 28,3; 25,8; 25,7; 23,1; 22,6; 14,1.

**(5a) (5-Dodecyloxykarbonylpentyl)ethylester kyseliny uhličité;**  $C_{21}H_{40}O_5$ ;  $M=372,55 \text{ gmol}^{-1}$ ; výtěžek: 80 %; bezbarvý olej; látka v literatuře nepopsaná; IČ ( $CHCl_3$ ):  $\nu_{\max}$  2927, 2856, 1732, 1467, 1405, 1388, 1369  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ): 4,22-4,01 (6H, m,  $\underline{CH_2OCOOCH_2}$ ,  $\underline{COOCH_2}$ ); 2,33-2,26 (2H, m,  $\underline{CH_2COO}$ ); 1,73-1,19 (29H, m, 13 $CH_2$ ,  $\underline{OCH_2CH_3}$ ); 0,90-0,83 (3H, m,  $\underline{CH_3}$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ ): 173,6; 155,2; 67,6; 64,5; 63,8; 34,1; 31,9; 29,62; 29,57; 29,52; 29,3; 29,2; 28,6; 28,4; 25,9; 25,3; 14,3; 14,1.

**(5b) (5-Dodecyloxykarbonylpentyl)dodecylester kyseliny uhličité;**  $C_{31}H_{60}O_5$ ;  $M=512,83 \text{ gmol}^{-1}$ ; výtěžek: 75 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=22-23,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ ( $CHCl_3$ ):  $\nu_{\max}$  2927, 2856, 1732, 1467, 1404, 1378, 1361  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$ ): 4,15-4,01 (6H, m,  $\underline{CH_2OCOOCH_2}$ ,  $\underline{COOCH_2}$ ); 2,30 (2H, t ( $J=7,4$ ),  $\underline{CH_2COO}$ ); 1,74-1,19 (44H, m, 22 $CH_2$ ); 0,91-0,83 (6H, m, 2 $CH_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $CDCl_3$ ): 173,6; 155,3; 68,1; 67,6; 64,5; 34,1; 31,9; 29,61; 29,55; 29,54; 29,50; 29,47; 29,32; 29,23; 29,21; 28,64; 28,60; 28,4; 25,9; 25,7; 25,3; 24,6; 22,7; 14,1.



### 6.2.6. Příprava symetrických esterů kyseliny uhličité 6a, 7

Reakce byla prováděna v dusíkové atmosféře. Hydroxyester **15a** nebo hydroxyamid **12b** (1 mmol) byl rozpuštěn v čerstvě vysušeném THF (5 ml) a k tomuto roztoku byl přidán bezvodý pyridin (1 mmol). Roztok byl ochlazen na -20 °C a byl k němu přikapán trichlormethyl-chlorformiát (0,55 mmol). Teplota -20 °C byla udržována ještě 2 hod a poté byla směs ponechána stát při laboratorní teplotě přes noc. Vzniklá suspenze byla naředěna 20 ml THF, přefiltrována a filtrát byl vakuově zahuštěn. Produkt byl čištěn chromatografií na sloupci silikagelu směsí hexan/ethyl-acetát.

**(6a) bis(5-dodecyloxykarbonylpentyl)ester kyseliny uhličité;** C<sub>37</sub>H<sub>70</sub>O<sub>7</sub>; M=626,30 g mol<sup>-1</sup>; výtěžek: 66 %; bezbarvá kapalina; látka v literatuře nepopsaná; IČ (CHCl<sub>3</sub>):  $\nu_{\max}$  2930, 2856, 1770, 1727, 1466, 1377, 1360 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 4,31 (4H, t (J=6,6), CH<sub>2</sub>OCOOCH<sub>2</sub>); 4,06 (4H, t (J=6,7), 2COOCH<sub>2</sub>); 2,32 (4H, t (J=7,4), 2CH<sub>2</sub>COO); 2,36-1,16 (52H, m, 26CH<sub>2</sub>); 0,87 (6H, t (J=6,7), 2CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 173,4; 150,6; 71,5; 64,2; 33,6; 31,5; 29,2; 29,13; 29,08; 28,9; 28,8; 27,6; 25,5; 24,7; 22,2; 13,7.

**(7) bis(5-dodecylaminokarbonylpentyl)ester kyseliny uhličité;** C<sub>37</sub>H<sub>72</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; M=624,97 g mol<sup>-1</sup>; výtěžek: 63 %; bezbarvá kapalina; látka v literatuře nepopsaná; IČ (CHCl<sub>3</sub>):  $\nu_{\max}$  3448, 2929, 2856, 1771, 1662, 1518, 1466, 1376 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 6,89 (1H, bs, NH); 4,38-4,01 (4H, m, CH<sub>2</sub>OCOOCH<sub>2</sub>); 3,36-3,17 (4H, m, 2 CH<sub>2</sub>NHCO); 2,54-2,19 (4H, m, 2NHCOCH<sub>2</sub>); 1,83-1,15 (26H, m, 13CH<sub>2</sub>); 0,91-0,80 (6H, m, 2CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 173,9; 150,6; 71,9; 40,2; 35,5; 31,9; 29,60; 29,56; 29,51; 29,3; 29,2; 27,9; 26,9; 25,3; 25,10; 25,06; 22,7; 14,1.

### 6.2.7. Příprava esteru kyseliny uhličité 6b

Reakce byla prováděna v dusíkové atmosféře.

1. Do bezvodého THF (10 ml) bylo přidáno aktivní uhlí (5 mg), ke směsi byl přidán roztok trichlormethyl-chlorformiátu (0,73 mmol) v THF (10 ml) a vzniklá směs byla míchána za laboratorní teploty 10 minut. Pak byl přikapán roztok hydroxyesteru **15b** (0,64 mmol) v THF (5 ml), přikapávání trvalo asi 1,5 hod, aby se zabránilo vzniku symetrického karbonátu. Po přidání veškerého **15b** byl roztok míchán ještě 1 hod, přefiltrován a vakuově zahuštěn při 30 °C. Vzniklý nažloutlý olej (chlorformiát) byl bez přečištění použit okamžitě do dalšího kroku.

2. Hydroxyester **15a** (0,64 mmol) byl rozpuštěn v bezvodém pyridinu (5 ml), roztok byl ochlazen na -20 °C a byl k němu přikapán připravený chlorformiát. Teplota -20 °C byla udržována ještě 1 hod a poté byla směs míchána při laboratorní teplotě přes noc. Vzniklá suspenze byla naředěna chloroformem (20 ml) a pětkrát promyta vodou. Organická vrstva byla vysušena síranem sodným a zahuštěna. Pyridin byl ze směsi odstraněn azeotropicky destilací se suchým toluenem a následným ponecháním v exsikátoru nad kyselinou sírovou ve vakuu 1-2 dny. Produkt byl čištěn chromatografií na sloupci silikagelu směsí hexan/ethyl-acetát 9:1.

## 6. Experimentální část

**(6b) (6-dodecyloxykarbonylhexyl)(5-dodecyloxykarbonylpentyl)ester kyseliny uhličité;**  $C_{38}H_{72}O_7$ ;  $M=640,33 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 20 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=22-24,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ (nujol):  $\nu_{\max}$  1743, 1259, 1166, 722  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 4,15-4,01 (8H, m,  $\text{CH}_2\text{OCOOCH}_2$ ,  $2\text{COOCH}_2$ ); 2,30 (2H, t ( $J=7,7$ ),  $\text{CH}_2\text{COO}$ ); 2,29 (2H, t ( $J=7,4$ ),  $\text{CH}_2\text{COO}$ ); 1,75-1,15 (54H, m,  $27\text{CH}_2$ ); 0,87 (6H, t ( $J=6,6$ ),  $2\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 173,6; 155,3; 67,9; 67,7; 64,51; 64,46; 34,2; 34,1; 31,9; 29,62; 29,56; 29,51; 29,3; 29,2; 28,7; 28,6; 28,5; 28,4; 25,9; 25,4; 25,3; 24,8; 24,6; 22,7; 14,1.

### 6.2.8. Příprava esterů kyseliny karbamové 8a-8d

Reakce byla prováděna v dusíkové atmosféře. **T12** (0,6 mmol) byl rozpuštěn v bezvodém chloroformu (5 ml), aby došlo k uvolnění **DDEAK** (1,2 mmol), a k jeho roztoku byl přidán bezvodý pyridin (1 ml). K tomu byl přikapán za laboratorní teploty odpovídající alkyl-chlorformiát (1,5 mmol) a směs byla míchána za laboratorní teploty ještě 3-5 hod. Poté byla naředěna chloroformem (10 ml) a třikrát promyta vodou. Organické vrstvy byly vysušeny síranem sodným a vakuově zahuštěny. Pyridin byl ze směsi odstraněn azeotropicky destilací se suchým toluenem a následným ponecháním v exsíkátoru nad kyselinou sírovou ve vakuu 1-2 dny. Produkt byl čištěn chromatografií na sloupci silikagelu směsí hexan/ethyl-acetát.

**(8a) ethylester N-(5-dodecyloxykarbonylpentyl)karbamové kyseliny;**  $C_{21}H_{41}NO_4$ ;  $M=371,57 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 92 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=26,5-29 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\max}$  3454, 2928, 2856, 1719, 1517, 1466  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 4,65 (1H, bs, NH); 4,17-3,99 (4H, m,  $2\text{COOCH}_2$ ); 3,22-3,05 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{NHCOO}$ ); 2,33-2,25 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{COO}$ ); 1,73-1,16 (29H, m,  $13\text{CH}_2$ ,  $\text{CH}_3$ ); 0,87 (3H, t ( $J=6,7$ ),  $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 173,7; 156,6; 64,5; 60,6; 40,7; 34,1; 31,9; 29,6; 29,54; 29,49; 29,3; 29,2; 28,6; 26,2; 25,9; 24,5; 22,6; 14,6; 14,1.

**(8b) oktylester N-(5-dodecyloxykarbonylpentyl)karbamové kyseliny;**  $C_{27}H_{53}NO_4$ ;  $M=455,73 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 78 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=42-45 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\max}$  3454, 2928, 2856, 1717, 1517, 1467  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 4,65 (1H, bs, NH); 4,10-3,97 (4H, m,  $2\text{COOCH}_2$ ); 3,23-3,06 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{NHCO}$ ); 2,33-2,25 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{COO}$ ); 1,70-1,17 (36H, m,  $18\text{CH}_2$ ); 0,93-0,81 (6H, m,  $2\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 173,7; 156,7; 64,5; 40,7; 34,1; 31,9; 31,8; 29,61; 29,55; 29,50; 29,3; 29,23; 29,19; 29,0; 28,6; 26,2; 28,90; 28,85; 24,6; 22,7; 22,6; 14,10; 14,08.

**(8c) decylester N-(5-dodecyloxykarbonylpentyl)karbamové kyseliny;**  $C_{29}H_{57}NO_4$ ;  $M=483,78 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 86 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=47-48,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\max}$  3454, 2927, 2856, 1717, 1517, 1467  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 4,65 (1H, bs, NH); 4,09-3,97 (4H, m,  $2\text{COOCH}_2$ ); 3,22-3,06 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{NHCO}$ ); 2,29 (2H, t ( $J=7,4$ ),  $\text{CH}_2\text{COO}$ ); 1,71-1,17 (40H, m,  $20\text{CH}_2$ ); 0,91-0,83 (6H, m,  $2\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 173,7 (ester); 156,8 (karbamát); 64,9;

64,5; 40,7; 34,1; 31,88; 31,86; 29,7; 29,62; 29,60; 29,55; 29,51; 29,32; 29,28; 29,2; 29,0; 28,6; 26,2; 25,9; 25,8; 24,5; 22,7; 14,1.

**(8d) dodecylester N-(5-dodecyloxykarbonylpentyl)karbamové kyseliny;**  $C_{31}H_{61}NO_4$ ;  $M=511,84 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 85 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=52,5-53,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\text{max}}$  3454, 2927, 2855, 1717, 1517, 1467  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 4,65 (1H, bs, NH); 4,13-3,96 (4H, m,  $2\text{COOCH}_2$ ); 3,23-3,08 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{NHCO}$ ); 2,29 (2H, t ( $J=7,4$ ),  $\text{CH}_2\text{COO}$ ); 1,71-1,16 (44H, m,  $22\text{CH}_2$ ); 0,87 (6H, t ( $J=6,6$ ),  $2\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 173,7; 156,7; 64,5; 40,7; 34,1; 31,9; 29,7; 29,6; 29,53; 29,50; 29,33; 29,28; 29,23; 29,0; 28,6; 26,2; 25,90; 25,86; 24,6; 22,7; 14,1.

### 6.2.9. Příprava esterů kyseliny karbamové 9a-9b

Reakce byla prováděna v dusíkové atmosféře.

1. Do bezvodého THF (10 ml) bylo přidáno aktivní uhlí (5 mg), k tomu byl přidán roztok trichlormethyl-chlorformiátu (0,73 mmol) v THF (10 ml) a vzniklá směs byla míchána za laboratorní teploty 10 minut. Pak byl přikapán roztok hydroxyesteru **15a** nebo **15b** (0,67 mmol) v THF (5 ml), přikapávání trvalo asi 1,5 hod, aby se zabránilo vzniku symetrického karbonátu. Po přidání veškerého **15a** byl roztok míchán ještě 1 hod, přefiltrován a vakuově zahuštěn při 30  $^\circ\text{C}$ . Vzniklý nažloutlý olej (chlorformiát) byl bez přečištění použit okamžitě do dalšího kroku.

2. **T12** (0,335 mmol) byl rozpuštěn v bezvodém chloroformu (5 ml), aby došlo k uvolnění **DDEAK** (0,67 mmol), a k jeho roztoku byl přidán bezvodý pyridin (1 ml). K tomu byl za laboratorní teploty přikapán připravený chlorformiát a směs byla míchána přes noc. Poté byla naředěna chloroformem (20 ml) a třikrát promyta vodou. Organická vrstva byla vysušena síranem sodným a vakuově zahuštěna. Pyridin byl ze směsi odstraněn azeotropicky destilací se suchým toluenem a následným ponecháním v exsikátoru nad kyselinou sírovou ve vakuu 1-2 dny. Produkt byl čištěn chromatografií na sloupci silikagelu směsí hexan/ethyl-acetát.

**(9a) (5-dodecyloxykarbonylpentyl)ester N-(5-dodecyloxykarbonylpentyl)karbamové kyseliny;**  $C_{37}H_{71}NO_6$ ;  $M=625,98 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 47 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=49,5-50,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\text{max}}$  3453, 2927, 2856, 1720, 1517, 1466  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 4,66 (1H, bs, NH); 4,08-3,99 (6H, m,  $3\text{OCH}_2$ ); 3,21-3,07 (2H, m,  $\text{NHCH}_2$ ); 2,29 (4H, t ( $J=7,4$ ),  $2\text{CH}_2\text{COO}$ ); 1,70-1,17 (52H, m,  $26\text{CH}_2$ ); 0,90-0,83 (6H, m,  $2\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 173,7; 156,6; 64,5; 40,7; 34,2; 34,1; 31,9; 29,7; 29,61; 29,60; 29,55; 29,50; 29,3; 29,2; 28,7; 28,6; 26,2; 25,9; 25,5; 24,6; 24,55; 22,7; 14,1.

**(9b) (6-dodecyloxykarbonylhexyl)ester N-(5-dodecyloxykarbonylpentyl)karbamové kyseliny;**  $C_{38}H_{73}NO_6$ ;  $M=640,01 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 46 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=50-52 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\text{max}}$  3453, 2927, 2856, 1720, 1517, 1466  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 4,66 (1H, bs, NH); 4,08-3,98 (6H, m,  $3\text{OCH}_2$ ); 3,22-3,07 (2H, m,  $\text{NHCH}_2$ ); 2,33-2,25 (4H, m,  $2\text{CH}_2\text{COO}$ ); 1,69-1,19 (54H, m,  $27\text{CH}_2$ ); 0,91-0,83 (6H, m,  $2\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 173,6; 156,7; 64,5; 64,4; 34,2;

## 6. Experimentální část

34,1; 31,9; 29,59; 29,55; 29,50; 29,3; 29,2; 28,81; 28,76; 28,6; 26,2; 25,9; 25,6; 24,8; 24,5; 22,7; 14,1.

### 6.2.10. Příprava esterů kyseliny šťavelové 10, 11

Reakce byla prováděna v dusíkové atmosféře. Hydroxyester **15a** nebo hydroxyamid **12b** (1,5 mmol) byl rozpuštěn v bezvodém chloroformu (10 ml) s přidavkem suchého pyridinu (1,7 mmol), k tomu byl přidán roztok oxalyldichloridu (0,83 mmol) v bezvodém chloroformu (1 ml) a směs byla míchána za laboratorní teploty 24 hod. Poté byla naředěna chloroformem (20 ml) a třikrát promyta vodou. Organický podíl byl vysušen síranem sodným a vakuově zahuštěn. Pyridin byl ze směsi odstraněn azeotropicky destilací se suchým toluenem a následným ponecháním v exsíkátoru nad kyselinou sírovou ve vakuu 1-2 dny. Produkt byl čištěn chromatografií na sloupci silikagelu směsí hexan/ethyl-acetát 8:2.

**(10) bis(5-dodecyloxykarbonylpentyl)ester kyseliny šťavelové;**  $C_{38}H_{70}O_8$ ;  $M=654,97 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 52 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=38,5-40 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\text{max}}$  3028, 2927, 2856, 1763, 1739, 1587, 1466, 1363, 1318  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 4,28 (4H, t ( $J=6,7$ ),  $\text{CH}_2\text{OCOCOOCH}_2$ ); 4,05 (4H, t ( $J=7,0$ ),  $2\text{COOCH}_2$ ); 2,31 (4H, t ( $J=7,4$ ),  $2\text{CH}_2\text{COO}$ ); 1,82-1,15 (26H, m,  $13\text{CH}_2$ ); 0,91-0,82 (6H, m,  $2\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 173,5; 157,9; 66,8; 64,5; 34,0; 31,9; 29,61; 29,55; 29,50; 29,3; 29,2; 28,6; 28,0; 25,9; 25,3; 24,5; 22,7; 14,1.

**(11) bis(5-dodecylaminokarbonylpentyl)ester kyseliny šťavelové;**  $C_{38}H_{72}N_2O_6$ ;  $M=653,01 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 45 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=66-70 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ ( $\text{CHCl}_3$ ): 3449, 3008, 2929, 2856, 1726, 1660, 1518, 1466  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 5,47 (2H, bs, 2NH); 4,39-4,23 (4H, m,  $2\text{CH}_2\text{O}$ ); 3,26-3,17 (4H, m,  $2\text{CH}_2\text{NHCO}$ ); 2,16 (4H, t ( $J=7,8$ ),  $2\text{NHCOCH}_2$ ); 1,81-1,16 (26H, m,  $13\text{CH}_2$ ); 0,91-0,82 (6H, m,  $2\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 172,4; 157,9; 66,9; 63,2; 39,5; 36,5; 31,9; 29,61; 29,59; 29,55; 29,30; 29,26; 28,0; 26,9; 25,4; 25,2; 22,6; 14,1; 13,9.

## 6.3. Syntéza rozvětvených analogů T12

### 6.3.1. Příprava $\omega$ -bromkyselin 22a-22b

Příslušný lakton (0,56 mol) byl rozpuštěn ve směsi tvořené 48% kyselinou bromovodíkovou (320 ml) a koncentrovanou kyselinou sírovou (77 ml). Směs byla ponechána při laboratorní teplotě 2 hod a poté byla 4 hod zahřívána pod zpětným chladičem k varu. Po ochlazení byla nalita do 1,5 l destilované vody. Organická vrstva byla oddělena, vodná byla nasycena NaCl a pětikrát promyta diethyletherem. Spojené organické podíly byly vysušeny síranem sodným a vakuově zahuštěny. Vzniklá nahnědlá kapalina byla čištěna frakční destilací za sníženého tlaku.

V případě kyseliny 8-bromoktanové (**22b**) byl výchozí lakton připraven oxidací cyklooktanonu 30% peroxidem vodíku (postup byl obdobný jako v kapitole 6.1.4.).

Surový lakton byl bez předchozího čištění použit do dalšího kroku stejně jako  $\epsilon$ -kaprolakton.

**(22a) 6-bromhexanová kyselina;**  $C_6H_{11}BrO_2$ ;  $M=195,06 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 75 %; bílá krystalická látka;  $t_v=145-147 \text{ }^\circ\text{C}/12 \text{ torr}$  (lit.<sup>61</sup> uvádí  $t_v$  134-136  $^\circ\text{C}/7 \text{ torr}$ ).

**(22b) 8-bromoktanová kyselina;**  $C_8H_{15}BrO_2$ ;  $M=223,11 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek 18 %; (počítáno na navážku cyklooktanonu); bílá krystalická látka;  $t_v=168-169 \text{ }^\circ\text{C}/12 \text{ torr}$  (lit.<sup>62</sup> uvádí 147-150  $^\circ\text{C}/2 \text{ torr}$ ).

### 6.3.2. Příprava sodných solí $\omega$ -bromkyselin 23a-23b

Roztok ethoxidu sodného připravený reakcí sodíku (0,39 mol) s bezvodým ethanolem (500 ml) byl přidán k roztoku  $\omega$ -bromkyseliny (0,39 mol) v bezvodém ethanolu (320 ml). Směs byla míchána 0,5 hod, ethanol byl vakuově oddestilován a vzniklá bílá sraženina byla několikrát na filtru promyta diethyletherem, rozetřena ve třecí misce a dosušena ve vakuu při 70  $^\circ\text{C}$ .

**(23a) sodná sůl 6-bromhexanové kyseliny;**  $C_6H_{10}BrO_2Na$ ;  $M=217,04 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek 98 %; bílá krystalická látka.

**(23b) sodná sůl 8-bromoktanové kyseliny;**  $C_8H_{14}BrO_2Na$ ;  $M=245,09 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek 99 %; bílá krystalická látka.

### 6.3.3. Příprava katalyzátoru $Li_2CuCl_4$

$LiCl \cdot H_2O$  (0,002 mol) a  $CuCl_2 \cdot 2H_2O$  (0,001 mol) byly společně opatrně žíhány v baňce do vytvoření hnědého zbarvení (směs nesmí zčernat!). K tomu byl přidán čerstvě vysušený THF (10 ml), čímž vznikl oranžový roztok, a baňka byla uzavřena septem. Roztok byl připravován vždy čerstvý a byl spotřebován nejpozději do druhého dne.

### 6.3.4. Příprava alkoholů 16a-16e a 17a-17b

Nejprve byly připraveny rozvětvené alkylmagnesiumbromidy **24a-24d** nebo **25a-25b** z příslušných rozvětvených alkylbromidů. Roztok alkylbromidu (0,25 mol) v bezvodém THF (50 ml) byl přikapán k hořčíku (0,252 mol) v bezvodém THF (250 ml). Reakce byla aktivována několika krystalky jodu. Směs byla poté zahřívána k varu pod zpětným chladičem dokud se všechny hořčík nerozpustil. Roztok byl okamžitě použit do dalšího kroku.

Sůl **23a** nebo **23b** (0,16 mol) byla rozsuspendována v bezvodém THF (250 ml), ochlazená na -10  $^\circ\text{C}$  a byl k ní přidán čerstvě připravený roztok katalyzátoru  $Li_2CuCl_4$  (0,001 mol) v THF. Poté byl za intenzivního míchání přikapáván roztok alkylmagnesiumbromidu **24a-24d** nebo **25a-25b** tak, aby teplota nepřesáhla -5  $^\circ\text{C}$ .

## 6. Experimentální část

Směs při tom měnila barvu z oranžové přes modrou a zelenou do bezbarvé. Po přidání veškerého Grignardova činidla byla teplota  $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$  udržována ještě další 4 hod. Po ohřátí na laboratorní teplotu byl přidán  $\text{LiAlH}_4$  (0,16 mol), se kterým byla směs 1 hod zahřívána k varu pod zpětným chladičem. Poté byla nalita na rozdrcený led a vzniklá bílá sraženina byla rozpuštěna přidáním 30% kyseliny sírové. Organická vrstva byla oddělena a vodná byla třikrát extrahována diethyletherem. Spojené organické podíly byly vysušeny síranem sodným a vakuově zahuštěny. Vzniklá nahnědlá kapalina byla čištěna frakční destilací za sníženého tlaku.

**(16a) 7-methyloktanol;**  $\text{C}_9\text{H}_{20}\text{O}$ ;  $M=144,26\text{ gmol}^{-1}$ ; výtěžek: 62 %; bezbarvá kapalina oktanolového zápachu;  $t_v=96-97\text{ }^{\circ}\text{C}/10\text{ torr}$  (lit.<sup>63</sup> uvádí  $t_v$   $100\text{ }^{\circ}\text{C}/13\text{ torr}$ ); IČ (samotná látka):  $\nu_{\text{max}}$  3332, 2954, 2927, 2868, 2856, 1467, 1384, 1366, 1058,  $724\text{ cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 3,61 (2H, t (J=6,6),  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 2,14 (1H, s, OH); 1,62-1,02 (11H, m, CH, 5 $\text{CH}_2$ ); 0,84 (6H, d (J=6,6), 2 $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 73,0; 38,9; 32,7; 29,6; 27,9; 27,3; 25,7; 22,6.

**(16b) 8-methylnonanol;**  $\text{C}_{10}\text{H}_{22}\text{O}$ ;  $M=158,29\text{ gmol}^{-1}$ ; výtěžek: 62 %; bezbarvá kapalina oktanolového zápachu;  $t_v=103-104\text{ }^{\circ}\text{C}/10\text{ torr}$  (lit.<sup>64</sup> uvádí  $t_v$   $80\text{ }^{\circ}\text{C}/6\text{ torr}$ ); IČ (samotná látka):  $\nu_{\text{max}}$  3331, 2953, 2927, 2866, 2854, 1467, 1384, 1366, 1058,  $723\text{ cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 3,61 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 1,94 (1H, s, OH); 1,60-1,02 (13H, m, CH, 6 $\text{CH}_2$ ); 0,84 (6H, d (J=6,6), 2 $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 63,0; 39,0; 32,7; 29,8; 29,4; 27,9; 27,3; 25,7; 22,6.

**(16c) 9-methyldekanol;**  $\text{C}_{11}\text{H}_{24}\text{O}$ ;  $M=172,31\text{ gmol}^{-1}$ ; výtěžek: 63 %; bezbarvá kapalina oktanolového zápachu;  $t_v=119-120\text{ }^{\circ}\text{C}/10\text{ torr}$  (lit.<sup>65</sup> uvádí  $t_v$   $135-136\text{ }^{\circ}\text{C}/12\text{ torr}$ ); IČ (samotná látka):  $\nu_{\text{max}}$  3328, 2953, 2926, 2854, 1467, 1384, 1366, 1056,  $722\text{ cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 3,60 (2H, t (J=6,7),  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 1,93 (1H, s, OH); 1,60-1,02 (15H, m, CH, 7 $\text{CH}_2$ ); 0,84 (6H, d (J=7,2), 2 $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 62,9; 39,0; 32,7; 29,8; 29,6; 29,4; 27,9; 27,4; 25,7; 22,6.

**(16d) 10-methylundekanol;**  $\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{O}$ ;  $M=186,34\text{ gmol}^{-1}$ ; výtěžek: 74 %; bezbarvá kapalina;  $t_v=135-136\text{ }^{\circ}\text{C}/10\text{ torr}$  (lit.<sup>66</sup> uvádí  $t_v$   $147-149\text{ }^{\circ}\text{C}/18\text{ torr}$ ); IČ (samotná látka):  $\nu_{\text{max}}$  3335, 2953, 2925, 2854, 1467, 1384, 1366, 1057,  $721\text{ cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 3,62 (2H, t (J=6,6),  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 1,94 (1H, s, OH); 1,61-1,03 (17H, m, CH, 8 $\text{CH}_2$ ); 0,84 (6H, d (J=6,6), 2 $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 63,0; 39,0; 32,7; 29,9; 29,6; 29,4; 27,9; 27,4; 25,7; 22,6.

**(16e) 11-methyldodekanol;**  $\text{C}_{13}\text{H}_{28}\text{O}$ ;  $M=200,37\text{ gmol}^{-1}$ ; výtěžek: 68 %; bezbarvá kapalina;  $t_v=146-147\text{ }^{\circ}\text{C}/10\text{ torr}$  (lit.<sup>65</sup> uvádí  $t_v$   $139\text{ }^{\circ}\text{C}/11\text{ torr}$ ); IČ (samotná látka):  $\nu_{\text{max}}$  3332, 2953, 2925, 2854, 1467, 1384, 1366, 1057,  $721\text{ cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 3,62 (2H, t (J=6,6),  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 1,67 (1H, bs, OH); 1,61-1,03 (19H, m, CH, 9 $\text{CH}_2$ ); 0,85 (6H, d (J=6,6), 2 $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 63,0; 39,0; 32,8; 29,9; 29,7; 29,61; 29,59; 29,4; 27,9; 27,4; 25,7; 22,5.

**(17a) 8-ethyldekanol;**  $\text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{O}$ ;  $M=186,34\text{ gmol}^{-1}$ ; výtěžek: 66 %; bezbarvá kapalina; látka v literatuře nepopsaná;  $t_v=131-132\text{ }^{\circ}\text{C}/10\text{ torr}$ ; IČ (samotná látka):  $\nu_{\text{max}}$  3355;

2960; 2926; 2857; 1457; 1379; 1056; 721;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 3,62 (2H, t ( $J=6,6$ ),  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 1,62-1,49 (1H, m, CH); 1,46 (1H, bs, OH); 1,38-1,06 (16H, m,  $8\text{CH}_2$ ); 0,82 (6H, t ( $J=7,4$ ),  $2\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 63,0; 40,3; 32,8; 30,1; 29,5; 26,7; 25,7; 25,4; 10,9.

**(17b) 10-ethyl-dodekanol**;  $\text{C}_{14}\text{H}_{30}\text{O}$ ;  $M=214,39\text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 64 %; bezbarvá kapalina;  $t_v=159-160\text{ }^\circ\text{C}/10\text{ torr}$  (lit.<sup>67</sup> uvádí  $155-160\text{ }^\circ\text{C}/10\text{ torr}$ ); IČ (samotná látka):  $\nu_{\text{max}}$  3321; 2960; 2923; 2853; 1461; 1379; 1056; 721  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 3,67-3,55 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ); 2,01 (1H, bs, OH); 1,81-1,72 (1H, m, CH); 1,39-1,04 (20H, m,  $10\text{CH}_2$ ); 0,81 (6H, t ( $J=7,4$ ),  $2\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 62,9; 40,3; 32,74; 32,69; 30,1; 29,6; 29,4; 26,7; 25,7; 25,4; 10,9.

### 6.3.5. Příprava kyselin 18a-18e a 19a-19b

V 90% kyselině octové (56 ml) byl rozpuštěn oxid chromový (56 mmol) a roztok byl ochlazen na  $+5\text{ }^\circ\text{C}$ . Alkohol **16a-16e** nebo **17a-17b** (14 mmol) byl přikapán za intenzivního míchání takovou rychlostí, aby teplota nepřesáhla  $+5\text{ }^\circ\text{C}$ . V chlazení bylo pokračováno ještě 2 hod, pak byla směs ponechána stát při laboratorní teplotě přes noc. Poté byla naředěna 100 ml vody, pětkrát extrahována diethyletherem a organické extrakty byly promyty nasyceným roztokem uhličitanu sodného. Vodná vrstva byla okyselená kyselinou chlorovodíkovou a extrahována pětkrát diethyletherem. Organické podíly byly promyty vodou, vysušeny síranem sodným a vakuově zahuštěny. Získaný žlutý olej byl čištěn chromatografií na sloupci silikagelu směsí hexan/ethyl-acetát 9:1.

**(18a) 7-methyl-oktanová kyselina**;  $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}_2$ ;  $M=158,24\text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 72 %; bezbarvý olej zapáchající po krátké kyselině;  $t_f=3-5\text{ }^\circ\text{C}$  (lit.<sup>68</sup> uvádí  $t_f 0\text{ }^\circ\text{C}$ ); IČ ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\text{max}}$  3515, 3028, 2956, 2931, 2869, 1708, 1467, 1412, 1385, 1366, 1280  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 10,96 (1H, bs, COOH); 2,34 (2H, t ( $J=7,4$ ),  $\text{CH}_2\text{COOH}$ ); 1,69-1,57 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ); 1,57-1,10 (7H, m, CH,  $3\text{CH}_2$ ); 0,86 (6H, d ( $J=6,6$ ),  $2\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 180,5; 38,7; 34,1; 29,3; 27,9; 27,0; 25,7; 22,59; 22,55.

**(18b) 8-methyl-nonanová kyselina**;  $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_2$ ;  $M=172,27\text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 61 %; nažloutlá krystalická látka zapáchající po krátké kyselině;  $t_f=15-19\text{ }^\circ\text{C}$  (lit.<sup>69</sup> uvádí  $t_f 23,7-24\text{ }^\circ\text{C}$ ); IČ ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\text{max}}$  3515, 3026, 2955, 2928, 2868, 2857, 1708, 1467, 1412, 1384, 1366, 1291  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 10,16 (1H, bs, COOH); 2,33 (2H, t ( $J=7,4$ ),  $\text{CH}_2\text{COOH}$ ); 1,69-1,56 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ); 1,56-1,08 (9H, m, CH,  $4\text{CH}_2$ ); 0,86 (6H, d ( $J=6,6$ ),  $2\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 180,3; 38,9; 34,2; 29,5; 29,1; 27,9; 27,2; 24,7; 22,6.

**(18c) 9-methyl-dekanová kyselina**;  $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_2$ ;  $M=186,30\text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 70 %; bílá krystalická látka;  $t_f=28-29,5\text{ }^\circ\text{C}$  (lit.<sup>65</sup> uvádí  $t_f 29-29,5\text{ }^\circ\text{C}$ ); IČ ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\text{max}}$  3515, 3027, 2955, 2927, 2856, 1708, 1467, 1412, 1384, 1366, 1285  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 10,94 (1H, bs, COOH); 2,34 (2H, t ( $J=7,4$ ),  $\text{CH}_2\text{COOH}$ ); 1,67-1,56 (2H, m,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ ); 1,56-1,08 (11H, m, CH,  $5\text{CH}_2$ ); 0,86 (6H, d ( $J=6,6$ ),  $2\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 180,4; 39,0; 34,1; 29,7; 29,3; 29,0; 27,9; 27,3; 24,7; 22,6.

## 6. Experimentální část

**(18d) 10-methylundekanová kyselina;**  $C_{12}H_{24}O_2$ ;  $M=200,32 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 70 %; bílá krystalická látka;  $t_f=36,5-39 \text{ }^\circ\text{C}$  (lit.<sup>70</sup> uvádí  $t_f$  41,2  $^\circ\text{C}$ ); IČ ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\text{max}}$  3515, 3031, 2954, 2927, 2856, 1708, 1467, 1412, 1384, 1366, 1290  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 11,50 (1H, bs, COOH); 2,34 (2H, t ( $J=7,4$ ),  $\underline{\text{CH}_2}\text{COOH}$ ); 1,70-1,56 (2H, m,  $\underline{\text{CH}_2}\text{CH}_2\text{COOH}$ ); 1,56-1,08 (13H, m, CH, 6 $\text{CH}_2$ ); 0,86 (6H, d ( $J=6,6$ ), 2 $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 180,4; 39,0; 34,1; 29,8; 29,5; 29,2; 29,1; 28,0; 27,4; 24,7; 22,7.

**(18e) 11-methyldodekanová kyselina;**  $C_{13}H_{26}O_2$ ;  $M=214,35 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 87 %; bílá krystalická látka;  $t_f=37-40 \text{ }^\circ\text{C}$  (lit.<sup>65</sup> uvádí  $t_f$  40,5-41  $^\circ\text{C}$ ); IČ ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\text{max}}$  3515, 3030, 2954, 2927, 2855, 1708, 1467, 1412, 1384, 1366, 1288  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 11,66 (1H, bs, COOH); 2,35 (2H, t ( $J=7,4$ ),  $\underline{\text{CH}_2}\text{COOH}$ ); 1,70-1,56 (2H, m,  $\underline{\text{CH}_2}\text{CH}_2\text{COOH}$ ); 1,56-1,08 (15H, m, CH, 7 $\text{CH}_2$ ); 0,86 (6H, d ( $J=6,6$ ), 2 $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 180,5; 39,0; 34,1; 29,9; 29,6; 29,4; 29,2; 29,0; 27,9; 27,4; 24,6; 22,6.

**(19a) 8-ethyldekanová kyselina;**  $C_{12}H_{24}O_2$ ;  $M=200,32 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 53 %; bezbarvý olej; látka v literatuře nepopsaná; IČ ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\text{max}}$  3516; 3019; 2961; 2930; 2873; 2858; 2679; 1708; 1462; 1412; 1380; 1285  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 3,74 (1H, s, COOH); 2,34 (2H, t ( $J=7,7$ ),  $\underline{\text{CH}_2}\text{COOH}$ ); 1,69-1,55 (2H, m,  $\underline{\text{CH}_2}\text{CH}_2\text{COOH}$ ); 1,40-1,06 (13H, m, CH, 6 $\text{CH}_2$ ); 0,82 (6H, t ( $J=7,4$ ), 2 $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 180,0; 63,6; 40,3; 34,1; 32,6; 29,7; 29,1; 26,5; 25,4; 24,7; 10,9.

**(19b) 10-ethyldodekanová kyselina;**  $C_{14}H_{28}O_2$ ;  $M=228,38 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 68 %; bezbarvý olej; látka v literatuře nepopsaná; IČ ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\text{max}}$  3516; 3019; 2961; 2927; 2873; 2857; 2674; 1708; 1462; 1412; 1380; 1287  $\text{cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 3,73 (1H, s, COOH); 2,33 (2H, t ( $J=7,6$ ),  $\underline{\text{CH}_2}\text{COOH}$ ); 1,68-1,54 (2H, m,  $\underline{\text{CH}_2}\text{CH}_2\text{COOH}$ ); 1,38-1,06 (17H, m, CH, 8 $\text{CH}_2$ ); 0,82 (6H, t ( $J=7,4$ ), 2 $\text{CH}_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 179,7; 63,6; 40,3; 34,1; 32,7; 30,0; 29,5; 29,2; 29,1; 26,7; 25,4; 24,7; 10,9.

### 6.3.6. Příprava hydrochloridů aminoesterů 26a-26e a 27a-27b

Směs hydrochloridu kyseliny 6-aminohexanové (6,16 mmol) s thionylchloridem (2,5 ml) byla za intenzivního míchání zahřívána na 40  $^\circ\text{C}$  30 min. Poté byl přebytek  $\text{SOCl}_2$  vakuově oddestilován, byl přidán suchý toluen a směs byla znovu vakuově zahuštěna pro odstranění posledních stop  $\text{SOCl}_2$ . Ke zbytku byl přidán roztok alkoholu **16a-16e** nebo **17a-17b** (5,54 mmol) v bezvodém chloroformu (20 ml) a směs byla zahřívána k varu pod zpětným chladičem 1,5 hod. Vzniklý roztok byl vakuově zahuštěn a nažloutlý mazlavý surový produkt byl vysušen v exsikátoru nad NaOH. Poté byl rozsuspendován v hexanu a přečištěn sloupcovou chromatografií na mikrokrytalické celulóze (cca 15 g). Sloupec byl nejprve promýván hexanem do vymizení nezreagovaného alkoholu a kyseliny (ty byly detekovány pomocí TLC na silikagelu v mobilní fázi: hexan/ethyl-acetát 9:1). Produkt byl z celulózy vymyt směsí hexan/chloroform 7:3. Po zahuštění byl vysušen v exsikátoru nad  $\text{P}_4\text{O}_{10}$ .



**(26a) 5-(7-methyloktoxykarbonyl)pentylammonium-chlorid;**  $C_{15}H_{32}NO_2Cl$ ;  $M=293,88 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 65 %; nažloutlá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=78-83 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ ( $CHCl_3$ ):  $\nu_{\max}$  3401; 3031; 2981; 2957; 2934; 2869; 2641; 2540; 2455; 1727; 1612; 1522; 1467; 1384;  $1252 \text{ cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $CDCl_3$ ): 8,24 (3H, bs,  $NH_3^+$ ); 4,03 (2H, t,  $J=6,9$ ,  $CH_2OCO$ ); 3,08-2,93 (2H, m,  $\underline{CH_2}NH_3^+$ ); 2,31 (2H, t,  $J=7,2$ ,  $CH_2COO$ ); 1,87-1,09 (17H, m,  $8CH_2$ , CH); 0,85 (6H, d,  $J=6,6$ ,  $2CH_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $CDCl_3$ ): 173,5; 64,6; 60,4; 39,7; 38,9; 29,5; 28,6; 27,9; 27,2; 25,9; 25,9; 24,2; 22,6; 14,2.

**(26b) 5-(8-methylnonyloxykarbonyl)pentylammonium-chlorid;**  $C_{16}H_{34}NO_2Cl$ ;  $M=307,90 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 62 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=81-86 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ ( $CHCl_3$ ):  $\nu_{\max}$  3401; 3031; 2982; 2955; 2932; 2866; 2641; 2545; 2455; 1727; 1615; 1521; 1467; 1384;  $1252 \text{ cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $CDCl_3$ ): 8,24 (3H, bs,  $NH_3^+$ ); 4,04 (2H, t,  $J=6,9$ ,  $CH_2OCO$ ); 3,09-2,93 (2H, m,  $\underline{CH_2}NH_3^+$ ); 2,31 (2H, t,  $J=7,3$ ,  $CH_2COO$ ); 1,87-1,12 (19H, m,  $9CH_2$ , CH); 0,85 (6H, d,  $J=6,6$ ,  $2CH_3$ ),  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $CDCl_3$ ): 173,5; 64,5; 60,4; 39,7; 39,0; 29,5; 28,7; 28,0; 27,5; 27,2; 25,9; 25,8; 24,0; 22,5; 14,2.

**(26c) 5-(9-methyldecyloxykarbonyl)pentylammonium-chlorid;**  $C_{17}H_{36}NO_2Cl$ ;  $M=321,94 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 61 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=54-60 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ ( $CHCl_3$ ):  $\nu_{\max}$  3401; 3029; 2981; 2957; 2932; 2858; 2640; 2540; 2452; 1727; 1614; 1521; 1467; 1393;  $1251 \text{ cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $CDCl_3$ ): 8,25 (3H, bs,  $NH_3^+$ ); 4,04 (2H, t,  $J=6,8$ ,  $CH_2OCO$ ); 3,06-2,92 (2H, m,  $\underline{CH_2}NH_3^+$ ); 2,32 (2H, t,  $J=7,1$ ,  $CH_2COO$ ); 1,87-1,09 (21H, m,  $10CH_2$ , CH); 0,85 (6H, d,  $J=6,6$ ,  $2CH_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $CDCl_3$ ): 173,6; 64,5; 60,3; 39,6; 29,5; 33,8; 29,0; 28,7; 27,9; 27,6; 27,6; 25,8; 25,7; 24,3; 22,2; 14,2.

**(26d) 5-(10-methylundecyloxykarbonyl)pentylammonium-chlorid;**  $C_{18}H_{38}NO_2Cl$ ;  $M=335,96 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 58 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=87-96 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ ( $CHCl_3$ ):  $\nu_{\max}$  3401; 3019; 2982; 2955; 2928; 2857; 2647; 2535; 2454; 1727; 1615; 1521; 1467; 1393;  $1251 \text{ cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $CDCl_3$ ): 8,28 (3H, bs,  $NH_3^+$ ); 4,04 (2H, t,  $J=6,9$ ,  $CH_2OCO$ ); 3,08-2,92 (2H, m,  $\underline{CH_2}NH_3^+$ ); 2,31 (2H, t,  $J=7,1$ ,  $CH_2COO$ ); 1,87-1,10 (23H, m,  $11CH_2$ , CH); 0,85 (6H, d,  $J=6,6$ ,  $2CH_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $CDCl_3$ ): 173,5; 64,6; 60,4; 39,7; 39,0; 33,8; 29,9; 29,6; 28,9; 27,9; 27,4; 27,3; 25,9; 25,9; 24,2; 22,6; 14,2.

**(26e) 5-(11-methyldodecyloxykarbonyl)pentylammonium-chlorid;**  $C_{19}H_{40}NO_2Cl$ ;  $M=349,98 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 69 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=85-91 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ ( $CHCl_3$ ):  $\nu_{\max}$  3401; 3022; 2982; 2955; 2926; 2858; 2642; 2574; 2461; 1727; 1615; 1521; 1467; 1393;  $1252 \text{ cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $CDCl_3$ ): 8,27 (3H, bs,  $NH_3^+$ ); 4,06-3,98 (2H, m,  $CH_2OCO$ ); 3,09-2,92 (2H, m,  $\underline{CH_2}NH_3^+$ ); 2,31 (2H, t,  $J=7,3$ ,  $CH_2COO$ ); 1,87-1,07 (25H, m,  $12CH_2$ , CH); 0,84 (6H, d,  $J=6,6$ ,  $2CH_3$ );  $^{13}\text{C NMR}$  (75 MHz,  $CDCl_3$ ): 173,5; 64,6; 39,7; 39,0; 33,8; 29,9; 29,6; 29,5; 29,2; 28,6; 27,9; 27,4; 27,2; 25,9; 25,8; 24,2; 22,6; 14,2.

**(27a) 5-(8-ethyldecyloxykarbonyl)pentylammonium-chlorid;**  $C_{18}H_{38}NO_2Cl$ ;  $M=335,96 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 65 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=88-98 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ ( $CHCl_3$ ):  $\nu_{\max}$  3401; 3030; 2964; 2933; 2872; 2637; 2536; 2458; 1727; 1614; 1522; 1464; 1377;  $1252 \text{ cm}^{-1}$ ;  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $CDCl_3$ ): 8,24 (3H, bs,  $NH_3^+$ ); 4,06-

## 6. Experimentální část

3,99 (2H, m, CH<sub>2</sub>OCO); 3,08-2,92 (2H, m, CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub><sup>+</sup>); 2,30 (2H, t, J=7,5, CH<sub>2</sub>COO); 1,87-1,15 (23H, m, 11CH<sub>2</sub>, CH); 0,81 (6H, t, J=7,4, 2CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 173,5; 64,6; 60,4; 40,3; 39,7; 33,9; 32,6; 29,9; 29,3; 28,6; 27,2; 27,2; 26,6; 25,9; 25,4; 24,2; 14,2; 10,9.

**(27b) 5-(10-ethylododecyloxykarbonyl)pentylammonium-chlorid;** C<sub>20</sub>H<sub>42</sub>NO<sub>2</sub>Cl; M=364,02 g mol<sup>-1</sup>; výtěžek: 50 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná; t<sub>f</sub>=84-92 °C; IČ (CHCl<sub>3</sub>): ν<sub>max</sub> 3401; 3038; 2965; 2931; 2875; 2642; 2534; 2453; 1727; 1613; 1522; 1464; 1377; 1252 cm<sup>-1</sup>; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 8,27 (3H, bs, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>); 4,04 (2H, t, J=6,6, CH<sub>2</sub>OCO); 3,07-2,94 (2H, m, CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub><sup>+</sup>); 2,31 (2H, t, J=7,6, CH<sub>2</sub>COO); 1,87-1,09 (27H, m, 13CH<sub>2</sub>, CH); 0,82 (6H, t, J=7,1, 2CH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 173,4; 64,6; 60,4; 40,3; 39,7; 33,9; 32,7; 30,1; 29,6; 29,5; 29,3; 28,6; 27,2; 26,7; 25,9; 25,9; 25,4; 24,2; 14,2; 10,9.

### 6.3.7. Příprava rozvětvených karbamátů 20a-20e a 21a-21b

Hydrochlorid aminoesteru **26a-26e** nebo **27a-27b** (3,40 mmol) byl rozpuštěn ve vodě (30 ml), zalkalizován TEA (10,20 mmol) a extrahován diethyletherem (5x20 ml). Spojené organické extrakty byly promyty vodou (2x10 ml), vysušeny síranem sodným (sušidlo bylo po odfiltrování řádně propláchnuto chloroformem pro vymytí případného karbamátu), zahuštěny a dosušeny v exsikátoru. Výsledný nažloutlý olej byl rozpuštěn v malém množství diethyletheru a tento roztok byl 20 min probubláván mírným proudem CO<sub>2</sub>, což vedlo ke vzniku karbamátů ve formě bílé krystalické látky. Suspenze byla ponechána krystalizovat při -20 °C dva dny. Vzniklé krystaly byly odfiltrovány a vysušeny v exsikátoru nad P<sub>4</sub>O<sub>10</sub>.

V případě látek **20a**, **21a** a **21b** vznikal karbamát ve formě nefiltrovatelných jemných krystalů. Proto byl supernatant nad sraženinou odsát při -20 °C, nahrazen čistým diethyletherem a znovu probubláván CO<sub>2</sub>. Tento postup byl opakován dokud roztok nad sraženinou nebyl čistý. Poté byl zahuštěn a vysušen v exsikátoru nad P<sub>4</sub>O<sub>10</sub>.

**(20a) 5-(7-methyloktýloxykarbonyl)pentylammonium 5-(7-methyloktýloxykarbonyl)pentylkarbamát;** C<sub>31</sub>H<sub>62</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>; M=558,85 g mol<sup>-1</sup>; výtěžek: 62 %; mírně nažloutlá krystalická látka; v literatuře nepopsaná; t<sub>f</sub>=28-33 °C; IČ (nujol): ν<sub>max</sub> 3331; 3271; 1739; 1635; 1567; 1536; 1307; 1169; 723 cm<sup>-1</sup>; IČ (CHCl<sub>3</sub>): ν<sub>max</sub> 3449; 3026; 2954; 2931; 2858; 2337; 1724; 1659; 1577; 1477; 1366 cm<sup>-1</sup>.

**(20b) 5-(8-methylnonyloxykarbonyl)pentylammonium 5-(8-methylnonyloxykarbonyl)pentylkarbamát;** C<sub>33</sub>H<sub>66</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>; M=583,90 g mol<sup>-1</sup>; výtěžek: 60 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná; t<sub>f</sub>=43-45 °C; IČ (nujol): ν<sub>max</sub> 3436; 3247; 1723; 1648; 1577; 1535; 1292; 721 cm<sup>-1</sup>; IČ (CHCl<sub>3</sub>): ν<sub>max</sub> 3401; 3024; 2954; 2930; 2857; 2337; 1712; 1670; 1577; 1467; 1364 cm<sup>-1</sup>.

**(20c) 5-(9-methyldecyloxykarbonyl)pentylammonium 5-(9-methyldecyloxykarbonyl)pentylkarbamát;** C<sub>35</sub>H<sub>70</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>; M=614,96 g mol<sup>-1</sup>; výtěžek: 43 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná; t<sub>f</sub>=39-43 °C; IČ (nujol): ν<sub>max</sub> 3310; 3270; 1741; 1640; 1568; 1539; 1310; 1168; 723 cm<sup>-1</sup>; IČ (CHCl<sub>3</sub>): ν<sub>max</sub> 3452; 3026; 2954; 2930; 2856; 2337; 1725; 1658; 1567; 1467; 1364 cm<sup>-1</sup>.

**(20d) 5-(10-methylundecyloxykarbonyl)pentylammonium 5-(10-methylundecyloxykarbonyl)pentylkarbamát;**  $C_{37}H_{74}N_2O_6$ ;  $M=643,01 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 61 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=39-40,5 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ (nujol):  $\nu_{\max}$  3331; 3271; 1739; 1638; 1578; 1537; 1290; 1167; 722  $\text{cm}^{-1}$ ; IČ ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\max}$  3449; 3018; 2928; 2856; 2337; 1724; 1660; 1581; 1467; 1366  $\text{cm}^{-1}$ .

**(20e) 5-(11-methyldodecyloxykarbonyl)pentylammonium 5-(11-methyldodecyloxykarbonyl)pentylkarbamát;**  $C_{39}H_{78}N_2O_6$ ;  $M=671,07 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 62 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=52-55 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ (nujol):  $\nu_{\max}$  3450; 3247; 1723; 1652; 1577; 1536; 1294; 1187; 720  $\text{cm}^{-1}$ ; IČ ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\max}$  3458; 3017; 2927; 2856; 2337; 1724; 1658; 1577; 1467; 1366  $\text{cm}^{-1}$ .

**(21a) 5-(8-ethyldecyloxykarbonyl)pentylammonium 5-(8-ethyldecyloxykarbonyl)pentylkarbamát;**  $C_{37}H_{74}N_2O_6$ ;  $M=643,01 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 38 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=63-68 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ (nujol):  $\nu_{\max}$  3334; 3270; 1730; 1634; 1561; 1533; 1305; 1139; 723  $\text{cm}^{-1}$ ; IČ ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\max}$  3448; 3420; 3006; 2961; 2931; 2858; 2337; 1724; 1659; 1518; 1462; 1386; 1259.

**(21b) 5-(10-ethyldodecyloxykarbonyl)pentylammonium 5-(10-ethyldodecyloxykarbonyl)pentylkarbamát;**  $C_{41}H_{82}N_2O_6$ ;  $M=699,12 \text{ g mol}^{-1}$ ; výtěžek: 43 %; bílá krystalická látka; v literatuře nepopsaná;  $t_f=58-63 \text{ }^\circ\text{C}$ ; IČ (nujol):  $\nu_{\max}$  3331; 3270; 1730; 1634; 1563; 1534; 1305; 1168; 722  $\text{cm}^{-1}$ ; IČ ( $\text{CHCl}_3$ ):  $\nu_{\max}$  3448; 3419; 3005; 2960; 2930; 2857; 2337; 1724; 1659; 1519; 1462; 1379; 1259.

#### 6.4. Hodnocení transdermálně akcelerační účinnosti

Transdermálně akcelerační účinnost byla testována *in vitro* s použitím modifikované Franzovy difúzní cely (obr. 35). Jako modelová membrána byla použita prasečí kůže plně tloušťky a modelovým léčivem byl theofylin.

##### 6.4.1. Příprava kůže

Prasečí uši byly získány z místních jatek (Masokombinát Skaličan). Pomocí skalpelu byla z dorsální strany oddělena kůže plně tloušťky, ta byla zbavena chlupů a na 5 minut ponořena do 0,05% roztoku azidu sodného ve vodě. Takto připravená kůže byla skladována při  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ , maximálně 2 měsíce. V době potřeby byla pomalu rozmrazena.

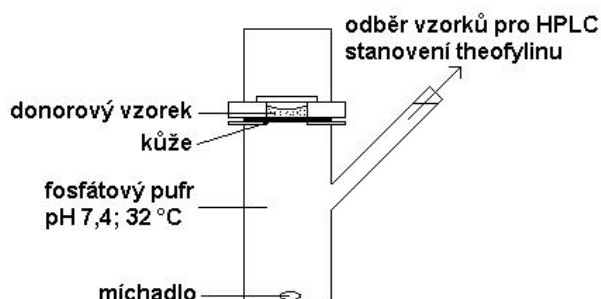
##### 6.4.2. Příprava donorových vzorků

Donorové vzorky byly připraveny jako suspenze obsahující 5 % theofylinu a 1 % testovaného akceleračního činidla v příslušném donorovém médiu. Kontrolní (slepé) vzorky byly připraveny bez přidání akceleračního činidla. Připravená suspenze byla míchána 5 minut při  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  a poté byla ponechána stát 24 hod při  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## 6. Experimentální část

### 6.4.3. Permeační experiment

Prasečí kůže byla nastříhána na čtverečky cca 2x2 cm, které byly upevněny do Franzovy difúzní cely (obr. 35) dorzální stranou nahoru, plocha vystavená působení vzorku činila 1 cm<sup>2</sup>. Akceptorová část cely byla naplněna fosfátovým pufr



Obr. 35. Franzova difúzní cely

sodného a byla nechána temperovat na 32 °C. Na kůži bylo poté nanášeno 200 µl donorového vzorku a překryto krycím sklíčkem. Během 48 následujících hodin byly v sedmi předem definovaných časových intervalech odebírány vzorky akceptorové fáze (0,6 ml) pro stanovení prošlého theofylinu. Odebrané množství bylo vždy nahrazeno stejným objemem pufru.

### 6.4.4. Stanovení theofylinu v donorovém médiu

Theofylin byl v odebraných vzorcích stanoven pomocí HPLC s následujícími podmínkami:

pumpa: LCP 4100 (Ecom, Praha),

UV detektor: LCD 2083 (Ecom, Praha),

software: CSW 1.7,

kolona: LiChrospher 100, stacionární fáze: RP-18 (5 µm) (Merck, Darmstadt),

mobilní fáze: 0,1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/methanol 6:4 (v/v),

průtok: 1,2 ml/min,

vlnová délka: 272 nm,

retenční čas theofylinu: 3,3±0,1 min.

### 6.4.5. Výpočet fluxů a akceleračních poměrů

Množství theofylinu prošlého přes kůži (µgcm<sup>-2</sup>) bylo vyneseno do grafu proti času a z lineární části této závislosti byl vypočítán flux v rovnovážném stavu J (µgcm<sup>-2</sup>h<sup>-1</sup>). Výsledným číslem popisujícím aktivitu akceleračního poměru (AP±SO). AP je poměr J theofylinu v přítomnosti akceleračního poměru ku J u slepého vzorku (bez akceleračního poměru). Hladina významnosti výsledků byla ověřována porovnáním J s použitím Studentova t-testu.

## 6.5. Popis rozkladu T12 v mírně kyselém prostředí

### 6.5.1. Časový vývoj IČ spekter směsi T12 a PK nebo T12 a extrahovaných lipidů SC

**T12** (10 mg) a PK (5 mg) nebo **T12** (2 mg) a lipidy SC (10 mg) byly společně rozetřeny v nujolu a první spektrum této směsi bylo změřeno ihned po smíchání (časová prodleva od smíchání činila maximálně 3 min). Následující spektra byla snímána po 10, 20, 30 ...240 min a poslední po 24 hod. Spektra byla měřena v NaCl kyvetě, při laboratorní teplotě a pod dusíkovou atmosférou, aby byl vyloučen vliv atmosférického CO<sub>2</sub>.

### 6.5.2. Extrakce lipidů SC

Lipidy byly extrahovány pomocí modifikované metody podle Bligha a Dyera.<sup>71</sup> Kousky suchého SC (viz kapitola 6.7.1.) byly 2 hod míchány se směsí chloroform/methanol/voda 2:1:1. Vodná vrstva byla oddělena, organická fáze byla promyta nasyceným roztokem NaCl a vodou, vysušena síranem sodným a vakuově zahuštěna. Takto získané lipidy SC byly uchovávány v exsikátoru nad P<sub>4</sub>O<sub>10</sub>. Pro ověření obsahu mastných kyselin bylo změřeno jejich IČ spektrum v nujolu.

### 6.5.3. TGA

TGA vzorku (cca 5 mg) byla provedena v dusíkové atmosféře při dvou konstantních teplotách: 30 a 50 °C. Přesná hmotnost vzorku byla snímána v 0,5 min intervalech po dobu 90 min (při 30 °C) nebo 200 min (při 50 °C). Měření byla provedena pro a) samotný **T12** a b) jeho směs s PK (1:1 molárně). V případě směsi byl **T12** s PK rozetřen dohromady ihned před začátkem měření. Naměřená hmotnost vzorku byla následně převedena na procenta původního molárního množství **T12** a vynesena do grafu proti času.

## 6.6. Stanovení rozpustnosti theofylinu

Vzorky pro stanovení rozpustnosti byly připraveny stejným způsobem jako vzorky pro permeační experiment. Po 24 hod při 37 °C byly ponechány ještě 3 dny stát při laboratorní teplotě a poté byly centrifugovány (7000 otáček/min, 10 min). Supernatant byl odebrán, naředěn 200x vodou (v případě IPM vzorků methanolem) a theofylin byl stanoven pomocí HPLC (viz kap. 6.4.4.). Rozpustnost byla vyjádřena v mg/100 ml vehikula.

## 6.7. Rozdělování theofylinu do SC

### 6.7.1. Izolace SC

Z prasečích uší byla pomocí skalpelu z dorsální strany oddělena kůže a ta byla zbavena chlupů. Povrch kůže byl několikrát otřen vatou namočenou v acetonu pro odstranění povrchových lipidů. Poté byla kůže nastříhána na kousky cca 1x1 cm, které byly na 2 min ponořeny do vody 60 °C teplé. Po vyjmutí z nich bylo opatrně pomocí pinzety odděleno SC, položeno dermální stranou na filtrační papír nasáklý 0,5% roztokem trypsinu ve fosfátovém pufru (pH 7,4) a necháno při laboratorní teplotě 12 hod.<sup>72</sup> Poté byly plátky SC opláchnuty vodou, vysušeny ve vakuu a uchovávány v exsikátoru nad P<sub>4</sub>O<sub>10</sub>.

### 6.7.2. Hydratace SC

V době potřeby bylo naváženo suché SC (cca 10 mg na 1 vzorek), v uzavřené lékovce bylo přelito 0,002% roztokem azidu sodného (cca 1 ml) a ponecháno 3 dny v lednici (+5 °C). Po vyjmutí z roztoku byly plátky SC šetrně vymačkány ve filtračním papíře, aby byla odstraněna přebytečná voda z jejich povrchu.<sup>73</sup> Takto získané hydratované SC bylo následně ihned použito pro stanovení rozdělovacího koeficientu.

### 6.7.3. Stanovení rozdělovacího koeficientu

Vzorky hydratovaného SC byly rozděleny do dvou skupin. K jedné polovině byl přidán 1 ml roztoku obsahujícího theofylin (0,1 mg/100 ml) a **T12** (1 mg/100 ml) v daném vehikulu (V, PGV nebo IPM). Druhou polovinu tvořily slepé vzorky obsahující 1 ml roztoku theofylinu (0,1 mg/100 ml) ve vehikulu bez přídavku **T12**. Všechny vzorky byly v uzavřených lékovkách 24 hod pomalu míchány při laboratorní teplotě. Poté bylo SC odfiltrováno přes bakteriální filtr (velikost pórů: 0,22 μm) a ve filtrátu byl stanoven obsah theofylinu pomocí HPLC (podmínky stejné jako v kapitole 6.4.4., kromě mobilní fáze, ta byla v tomto případě: 0,1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/methanol 7:3 (v/v), retenční čas theofylinu: 4,4±0,1 min).

$$P_{SC/rozp.} = \frac{C_0 - C_{24}}{C_{24}}$$

Rovnice 2. Výpočet rozdělovacího koeficientu mezi vehikulem a SC.

Výsledek byl vyjádřen jako P<sub>SC/rozp.</sub> (rozdělovací koeficient mezi SC a vehikulem). Jeho výpočet je uveden v rovnici 2.

C<sub>0</sub> bylo počáteční množství theofylinu ve vehikulu (0,001 mg/1 ml) a C<sub>24</sub> bylo výsledné množství po 24hodinové inkubaci.

**7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ**

AP	akcelerační poměr
$C_0$	výchozí koncentrace léčiva ve vehikulu
D	difúzní koeficient
DDEAK	dodecylester kyseliny 6-aminohexanové
DMSO	dimethylsulfoxid
DSC	diferenciální skenovací kalorimetrie
h	tloušťka bariéry
IPM	isopropyl-myristát
J	flux
MA	mastné (vyšší alifatické) alkoholy
MK	mastné (vyšší alifatické) kyseliny
p	statistická hladina významnosti
PK	palmitová kyselina
PG	propylenglykol
PGV	směs propylenglykol/voda 3:2
$P_{SC/rozp.}$	rozdělovací koeficient theofylinu mezi SC a vehikulem
$R^2$	hodnota spolehlivosti
SC	stratum corneum
SO	směrodatná odchylka
T12	Transkarbam 12
TBAI	tetrabutylammonium-jodid
TDD	transdermální podání léčiv (transdermal drug delivery)
TEA	triethylamin
TGA	thermogravimetrická analýza
THF	tetrahydrofuran
$t_t$	teplota tání
$t_v$	teplota varu
V	voda

## 8. LITERATURA

- 1 Kanikkannan, N. Structure – Activity Relationship of Chemical Penetration Enhancers in Transdermal Drug Delivery. *Curr. Med. Chem.* **2000**, *7*, 593-608.
- 2 Prausnitz, M.R.; Mitragotri, S.; Langer, R. Current Status and Future Potential of Transdermal Drug Delivery. *Nature Rev. Drug Discovery* **2004**, *2*, 115-124.
- 3 Bhattacharya, A.; Ghosal, S.K. Permeation Kinetics of Ketotifen Fumarate Alone and in Combination with Hydrophobic Permeation Enhancers through Human Cadaver Epidermis. *Bolletino Chimico Farmaceutico* **2000**, *139*, 177-181.
- 4 Vávrová, K.; Zbytovská, J.; Hrabálek, A. Amphiphilic Transdermal Permeation Enhancers: Structure-Activity Relationships. *Curr. Med. Chem.* **2005**, *12*, 2273-2291.
- 5 Menon, G.K. New Insights into Skin Structure: Scratching the Surface. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2002**, *54*, Suppl. I, S3-S17.
- 6 Suhonen, M.T.; Bouwstra, J.A.; Urtti, A. Chemical Enhancement of Percutaneous Absorption in Relation to Stratum Corneum Structural Alterations. *J. Control. Release* **1999**, *59*, 149-161.
- 7 Elias, P.M. Stratum Corneum Defensive Functions: An Integrated View. *J. Invest Dermatol.* **2005**, *125*, 183-200.
- 8 Bouwstra, J.A.; Gooris, G.S.; Salomons-de Vries, M.A.; van der Spek, J.A.; Bras, W. Structure of Human Stratum Corneum as a Function of Temperature and Hydration: A Wide-Angle X-Ray Diffraction Study. *Int. J. Pharm.* **1992**, *84*, 205-216.
- 9 Madison, K.C.; Swartzendruber, D.T.; Wertz, P.W.; Downing, D.T. Presence of Intact Intercellular Lipid Lamellae in the Upper Layers of the Stratum Corneum. *J. Invest. Dermatol.* **1987**, *88*, 714-718.
- 10 Barry, B.W. Novel Mechanisms and Devices to Enable Successful Transdermal Drug Delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2001**, *14*, 101-114.
- 11 Benson, H.A.E. Transdermal Drug Delivery: Penetration Enhancement Techniques. *Curr. Drug Deliv.* **2005**, *2*, 23-33.
- 12 Scheuplein, R.J.; Blank, I.H. Permeability of the Skin. *Physiol. Rev.* **1971**, *51*, 702-747.
- 13 Hadgraft, J. Skin Deep. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *58*, 291-299.
- 14 Hrabálek, A.; Doležal, P.; Šklubalová, Z.; Farsa, O.; Krebs, A. Akceleranty transdermální penetrace. *Chemické listy* **1999**, *93*, 107-119.
- 15 Williams, A.C.; Barry, B.W. Penetration Enhancers. *Adv. Drug Deliv. Reviews* **2004**, *56*, 603-618.
- 16 Chattaraj, S.C.; Walker, R.B. Penetration Enhancer Classification. In: *Percutaneous Penetration Enhancers*; Smith, E.W.; Maibach, H.I. Ed.; Boca Raton (Florida): CRC Press, **1995**; pp. 5-20.
- 17 Klingman, A.M. Topical Pharmacology and Toxicology of Dimethylsulfoxide. *J. Am. Med. Assoc.* **1965**, *193*, 796.
- 18 Stoughton, R.B. Enhanced Percutaneous Penetration with 1-dodecylazacycloheptan-2-one. *Arch. Dermatol.* **1982**, *118*, 474-477.
- 19 Wiechers, J.W.; de Zeeuw, R.A. Transdermal Drug Delivery: Efficacy and Potential Applications of the Penetration Enhancer Azone. *Drug Des. Deliv.* **1990**, *6*, 87-100.
- 20 Aungst, B.J. Fatty Acids as Skin Permeation Enhancers. In: *Percutaneous Penetration Enhancers*; Smith, E.W.; Maibach, H.I. Ed.; Boca Raton (Florida): CRC Press, **1995**; pp. 277-287.



- 21 Megrab, N.A.; Williams, A.C.; Barry, B.W. Oestradiol Permeation Across Human Skin, Silastic and Snake Skin Membranes: the Effects of Ethanol / Water co-Solvent Systems. *Int. J. Pharm.* **1995**, *114*, 237-245.
- 22 Berner, B.; Liu, P. Alcohols. In: *Percutaneous Penetration Enhancers*; Smith, E.W.; Maibach, H.I. Ed.; Boca Raton (Florida): CRC Press, **1995**; pp. 45-46.
- 23 Gloor, M.; Fluhr, J.; Wasik, B.; Gehring, W. Clinical Effect of Salicylic Acid and High Dose Urea Applied in Standardized NRF Formulations. *Pharmazie* **2001**, *56*, 810-814.
- 24 Wong, O.; Tsuzuki, N.; Nghiem, B.; Kuehnhoff, J.; Itoh, T.; Masaki, K.; Huntingdon, J.; Konishi, R.; Rytting, J.H.; Higuchi, T. Unsaturated Cyclic Ureas as New Non-toxic Biodegradable Transdermal Penetration Enhancers: II. Evaluation Study. *Int. J. Pharm.* **1989**, *52*, 191-192.
- 25 Kato, A.; Ishibashi, Y.; Miyake, Y. Effect of Egg-yolk Lecithin on Transdermal Delivery of Bunazosin Hydrochloride. *J. Pharm. Pharmacol.* **1987**, *39*, 399-400.
- 26 Hadgraft, J.; Peck, J.; Williams, D.G.; Pugh, W.J.; Allan, G. Mechanisms of Action of Skin Penetration Enhancers/Retarders: Azone and Analogues. *Int. J. Pharm.* **1996**, *141*, 17-25.
- 27 Hrabálek, A.; Doležal, P.; Farsa, O.; Krebs, A.; Kroutil, A.; Roman, M.; Šklubalová, Z.  $\omega$ -Amino Acid Derivatives, Processes of Their Preparation and Their Use. U.S. Pat. 6,187,938 (**2001**).
- 28 Doležal, P.; Hrabálek, A.; Semecký, V.  $\epsilon$ -Aminocaproic Acid Esters as Transdermal Penetration Enhancing Agents. *Pharm. Res.* **1993**, *10*, 1015-1019.
- 29 Hrabálek, A.; Doležal, P.; Vávrová, K.; Zbytovská, J.; Holas, T.; Klimentová, J.; Novotný, J. Synthesis and Enhancing Effect of Transkarbam 12 on the Transdermal Delivery of Theophylline, Clotrimazole, Flobufen, and Griseofulvin. *Pharm. Res.* **2006**, *23*, 912-919.
- 30 Hrabálek, A.; Doležal, P.; Palát, K. Physico-Chemical Parameters and Skin Permeation Enhancing Effect of  $\omega$ -Amino Acid Derivatives. In: *Perspectives in Percutaneous Penetration*, Vol 7A; Brain, K.R.; Walters, K.A. Ed.; STS Publishing (Cardiff), **2000**, p. 70.
- 31 Zbytovská, J.; Raudenkolb, S.; Wartewig, S.; Hübner, W.; Rettig, W.; Pissis, P.; Hrabálek, A.; Doležal, P.; Neubert, R. Phase Behaviour of Transkarbam 12. *Chem. Phys. Lipids.* **2004**, *129*, 97-109.
- 32 Holas, T.; Zbytovská, J.; Vávrová, K.; Berka, P.; Mádlová, M.; Klimentová, J.; Hrabálek, A. Thermotropic Phase Behavior of Long-Chain Alkylammonium-Alkylcarbamates. *Termochim. Acta* **2006**, *441*, 116-123.
- 33 Montagna, W. Histology and Cytochemistry of Human Skin IX. The Distribution of Non-Specific Esterases. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **1955**, *1*, 13-16.
- 34 Pei-Lin Wu; Chia-Hao Su; Yi-Jeng Gu A Facile Synthesis of Azidoformate via Chloroformate. *J. Chin. Chem. Soc.-Taip.* **2000**, *47*, 271.
- 35 Mizushima, H.; Takahashi, M.; Yamamuro, A.; Matsuo, T.; Yahagi, K. U.S. Patent, 511, 100, 1997.
- 36 Flowers, H.M. Synthesis of Some Long-Chain Acylamidoalkyl Glucosides. *Carbohydr. Res.* **1976**, *46*, 133-137.
- 37 Barry, J.; Bram, G.; Decodts, G.; Loupy, A.; Pigeon, P.; Sansoulet, J. Easy and Efficient Anion Alkylations in Solid-Liquid PTC Conditions. *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 5407-5408.
- 38 Heyne, H.W.; Jones, H. A Synthesis of  $\omega$ -Bromocaproic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**, *73*, 1361-1362.
- 39 Zacharkin, L.I.; Čurilova, I.M.; Anikina, E.V. Sintéz pervičnych normalnykh alifatičeskikh spirtov četnoho rjada C24-C30 iz ciklododekanona. *Russ. J. Org. Chem.* **1988**, *24*, 77-80.

## 8. Literatura

- 
- 40 Yuasa, Y.; Tsuruta, H. Convenient Syntheses of iso-Methyl-Branched Long-Chain Aliphatic Aldehydes, Known to Contribute Significantly to Meat Flavour. *Flavour Frag. J.* **2004**, *19*, 199-204.
- 41 Pattison, F.L.M.; Stothers, J.B.; Woolford, R.G. Anodic Synthesis Involving  $\omega$ -Monocarboxylic Acids. *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 2255-2259.
- 42 Hrabálek, A.; Doležal, P.; Roman, M.; Macháček, M.; Šklubalová, Z. Esters of  $\omega$ -Amino Acids as Flexible Penetration Enhancers. *Pharmazie* **1994**, *49*, 325.
- 43 Chu, F.; Dueno, E.E.; Jung, K.W. Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> Promoted O-Alkylation of Alcohols for the Preparation of Mixed Alkyl Carbonates. *Tetrahedron Lett.* **1999**, *40*, 1847-1850.
- 44 Cella, J.A.; Bacon, S.W. Preparation of Dialkyl Carbonates via the Phase-Transfer-Catalyzed Alkylation of Alkali Metal Carbonate and Bicarbonate Salts. *J. Org. Chem.* **1984**, *49*, 1122-1125.
- 45 Møllgard, B. In: *Pharmaceutical Skin Penetration Enhancement*; Walters, K.A.; Hadgraft, J. Ed.; Marcel Dekker (New York), **1993**; pp. 229-242.
- 46 Andega, S.; Kanikkannan, N.; Singh, M. Comparison of the Effect of Fatty Alcohols on the Permeation of Melatonin between Porcine and Human Skin. *J. Control. Release* **2001**, *77*, 17-25.
- 47 Sloan, K.B.; Beall, H.D.; Taylor, H.E.; Getz, J.J.; Villaneuva, R.; Nipper, R.; Smith, K. Transdermal Delivery of Theophylline from Alcohol Vehicles. *Int. J. Pharm.* **1998**, *171*, 185-193.
- 48 Kadir, R.; Stempler, D.; Liron, Z.; Cohen, S. Delivery of Theophylline into Excised Human Skin from Alkanoic Acid Solutions: a "Push-Pull" Mechanism. *J. Pharm. Sci.* **1987**, *76*, 774-779.
- 49 Devaux, P.F.; Seigneuret, M. Specificity of Lipid-Protein Interactions as Determined by Spectroscopic Techniques. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *822*, 63-125.
- 50 Chantasart, D.; Li, S.K.; He, N.; Warner, K.S.; Prakongpan, S.; Higuchi, W.I. Mechanistic Studies of Branched-Chain Alkanols as Skin Permeation Enhancers. *J. Pharm. Sci.* **2004**, *93*, 762-779.
- 51 Gunstone, F.D. High Resolution <sup>13</sup>C NMR Study of Synthetic Branched-Chain Acids and of Wool Wax Acids and Isostearic Acid. *Chem. Phys. Lipids* **1993**, *65*, 155-163.
- 52 Marzouki, Z.M.H.; Taha, A.M.; Gomaa, K.S. Fatty Acid Profiles of Sebaceous Triglycerides by Capillary Gas Chromatography with Mass-Selective Detection. *J. Chromatogr. B* **1988**, *425*, 11-24.
- 53 Schneider, I.M.; Dobner, B.; Neubert, R.; Wohlrab, W. Evaluation of Drug Penetration into Human Skin ex vivo Using Branched Fatty Acids and Propylene Glycol. *Int. J. Pharm.* **1996**, *145*, 187-196.
- 54 Aungst, B.J. Structure/Effect Studies of Fatty Acid Isomers as Skin Penetration Enhancers and Skin Irritants. *Pharm. Res.* **1989**, *6*, 244-247.
- 55 Hrabálek, A.; Vávrová, K.; Doležal, P.; Macháček, M. Esters of 6-Aminohexanoic Acid as Skin Permeation Enhancers: The Effect of Branching in the Alkanol Moiety. *J. Pharm. Sci.* **2005**, *94*, 1494-1499.
- 56 Kanikkannan, N.; Singh, M. Skin Permeation Enhancement Effect and Skin Irritation of Saturated Fatty Alcohols. *Int. J. Pharm.* **2002**, *248*, 219-228.
- 57 Holas, T.; Vávrová, K.; Klimentová, J.; Hrabálek, A. Synthesis and Transdermal Permeation-Enhancing Activity of Ketone, Amide, and Alkane Analogs of Transkarbam 12. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 2896-2903.

- 
- 58 Holas, T.; Vávrová, K.; Šíma, M.; Klimentová, J.; Hrabálek, A. Synthesis and Transdermal Permeation-Enhancing Activity of Carbonate and Carbamate Analogs of Transkarbam 12. *Bioorg. Med. Chem.*, submitted.
- 59 Holas, T. Disertační práce. FaF UK, Hradec Králové **2006**.
- 60 Hui, X.; Wester, R.C.; Magee, P.S.; Maibach, H.I. Partitioning of Chemicals from Water into Powdered Human Stratum Corneum (Callus) – A Model Study. In: *Percutaneous Absorption*; Bronaugh, R.L.; Maibach, H.I. Ed.; Marcel Dekker (New York), **1998**; pp. 255-269.
- 61 Yukito Murakami; Akio Nakano; Hidetsugu Ikeda Preparation of Stable Single-Compartment Vesicles with Cationic and Zwitterionic Amphiphiles Involving Amino Acid Residues. *J. Org. Chem.* 1982, 47, 2137-2144.
- 62 Chuit, P.; Hausser, J. Sur les acides-alcools polyméthylène-carboniques de 8 à 21 atomes de carbone. *Helv. Chim. Acta* **1929**, 12, 463-492.
- 63 Cason, J. Branched-Chain Fatty Acids. I. Synthesis of 17-Methyloctadecanoic Acid. *J. Am. Chem. Soc.* **1942**, 64, 1106-1110.
- 64 Hassarajani, S.A.; Mithran, S.; Mamdapur, V.R. Synthesis of 8-Methylnonanol, a Common Intermediate for Dihydrocapsicin and Fresh Water Mussel Component. *Indian J. Chem. Sect. B: Org. Chem. Incl. Med. Chem.* **1995**, 34B, 429-431.
- 65 Weitzel, G.; Wojahn, J. Biochemistry of Branched Carboxylic Acids. V. Preparation of all the (±)-Monomethylpalmitic Acids. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1951**, 287, 65-89.
- 66 Milburn, A.H.; Truter, E.V. Components of Wool Wax. II. Synthesis of the Acids and Alcohols of the iso- and the (+)-anteiso-Series. *J. Chem. Soc.* **1954**, 3344-3351.
- 67 Cason, J.; Stanley, W.L. Branched-Chain Fatty Acids. IX. Synthesis of Acids with Symmetrical End-Groups. *J. Org. Chem.* **1949**, 14, 137-146.
- 68 Levene, P.A.; Allen, C.H. The Oxidation of Branched Chain Fatty Acids. *J. Biol. Chem.* **1916**, 27, 433-462.
- 69 Hougen, F. W.; Ilse, D.; Sutton, D. A.; de Villiers, J. P. Wool wax. III. Synthesis of Some iso Acids. *J. Chem. Soc. Abstracts* **1953**, 98.
- 70 Weitkamp, A.W. The Acidic Constituents of Degras. A New Method of Structure Elucidation. *J. Am. Chem. Soc.* 1945, 67, 447-454.
- 71 Bligh, E.G.; Dyer, W.J.: A Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1959**, 37, 911-917.
- 72 Klingman, A.E.; Christophers, E.: Preparation of Isolated Sheets of Human Stratum Corneum. *Arch. Dermatol.* **1963**, 88, 702-705.
- 73 Narishetty, S.T.K.; Panchagnula, R.: Transdermal Delivery of Zidovudine: Effect of Terpenes and Their Mechanism of Action. *J. Control. Release* **2004**, 95, 367-379.