

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra organické a bioorganické chemie



Optimalizace syntézy 32-hydroxydotriakontanové kyseliny

Diplomová práce

Sommerová Veronika

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

Hradec Králové 2018

Prohlášení

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

V Hradci Králové

15. 5. 2018

Sommerová Veronika

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli PharmDr. Lukáši Opálkovi, Ph.D. za čas, péči, neocenitelné rady a nikdy nekončící trpělivost při mých nikdy nekončících dotazech. V neposlední řadě také děkuji své rodině, příteli a jmenovitě Anežce Lalinské a Simoně Suché za mimořádnou psychickou podporu ve chvílích, kdy jsem měla pocit, že tuto práci nikdy nedokončím.

Abstrakt

Acylceramidy patří do podskupiny ceramidů s ultradlouhým řetězcem. Jsou klíčovými komponenty extracelulární lipidové matrix *stratum corneum*, ve které hrají důležitou roli pro správnou funkci kožní bariéry (brání nadměrné ztrátě vody a průniku exogenních substancí a patogenů do organismu).

Kyselina 32-hydroxydotriakontanová je jedna z kyselin, které tvoří skelet všech acylceramidů. V molekule acylceramidů je karboxylová skupina této kyseliny navázána na primární amino skupinu sfingoidní báze a ω -hydroxylová skupina je esterifikována kyselinou linolovou. Kyselina 32-hydroxydotriakontanová se může ve *stratum corneum* vyskytovat jako součást volného acylceramidu nebo může být kovalentně navázána na povrch korneocytů a tvořit „první lamelu“, která poté slouží jako základ pro správnou orientaci ostatních lipidů v matrix.

Současná literatura popisuje syntézu 32-hydroxydotriakontanové kyseliny, ale pouze s relativně nízkými celkovými výtěžky. Nejproblematictější částí syntézy se jeví být spojování dvou kratších fragmentů vedoucích ke vzniku ultradlouhého řetězce. Hlavním cílem této práce byla optimalizace reakčních podmínek a zvýšení výtěžnosti přípravy ultradlouhé kyseliny se zaměřením na tento nejkomplicovanější krok. První možností, jak zvýšit výtěžek bylo modifikovat reakční podmínky v dříve popsané Wittigově reakci. Wittigova reakce je v literatuře popsána s výtěžkem pouze okolo 35 %. Očekávali jsme, že změna reakčního času nebo teploty během formování fosfonium ylidu povede ke zlepšení. Bohužel se nepodařilo signifikantně zvýšit výtěžky.

Jelikož Wittigova reakce patří mezi olefinační reakce, dalším cílem bylo vyzkoušet jiné typy olefinačních reakcí pro případné zvýšení výtěžnosti tohoto kroku. V této práci jsme se zaměřili hlavně na Julia a Julia-Kocienski reakce a jejich modifikace. Pro tento účel byla připravena série dosud nepopsaných heterocyklických derivátů hexadekanové kyseliny jakožto výchozích látek pro tento typ reakce. Nejvyšších

výtěžků se podařilo dosáhnout pomocí Julia-Kocienski olefinace s (1-cyklohexyl-1*H*-tetrazol-5-yl)sulfonylovým derivátem hexadekanové kyseliny jako výchozí látkou. V tomto případě jsme byli schopni zvýšit výtěžky reakce nad 70 %, což je přibližně dvojnásobek oproti předchozímu postupu a znamená to značné zlepšení popsané reakční dráhy.

Abstract

Acylceramides belong to the subgroup of ultralong chain ceramides. They are essential components of the extracellular lipid matrix of *stratum corneum*, where they play a crucial role in proper function of skin barrier (they help preventing the excessive water loss and penetration of exogenous substances and pathogens to the organism).

The 32-hydroxydotriacontanoic acid is one of the fatty acids forming the backbone of all the acylceramides. In the molecule of acylceramide, the carboxyl group of this acid is bound to a primary amino group of the sphingoid base and the ω -hydroxy group is esterified with linoleic acid. In the *stratum corneum*, 32-hydroxydotriacontanoic acid may remain as a part of free acylceramides or it can be covalently linked to the surface of corneocytes and form the "first lamella", which then serves as a basis for the orientation of other lipids in the matrix.

The recent literature describes the synthesis of 32-hydroxydotriacontanoic acid but only with relatively small overall yields. The most problematic part of the synthesis seems to be the connection of two shorter fragments leading to the ultralong chain. The main aim of this research project was to optimise the reaction conditions to increase the yield of formation of the ultralong acid, focusing on the most complicated step. First possibility to increase the yield was by modifying the reaction conditions in the previously described Wittig reaction. In the literature, the Wittig reaction was described with a yield around only 38%. We expected that a change in the reaction time or temperature during the ylide formation might lead to an improvement. Unfortunately, we were not able to increase the yields significantly.

Since Wittig reaction belongs to a group of olefination reactions, the next aim was to examine additional olefination reactions to possibly increase the yield of this step. In this thesis, we mainly focused on Julia and Julia-Kocienski reactions and

their modifications. For this purpose, a series of hitherto unpublished heterocyclic derivatives of hexadecanoic acid was prepared as starting materials for this type of reaction. The highest yields were obtained by the modified Julia-Kocienski reaction with (1-cyclohexyl-1*H*-tetrazole-5-yl)sulfonyl derivative of hexadecanoic acid as a starting material. In this case, we were able to increase the yields even over 70% which is approximately double compared to a previous procedure meaning a great improvement in the described reaction pathway.

Obsah

PROHLÁŠENÍ	2
PODĚKOVÁNÍ	3
ABSTRAKT	4
ABSTRACT	6
1. ÚVOD A CÍL PRÁCE	10
2. TEORETICKÁ ČÁST	11
2.1. STAVBA KŮŽE	11
2.2. STRATUM CORNEUM	13
2.3. CERAMIDY.....	14
2.4. ACYLCERAMIDY	16
2.5. BIOSYNTÉZA ACYLCER.....	17
2.6. CHEMICKÁ SYNTÉZA ACYLCER	20
2.7. SYNTÉZA ULTRADLOUHÉHO ŘETĚZCE ZA POMOCI OLEFINAČNÍCH REAKCÍ	27
2.7.1. <i>Wittigova reakce</i>	28
2.7.2. <i>Petersonova olefinace</i>	29
2.7.3. <i>Julia olefinace</i>	30
2.7.4. <i>Modifikace Julia olefinace</i>	31
2.7.5. <i>McMurryho reakce</i>	32
3. VÝSLEDKY A DISKUZE	34
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	41
4.1. CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	41
4.2. SYNTETICKÁ ČÁST.....	42

4.2.1.	<i>Syntéza 16-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)hexadekanalu</i>	<i>42</i>
4.2.2.	<i>Syntéza sulfonových derivátů hexadekanové kyseliny</i>	<i>47</i>
4.2.3.	<i>Olefinární reakce.....</i>	<i>56</i>
5.	ZÁVĚR	60
6.	SEZNAM ZKRATEK	62
7.	POUŽITÁ LITERATURA	63

1. Úvod a cíl práce

Acylceramidy patří do skupiny ceramidů s ultradlouhým řetězcem a jsou podstatnou složkou kožní bariéry. Ve *stratum corneum* se acylceramidy vyskytují volně nebo jsou vázané na povrch korneocytů, čímž vytváří tzv. templát (první lamelu), podle které se uspořádávají další vrstvy lipidů. Acylceramidy nejsou komerčně dostupné, jejich syntéza byla pospána jen v několika málo případech mnoha krokovým postupem s poměrně nízkým celkovým výtěžkem. Kostru acylceramidů tvoří kyselina 32-hydroxydotriakontanová, na jejíž syntézu (případně optimalizaci dříve popsané syntézy) jsme se v této práci zaměřili.

Hlavním cílem této práce tedy bylo dosažení zlepšení reakčních podmínek klíčových kroků přípravy této kyseliny s hlavním zaměřením na nejkomplikovanější krok: přípravu ultradlouhého řetězce. Hlavní cíl můžeme rozdělit na tři dílčí cíle:

- **Optimalizace dříve použité Wittigovy reakce.** Cílem bylo dosáhnout vyšších výtěžků spojovací reakce modifikací podmínek, zejména změnou teploty a doby formování fosfonium ylidu a následné tvorby nenasycené sloučeniny.
- **Využití jiných typů olefinačních reakcí.** Zde bylo cílem prozkoumat literaturu a vyhledat možnosti obměny Wittigovy reakce za jinou (obdobnou) reakci, která by potenciálně vedla k vyšším výtěžkům při tvorbě ultradlouhého řetězce.
- **Dokončení syntézy 32-hydroxydotriakontanové kyseliny.** Cílem této části bylo využití získané nenasycené ultradlouhé kyseliny a s její pomocí pokračovat dále v syntéze hlavního segmentu acylceramidů, který by následně byl využit pro další chemické modifikace nebo při přípravě modelových lipidových membrán.

2. Teoretická část

Kůže (*cutis, derma*) tvoří přibližně 15 % z celkové tělesné váhy dospělého jedince a její povrch (1,5-2 m²) z ní dělá největší orgán lidského těla zajišťující mnoho důležitých funkcí. Kůže poskytuje mechanickou bariéru proti vlivům vnějšího prostředí, a to především vůči vlivům fyzikálním, chemickým a mikrobiologickým. Má také nezastupitelnou roli v termoregulaci, metabolismu a zabraňuje trans-epidermálním ztrátám vody.¹⁻³

2.1. Stavba kůže

Kůže se skládá ze tří hlavních vrstev. Nejsvrchnější vrstva je nazývána pokožka (*epidermis*), pod ní se nachází škára (*corium, dermis*) a nejspodnější vrstvu tvoří podkožní vazivo (*tela subcutanea, hypodermis*).^{1,3}

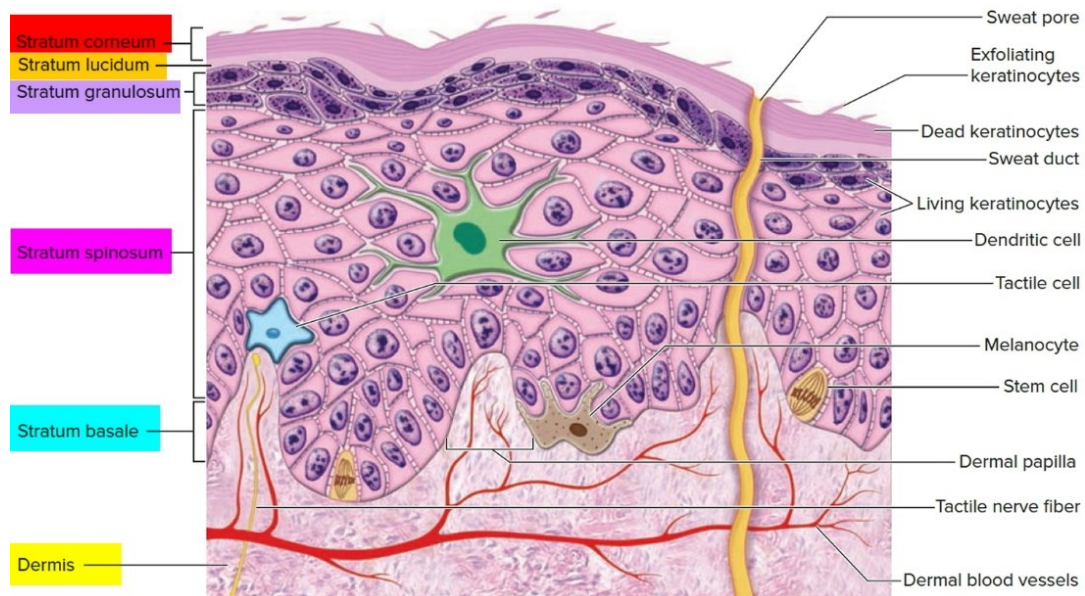
Nejdůležitější pro bariérovou funkci je *epidermis*. Tloušťka *epidermis* se pohybuje od 0,05 mm (kolem očí) až po 4 mm (na patách). Základními buňkami jsou keratinocyty, které tvoří 95 % všech buněk *epidermis*. Zbýlých 5 % potom tvoří buňky symbiotické, mezi něž řadíme melanocyty, Langerhansovy buňky a Merkelovy buňky.¹

Epidermis sestává z několika vrstev (Obr. 1 na následující straně). Nejspodnější vrstvu tvoří *stratum basale*, které je také nazýváno *stratum germinativum*. Skládá se z jedné vrstvy kubických až cylindrických zárodečných buněk spojených s bazální membránou. V této vrstvě, jako v jediné, dochází k buněčnému dělení a vzniku nových buněk. Na tuto vrstvu navazuje *stratum spinosum*, je tvořeno 2-5 vrstvami buněk, které se směrem k povrchu zplošťují a získávají tak polyedrický tvar. Další vrstvou směrem k povrchu je *stratum granulosum* obsahující 1-3 vrstvy buněk. Tady se začínají vytvářet zrna keratohyalinu, který je prekurzorem keratinu. Buňky této vrstvy se směrem k povrchu dále diferencují, podléhají buněčné smrti a po ztrátě jádra se mění ve *stratum lucidum*, což je tenká vrstva, která je výrazná hlavně

v tlustší epidermis (např. na dlaních, bříškách prstů či chodidlech). Nejsvrchnější vrstvou epidermis je *stratum corneum*. Buňky jsou v této vrstvě již úplně zploštělé, bezjaderné a nazývají se korneocyty, a ty se pak postupně odlučují a odpadávají (proces deskvamace).^{2, 4} *Stratum corneum* bude podrobněji probráno v následující kapitole.

Pod epidermis se nachází *dermis* (škára, *corium*), tvoří ji vazivo a zvlněná kolagenní a elastická vlákna, díky kterým je kůže pevná a pružná. Je přibližně 0,5-2,5 mm široká a skládá se ze dvou vrstev. Povrchová vrstva, *stratum papillare* je v kontaktu s bazální membránou. Obsahuje kromě sítí vláken větší množství vazivových buněk, je bohatě prokrvena a má mnoho sensorických nervových zakončení a představuje tak fyziologickou podporu pro vnější epidermis. Hlubší vrstva, *stratum reticulare* má více hustých svazků kolagenních fibril oproti elastickým fibrilám.^{1-3, 5}

Nejspodnější vrstvou je *hypodermis* (*tela subcutanea*), jejíž součástí je mimo jiné podkožní tuk, který se podílí na tepelné izolaci a zároveň slouží jako zásoba energie.¹

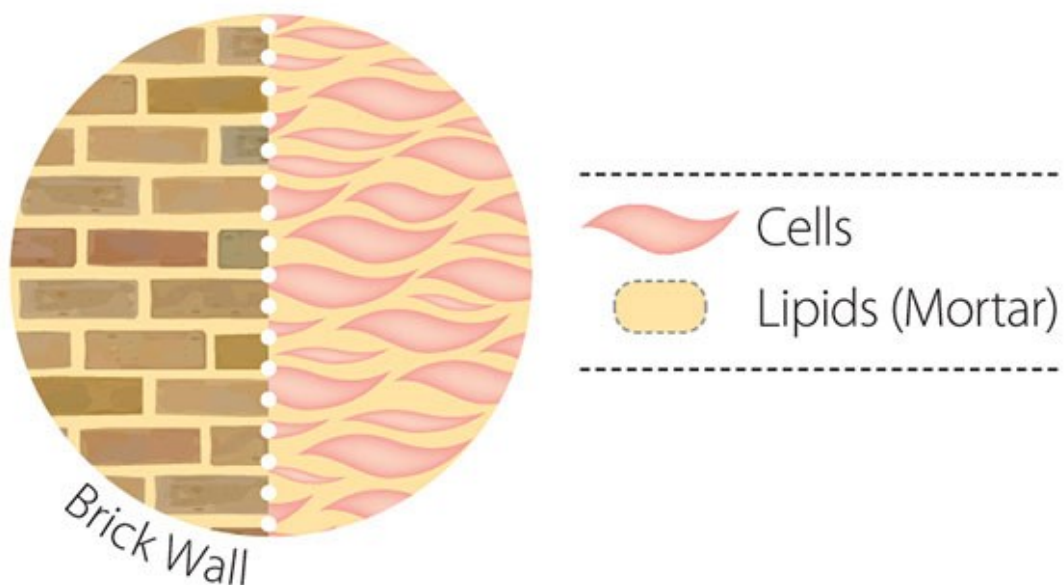


Obr. 1: Průřez lidskou kůží se zaměřením na jednotlivé vrstvy epidermis.

Zdroj: <https://healthjade.com/wp-content/uploads/2017/10/layers-of-epidermis.jpg>

2.2. Stratum corneum

Stratum corneum (SC) se nachází v nejsvrchnější vrstvě epidermis, skládá se z korneocytů (zrohovatělých buněk) a mezibuněčné lipidové hmoty (matrix). Lidské SC obsahuje průměrně 15-20 vrstev korneocytů (o tloušťce přibližně 10-20 μm), které jsou uloženy v lipidové matrix a takto spolu vytvářejí vysoce uspořádaný systém lamelárních membrán, které si zjednodušeně můžeme představit jako „bricks and mortar“ (v češtině „cihly a malta“), kde korneocyty představují cihly a extracelulární lipidy maltu (Obr. 2 na následující straně).^{2, 6-8} Soudržnost buněk je navíc zajištěna desmozomy.⁵ Tato extracelulární hydrofobní lipidová matrix tvoří hlavní permeabilní bariéru kůže a poskytuje efektivní ochranu proti nadměrné ztrátě vody z organismu do vnějšího prostředí a zároveň chrání spodní vrstvy proti průniku vnějších patogenů, stejně jako chemických látek, alergenů a mechanických částic. Skládá se z ekvimolární směsi ceramidů (přibližně 50 % hmotnosti), cholesterolu (přibližně 25 % hmotnosti) a volných mastných kyselin (přibližně 15 % hmotnosti) s malým množstvím dalších molekul (např. derivátů cholesterolu). Složení SC v tomto poměru je zásadní pro správnou funkci kožní bariéry. Při narušení tohoto složení dochází nejen ke snížení bariérové funkce. V případě menších změn ve složení SC (zejména změny poměrů koncentrací jednotlivých přítomných lipidů) můžeme pozorovat výskyt onemocnění jako atopická dermatitida, psoriáza či lamelární ichtyóza. Zásadní změny (např. úplná nepřítomnost jednoho z klíčových lipidů) však mohou vést i k úmrtí krátce po porodu.⁸⁻¹⁰



Obr. 2: Zjednodušené schéma *stratum corneum*.

Zdroj: <https://blog.healthpost.co.nz/wp-content/uploads/Brick-Wall-Diagram-for-Skin-blog-140211.jpg>

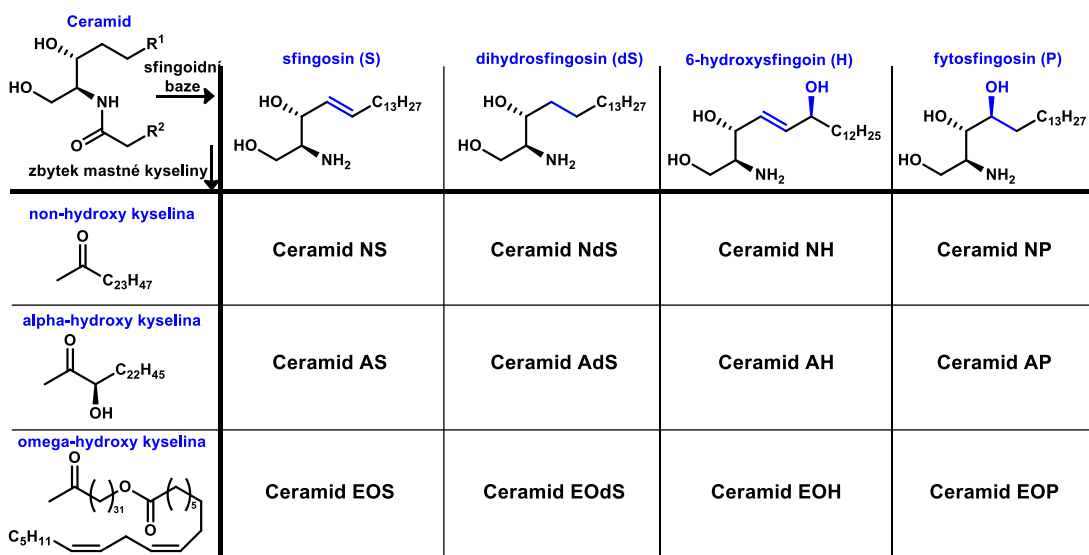
2.3. Ceramidy

Ceramidy (Cer) jsou nejdůležitější a nejspecifičtější částí lipidů SC. Jsou klíčové zejména pro udržení správné bariérové funkce kůže, avšak hrají důležitou roli také v adhezi buněk, epidermální diferenciaci a mají funkci signálních molekul.^{11, 12}

Do současné doby bylo popsáno 15 podtříd Cer.¹³ Pokud vezmeme v úvahu rozdílné délky jednotlivých řetězců různých podtříd Cer, dostaneme pak téměř 5000 odlišných molekul, což ukazuje, že Cer jsou velmi rozmanitou skupinou lipidů.¹⁴ Cer ve své struktuře obsahují bazický aminoalkohol s dlouhým řetězcem (nejčastěji s 18-24 C), kterým může být sfingosin (S), fytosfingosin (P), 6-hydroxysfingosin (H), dihydrosfingosin (dS) a aminoalkohol se čtyřmi hydroxylovými skupinami (T), který není příliš dobře charakterizován. Bazické aminoalkoholy jsou také nazývány jako sfingoidní báze.¹⁵ Na primární aminoskupinu aminoalkoholu se amidovou vazbou váže nasycená mastná kyselina (N), která může být α -hydroxylována (A) nebo ω -hydroxylována (O). Tato mastná kyselina obvykle obsahuje 16-36 C. Cer mohou být dále esterifikovány v ω -poloze kyselinou linolovou (EO), případně v poloze 1 nesubstituovanou kyselinou (1-O-acylCer). ω -hydroxylová skupina acylu může být

také kovalentně (esterovou vazbou) navázána na membránové proteiny korneocytů, zejména involucrin, a takto tvořit jejich lipidový obal, tj. korneocytální lipidovou obálku, u které se předpokládá, že slouží jako matrice pro uspořádání dalších vrstev lipidů v mezibuněčných prostorech SC.^{5, 16-18}

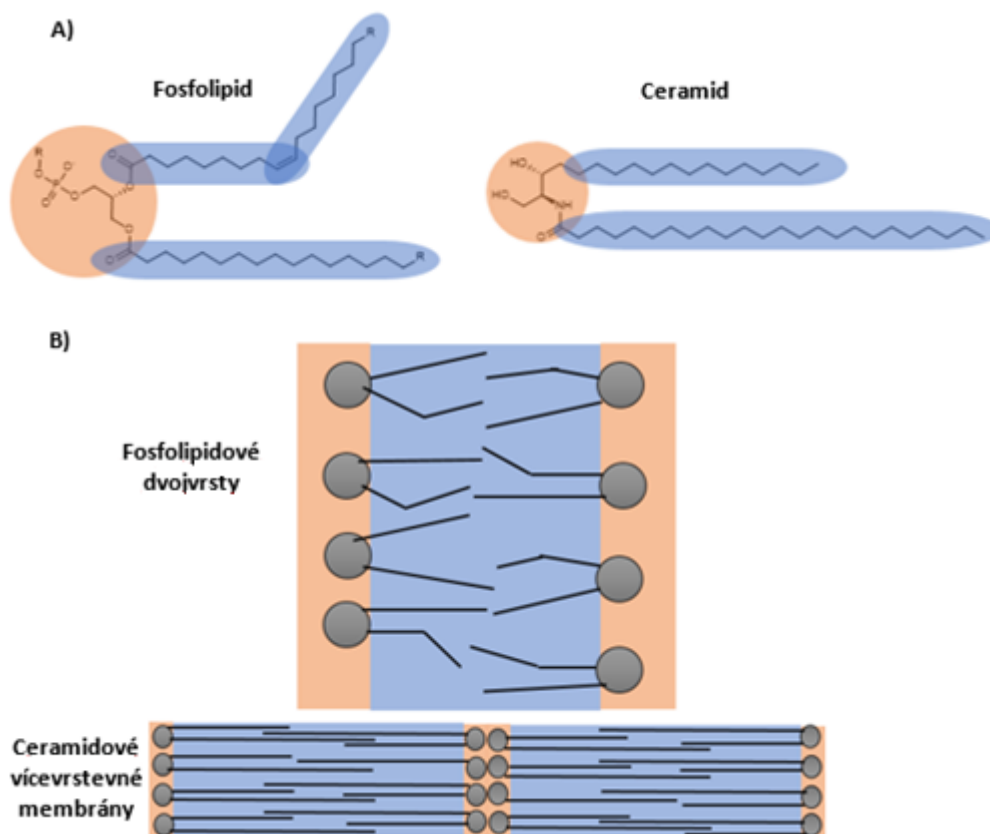
Názvosloví Cer v této podobě bylo poprvé navrženo v roce 1993 a bylo několikrát upraveno.¹⁹ Využívá symbolů sfingoidních bází a acylů (které byly zmíněny dříve). Kombinací těchto symbolů vzniká název příslušné podtřídy Cer, například Cer AP obsahuje ve své molekule fytosfingosin, který je acylován α -hydroxylovanou kyselinou a Cer EOS je tvořen sfingosinem, který je acylován ω -hydroxylovanou kyselinou s navázanou kyselinou linolovou v ω -poloze. Struktury nejběžnějších Cer v lidském SC jsou zobrazeny na Obr. 3.



Obr. 3: Struktury hlavních podtříd Cer nalezených v lidské kůži.

Díky své struktuře slouží Cer jako molekulární spojky mezi jednotlivými lamelami. Molekula Cer je podobná molekule fosfolipidů, které jsou také důležitou součástí buněčných membrán. Jejich molekuly obsahují polární hlavu a dva lipofilní řetězce. Polární hlava Cer je ve srovnání s fosfolipidy o poznání menší, proto je uspořádání Cer v lamelě těsnější. Porovnáme-li lipofilní řetězce připojené na polární hlavu, jsou podstatně delší u molekul Cer než u fosfolipidů. Díky těmto rozdílům jsou Cer

schopné vytvářet několikavrstvé, vzájemně propojené lamely, na rozdíl od fosfolipidů, které tvoří pouze dvojvrstvy (Obr. 4).⁵



Obr. 4: Srovnání A) molekuly fosfolipidu a ceramidu. B) fosfolipidových dvojvrstev s vícevrstevnými membránami Cer.

2.4. Acylceramidy

Acylceramidy (acylCer; Cer třídy EO) jsou nejdelší Cer, které se ve SC a obecně v lidském těle vyskytují. Stejně jako ostatní Cer obsahují jednu ze čtyř sfingoidních bází, avšak v acylovém řetězci obsahují nasycenou ω -hydroxylovanou mastnou kyselinu, která je podstatně delší, obsahuje nejčastěji 30-36 C (Cer běžně obsahují 16-24 C, maximální délka je pak 28 C).⁶

Mastná kyselina je v ω -poloze esterifikována převážně kyselinou linolovou (v lidském těle je zastoupena až v 95 %). U ostatních živočichů je procentuální

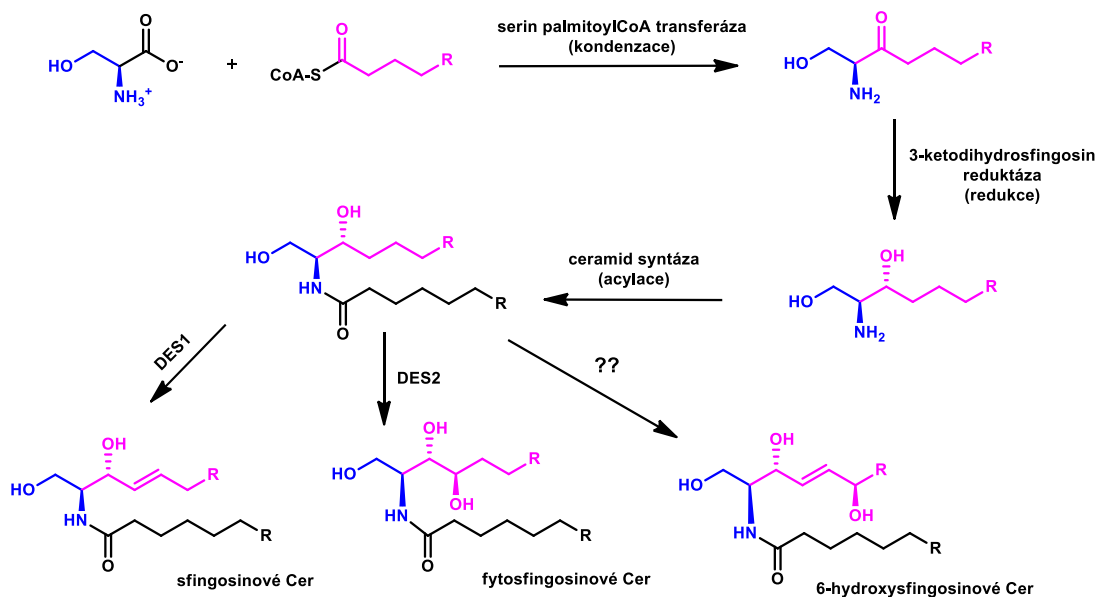
zastoupení této kyseliny nižší (u prasat 75-77 %, u morčat 84 %, u krys a myší je zastoupena jen ve 32-45 %).²⁰ V případě nedostatku esenciálních mastných kyselin je kyselina linolová nejčastěji nahrazena kyselinou olejovou a jinými neesenciálními mastnými kyselinami. Tyto změny následně vedou k formaci lamelární membrány s narušenou bariérovou funkcí, což vede k závěru, že acylCer obsahující kyselinu linolovou jsou nezbytné ke správné funkci lidské kožní bariéry.^{9, 20-22}

AcylCer jsou důležité pro správnou funkci kožní bariéry a pro přežití na souši. Bylo prokázáno, že závažné poruchy biosyntézy acylCer jsou neslučitelné se životem a jedinci s takovým postižením umírají krátce po narození v důsledku obrovských ztrát vody přes kůži.^{9, 23, 24} Naopak při mírnější poruše ve složení bariérových lipidů (v této části jsem se zaměřila na acylCer) dochází k rozvoji různých kožních onemocnění, jako je atopická dermatitida a Nethertonův syndrom, které vykazují snížené hladiny všech acylCer (EOS, EOP, EOH, EODs), psoriáza (snížená hladina zejména acylCer EOP), lamelární ichtyózy (snížená hladina zejména acylCer EOS) a Chanarinův-Dorfmanův syndrom (snížené hladiny acylCer obecně).^{6, 9, 19, 25, 26}

2.5. Biosyntéza acylCer

AcylCer se tvoří v pozdní fázi diferenciaci keratinocytů. Biosyntéza začíná tvorbou sfingoidní báze na membráně endoplasmatického retikula. První reakcí je kondenzace L-serinu a palmitoylkoenzymu A (palmitoylCoA), která je katalyzována serin palmitoylCoA transferázou. Při této kondenzaci vzniká 3-ketodihydrosfingosin. Druhým krokem biosyntézy sfingoidní báze je redukce keto skupiny za vzniku dihydrosfingosinu. Enzym, který tuto reakci katalyzuje se nazývá 3-ketodihydrosfingosin reduktáza.^{9, 21} Ke tvorbě dalších sfingoidních bází z dihydrosfingosinu nedochází ihned, ale až po acylaci primární amino skupiny. Jeden z důvodů, proč se to neděje je fakt, že samotný sfingosin spouští apoptózu.²⁷ Po redukci následuje acylace primární amino skupiny, která probíhá díky Cer syntázám (CerS), které vážou acyl-CoA (donor mastné kyseliny) k dihydrosfingosinu.²¹ Doposud bylo popsáno 6 podskupin CerS (1-6), každý enzym

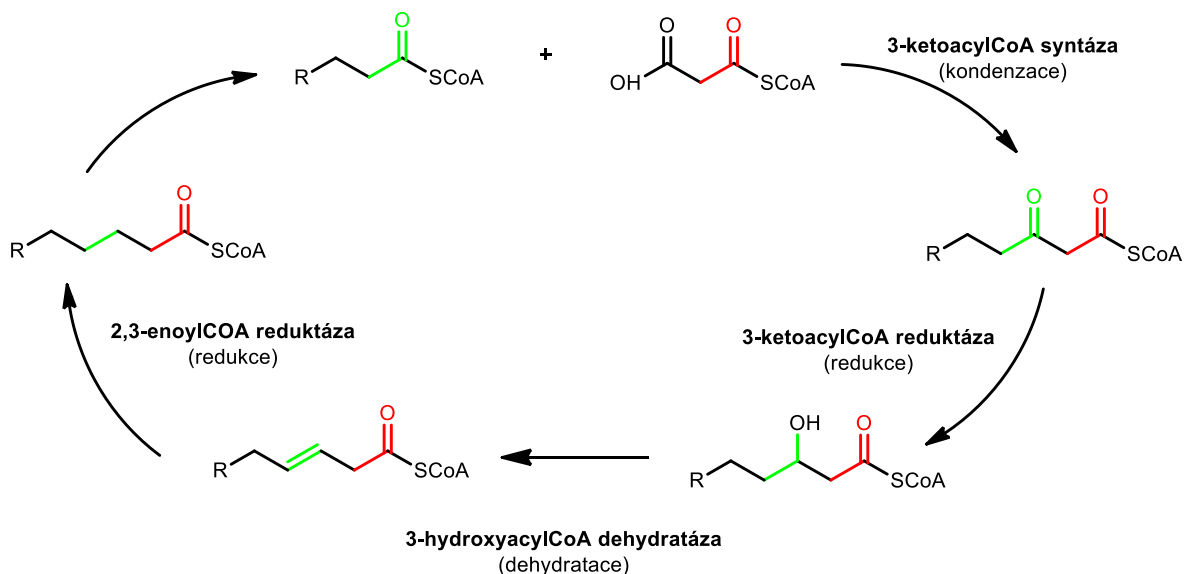
vykazuje preferenci k jiné délce acylu (i když se jejich substráty částečně překrývají). Pro syntézu ultradlouhých Cer je nejdůležitější CerS3.⁹ Po acylaci je upravena sfingoidní část pomocí enzymů ze skupiny desaturáz (dihydro-Cer desaturázy – DES). Přeměnu dihydrosfingosinu na sfingosin katalyzuje DES1, DES2 je zodpovědná za přeměnu fytosfingosinu, přeměna na 6-hydroxysfingosin je zprostředkována enzymem, který zatím nebyl identifikován (Obr. 5).^{9, 21, 28} Do tohoto kroku je biosyntéza acylCer stejná s biosyntézou ostatních Cer. U Cer, které jsou α -hydroxylovány je za tuto hydroxylaci zodpovědný enzym 2-hydroxyláza.²⁹



Obr. 5: Počátek biosynthetic dráhy vedoucí k syntéze Cer (tato dráha je stejná i pro acylCer).

Syntéza mastných kyselin (MK) probíhá v cytosolu. MK do délky řetězce 16 C jsou syntetizovány pomocí multifunkčního komplexu nazývaného syntáza mastných kyselin.^{9, 30} Prodlužování řetězce probíhá ve čtyřech opakujících se krocích (kondenzace, redukce, dehydratace a redukce) a řetězec se prodlužuje v každém cyklu o dva uhlíky. Nejprve dochází ke kondenzaci acylCoA a malonylCoA (donor dvouuhlíkatého fragmentu), tento krok katalyzuje enzym zvaný 3-ketoacylCoA syntáza. Druhým krokem je redukce 3-ketoacylCoA na 3-hydroxyacylCoA katalyzovaná 3-ketoacylCoA reduktázou. Následuje dehydratace katalyzovaná 3-hydroxyacylCoA dehydratázou a vzniká *trans*-2-enoylCoA. Závěrečným krokem je

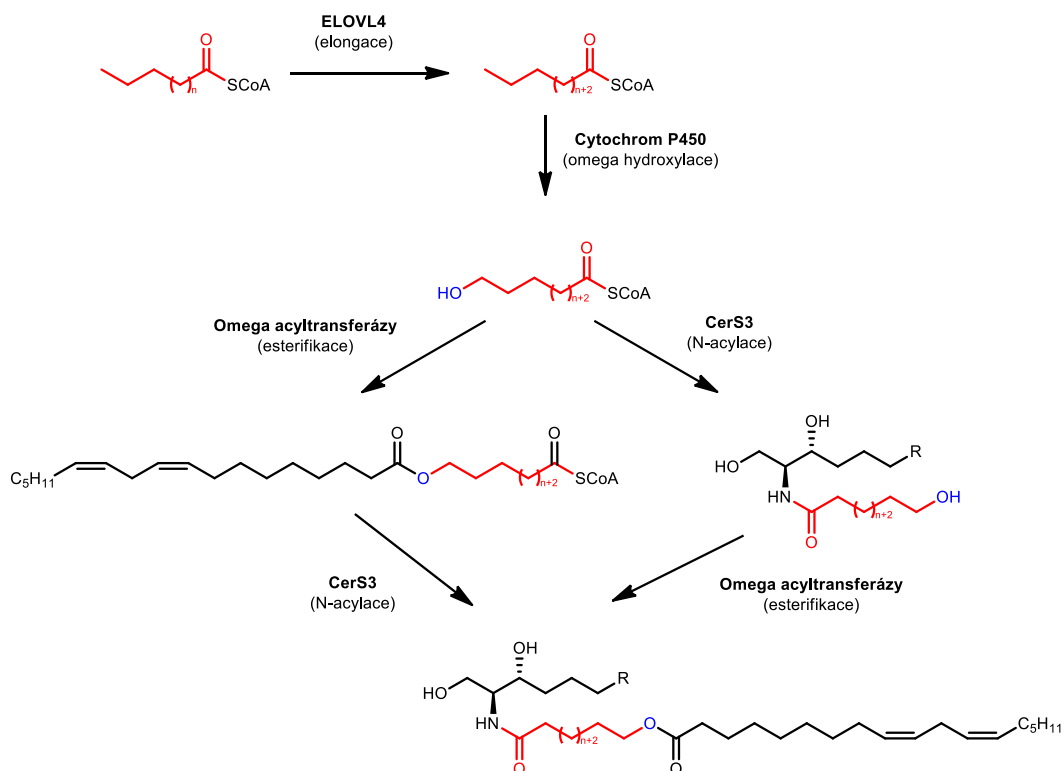
redukce za vzniku acylCoA, který je o dva uhlíky delší než na počátku. Tento krok je katalyzován enzymem 2,3-enoylCoA reductázou (Obr. 6).^{21, 31}



Obr. 6: Cyklický proces elongace volných MK probíhající ve čtyřech krocích.

Poté jsou z MK o 16 C vytvářeny velmi dlouhé MK pomocí enzymů ze skupiny elongáz (ELOVL 1-7). Název je odvozen od jejich anglického popisu funkce: „elongation of very long chain fatty acids“. Tato elongace pak probíhá na endoplasmatickém retikulu.^{21, 30} Každá elongáza preferuje substráty do různé délky (například ELOVL1 do 24 C). Elongázy kromě substrátové specifity vykazují také tkáňovou specifitu.⁹ Pro tvorbu delšího řetězce (>28 C, které jsou nezbytné při biosyntéze acylCer) je potřeba ELOVL4. Následuje ω -hydroxylace, která probíhá pomocí P-450 a je nezbytná pro tvorbu acylCer.³²

K dokončení kompletní biosyntézy acylCer zbývá ω -esterifikace MK pomocí ω -acyltransferázy.³³ Z nejnovějších poznatků vyplývá, že acyltrásferázovou aktivitu v tomto případě vykazují PNPLA1 (patatin-like phospholipase).^{34, 35} Zatím však nebylo jednoznačně prokázáno, zdali dochází nejdříve k ω -esterifikaci a až poté k N-acylaci (CerS3), nebo naopak (Obr. 7 na následující straně).⁹

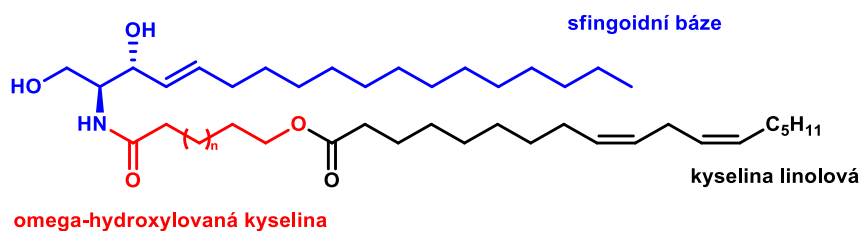


Obr. 7: Elongace mastné kyseliny, její ω -hydroxylace a dokončení biosyntézy acylCer.

2.6. Chemická syntéza AcylCer

Kompletní syntéza acylCer byla doposud popsána jen několika postupy, proto i nadále tato oblast zůstává otevřená dalším přístupům. Jednou z hlavních obtíží v syntéze acylCer je nerozpustnost a nízká reaktivita jejich prekurzorů. Izolace acylCer z kůže v dostatečném množství je rovněž problematická, protože jejich zastoupení je poměrně malé.³⁶

Při retrosyntetickém rozboru molekuly acylCer zjistíme, že se molekula skládá ze tří hlavních stavebních bloků. Sfingoidní báze, ω -hydroxylované nasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (30-36 C) a kyseliny linolové (Obr. 8 na následující straně).



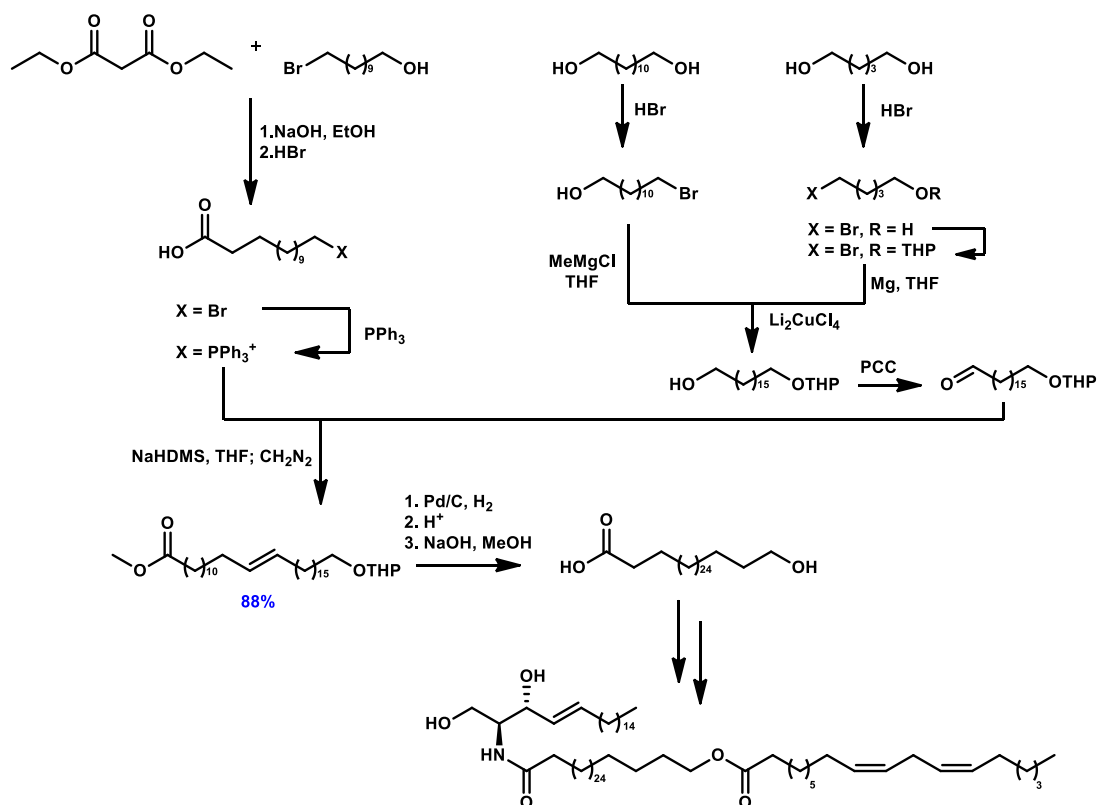
Obr. 8: Popis jednotlivých strukturních celků molekuly acylCer (běžně $n = 26-28$).

V současné době jsou v literatuře popsány čtyři postupy přípravy acylCer. Na následujících stránkách se pokusím krátce shrnout jednotlivé postupy přípravy s důrazem na jejich slabší a silnější stránky.

V roce 1991 Mori a kol. popsali syntézu jednoho z cerebrosidů (glukosylovaný acylCer). Při syntéze sphingoidní báze (sfingosin s řetězcem 20 C) vycházeli z L-serinu, ze kterého připravili oxazolidinkarbaldehyd (neboli Garnerův aldehyd), který reagoval s heptadec-1-ynem za vzniku směsi diastereoizomerů (pro zvýšení poměru vzniku požadovaného diastereoizomeru byl do reakční směsi přidán HMPA). Následovala redukce trojné vazby na dvojnou lithiem v ethylaminu za vzniku 20 C sfingosinu, který byl derivatizován, aby mohl být použit v dalších reakcích (glukosylace a N-acylace). Výchozí látkou pro syntézu ω -hydroxylované kyseliny (30 C) byl 15-pentadekanolid. Jeho methanolýzou došlo k otevření laktonového kruhu za vzniku ω -hydroxylovaného esteru, ze kterého byly připraveny dvě různé 15 C látky, které Wittigovou reakcí poskytly 30 C nenasycenou mastnou kyselinu. Oxidací hydroxylové skupiny ω -hydroxylovaného esteru na skupinu aldehydickou pomocí pyridinium chlorochromátu (PCC) vznikl první reaktant pro Wittigovu reakci. Alkoholická skupina druhé molekuly výše zmíněného esteru byla chráněna prostřednictvím terc-butyldifenylsilyletheru (TBDPS) a poté byl ester redukován $LiAlH_4$ za vzniku alkoholu, který byl v dalším kroku převeden na bromid (druhý reaktant). Wittigovou reakcí obou připravených reaktantů s trifenylofosfinem v prostředí *n*-butyllithia jako báze došlo ke spojení dvou kratších fragmentů za vzniku 30 C esteru nenasycené mastné kyseliny s výtěžkem 77 %. Po hydrogenaci a převedení na kyselinu, která byla aktivována *p*-nitrofenylovou skupinou,

Nejproblematictější částí syntézy byla reakce Garnerova aldehydu a heptadec-1-ynu, při níž vznikala směs diastereoizomerů, ale pro další reakce byl požadován jen jeden z nich. Přídavkem HMPA se výrazně změnil poměr diastereoizomerů ve prospěch požadovaného izomeru, nicméně výtěžek této reakce nepřesahuje 70 %. Naopak Wittigovou reakcí obou připravených reaktantů došlo ke vzniku 30 C esteru nenasycené mastné kyseliny s výtěžkem 77 %, pravděpodobně díky vyšší rozpustnosti vznikajícího produktu (esteru).³⁷

Müller a kol. navrhli v roce 2000 syntézu acylCer jiným způsobem. Soustředili se zejména na syntézu ω -hydroxylované mastné kyseliny pomocí tří různých couplingových reakcí. Nejprve připravili 13-bromtridekanovou kyselinu, která vznikla z diethylmalonátu a 11-bromundekanolu. Poté byla kyselina zahřívána s trifenylfosfinem za vzniku fosfoniové soli, která se stala prvním reaktantem pro Wittigovu reakci. Druhým reaktantem byl aldehyd obsahující 17 C řetězec. Jeho příprava vycházela z 1,12-dodekandiolu, ze kterého byla působením HBr připravena monobromovaná sloučenina (12-bromdodekanol). Stejný postup byl použit při přípravě 5-brompentanolu z 1,5-pentandiolu. Alkoholická skupina 5-brompentanolu byla chráněna tetrahydropyranylovou skupinou a výsledný chráněný alkyl halogenid reagoval s hořčíkem za vzniku Grignardovy sloučeniny. Tato Grignardova sloučenina poté reagovala s 12-bromdodekanolem v přítomnosti methylmagnesium chloridu a Li_2CuCl_4 ^{cit.38} za vzniku meziproductu (17 C alkoholu), který byl oxidován pomocí PCC na požadovaný aldehyd. Z 13-bromtridekanové kyseliny a aldehydu v přítomnosti bis(trimethylsilyl)amidu (NaHMDS) a diazomethanu vznikl methylester 30 C nenasycené mastné kyseliny. Následovala její hydrogenace, odstranění tetrahydropyranylové skupiny a hydrolýza methylesteru za vzniku ω -hydroxylované mastné kyseliny s délkou řetězce 30 C. Kyselina linolová byla nejprve aktivována 2-chlor-1-methylpyridinium jodidem, a až poté použita k esterifikaci. Závěrečným krokem byla N-acylace 18 C sfingosinu vzniklou kyselinou pomocí N-ethoxykarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolinem (EEDQ). Celkový výtěžek syntézy činil 3 % ve třinácti krocích (Obr. 10 na následující straně).³⁹

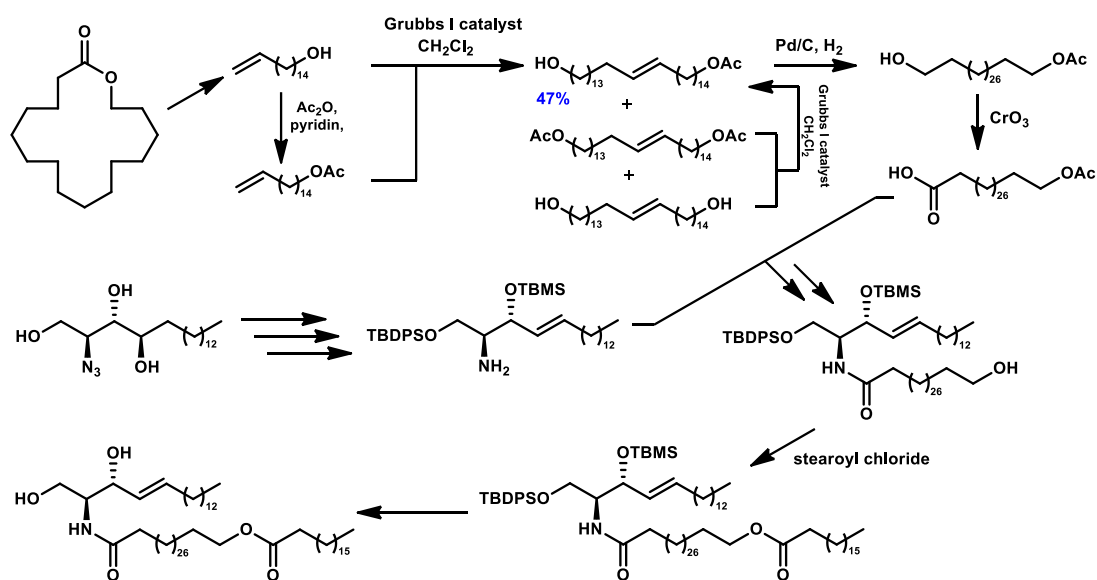


Obr. 10: Syntéza acylCer podle Müllera a kol. (2000).

Největším úskalím syntézy byla esterifikace ω -hydroxylované kyseliny kyselinou linolovou, protože nasycená mastná kyselina byla téměř nerozpustná v běžných rozpouštědlech, a i přes aktivaci linolové kyseliny pomocí 2-chlor-1-methylpyridinium jodidem probíhala esterifikace pouze s výtěžkem 40 %. Naopak silnou stránkou tohoto postupu byla právě Wittigova reakce, která v přítomnosti diazomethanu, který okamžitě reagoval za vzniku methylesteru, probíhala s výtěžkem 88 %. Pravděpodobným důvodem bylo opět zlepšení rozpustnosti vznikajícího produktu podobně jako tomu bylo u syntézy popsané Morim a kol.³⁹

Později Tashiro a kol. připravili ω -stearyl esterifikované Cer. Při přípravě ω -hydroxylované mastné kyseliny na rozdíl od předchozích postupů nevyužili Wittigovu reakci, ale rozhodli se pro zkříženou metatezi. Stejně jako Mori a kol. vycházeli z 15-pentadekanolidu, který byl převeden na ω -nenasycený alkohol

(mezistupněm byl odpovídající hemiacetal) redukcí a následnou reakcí s Wittigovým činidlem v jednom kroku. Tento nenasycený alkohol byl následně acetylován. Zkřížená metateze alken-1-olu a jeho esteru v poměru 1:1 probíhala za katalýzy Grubbsovým katalyzátorem první generace a poskytla požadovaný olefin společně s diesterem a diolem (jako vedlejšími produkty). Tyto vedlejší produkty byly zužitkovány následnou další metatezí diesteru a diolu, z čehož vznikl opět požadovaný olefin společně s diesterem a diolem. Olefin byl hydrogenován a oxidován pomocí CrO_3 (Jonesovo činidlo) na kyselinu. Výchozí látkou pro syntézu sfingoidní báze byl komerčně dostupný fytosfingosin, ze kterého byl připraven azid, jehož hydroxylové skupiny byly chráněny silylací. Chráněný azid byl redukován a alkalicky zpracován za vzniku aminu, který kondenzoval s připravenou kyselinou v prostředí 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylkarbodiimid hydrochloridu, hydroxybenzotriazolu a diisopropylethylaminu. Následovalo odštěpení acetylové skupiny za vzniku volné alkoholické skupiny. Acylací ω -hydroxylové skupiny kyselinou stearovou a desilylací vznikl stearyl ester Cer. Celkový výtěžek reakce byl 12 % (vztaheno na výchozí 15-pentadekanolid) v jedenácti krocích (Obr. 11).⁴⁰



Obr. 11: Syntéza acylCer s esterově vázanou kyselinou stearovou místo linolové v ω -poloze podle Tashira a kol. (2012).

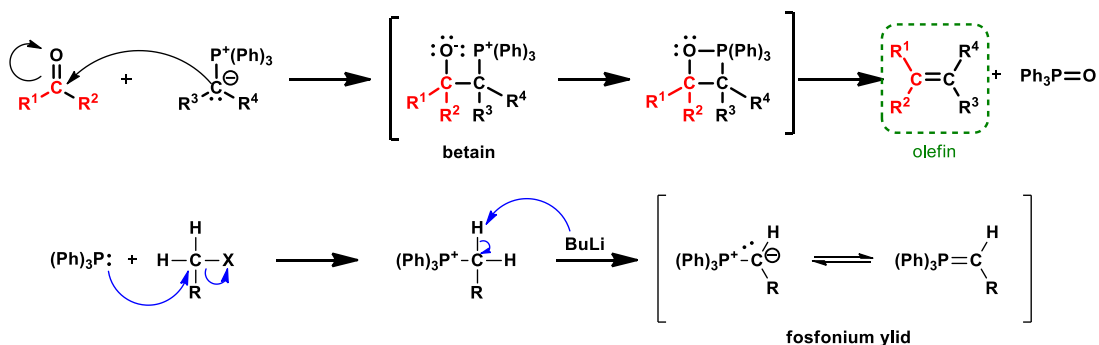
Problematickou částí této syntézy byla zkřížená metateze, kde požadovaný produkt vznikal společně s dalšími, nežádoucími látkami (diacetát a diol), proto bylo nutné je nechat opětovně reagovat další metatezí, čímž došlo k prodloužení syntézy o jeden krok. Naopak *N*-acylace aminu připraveného z fytosfingosinu s 30 C chráněnou kyselinou probíhala s velmi dobrým výtěžkem (98 %).

Opálka a kol. popsali syntézu acylCer, ze které vychází tato diplomová práce. Syntéza ω -hydroxylované kyseliny vycházela z 16-bromhexadekanové kyseliny, která byla nejprve redukována na bromalkohol a ten byl v dalším kroku chráněn tetrahydropyranylovou skupinou (THP). Chráněný alkohol byl převeden na ester a jeho následnou redukcí vznikl alkohol. Swernova oxidace alkoholu poskytla aldehyd (první partner pro Wittigovu reakci). Druhý partner, fosfoniová sůl, byl připraven taktéž z 16-bromhexadekanové kyseliny reakcí s trifenyfosfinem. Wittigovou reakcí obou partnerů v přítomnosti bis(trimethylsilyl)amidu vznikla 32 C nenasycená mastná kyselina. Kyselina byla methylována a katalyticky hydrogenována, poté byla odstraněna THP skupina a následně i methylester za vzniku 32-hydroxydotriakontanové kyseliny. Tato kyselina nakonec nebyla použita pro další syntézu díky nízké reaktivitě a rozpustnosti. Nenasycená mastná kyselina vzniklá při Wittigově reakci byla převedena na sukcinimidylester, čímž byla výrazně zvýšena rozpustnost a tato skupina zároveň později posloužila jako aktivující skupina pro tvorbu amidové vazby. Dalším krokem bylo navázání kyseliny linolové na volnou ω -hydroxylovou skupinu pomocí Yamaguchiho esterifikační reakce. Výsledné acylCer byly získány přímou reakcí tohoto prekurzoru se sfingoidní bází. Sfingoidní báze (S, dS a P) jsou v dnešní době již komerčně dostupné. Celkový výtěžek této dvanáctikrokové reakce činil 11 % v miligramových množstvích a 7 % v množstvích gramových (Obr. 12 na následující straně).³⁶

vybraných olefinačních reakcí potenciálně použitelných pro syntézu ultradlouhých řetězců.

2.7.1. Wittigova reakce

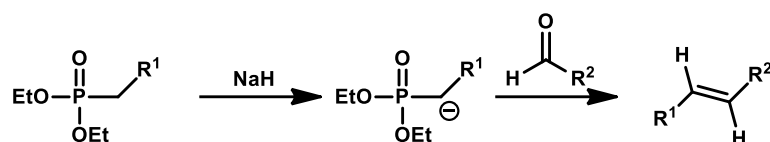
Byla objevena Georgem Wittigem v roce 1954. Jedná se o chemickou reakci aldehydu nebo ketonu s fosfoniovou solí za vzniku nenasycené sloučeniny. Při reakci prostřednictvím adice fosfonium ylidu na aldehyd nebo keton vzniká obojetný ion, zvaný betain, který není možné za normálních podmínek izolovat, jelikož se spontánně rozkládá za vzniku nenasycené sloučeniny a trifenylofosfanoxidu. Fosfonium ylidy pro Wittigovu reakci se snadno připravují z primárních alkylhalogenidů a trifenylofosfinu ve dvou krocích. Prvním krokem je nukleofilní atak (S_N2 mechanismus) trifenylofosfinu na primární alkyl halogenid za vzniku fosfoniové soli, ze které se následně v prostředí silné báze (nejčastěji se používá butyl lithium, bis(trimethylsilyl)amid sodný nebo hydrid sodný) odtrhává proton z atomu uhlíku sousedícího s atomem fosforu a vzniká fosfonium ylid (Obr. 13).⁴¹⁻⁴³



Obr. 13: Mechanismus Wittigovy reakce a přípravy fosfonium ylidu.

Wittigova reakce je velmi obecná a použitím vhodné kombinace aldehydu (respektive ketonu) a ylidu je možno připravit mono-, di- a trisubstituované nenasycené sloučeniny. Tetrasubstituované alkeny pravděpodobně nevznikají kvůli sterickému bránění.⁴²

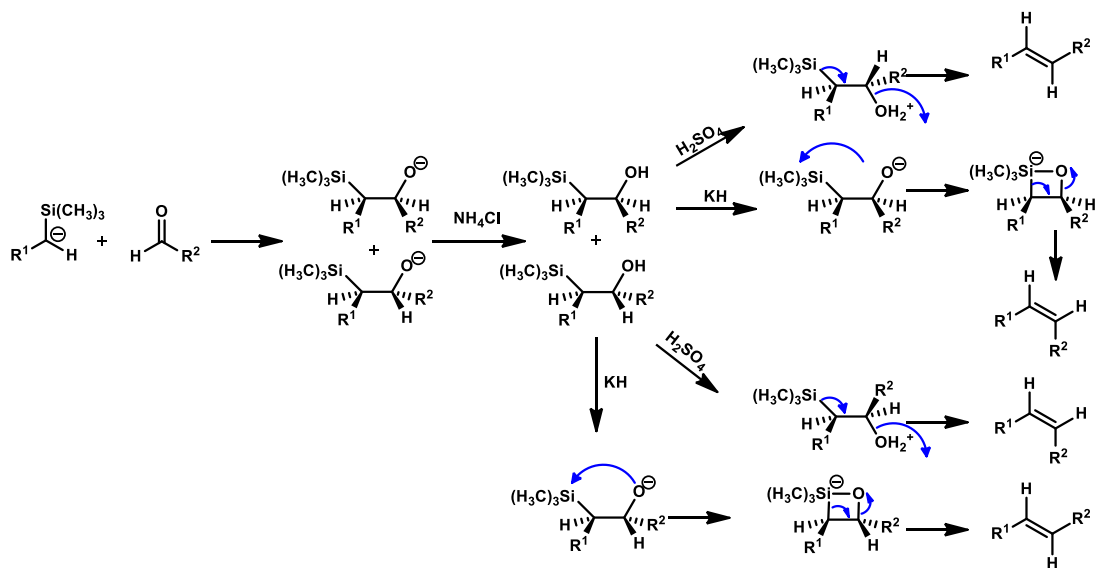
Při Wittigově reakci za běžných podmínek vzniká směs *E*, *Z* izomerů v závislosti na struktuře ylidu. V případě, že je na uhlík ylidu, ze kterého odtrháváme proton, vázána elektron akceptorová skupina (např. karboxylát nebo deriváty karboxylové kyseliny), hovoříme o tzv. stabilizovaném ylidu, který při Wittigově reakci poskytuje produkt převážně v podobě *E*-izomeru. Pokud v tomto místě není vázána žádná elektron akceptorová skupina, hovoříme o nestabilizovaném ylidu, který následně při Wittigově reakci poskytuje převážně *Z*-izomer produktu. Modifikací předchozího postupu je Horner-Wadsworth-Emmonsova reakce, u které se namísto trifenylfosfoniové soli používají fosfonáty. Hlavním produktem jsou v tomto případě *E* izomery alkenů (Obr. 14).^{43, 44}



Obr. 14: Obecné schéma Horner-Wadsworth-Emmonsovy reakce.

2.7.2. Petersonova olefinace

V roce 1968 Peterson a kol. popsali vznik olefinů pomocí reakce (trimethylsilyl)methylmagnesiumchloridu s benzofenonem, jejíž průběh následně zobecnili do dnes běžně známé podoby. Obecně se tedy jedná o reakci α -silyl karbaniontů s aldehydy (či ketony) za vzniku β -hydroxysilanu, který je následně kyselé nebo bazicky eliminován na nenasycenou sloučeninu. Petersonova reakce je alternativou k Wittigově reakci, a proto je také někdy nazývána „silyl-Wittigova“ reakce (Obr. 15 na následující straně).^{45, 46}

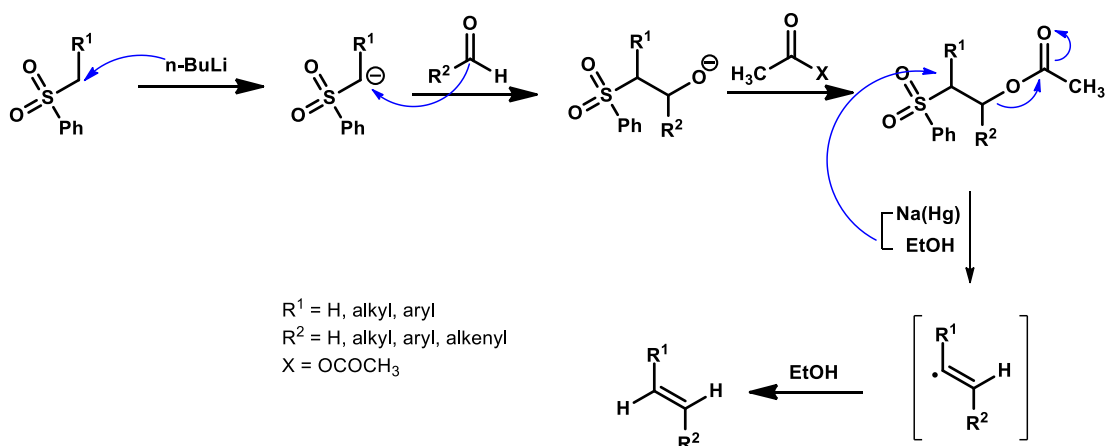


Obr. 15: Mechanismus Petersonovy reakce se zdůrazněním možné stereochemie konečného produktu.

Petersonovou reakcí je možno připravit *E* i *Z* izomery, jak ukazuje obrázek výše. Stereochemie produktu může být ovlivňována přidáním kyseliny nebo báze, což mění mechanismus výsledné eliminace. Při použití báze obvykle dochází k syn-eliminaci (cyklický čtyřčlenný meziprodukt), zatímco použití kyseliny vede k anti-eliminaci.^{44, 46}

2.7.3. Julia olefinace

Julia olefinace, také známá jako Julia-Lythgoe olefinace byla popsána v roce 1973. Jedná se o reakci aldehydu či ketonu s alkylsulfonfylbenzenem. Obdobně jako při Wittigově reakci je odtržen proton z atomu uhlíku, sousedícího se sulfonovou skupinou a vzniká anion, který nejprve reaguje s aldehydem a následně s acetanhydridem a vytváří stabilní meziprodukt. Přesný mechanismus redukce není znám, ale bylo prokázáno, že probíhá přes radikálový meziprodukt, který je nakonec protonován a poskytuje požadovanou nenasycenou sloučeninu (Obr. 16 na následující straně).^{44, 47, 48}

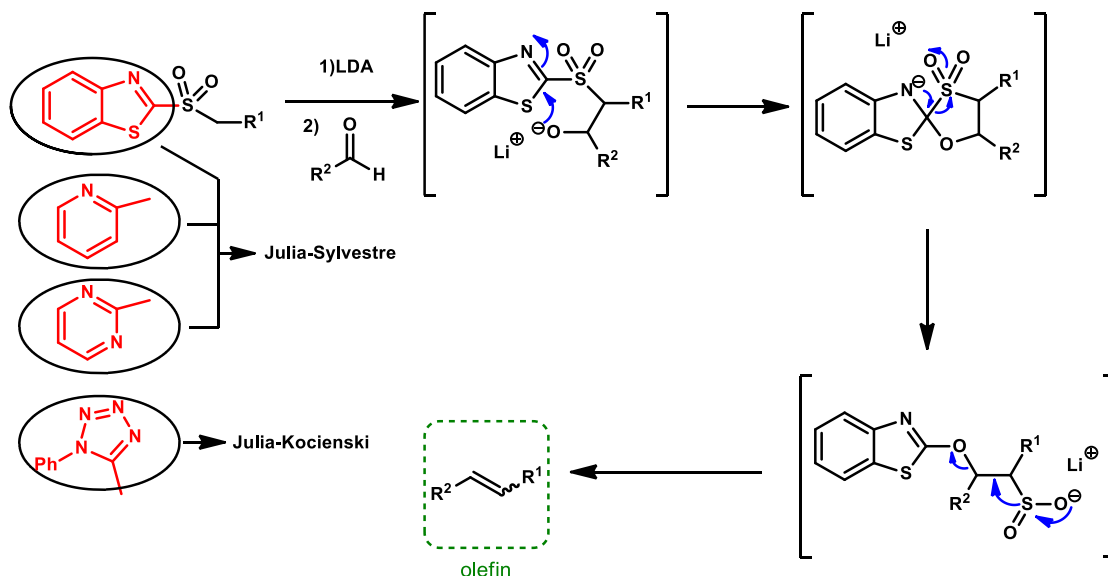


Obr. 16: Mechanismus Julia olefinace.

Touto reakcí je možno připravit mono-, di-, tri- nebo tetrasubstituované nenasycené sloučeniny. Stereochemie výsledného alkenu je nezávislá na stereochemii sulfonového meziprojektu, předpokládá se, že radikálové meziprojektu preferují termodynamicky stabilnější *trans* konformaci. To je důvod proč Julia olefinace preferuje vznik *E*-olefinů.^{49,48, 50}

2.7.4. Modifikace Julia olefinace

V současné době je k dispozici několik modifikací původní Julia olefinace. Sylvestre a kol. v roce 1991 publikovali přímou syntézu olefinů. Náhrada alkylsulfonylbenzenu jako výchozí látky za alkylsulfonylbenzothiazoly výrazně mění průběh reakce. Reakcí alkylsulfonylbenzothiazolu s LDA vzniká meziprojekt (aniont), který velmi rychle reaguje s aldehydem (či ketonem) za vzniku alkoholátu. Tento alkoholát je mnohem reaktivnější než v případě Julia olefinace, podstupuje Smilesův přesmyk za vzniku soli sulfinové kyseliny a vzniká požadovaná nenasycená sloučenina. Tato metoda umožnila přípravu olefinů v jednom kroku za použití relativně dostupných reagentů. Sylvestre a kol. také vyzkoušeli několik obměn heterocyklické části molekuly (výměna benzothiazolu za pyridin, pyrimidin, aj.; Obr. 17).^{48, 51}



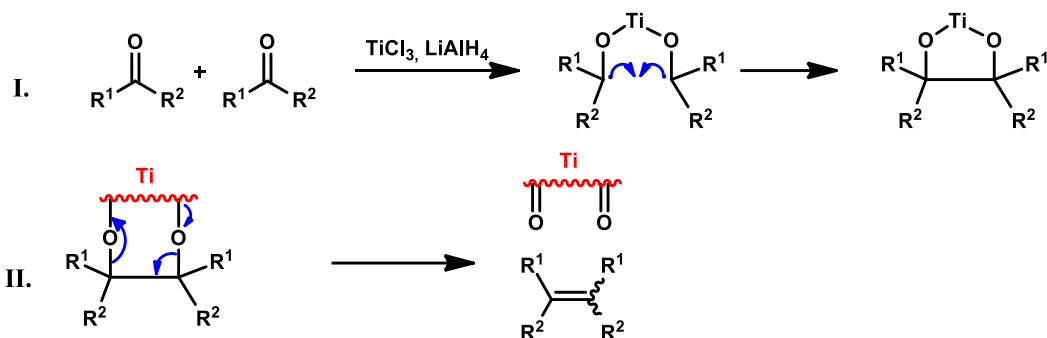
Obr. 17: Mechanismus modifikovaných Julia olefinací (Julia-Sylvestre a Julia-Kocienski).

Další modifikaci původní Julia olefinace popsal Kocienski a kol. Namísto benzothiazolu v heterocyklické části molekuly sulfonu použili 1-fenyl-1H-tetrazol. Reakce pak probíhá v přítomnosti bis(trimethylsilyl)amidu stejným mechanismem jako reakce popsaná v předchozím odstavci.⁵¹

2.7.5. McMurryho reakce

McMurry a kol. v roce 1974 popsali reakci, při níž ze dvou molekul aldehydu (nebo ketonu) vzniká alken pomocí reakce s chloridem titanitým a redukčním činidlem (např. LiAlH₄). Působením LiAlH₄ na Ti³⁺ vzniká Ti⁰, který je zdrojem elektronů. Předpokládá se, že McMurryho reakce je dvoustupňový proces zahrnující nejprve spojení pinacol radikál-radikál (důkazem toho jsou pinakolové produkty, které mohou být izolovány z reakce za určitých podmínek). Následně Ti⁰ deoxygenuje diol mechanismem, který není plně pochopen, ale předpokládá se, že zahrnuje vazbu diolu na povrch Ti⁰ částic vzniklých při redukcí TiCl₃. Výsledkem je směs *E*, *Z* izomerů požadovaného alkenů.

McMurryho reakce je velmi užitečná ke tvorbě tetrasubstituovaných olefinů, nicméně výsledná dvojná vazba musí být symetrická, protože reakce dvou rozdílných aldehydů (či ketonů) jsou jen zřídka selektivní (Obr. 18).^{44, 46, 52}



Obr. 18: Mechanismus McMurryho reakce vhodný pro přípravu tetrasubstituovaných derivátů.

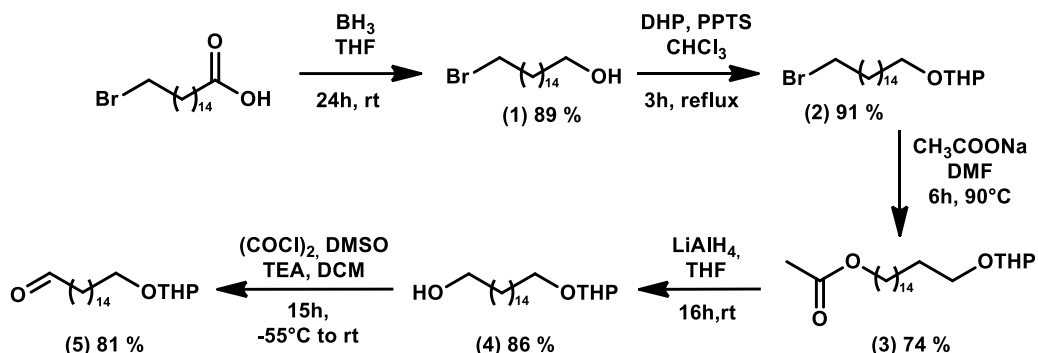
Olefinační reakce jsou obecně velmi rozšířeným a univerzálním typem reakce, protože umožňují vznik jinak těžko připravitelných produktů, které je poté snadné využít v dalších krocích potenciálních syntéz. Z uvedených příkladů olefinačních reakcí je zřejmé, že díky nim můžeme připravit různé mono-, di-, tri- až tetrasubstituované nenasycené molekuly. Počet substituentů na výsledné dvojně vazbě závisí na typu mechanismu reakce i na velikosti jednotlivých substituentů, které mohou stericky bránit vzniku tetrasubstituovaných produktů jako je tomu u výše popsané Wittigovy reakce. Obdobně tomu je i u stereochemie jednotlivých reakcí, která je závislá na mechanismu reakce a umožňuje přípravu *E* i *Z* izomerů, což se v mnoha případech dá ovlivnit podmínkami reakce, jak je uvedeno výše u jednotlivých typů reakcí.

3. Výsledky a diskuze

Syntéza 32-hydroxydotriakontanové kyseliny již byla publikována. Dosavadní syntéza popsána Opálkou a kol. (viz kapitola 2.6) umožnila efektivní přípravu acylCer a to i ve větším měřítku. Avšak i tato syntéza obsahuje svá slabší místa v podobě reakcí, které probíhají s relativně nízkým výtěžkem, což se samozřejmě potom odráží v celkovém výtěžku syntézy.³⁶ Vzhledem k tomu, že je tato kyselina součástí acylCer, které jsou naprosto nezbytné pro správné fungování kožní bariéry, rozhodli jsme se zaměřit důkladně na optimalizaci některých problematických kroků, mezi něž jednoznačně patří Wittigova reakce (tvorba ultradlouhého řetězce).

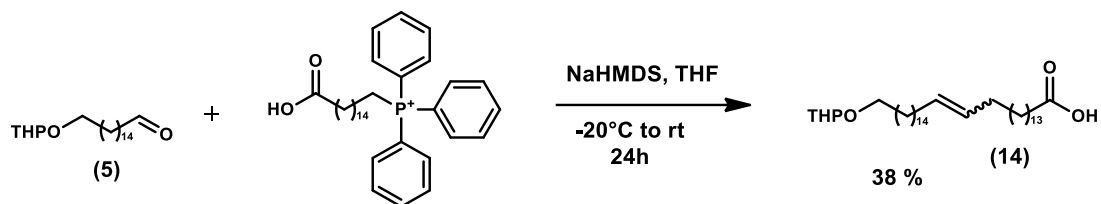
Prvním plánovaným krokem byla příprava 16-((tetrahydro-2*H*-pyran-2-yl)oxy)hexadekanalu, protože není komerčně dostupný a pro veškeré následující reakce je zcela nepostradatelný. Základem se stala výše popsána syntéza acylCer Opálkou a kol (Obr. 12).³⁶ Tento syntetický přístup byl vybrán díky ověřenému a poměrně jednoduchému postupu s dobrou výtěžností. Syntéza vycházela z komerčně dostupné 16-bromhexadekanové kyseliny, která byla redukována na alkohol **(1)** pomocí $\text{BH}_3\cdot\text{THF}$. Výtěžek reakce byl 89 %, který se od publikovaného (97 %) mírně lišil. Tento rozdíl mohl být způsoben předčasným ukončením reakce, jelikož TLC z reakční směsi již neukazovalo na přítomnost výchozí látky, avšak po její extrakci a prvotním přečištění byla na TLC detekována malá část výchozí látky. Následně byla hydroxylová skupina alkoholu **(1)** chráněna tetrahydropyranilovou skupinou v prostředí pyridinium *p*-toluensulfátu s 91% výtěžkem, který je srovnatelný s výtěžkem publikovaným (97 %). Dalším krokem bylo převedení chráněného alkoholu na ester **(3)** s výtěžkem 74 %, který byl nižší než publikovaný (94 %), nicméně jsme ho považovali za uspokojivý. Ester **(3)** byl poté redukován na alkohol **(4)** pomocí LiAlH_4 . Výtěžek této reakce byl 86 %, který je srovnatelný s publikovaným (82 %). Posledním krokem přípravy požadovaného aldehydu **(5)** byla Swernova oxidace alkoholu **(4)** s výtěžkem 81 %, který je srovnatelný

s publikovaným (86 %).³⁶ Aldehyd (**5**) byl poté použit jako výchozí látka pro Wittigovu reakci a další olefinační reakce (Obr. 19).



Obr. 19: Příprava výchozího aldehydu pro veškeré následující olefinační reakce, včetně Wittigovy.

Prvním přístupem při optimalizaci syntézy kyseliny 32-hydroxydotriakontanové byla modifikace publikované Wittigovy reakce.³⁶ Nejprve jsme vyzkoušeli postup, kdy byl k fosfoniové soli přidán THF za vzniku suspenze a při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ byla přidána báze (NaHMDS), poté byla reakce zahřáta na laboratorní teplotu, kde byla ponechána po dobu 1 hod, před přidáním aldehydu (**5**) byla reakční směs opět ochlazená na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tvorba ylidu tedy probíhala za laboratorní teploty, reakcí jsme dosáhli výtěžku 42 %, který je srovnatelný s publikovaným,³⁶ nicméně na kontrolním TLC po ukončení reakce a extrakci byly stále detekovatelné výchozí látky ve značném množství, proto bylo dalším krokem prodloužení reakčního času na 48 hodin. Delší reakční čas však nevedl k dalšímu navýšení výtěžku, maximální výtěžek získaný tímto postupem byl 33 % (což je ještě méně než v předchozím případě). Dalším přístupem byla reakce, kde by ylid byl připraven za chlazení po celou dobu jeho vzniku. Byl tedy vynechán mezikrok zahřívání reakční směsi na laboratorní teplotu před přidáním aldehydu a ylid vznikl při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 1,5 hod; u tohoto postupu jsme dosáhli výtěžku 41 %. Schéma Wittigovy reakce a tabulka s detaily reakčních podmínek provedených modifikací je uvedena na obrázku 20.

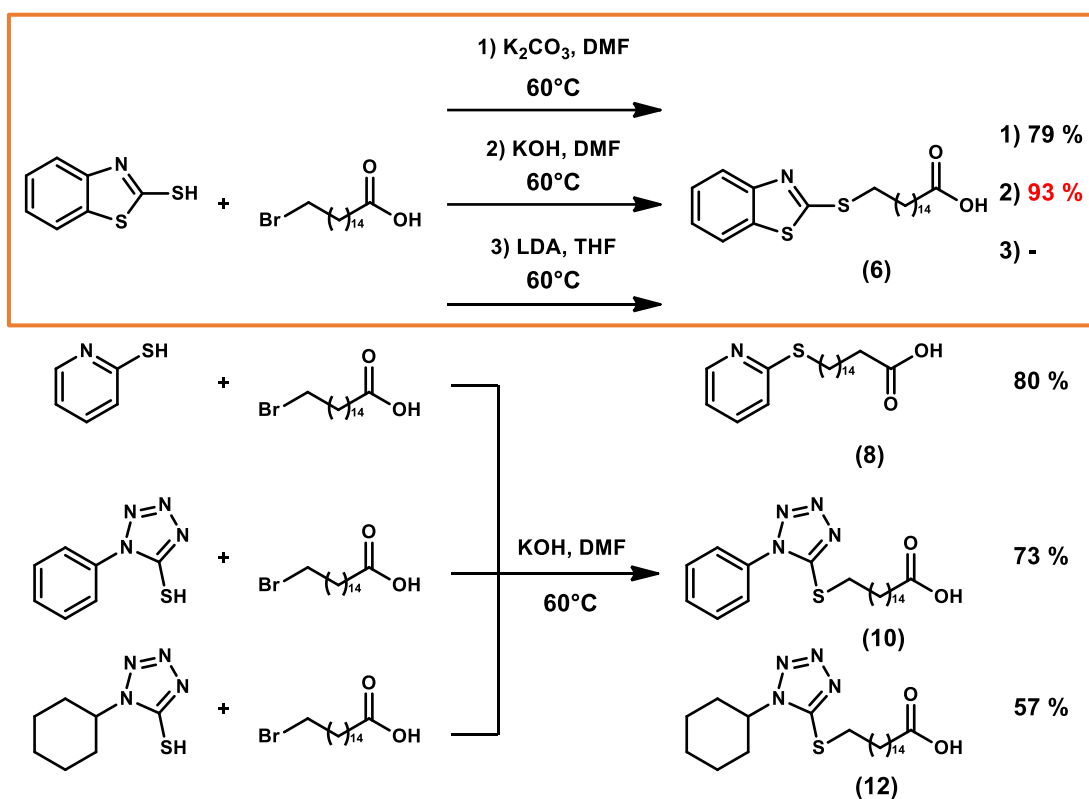


	Teplota přidání baze	Teplota vzniku ylidu	Doba tvorby ylidu	Teplota při přidání aldehydu	Celkový reakční čas	Výtěžek
Orig. postup	-20 °C	20 °C-reflux	1 hod	-20 °C	24 hod	38 %
1. modifikace	-20 °C	20 °C	1 hod	-20 °C	24 hod	42 %
2. modifikace	-20 °C	20 °C	1 hod	-20 °C	48 hod	33 %
3. modifikace	-20 °C	-20 °C	1,5 hod	-20 °C	24 hod	41 %

Obr. 20: Schéma Wittigovy reakce ukazující publikovaný postup a tabulka s detaily provedených modifikací v teplotách a reakčních časech.

Druhým přístupem při optimalizaci syntézy kyseliny 32-hydroxydotriakontanové bylo využití jiných typů olefinačních reakcí (Julia-Sylvestre a Julia-Kocienski reakce), pro které bylo nejprve nutno připravit výchozí látky (sulfonové deriváty hexadekanové kyseliny), jelikož nejsou komerčně dostupné. Výchozími látkami pro přípravu sulfonů byly zvoleny heterocyklické thiohy (dříve popsané, případně jejich analogy), ze kterých byly připraveny jejich sulfidy a ty byly následně oxidovány na sulfony. Benzothiazol-2-thiol byl použit jako výchozí látka pro první reakci přípravy derivátů sulfidů hexadekanové kyseliny, na které jsme vyzkoušeli tři různé reakční podmínky, abychom vybrali nejvhodnější přístup. Postup reakce s nejvyšším výtěžkem byl poté aplikován na zbylé heterocyklické sulfony. Benzothiazol-2-thiol reagoval s kyselinou 16-bromhexadekanovou v bazickém prostředí za vzniku sulfidového derivátu (**6**). V prvním postupu byl jako báze použit K_2CO_3 v DMF jako rozpouštědlo. Když po dvou hodinách nebyla na TLC patrná skvrna vznikajícího produktu, byla reakční směs zahřáta na 60 °C a reakce byla ponechána přes noc. Výtěžek této reakce byl 79 %. Jako druhá báze byl použit hydroxid draselný, totožným postupem byl dosažen výtěžek 93 %. Třetí bází byl lithium diisopropylamid, ale ani po 48 hod se nepodařilo pomocí TLC detekovat produkt

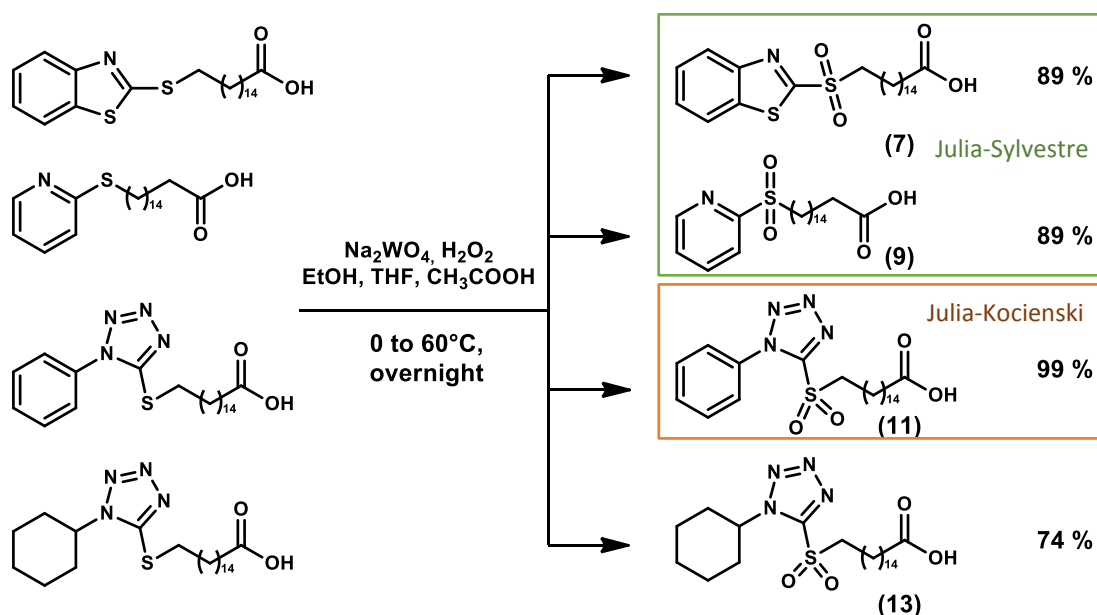
(pravděpodobně došlo k rozkladu). Nejvýhodnější tedy byla reakce v prostředí hydroxidu draselného a tento postup byl použit pro přípravu sulfidového derivátu **(8)** z pyridin-2-thiolu a kyseliny 16-bromhexadekanové s výtěžkem 80 %, sulfidového derivátu **(10)** z 1-fenyl-1*H*-tetrazol-5-thiolu a kyseliny 16-bromhexadekanové s výtěžkem 73 % a sulfidového derivátu **(12)** z 1-cyklohexyl-1*H*-tetrazol-5-thiolu a kyseliny 16-bromhexadekanové s výtěžkem 57 %. Příprava sulfidového derivátu hexadekanové kyseliny **(10)** byla následně ještě modifikována, při extrakci bylo nutné vyměnit organické rozpouštědlo, původní chloroform byl zaměněn za diethylether z důvodu nesnadného rozdělení organické a vodné vrstvy (výtěžek reakce s původní extrakcí byl pouze 47 %; Obr. 21).



Obr. 21: Optimalizace nukleofilní substituce při vzniku sulfidů (v oranžovém rámečku), jakožto meziproductů syntézy a příprava dalších derivátů sulfidů na základě odlišných heterocyklů.

Sulfidová skupina byla poté oxidována na sulfonovou 30% peroxidem vodíku za katalýzy wolframanem sodným. Ke stanovení reakčního času bylo v průběhu reakce nutné rozlišit různé oxidační stupně síry v reakční směsi: sulfid od meziproductu

sulfoxidu a od požadovaného sulfonu. K vyhodnocení TLC desek bylo proto s výhodou využito působení roztoku manganistanu draselného (s následným zahřátím), který umožňuje vizualizaci sulfoxidu na základě možné oxidace, avšak konečný sulfon nedetekuje, protože se jedná o konečný produkt oxidace a není jej možné dále oxidovat. Reakce tedy probíhala do doby, než byl postupně vznikající sulfoxid plně oxidován na sulfon (nebyl dále detekován na TLC) a reakční čas byl stanoven na 24 hod. Tímto postupem byly připraveny požadované sulfonové deriváty. Sulfony **(7)** a **(9)** s výtěžkem 89 % byly výchozími látkami pro Julia-Sylvestre olefinace, sulfon **(11)** s výtěžkem 99 % byl výchozí látkou pro Julia-Kocienski olefinaci a poslední ze sulfonů **(13)** s výtěžkem 74 % byl použit pro modifikovanou Julia-Kocienski olefinaci, která nebyla v dosavadní literatuře prozatím použita (Obr. 22).

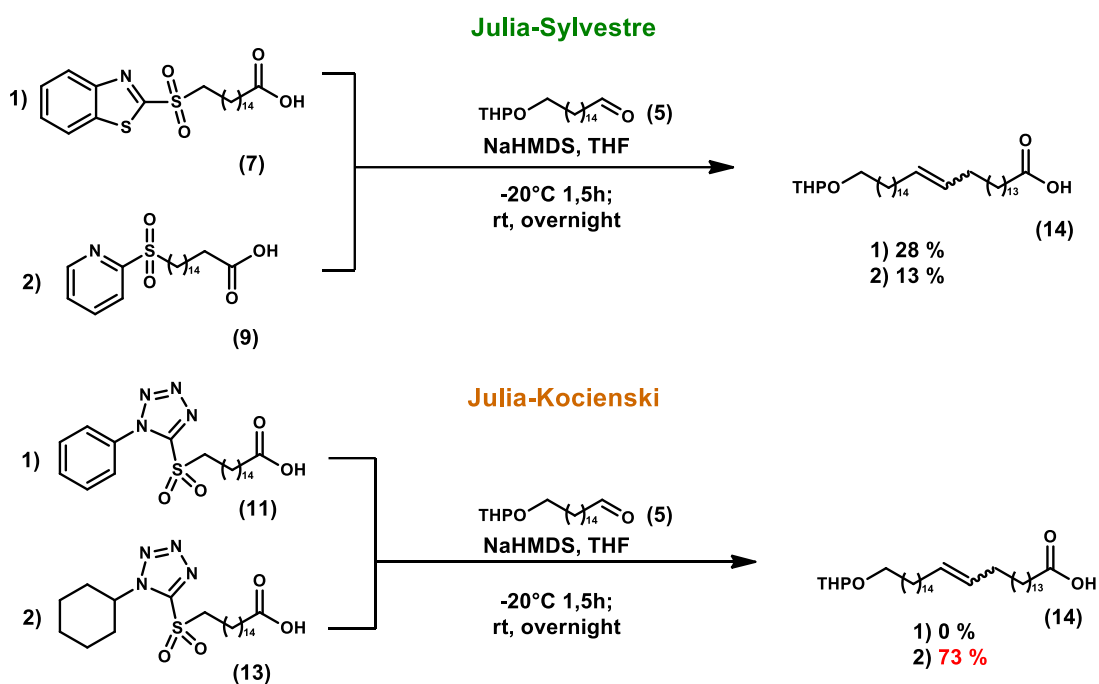


Obr. 22: Příprava sulfonových derivátů z dříve připravených sulfidových derivátů pomocí peroxidu vodíku.

Závěrečným krokem byla reakce připravených derivátů sulfonů hexadekanové kyseliny s aldehydem. U těchto reakcí byl analogicky použit postup jako u Wittigovy reakce, kdy vznikal ylid za chlazení. Julia-Sylvestre reakcí sulfonů **(7)** a **(9)** s aldehydem **(5)** se podařilo připravit nenasycenou mastnou kyselinu **(14)**

s výtěžkem 28 %, resp. 13 %, což nepřineslo žádné zlepšení. Julia-Kocienski reakcí sulfonu (**11**) a aldehydu (**5**) neposkytla požadovaný produkt (**14**), což je poměrně nečekané. Tato reakce bude ještě v budoucnu opakována, aby se tento výsledek potvrdil nebo vyvrátil.

Výrazného zlepšení jsme dosáhli až modifikací Julia-Kocienski olefinace, reakcí aldehydu (**5**) se sulfonovým derivátem hexadekanové kyseliny (**13**), který obsahoval cyklohexyltetrazolový fragment a jehož obdoby prozatím nebyly v dosavadní literatuře popsány. Díky této modifikaci jsme dosáhli velmi dobrého výtěžku 73 %, což je téměř dvojnásobek oproti v literatuře popsané Wittigově reakci, a tím se nám otevírají další možnosti pro modifikace syntézy.³⁶ Schémata všech provedených olefinačních reakcí jsou znázorněna na obrázku 22.



Obr. 22: Schémata olefinačních reakcí vedoucí k požadovanému nenasycenému meziproduktu. Poslední reakce schématu je prozatím nejnadějnější s výtěžkem přes 70 %.

Příprava aldehydu (**5**) probíhala díky ověřenému postupu velmi dobře. Díky pěti krokové syntéze s celkovým výtěžkem 42 % se podařilo připravit dostatečné množství jeho prekurzoru-alkoholu (**4**), který byl vždy v čas potřeby oxidován na

aldehyd **(5)**. Příprava ostatních výchozích látek (druhých partnerů pro olefinační reakce) probíhala poměrně dobře ve dvou nenáročných krocích. Celkové výtěžky těchto dvoukrokových reakcí se pohybovaly mezi 42 až 83 %. Do budoucna bude nutno některé reakce zopakovat ve větším množství a optimalizovat je vzhledem k proměnlivým výtěžkům jednotlivých reakcí. Obtížnou částí byly, dle očekávání, spojovací reakce. Zde jsme provedli celkově tři obměny Wittigovy reakce, které však nevedly k uspokojivému zlepšení. Následně byly provedeny čtyři spojovací reakce založených na postupu popsáném v literatuře, zejména obměnách Julia olefinace. Díky těmto reakcím se podařilo získat produkt (nenasycenou ultradlouhou kyselinu) s výtěžky mezi 13 až 73 %. Díky modifikaci Julia-Kocienski reakce (s cyklohexyltetrazolovým derivátem) jsme byli schopni dosáhnout výtěžku nad 70 %, který považujeme za největší úspěch této diplomové práce. Zacházení s aldehydem **(5)** se ukázalo jako velmi problematické. Aldehyd **(5)** se stáním částečně oxiduje na odpovídající kyselinu, proto je nutné mít pro každou jednotlivou reakci připraven čerstvý.

Z časových důvodů nedošlo ke kompletnímu dokončení syntézy kyseliny 32-hydroxydotriakontanové, reakční postup byl ukončen na úrovni jejího nenasyčeného prekurzoru. K úspěšnému dokončení celé syntézy zbývají další čtyři kroky, avšak tento postup je již v literatuře popsán a nepředpokládáme výraznější problémy při dokončování celé syntézy.

4. Experimentální část

4.1. Chemikálie, přístroje a pomůcky

Výchozí látky, rozpouštědla a další chemikálie a materiály byly dodané zavedenými dodavateli: Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Německo), Merck (Darmstadt, Německo) a PENTA (Praha, Česká republika). Další látky: (15-karboxypentadecyl)trifenylfosfonium bromid, 1-fenyl-1*H*-tetrazol-5-thiol a 1-cyklohexyl-1*H*-tetrazol-5-thiol byly připraveny v rámci jiných projektů v pracovní skupině.

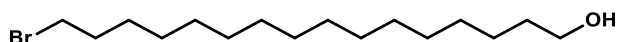
Na tenkovrstvou chromatografii (TLC) byly použity TLC desky Silica gel 60 F254 (Merck, Darmstadt, Německo). Na vyhodnocení (detekci) TLC desek byly použité dvě detekční směsi: 1) $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, $\text{H}_3[\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4]$, H_2SO_4 a voda; 2) KMnO_4 , H_2SO_4 a voda, vždy následovalo mírné až intenzivní zahřívání. Na charakterizaci látek pomocí NMR byly použity přístroje Varian Mercury-Vx BB 300 (NMR analýza; ^1H při 300 MHz a ^{13}C při 75 MHz), Varian VNMR S500 (^1H při 500 MHz a ^{13}C při 125 MHz).

NMR spektra byla vyhodnocena pomocí počítačového programu MestReNova. Schémata chemických reakcí byla vytvořena pomocí programu ChemDraw Professional.

4.2. Syntetická část

4.2.1. Syntéza 16-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)hexadekanalu

16-Bromhexadekanol (1)



Pracovní postup: 2,0 g kyseliny 16-bromhexadekanové (5,96 mmol) bylo vysušeno za použití hlubokého vakua, následně rozpuštěno ve 12 ml bezvodého THF a do tohoto roztoku bylo přidáno 7,2 ml (7,2 mmol) 1M roztoku $\text{BH}_3 \cdot \text{THF}$. Reakční směs byla míchána při laboratorní teplotě 24 hod pod argonovou atmosférou. Po 24 hod byl roztok odpařen na vakuové rotační odparce, zbytek rozpuštěn v MeOH a opět odpařen, aby se odstranily zbytky boranu. Tento postup byl opakován třikrát. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií za použití směsi Hex/EtOAc 9:1. Bylo izolováno 1,684 g produktu jako bílá krystalická látka.

Výtěžek: 89 % látky **1**.

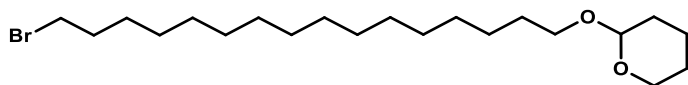
TLC (Hex/EtOAc – 3:1 s přidavkem 0,5 % CH_3COOH), $R_f = 0,56$.

Teplota tání: 51-53 °C.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 3.65 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 3.41 (t, $J = 6.9$ Hz, 2H), 1.93 – 1.78 (m, 2H), 1.64 – 1.52 (m, 2H), 1.48 – 1.38 (m, 4H), 1.38 – 1.22 (m, 20H).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 63.07, 34.06, 32.82, 32.78, 29.62, 29.59, 29.57, 29.52, 29.42, 28.75, 28.16, 25.72.

2-((16-bromhexadecyl)oxy)tetrahydro-2H-pyran (2)



Pracovní postup: 1,684 g sloučeniny **1** (5,24 mmol) bylo smícháno s 53,6 mg (2,13 mmol) pyridinium *p*-toluensulfátu, směs byla sušena za použití hlubokého vakua po dobu 1 hod. Tato směs byla rozpuštěna ve 20 ml bezvodého CHCl₃ a byl přidán 1 ml (10,9 mmol) 3,4-dihydro-2H-pyranu. Reakce probíhala při 85 °C pod zpětným chladičem a argonovou atmosférou po dobu 3 hod. Reakce byla ukončena přidáním 30 ml vody, směs byla následně extrahována do CHCl₃ (3 × 20 ml), organická vrstva byla vysušena pomocí Na₂SO₄. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií za použití směsi Hex/EtOAc 30:1. Výsledkem bylo 1,929 g olejovité bezbarvé látky.

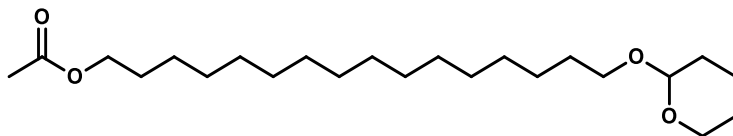
Výtěžek: 91 % látky **2**.

TLC: (Hex/EtOAc – 9:1), *R_f* = 0,56.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4.57 (t, *J* = 4.5, 2.8 Hz, 1H), 3.93 – 3.80 (m, 1H), 3.79 – 3.64 (m, 1H), 3.54 – 3.45 (m, 1H), 3.44 – 3.32 (m, 4H), 1.93 – 1.76 (m, 3H), 1.64 – 1.48 (m, 5H), 1.46 – 1.18 (m, 25H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 98.82, 67.68, 62.32, 34.05, 32.82, 30.76, 29.73, 29.63, 29.59, 29.57, 29.52, 29.47, 29.41, 28.75, 28.16, 26.22, 25.48, 19.68.

16-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)hexadecyl acetát (3)



Pracovní postup: 1,929 g (4,76 mmol) sloučeniny **2** bylo rozpuštěno ve 40 ml DMF, přidáno 0,47 g (5,73 mmol) octanu sodného a zahřáto na teplotu 90 °C, při kterých byla reakční směs udržována po dobu 6 hod v aparatuře pod zpětným chladičem. Po ochlazení na laboratorní teplotu byl DMF částečně odpařen (přibližně na jednu třetinu objemu), bylo přidáno 30 ml CHCl₃. Následovala extrakce vodou (4 × 50 ml) k odstranění DMF a nezreagovaného octanu sodného. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií za použití směsi Hex/EtOAc 25:1. Výsledkem bylo 1,358 g bezbarvé olejovité látky.

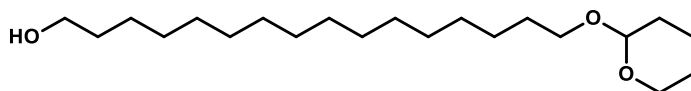
Výtěžek: 74 % látky **3**.

TLC: (Hex/EtOAc 6:1), $R_f = 0,55$.

¹H NMR (300 MHz, CDCl₃) δ 4.56 (t, $J = 4.5, 2.7$ Hz, 1H), 4.03 (t, $J = 6.8$ Hz, 2H), 3.92 – 3.81 (m, 1H), 3.77 – 3.64 (m, 1H), 3.55 – 3.43 (m, 1H), 3.42 – 3.30 (m, 1H), 2.03 (s, 3H), 1.91 – 1.65 (m, 2H), 1.66 – 1.42 (m, 3H), 1.35 – 1.19 (m, 29H).

¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃) δ 171.20, 98.79, 67.66, 64.63, 62.29, 30.75, 29.72, 29.62, 29.60, 29.58, 29.57, 29.53, 29.48, 29.46, 29.22, 28.56, 26.21, 25.87, 25.47, 20.98, 19.66.

16-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)hexadekan-1-ol (4)



Pracovní postup: 1,358 g (3,53 mmol) látky **3** bylo vysušeno na hlubokém vakuu, rozpuštěno v 5 ml bezvodého THF, ochlazeno na 0 °C pomocí ledové lázně a po kapkách bylo přidáno 9 ml (9 mmol) 1M roztoku LiAlH₄ v THF, to vše pod atmosférou argonu. Reakční směs byla pomalu zahřívána na laboratorní teplotu a míchána přes noc. Reakce byla ukončena opatrným přidáváním vody po kapkách za chlazení v ledové lázni. Vzhledem k výskytu sraženiny bylo přidáno větší množství vody, roztok byl zfiltrován a sraženina důkladně promyta CHCl₃. Následovala extrakce do CHCl₃ (3 × 15 ml) a vysušení Na₂SO₄. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií za použití směsi Hex/EtOAc 7:1. Výsledkem bylo 1,045 g bílé krystalické látky.

Výtěžek: 86 % látky **4**.

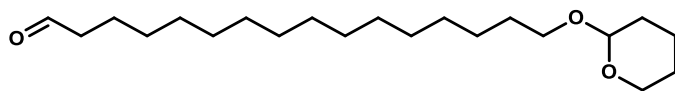
TLC: (Hex/EtOAc 3:1), *R_f* = 0,44.

Teplota tání: 34-36 °C.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 4.58 (t, *J* = 4.5, 2.8 Hz, 1H), 3.94 – 3.84 (m, 1H), 3.79 – 3.69 (m, 1H), 3.64 (t, *J* = 6.7 Hz, 2H), 3.55 – 3.47 (m, 1H), 3.44 – 3.31 (m, 1H), 1.91 – 1.78 (m, 1H), 1.77 – 1.64 (m, 2H), 1.64 – 1.46 (m, 8H), 1.41 – 1.18 (m, 23H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 98.82, 67.69, 63.04, 62.31, 32.79, 30.77, 29.73, 29.62, 29.58, 29.56, 29.47, 29.41, 26.22, 25.72, 25.49, 19.67.

16-((tetrahydro-2H-pyran-2-yl)oxy)hexadecanal (5)



Pracovní postup: 0,23 ml (2,68 mmol) $(\text{COCl})_2$ bylo rozpuštěno v 11,7 ml bezvodého DCM pod argonovou atmosférou a reakční směs byla ochlazená na $-55\text{ }^\circ\text{C}$. 0,42 ml (5,91 mmol) bezvodého DMSO bylo rozpuštěno v 5,9 ml bezvodého DCM a tento roztok byl přenesen do reakční baňky s roztokem $(\text{COCl})_2$. Po 10 min bylo přidáno 0,645 g (1,8 mmol) látky **4** rozpuštěné v 5,9 ml DCM po kapkách. Reakce byla ponechána při $-55\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 1,5 hod. Poté bylo přidáno 0,8 ml (5,74 mmol) bezvodého TEA a reakce byla pomalu zahřívána na pokojovou teplotu a ponechána za stálého míchání přes noc. Reakce byla ukončena přidáním 20 ml 20% roztoku NaCl, extrahována do chloroformu ($3 \times 20\text{ ml}$) a vysušena bezvodým Na_2SO_4 . Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií za použití směsi Hex/EtOAc 15:1. Výsledkem bylo 0,521 g bezbarvé olejovité látky.

Výtěžek: 81 % látky **5**.

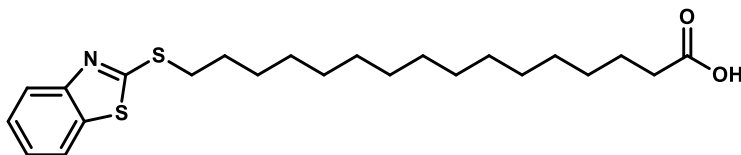
TLC: (Hex/EtOAc 6:1), $R_f = 0,58$.

$^1\text{H NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ 9.77 (t, $J = 1.9\text{ Hz}$, 1H), 4.58 (t, $J = 4.5, 2.8\text{ Hz}$, 1H), 3.93 – 3.83 (m, 1H), 3.79 – 3.65 (m, 1H), 3.58 – 3.46 (m, 1H), 3.43 – 3.30 (m, 1H), 2.53 – 2.34 (m, 2H), 1.88 – 1.78 (m, 1H), 1.76 – 1.67 (m, 1H), 1.67 – 1.46 (m, 6H), 1.46 – 1.21 (m, 24H).

$^{13}\text{C NMR}$ (126 MHz, CDCl_3) δ 202.93, 98.83, 67.68, 62.32, 43.90, 30.78, 30.30, 29.74, 29.66, 29.62, 29.60, 29.58, 29.55, 29.47, 29.40, 29.33, 29.15, 26.22, 25.49, 22.07, 19.69.

4.2.2. Syntéza sulfonových derivátů hexadekanové kyseliny

16-(benzo[d]thiazol-2-ylsulfanyl)hexadekanová kyselina (**6**) (metoda A)



Pracovní postup: Bylo naváženo 50 mg (0,14 mmol) kyseliny 16-bromhexadekanové, 27 mg (0,16 mmol) benzothiazol-2-thiolu a 51 mg (0,37 mmol) uhličitanu draselného. Tato navážka byla rozpuštěna v 5 ml DMF za vzniku zakaleného žlutého roztoku. Reakční směs byla zahřívána na 60 °C a ponechána za stálého míchání přes noc, kdy došlo ke změně zbarvení reakční směsi ze žluté na bílou. Dle TLC nebyla detekována výchozí látka, proto bylo zahřívání ukončeno a reakční směs byla ochlazena na laboratorní teplotu. Bylo přidáno 15 ml chloroformu a 15 ml vody. Směs byla okyselena přibližně na pH 1, organická vrstva byla extrahována vodou (3 × 30 ml) a vysušena bezvodým Na₂SO₄. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií za použití směsi CHCl₃/MeOH 100:1. Výsledkem bylo 50 mg bílé krystalické látky.

Výtěžek: 79 % látky **6**.

TLC: (Hex/EtOAc 2:1, 0,5 % CH₃COOH), *R_f* = 0,5.

Teplota tání: 70,5-72,5 °C.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.88 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 8.0, 0.8 Hz, 1H), 7.46 – 7.37 (m, 1H), 7.32 – 7.28 (m, 1H), 3.35 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.36 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.88 – 1.76 (m, 2H), 1.70 – 1.58 (m, 2H), 1.56 – 1.41 (m, 2H), 1.40 – 1.14 (m, 20H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 179.57, 167.51, 153.33, 135.11, 125.98, 124.08, 121.43, 120.87, 33.98, 33.66, 29.58, 29.54, 29.52, 29.42, 29.40, 29.21, 29.17, 29.06, 29.04, 28.74, 24.67.

16-(benzo[*d*]thiazol-2-ylsulfanyl)hexadekanová kyselina (6) (metoda B)

Pracovní postup: Bylo naváženo 50 mg (0,14 mmol) kyseliny 16-bromhexadekanové, 27 mg (0,16 mmol) benzothiazol-2-thiolu a 21 mg (0,37 mmol) hydroxidu draselného. Tato navážka byla rozpuštěna v 5 ml DMF za vzniku čirého žlutého roztoku. Reakční směs byla zahřívána na 60 °C a ponechána za stálého míchání přes noc, kdy došlo ke změně zbarvení reakční směsi ze žluté na bílou. Zahřívání bylo ukončeno a reakční směs byla ochlazena na laboratorní teplotu. Bylo přidáno 15 ml chloroformu a 15 ml vody. Směs byla okyselena přibližně na pH 1, organická vrstva byla extrahována vodou (3 × 30 ml) a vysušena bezvodým Na₂SO₄. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií za použití směsi CHCl₃/MeOH 100:1. Výsledkem bylo 59 mg bílé krystalické látky.

Výtěžek: 93 % látky 6.

TLC: (Hex/EtOAc 2:1, 0,5 % CH₃COOH), *R_f* = 0,5.

Teplota tání: 70,5-72,5 °C.

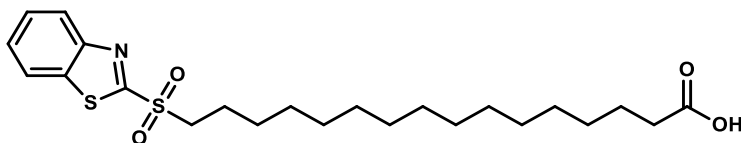
¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.88 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.76 (d, *J* = 8.0, 0.8 Hz, 1H), 7.46 – 7.37 (m, 1H), 7.32 – 7.28 (m, 1H), 3.35 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.36 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.88 – 1.76 (m, 2H), 1.70 – 1.58 (m, 2H), 1.56 – 1.41 (m, 2H), 1.40 – 1.14 (m, 20H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 179.57, 167.51, 153.33, 135.11, 125.98, 124.08, 121.43, 120.87, 33.98, 33.66, 29.58, 29.54, 29.52, 29.42, 29.40, 29.21, 29.17, 29.06, 29.04, 28.74, 24.67.

16-(benzo[*d*]thiazol-2-ylsulfanyl)hexadekanová kyselina (6) (metoda C)

Pracovní postup: Bylo naváženo 50 mg (0,14 mmol) kyseliny 16-bromhexadekanové, 27 mg (0,16 mmol) benzothiazol-2-thiolu, vysušeno na hlubokém vakuu a rozpuštěno v 5 ml bezvodého THF. Za chlazení v ledové lázni bylo přidáno 186 μl (0,37 mmol) 2M roztoku LDA v THF, po tomto přidavku byla chladicí lázeň odstraněna. Reakční směs byla ponechána za stálého míchání 48 hod. Produkt nebyl na TLC detekovaný, proto byla reakce ukončena a dále nebyla zpracovávána.

16-(benzo[d]thiazol-2-ylsulfonyl)hexadekanová kyselina (7)



Pracovní postup: 74,8 mg (0,16 mmol) látky **6** bylo naváženo, rozpuštěno v 1,5 ml EtOH, 1,5 ml CH₃COOH a 1,5 ml THF, ochlazeno na 0 °C, kdy bylo přidáno 15 mg (0,05 mmol) Na₂WO₄·2H₂O a po pěti minutách 600 µl (5,87 mmol) 30% H₂O₂. Po 10 min byl roztok bíle zakalen, po zahřátí na pokojovou teplotu se stal čirým. Reakce byla pozvolna zahřáta na 60 °C a opět ponechána přes noc pod zpětným chladičem. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla reakce ukončena přidáním 7 ml nasyceného roztoku Na₂S₂O₃ a vodná vrstva byla extrahována chloroformem (3 × 40 ml). Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií za použití směsi CHCl₃/MeOH 100:1. Výsledkem bylo 72 mg bílé krystalické látky.

Výtěžek: 89 % látky **7**.

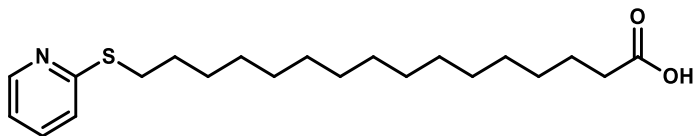
TLC: (Hex/EtOAc 2:1, 0,5 % CH₃COOH), *R_f* = 0,44.

Teplota tání: 117-119 °C.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.23 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 8.03 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.68 – 7.57 (m, 2H), 3.52 (t, 2H), 2.35 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.94 – 1.82 (m, 2H), 1.70 – 1.58 (m, 2H), 1.51 – 1.39 (m, 2H), 1.39 – 1.10 (m, 20H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 179.51, 165.94, 152.72, 136.75, 127.97, 127.62, 125.43, 122.32, 54.70, 33.94, 29.67, 29.54, 29.52, 29.49, 29.40, 29.38, 29.20, 29.15, 29.02, 28.87, 28.20, 24.65, 22.22.

16-(pyridin-2-ylsulfanyl)hexadekanová kyselina (8)



Pracovní postup: Bylo naváženo 100 mg (0,28 mmol) kyseliny 16-bromhexadekanové, 36 mg (0,32 mmol) pyridin-2-thiolu, 42 mg (0,74 mmol) KOH, rozpuštěno v 5 ml DMF a zahříváno na 60 °C pod zpětným chladičem přes noc. Reakce byla ochlazená na laboratorní teplotu a odpařena na vakuové odparce do sucha. Následně byla směs rozpuštěna v 60 ml diethyletheru, bylo přidáno 40 ml vody a směs byla okyselena přibližně na pH 1. Organická vrstva byla poté extrahována vodou (3 × 40 ml), vysušena bezvodým Na₂SO₄ a odpařena na vakuové odparce. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií za použití směsi CHCl₃/MeOH 100:1. Výsledkem bylo 87 mg bílé krystalické látky.

Výtěžek: 80 % látky **10**.

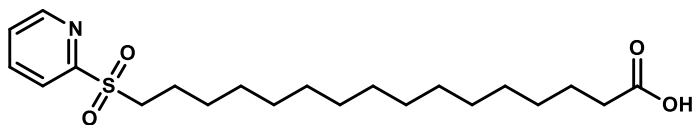
TLC: (Hex/EtOAc 2:1, 0,5 % CH₃COOH), *R_f* = 0,6.

Teplota tání: 69-71 °C.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.47 – 8.41 (m, 1H), 7.51 – 7.44 (m, 1H), 7.20 – 7.14 (m, 1H), 7.01 – 6.93 (m, 1H), 3.17 – 3.13 (m, 2H), 2.35 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.76 – 1.59 (m, 4H), 1.52 – 1.40 (m, 2H), 1.39 – 1.19 (m, 20H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 179.39, 159.66, 149.36, 135.89, 122.13, 119.19, 34.01, 30.23, 29.58, 29.56, 29.53, 29.48, 29.38, 29.26, 29.21, 29.18, 29.04, 28.94, 24.70.

16-(pyridin-2-ylsulfonyl)hexadekanová kyselina (9)



Pracovní postup: 72 mg (0,198 mmol) látky **10** bylo rozpuštěno ve 2 ml 93% EtOH, 2 ml CH₃COOH a 2 ml THF. Reakční směs byla ochlazena na 0 °C, bylo přidáno 15 mg (0,042 mmol) Na₂WO₄·2H₂O, po pěti minutách bylo přidáno 600 μl (5,86 mmol) 30% H₂O₂ a reakce byla ponechána 30 min při 0 °C. Reakce byla pozvolna zahřívána na 60 °C a pod zpětným chladičem ponechána za stálého míchání po dobu 24 hod. Reakce byla ukončena přidáním 10 ml nasyceného roztoku Na₂S₂O₃ a vodná vrstva byla extrahována chloroformem (3 × 40 ml). Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií za použití směsi CHCl₃/MeOH 100:1. Výsledkem bylo 70 mg bílé krystalické látky.

Výtěžek: 89 % látky **11**.

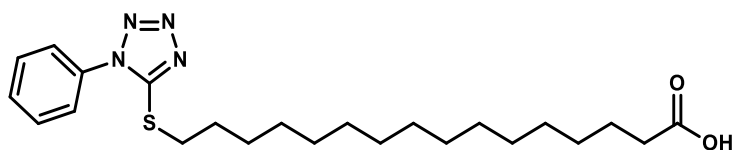
TLC: (Hex/EtOAc 2:1, 0,5 % CH₃COOH), *R_f* = 0,18.

Teplota tání: 88-90 °C.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 8.79 – 8.73 (m, 1H), 8.15 – 8.06 (m, 1H), 8.03 – 7.93 (m, 1H), 7.61 – 7.49 (m, 1H), 3.43 – 3.35 (m, 2H), 2.34 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.80 – 1.68 (m, 2H), 1.68 – 1.57 (m, 2H), 1.42 – 1.09 (m, 22H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 179.21, 157.30, 150.20, 138.13, 127.27, 122.16, 51.91, 33.98, 29.54, 29.51, 29.49, 29.41, 29.37, 29.20, 29.16, 29.03, 28.92, 28.29, 24.68, 22.02.

16-((1-fenyl-1*H*-tetrazol-5-yl)sulfanyl)hexadekanová kyselina (10)



Pracovní postup: Bylo naváženo 100 mg (0,28 mmol) kyseliny 16-bromhexadekanové, 58 mg (0,32 mmol) 1-fenyl-1*H*-tetrazol-5-thiolu, 42 mg (0,74 mmol) KOH, rozpuštěno v 8 ml DMF a zahříváno na 60 °C pod zpětným chladičem přes noc. Reakce byla ochlazena na laboratorní teplotu, bylo přidáno 25 ml chloroformu, 25 ml vody a směs byla okyselena přibližně na pH 1, organická vrstva byla extrahována vodou (3 × 40 ml), vysušena bezvodým Na₂SO₄ a odpařena na vakuové odparce. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií za použití směsi CHCl₃/MeOH 100:1. Výsledkem bylo 94 mg bílé krystalické látky.

Výtěžek: 73 % látky **8**.

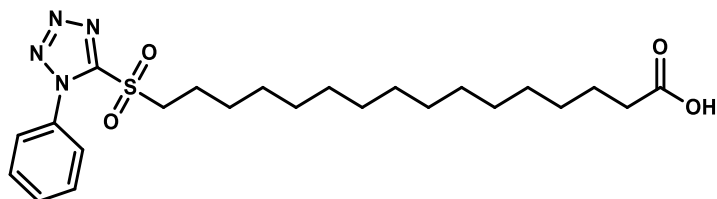
TLC: (Hex/EtOAc 2:1, 0,5 % CH₃COOH), *R_f* = 0,88.

Teplota tání: 70-72 °C.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.72 – 7.40 (m, 5H), 3.40 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.35 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.90 – 1.74 (m, 2H), 1.70 – 1.55 (m, 2H), 1.50 – 1.40 (m, 2H), 1.37 – 1.19 (m, 20H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 179.54, 154.52, 133.75, 130.04, 129.74, 123.85, 34.04, 33.37, 29.68, 29.58, 29.56, 29.54, 29.50, 29.40, 29.21, 29.06, 29.05, 29.00, 28.62, 24.70.

16-((1-fenyl-1H-tetrazol-5-yl)sulfonyl)hexadekanová kyselina (11)



Pracovní postup: 40 mg (0,09 mmol) látky **8** bylo rozpuštěno v 1 ml 96% EtOH, 1 ml CH₃COOH a 1 ml THF. Reakční směs byla ochlazena na 0 °C, bylo přidáno 7 mg (0,02 mmol) Na₂WO₄·2H₂O, po pěti minutách bylo přidáno 300 μl (2,93 mmol) 30% H₂O₂ a reakce byla ponechána 30 min při 0 °C. Reakce byla pozvolna zahřáta na 60 °C a pod zpětným chladičem ponechána za stálého míchání po dobu 24 hod. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla reakce ukončena přidáním 5 ml nasyceného roztoku Na₂S₂O₃ a vodná vrstva byla extrahována chloroformem (3 × 30 ml). Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií za použití směsi CHCl₃/MeOH 100:1. Výsledkem bylo 41 mg bílé krystalické látky.

Výtěžek: 99 % látky **9**.

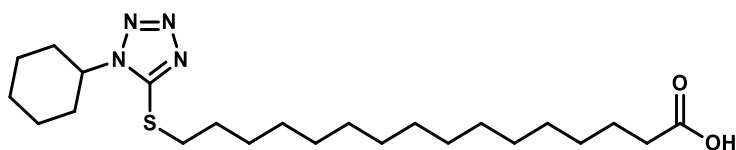
TLC: (Hex/EtOAc 2:1, 0,5 % CH₃COOH), *R_f* = 0,71.

Teplota tání: 80-82 °C.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.73 – 7.57 (m, 5H), 3.80 – 3.68 (m, 2H), 2.35 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.03 – 1.86 (m, 2H), 1.70 – 1.58 (m, 2H), 1.56 – 1.46 (m, 2H), 1.40 – 1.17 (m, 20H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 179.50, 153.50, 133.06, 131.43, 129.69, 125.06, 56.01, 33.93, 29.56, 29.53, 29.51, 29.41, 29.39, 29.20, 29.16, 29.03, 28.87, 28.12, 24.66, 21.93.

16-((1-cyclohexyl-1H-tetrazol-5-yl)sulfanyl)hexadekanová kyselina (12)



Pracovní postup: Bylo naváženo 100 mg (0,28 mmol) kyseliny 16-bromhexadekanové, 60 mg (0,32 mmol) 1-cyklohexyl-1H-tetrazol-5-thiolu, 42 mg (0,74 mmol) KOH, rozpuštěno v 5 ml DMF a zahříváno na 60 °C pod zpětným chladičem přes noc. Reakce byla ochlazena na laboratorní teplotu a odpařena na vakuové odparce do sucha. Následně byla směs rozpuštěna v 40 ml diethyletheru, bylo přidáno 40 ml vody a směs byla okyselena přibližně na pH 1. Organická vrstva byla poté extrahována vodou (3 × 40 ml), vysušena bezvodým Na₂SO₄ a odpařena na vakuové odparce. Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií za použití směsi CHCl₃/MeOH 100:1. Výsledkem bylo 74 mg bílé krystalické látky.

Výtěžek: 57 % látky **12**.

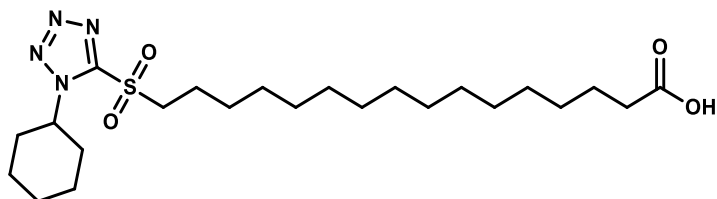
TLC: (Hex/EtOAc 2:1, 0,5 % CH₃COOH), R_f = 0,46.

Teplota tání: 75-77 °C.

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 4.23 – 4.02 (m, 1H), 3.35 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H), 2.35 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.09 – 2.01 (m, 2H), 2.00 – 1.90 (m, 4H), 1.86 – 1.70 (m, 4H), 1.70 – 1.54 (m, 2H), 1.49 – 1.40 (m, 4H), 1.38 – 1.19 (m, 20H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 179.35, 152.90, 58.11, 33.95, 33.18, 31.95, 29.66, 29.56, 29.55, 29.52, 29.49, 29.40, 29.37, 29.28, 29.19, 29.02, 28.99, 28.57, 25.16, 24.83, 24.66.

16-((1-cyclohexyl-1H-tetrazol-5-yl)sulfonyl)hexadekanová kyselina (13)



Pracovní postup: 63,5 mg (0,14 mmol) látky **12** bylo rozpuštěno v 2 ml 96% EtOH, 2 ml CH₃COOH a 2 ml THF. Reakční směs byla ochlazená na 0 °C, bylo přidáno 12 mg (0,036 mmol) Na₂WO₄·2H₂O, po pěti minutách bylo přidáno 500 μl (4,89 mmol) 30% H₂O₂ a reakce byla ponechána 30 min při 0 °C. Reakce byla pozvolna zahřáta na 60 °C a pod zpětným chladičem ponechána za stálého míchání po dobu 24 hod. Po ochlazení na laboratorní teplotu byla ukončena přidáním 7 ml nasyceného roztoku Na₂S₂O₃ a vodná vrstva byla extrahována chloroformem (3 × 20 ml). Produkt byl přečištěn sloupcovou chromatografií za použití směsi CHCl₃/MeOH 100:1. Výsledkem bylo 51 mg bílé krystalické látky.

Výtěžek: 74 % látky **13**.

TLC: (Hex/EtOAc 2:1, 0,5 % CH₃COOH), R_f = 0,33.

Teplota tání: 69-71 °C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 4.99 – 4.82 (m, 1H), 3.73 – 3.65 (m, 2H), 2.35 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.24 – 2.14 (m, 2H), 2.09 – 1.86 (m, 7H), 1.86 – 1.73 (m, 1H), 1.70 – 1.56 (m, 2H), 1.57 – 1.42 (m, 4H), 1.41 – 1.14 (m, 20H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 179.48, 152.62, 60.87, 55.85, 33.94, 32.89, 29.56, 29.53, 29.50, 29.41, 29.39, 29.20, 29.16, 29.03, 28.87, 28.11, 25.06, 24.69, 24.66, 21.92.

Varianta B: Wittigova reakce, tvorba ylidu 1 hod při laboratorní teplotě, dvojnásobný reakční čas

Pracovní postup reakce je totožný s variantou A, stejné byly i navážky výchozích látek, rozpouštědel a reaktantů. Reakční čas byl prodloužen z 24 hodin na 48 hodin. Výsledkem bylo 16 mg bílé krystalické látky.

Výtěžek: 33 % látky **14**.

Varianta C: Wittigova reakce, tvorba ylidu 1,5 hod při -20 °C

Pracovní postup reakce je totožný s variantou A, stejné byly navážky výchozích látek, rozpouštědel a reaktantů. Teplota tvorby ylidu byla -20 °C po dobu 1,5 hod. Výsledkem bylo 19 mg bílé krystalické látky.

Výtěžek: 41 % látky **14**.

Varianta D: Julia-Sylvestre olefinace

Pracovní postup: 23,2 mg (0,05 mmol) látky **7** bylo rozpuštěno v 1,5 ml bezvodého THF a ochlazeno na -20 °C pod argonovou atmosférou. Poté bylo přidáno 0,089 ml (0,089 mmol) 1M roztoku bis(trimethyl)silylamidu sodného v THF a reakce byla ponechána dalších 1,5 hod za chlazení. K výslednému oranžovému roztoku bylo přidáno 14,2 mg (0,04 mmol) aldehydu **5** rozpuštěného v 0,9 ml bezvodého THF za vzniku světle žlutého roztoku. Bylo pokračováno v chlazení dalších 30 min, následovalo pomalé zahřívání na laboratorní teplotu a reakce byla ponechána za stálého míchání přes noc. Reakce byla ukončena přidáním 1 ml nasyceného roztoku NH₄Cl a okyselená koncentrovanou HCl na pH 1. Extrakci do chloroformu (3 × 15 ml) následovala sloupcová chromatografie, nejdříve za použití směsi Hex/EtOAc 15:1 do vymytí veškerého zbylého aldehydu, poté bylo do mobilní fáze přidáno 0,5 % CH₃COOH. Výsledkem bylo 6 mg bílé krystalické látky.

Výtěžek: 28 % látky **14**.

Varianta E: Julia-Sylvestre olefinace

Pracovní postup: 75,2 mg (0,189 mmol) látky **9** bylo rozpuštěno v 2 ml bezvodého THF a ochlazeno na -20 °C pod argonovou atmosférou. Poté bylo přidáno 0,33 ml (0,33 mmol) 1M roztoku bis(trimethyl)silylamidu sodného v THF a reakce byla ponechána dalších 1,5 hod za chlazení. K výslednému oranžovému roztoku bylo přidáno 41,3 mg (0,121 mmol) aldehydu **5** rozpuštěného v 2,5 ml bezvodého THF za vzniku světle žlutého roztoku. Bylo pokračováno v chlazení dalších 30 min, následovalo pomalé zahřívání na pokojovou teplotu a reakce byla ponechána za stálého míchání přes noc. Reakce byla ukončena přidáním 5 ml nasyceného roztoku NH₄Cl a okyselena koncentrovanou HCl na pH 1. Extrakci do chloroformu (4 × 15 ml) následovala sloupcová chromatografie, nejdříve za použití směsi Hex/EtOAc 15:1 do vymytí veškerého zbylého aldehydu, poté bylo do mobilní fáze přidáno 0,5 % CH₃COOH. Výsledkem bylo 9 mg bílé krystalické látky.

Výtěžek: 13 % látky **14**.

Varianta F: Julia-Kocienski olefinace

Pracovní postup: 40 mg (0,0837 mmol) látky **11** bylo rozpuštěno v 1,5 ml bezvodého THF a ochlazeno na -20 °C pod argonovou atmosférou. Poté bylo přidáno 0,15 ml (0,15 mmol) 1M roztoku bis(trimethyl)silylamidu sodného v THF a reakce byla ponechána dalších 1,5 hod za chlazení. K výslednému oranžovému roztoku bylo přidáno 22 mg (0,064 mmol) aldehydu **5** rozpuštěného v 1,53 ml bezvodého THF za vzniku světle žlutého roztoku. Bylo pokračováno v chlazení dalších 30 min, následovalo pomalé zahřívání na pokojovou teplotu a reakce byla ponechána za stálého míchání přes noc. Reakce byla ukončena přidáním 5 ml nasyceného roztoku NH₄Cl a okyselena koncentrovanou HCl na pH 1. Extrakci do chloroformu (4 × 15 ml) následovala sloupcová chromatografie, nejdříve za použití směsi Hex/EtOAc 15:1 do vymytí veškerého zbylého aldehydu, poté bylo do mobilní fáze přidáno 0,5 % CH₃COOH. Výsledkem bylo 24,3 mg bílé krystalické látky. Požadována látka nebyla pomocí NMR analýzy detekována.

Varianta G

Pracovní postup: 40 mg (0,084 mmol) látky **13** bylo rozpuštěno v 1,5 ml bezvodého THF a ochlazeno na - 20 °C pod argonovou atmosférou. Poté bylo přidáno 0,16 ml (0,16 mmol) 1M roztoku bis(trimethyl)silylamidu sodného v THF a reakce byla ponechána dalších 1,5 hod za chlazení. K výslednému hnědému roztoku bylo přidáno 22 mg (0,064 mmol) aldehydu **5** rozpuštěného v 1,6 ml bezvodého THF. Bylo pokračováno v chlazení dalších 30 min, následovalo pomalé zahřívání na laboratorní teplotu a reakce byla ponechána za stálého míchání přes noc za vzniku oranžového roztoku. Reakce byla ukončena přidáním 5 ml nasyceného roztoku NH₄Cl a okyselena koncentrovanou HCl na pH 1. Extrakci do chloroformu (4 × 15 ml) následovala sloupcová chromatografie, nejdříve za použití směsi Hex/EtOAc 15:1 do vymytí veškerého zbylého aldehydu, poté bylo do mobilní fáze přidáno 0,5 % CH₃COOH. Výsledkem bylo 27 mg bílé krystalické látky.

Výtěžek: 73 % látky **14**.

Charakterizace látky **14**:

TLC: (Hex/EtOAc 6:1, 0,5 % CH₃COOH), $R_f = 0,38$.

Teplota tání: 46,5-48,5 °C

¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 5.40 – 5.37 (m, 1H), 5.37 – 5.33 (m, 1H), 4.62 – 4.54 (m, 1H), 3.93 – 3.82 (m, 1H), 3.79 – 3.66 (m, 1H), 3.56 – 3.45 (m, 1H), 3.43 – 3.32 (m, 1H), 2.34 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H), 2.08 – 1.92 (m, 4H), 1.89 – 1.77 (m, 1H), 1.76 – 1.67 (m, 1H), 1.67 – 1.44 (m, 6H), 1.39 – 1.20 (m, 48H).

¹³C NMR (126 MHz, CDCl₃) δ 179.37, 130.32, 129.85, 98.77, 67.67, 62.24, 53.40, 34.00, 32.57, 30.73, 29.74, 29.71, 29.65, 29.64, 29.62, 29.59, 29.57, 29.53, 29.50, 29.46, 29.41, 29.28, 29.22, 29.13, 29.04, 27.17, 26.20, 25.47, 24.69, 19.62.

5. Závěr

Hlavním cílem této práce byla optimalizace syntézy 32-hydroxydotriakontanové kyseliny, která tvoří základ molekuly všech acylCer. Pro splnění tohoto cíle jsme si stanovili tři dílčí cíle: pokusit se změnit podmínky dříve popsaného postupu zahrnujícího Wittigovu reakci, prověřit možnost využití jiného typu spojovací reakce při tvorbě ultradlouhého řetězce a na závěr dokončení celé syntézy vedoucí k ultradlouhé kyselině.

Bylo vyzkoušeno několik různých úprav podmínek publikované Wittigovy reakce, zahrnující změny teploty přípravy fosfonium ylidu a změny jednotlivých reakčních časů, avšak nedošlo k požadovanému zvýšení výtěžku. Tato reakce je pravděpodobně na hranici svých možností a nízká reaktivita výchozích látek v kombinaci s nízkou rozpustností vznikajícího produktu příliš neumožňují dále zvyšovat výtěžek nad přibližně 40 %, čehož bylo opakovaně dosaženo. Další možnou komplikací reakce je částečná nestabilita výchozího aldehydu (**5**), který se relativně snadno oxiduje na kyselinu, a proto je vždy nutné pracovat s čerstvě připraveným, aby se této komplikaci předešlo.

Dalším dílčím cílem bylo prověřit možnost uplatnění jiného typu spojovací reakce při tvorbě ultradlouhého řetězce. Zvoleno bylo několik reakcí odvozených od Julia olefinace, u kterých se předpokládalo, že by mohly fungovat lépe než dříve popsaná Wittigova reakce. Postupně se podařilo připravit sérii v literatuře dosud nepopsaných heterocyklických sulfonových derivátů hexadekanové kyseliny, které se staly výchozími látkami pro tyto modifikace olefinačních reakcí. Díky jedné z těchto modifikací (Julia-Kocienski reakce s využitím cyklohexyltetrazolového derivátu kyseliny) se podařilo zvýšit výtěžek reakce nad 70 %, což je dvojnásobek oproti dříve popsanému postupu. Tento úspěch tak otevírá další možnosti zkoumání přípravy extrémně dlouhých uhlovodíkových řetězců.

Posledním dílčím cílem bylo využití takto připravených nenasycených ultradlouhých mastných kyselin k přípravě konečného produktu, tedy 32-hydroxydotriakontanové kyseliny. Z časových důvodů se bohužel nepodařilo celou tuto syntézu dovést do zdárného konce, avšak následující postup byl již publikován, a v budoucnu nepředpokládáme žádné výrazné problémy s dokončením celého reakčního postupu. K dokončení kompletní syntézy kyseliny 32-hydroxydotriakontanové zbývají už jen 4 kroky. Následujícím krokem by bylo převedení karboxylové kyseliny před hydrogenací nenasycené mastné kyseliny (**14**) na methylester. Dále by následovala katalytická hydrogenace, ochránění THP skupiny a bazické odštěpení methylové skupiny.

Vzhledem k proměnlivým výtěžkům některých nově popsaných reakcí (zejména příprava sulfonových derivátů), bude v budoucnu také potřeba provést optimalizace jejich podmínek. V delším časovém horizontu bude připravená výsledná 32-hydroxydotriakontanová kyselina využita k zabudování do molekul ω -O-acylceramidů a ω -OH ceramidů, případně bude navázána na pevný nosič jakožto náhrada za korneocytální lipidovou obálku v modelech kožní bariéry.

6. Seznam zkratek

Ac ₂ O	anhydrid kyseliny octové
AcylCer	acylceramid
Cer	ceramid
CerS	ceramid syntáza
CoA	koenzym A
DCM	dichlormethan
DES	desaturáza
DMF	dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
EEDQ	<i>N</i> -ethoxykarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydrochinolin
EtOAc	ethylacetát
EtOH	ethanol
Hex	hexan
HMPA	hexamethylfosforamid
LDA	lithium diisopropylamid
MeOH	methanol
MK	mastná kyselina
NaHMDS	bis(trimethylsilyl)amid sodný
NMR	nukleární magnetická resonance
PCC	pyridinium chlorochromát
R _f	retenční faktor
SC	<i>stratum corneum</i>
TEA	triethylamin
TBDPS	terc-butyldifenylsilylether
THF	tetrahydrofuran
THP	tetrahydropyranylová skupina
TLC	tenkovrstvá chromatografie

7. Použitá literatura

1. Lai-Cheong, J. E.; McGrath, J. A., Structure and function of skin, hair and nails. *Medicine* **2017**, *45* (6), 347-351.
2. Čihák, R., *Anatomie 3*. 1. ed.; Grada Publishing: Praha, Czech Republic, **1997**.
3. Kittnar, O., *Lékařská fyziologie*. Grada: Praha, Czech Republic, **2011**.
4. Hrabálek, A.; Vávrová, K., Lze překonat kožní bariéru? *Praktické lékárenství* **2006**, *1* (1), 8-11.
5. Vávrová, K.; Hrabálek, A., Role ceramidů v kůži. *Praktické lékárenství* **2006**, *2* (2), 55-58.
6. van Smeden, J.; Janssens, M.; Gooris, G. S.; Bouwstra, J. A., The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2014**, *1841* (3), 295-313.
7. Menon, G. K.; Cleary, G. W.; Lane, M. E., The structure and function of the stratum corneum. *International Journal of Pharmaceutics* **2012**, *435* (1), 3-9.
8. Feingold, K. R.; Elias, P. M., Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2014**, *1841* (3), 280-294.
9. Uchida, Y.; Holleran, W. M., Omega-O-acylceramide, a lipid essential for mammalian survival. *Journal of Dermatological Science* **2008**, *51* (2), 77-87.
10. Meckfessel, M. H.; Brandt, S., The structure, function, and importance of ceramides in skin and their use as therapeutic agents in skin-care products. *Journal of the American Academy of Dermatology* **2014**, *71* (1), 177-184.
11. Choi, M. J.; Maibach, H. I., Role of ceramides in barrier function of healthy and diseased skin. *American Journal of Clinical Dermatology* **2005**, *6* (4), 215-223.
12. Cha, H. J.; He, C. F.; Zhao, H.; Dong, Y. M.; An, I. S.; An, S., Intercellular and intracellular functions of ceramides and their metabolites in skin (Review). *International Journal of Molecular Medicine* **2016**, *38* (1), 16-22.
13. Rabionet, M.; Gorgas, K.; Sandhoff, R., Ceramide synthesis in the epidermis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2014**, *1841* (3), 422-434.

14. van Smeden, J.; Hoppel, L.; van der Heijden, R.; Hankemeier, T.; Vreeken, R. J.; Bouwstra, J. A., LC/MS analysis of stratum corneum lipids: ceramide profiling and discovery. *Journal of Lipid Research* **2011**, *52* (6), 1211-1221.
15. Rabionet, M.; Bayerle, A.; Marsching, C.; Jennemann, R.; Grone, H. J.; Yildiz, Y.; Wachten, D.; Shaw, W.; Shayman, J. A.; Sandhoff, R., 1-O-acylceramides are natural components of human and mouse epidermis. *Journal of Lipid Research* **2013**, *54* (12), 3312-3321.
16. Bouwstra, J. A.; Ponec, M., The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **2006**, *1758* (12), 2080-2095.
17. Holleran, W. M.; Takagi, Y.; Uchida, Y., Epidermal sphingolipids: Metabolism, function, and roles in skin disorders. *Febs Letters* **2006**, *580* (23), 5456-5466.
18. Farwanah, H.; Wohlrab, J.; Neubert, R. H. H.; Raith, K., Profiling of human stratum corneum ceramides by means of normal phase LC/APCI-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2005**, *383* (4), 632-637.
19. Motta, S.; Monti, M.; Sesana, S.; Caputo, R.; Carelli, S.; Ghidoni, R., Ceramide composition of the psoriatic scale. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1993**, *1182* (2), 147-151.
20. Wertz, P. W.; Downing, D. T., Linoleate content of epidermal acylglucosylceramide in newborn, growing and mature mice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1986**, *876* (3), 469-473.
21. Kihara, A., Synthesis and degradation pathways, functions, and pathology of ceramides and epidermal acylceramides. *Progress in Lipid Research* **2016**, *63*, 50-69.
22. Hamanaka, S.; Suzuki, A.; Hara, M.; Nishio, H.; Otsuka, F.; Uchida, Y., Human epidermal glucosylceramides are major precursors of stratum corneum ceramides. *Journal of Investigative Dermatology* **2002**, *119* (2), 416-423.
23. Li, W. M.; Sandhoff, R.; Kono, M.; Zerfas, P.; Hoffmann, V.; Ding, B. C. H.; Proia, R. L.; Deng, C. X., Depletion of ceramides with very long chain fatty acids causes defective skin permeability barrier function, and neonatal lethality in ELOVL4 deficient mice. *International Journal of Biological Sciences* **2007**, *3* (2), 120-128.
24. Vasireddy, V.; Uchida, Y.; Salem, J. N.; Kim, S. Y.; Mandal, M. N. A.; Reddy, G. B.; Bodepudi, R.; Alderson, N. L.; Brown, J. C.; Hama, H.; Dlugosz, A.; Elias, P. M.; Holleran, W. M.; Ayyagari, R., Loss of functional ELOVL4 depletes very long-chain fatty acids ($\geq C28$) and the unique ω -O-acylceramides in skin leading to neonatal death. *Human Molecular Genetics* **2007**, *16* (5), 471-482.

25. Nardo, A.; Wertz, P.; Giannetti, A.; Seidenari, S., Ceramide and cholesterol composition of the skin of patients with atopic dermatitis. *Acta Dermatovenerologica* **1998**, *78* (1), 27-30.
26. Paige, D. G.; Morse, N.; Harper, J. I., Quantification of stratum corneum ceramides and lipid envelope ceramides in the hereditary ichthyoses. *British Journal of Dermatology* **1994**, *131* (1), 23-7.
27. Cuvillier, O., Sphingosine in apoptosis signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **2002**, *1585* (2), 153-162.
28. Ternes, P.; Franke, S.; Zähringer, U.; Sperling, P.; Heinz, E., Identification and characterization of a sphingolipid delta 4-desaturase family. *The Journal of biological chemistry* **2002**, *277* (28), 25512-25518.
29. Alderson, N. L.; Rembiesa, B. M.; Walla, M. D.; Bielawska, A.; Bielawski, J.; Hama, H., The human FA2H gene encodes a fatty acid 2-hydroxylase. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279* (47), 48562-48568.
30. Jakobsson, A.; Westerberg, R.; Jacobsson, A., Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. *Progress in Lipid Research* **2006**, *45* (3), 237-249.
31. Pewzner-Jung, Y.; Ben-Dor, S.; Futerman, A. H., When do lasses (longevity assurance genes) become CerS (ceramide synthases)? Insights into the regulation of ceramide synthesis. *Journal of Biological Chemistry* **2006**, *281* (35), 25001-25005.
32. Ohno, Y.; Nakamichi, S.; Ohkuni, A.; Kamiyama, N.; Naoe, A.; Tsujimura, H.; Yokose, U.; Sugiura, K.; Ishikawa, J.; Akiyama, M.; Kihara, A., Essential role of the cytochrome P450 CYP4F22 in the production of acylceramide, the key lipid for skin permeability barrier formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2015**, *112* (25), 7707.
33. Takagi, Y.; Nakagawa, H.; Matsuo, N.; Nomura, T.; Takizawa, M.; Imokawa, G., Biosynthesis of acylceramide in murine epidermis: Characterization by inhibition of glucosylation and deglycosylation, and by substrate specificity. *Journal of Investigative Dermatology* **2004**, *122* (3), 722-729.
34. Grond, S.; Eichmann, T. O.; Dubrac, S.; Kolb, D.; Schmuth, M.; Fischer, J.; Crumrine, D.; Elias, P. M.; Haemmerle, G.; Zechner, R.; Lass, A.; Radner, F. P. W., PNPLA1 deficiency in mice and humans leads to a defect in the synthesis of omega-O-acylceramides. *Journal of Investigative Dermatology* **2017**, *137* (2), 394-402.
35. Pichery, M.; Huchonq, A.; Sandhoff, R.; Severino-Freire, M.; Zaafour, S.; Opálka, L.; Levade, T.; Soldan, V.; Bertrand-Michel, J.; Lhuillier, E.; Serre, G.;

Maruani, A.; Mazereeuw-Hautier, J.; Jonca, N., PNPLA1 defects in patients with autosomal recessive congenital ichthyosis and KO mice sustain PNPLA1 irreplaceable function in epidermal omega-O-acylceramide synthesis and skin permeability barrier. *Human Molecular Genetics* **2017**, *26* (10), 1787-1800.

36. Opálka, L.; Kováčik, A.; Sochorová, M.; Roh, J.; Kuneš, J.; Lenčo, J.; Vávrová, K., Scalable synthesis of human ultralong chain ceramides. *Organic Letters* **2015**, *17* (21), 5456-5459.

37. Mori, K.; Matsuda, H., Synthesis of sphingosine relatives, X. Synthesis of (2S,3R4E)-1-O-(β -D-glucopyranosyl)-N-[30'-(linoleoyloxy)triacontanoyl]-4-icosasphingenine, a new esterified cerebroside isolated from human and pig epidermis. *Liebigs Annalen der Chemie* **2006**, *1991* (6), 529-535.

38. Novotný, J.; Pospěchová, K.; Hrabálek, A.; Čáp, R.; Vávrová, K., Synthesis of fluorescent C24-ceramide: Evidence for acyl chain length dependent differences in penetration of exogenous NBD-ceramides into human skin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2009**, *19* (24), 6975-6977.

39. Muller, S.; Schmidt, R. R., Synthesis of two unique compounds, a ceramide and a cerebroside, occurring in human stratum corneum. *Journal Fur Praktische Chemie-Practical Applications and Applied Chemistry* **2000**, *342* (8), 779-784.

40. Tashiro, T.; Mori, K., Synthesis of sphingolipids with an omega-esterified long acyl chain, ceramide components of the human epidermis. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **2012**, *76* (9), 1715-1720.

41. Wittig, G.; Haag, W., Über Triphenyl-phosphinmethylene als olefinbildende Reagenzien (II. Mitteil.1)). *Chemische Berichte* **2006**, *88* (11), 1654-1666.

42. McMurry, J., *Organická chemie*. VUTIUM, VŠCHT: Brno, Praha, Czech Republic, **2007**.

43. Solomons, T. W. G.; Fryhle, C. B., *Organic chemistry*. John Wiley: Hoboken, NJ, USA, **2008**.

44. Clayden, J., *Organic chemistry*. 1. ed.; Oxford University Press: New York, NY, USA, **2001**.

45. Peterson, D. J., Carbonyl olefination reaction using silyl-substituted organometallic compounds. *The Journal of Organic Chemistry* **1968**, *33* (2), 780-784.

46. Smith, M.; March, J., *March's advanced organic chemistry: reactions, mechanisms, and structure*. Wiley: New York, NY, USA, **2001**.

47. Plesniak, K.; Zarecki, A.; Wicha, J., The Smiles rearrangement and the Julia–Kocienski olefination reaction. In *Sulfur-Mediated Rearrangements II*, Schaumann, E., Ed. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, Germany, **2007**; pp 163-250.
48. Kelly, S. E., Alkene synthesis. In *Comprehensive organic synthesis*, Trost, B. M.; Fleming, I., Eds. Pergamon: Oxford, United Kingdom, **1991**; Vol. 1, pp 729-817.
49. Gueyrard, D., Extension of the modified Julia olefination on carboxylic acid derivatives: Scope and applications. *Synlett* **2018**, 29 (1), 34-45.
50. Keck, G. E.; Savin, K. A.; Weglarz, M. A., Use of samarium diiodide as an alternative to sodium/mercury amalgam in the Julia-Lythgoe olefination. *The Journal of Organic Chemistry* **1995**, 60 (10), 3194-3204.
51. Zajc, B.; Kumar, R., Synthesis of fluoroolefins via Julia-Kocienski olefination. *Synthesis-Stuttgart* **2010**, (11), 1822-1836.
52. McMurry, J. E.; Fleming, M. P., New method for the reductive coupling of carbonyls to olefins. Synthesis of beta-carotene. *Journal of the American Chemical Society* **1974**, 96 (14), 4708-4709.