

**TRIAZOLOVÉ DERIVÁTY
CHINOLIN-2,4(1*H*,3*H*)-DIONŮ POTENCIONÁLNĚ
VYUŽITELNÉ V KOSMETICE**

Bc. Tereza Dostálová

Diplomová práce
2015



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky
akademický rok: 2014/2015

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Tereza Dostálová**
Osobní číslo: **T13400**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie tuků, detergentů a kosmetiky**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Triazolové deriváty chinolin-2,4(1H,3H)-dionů potenciálně využitelné v kosmetice.**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část:

1. Zpracovat literární rešerši orientovanou na deriváty triazolu a chinolinu izolovaných z přírodních zdrojů i synteticky připravených a jejich stručný popis biologických účinků popř. aplikací v různých oblastech kosmetického průmyslu.

II. Praktická část:

1. Po přípravě výchozích látek se pokusit nalézt vhodný způsob pro přípravu chinolin-2,4(1H,3H)-dionů nesoucí v poloze 1 a 3 různé substituované 1,2,3-triazolové kruhy.
2. Izolované produkty charakterizovat dostupnými metodami.
3. U získaných látek provést antimikrobiální testy na vybraných mikroorganismech.
4. Vyhodnotit výsledky experimentů a sepsat diplomovou práci.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

Dle provedení literární rešerše s využitím databáze Chemical Abstracts.

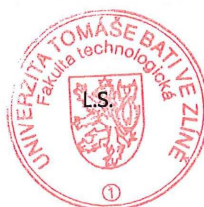
Vedoucí diplomové práce: **Ing. Roman Kimmel, Ph.D.**
Ústav chemie

Datum zadání diplomové práce: **20. ledna 2015**

Termín odevzdání diplomové práce: **18. května 2015**

Ve Zlíně dne 20. ledna 2015


doc. Ing. Román Čermák, Ph.D.
děkan




Ing. Martina Černeková, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: DOSTALOVÁ TEREZA

Obor: TVT.KD

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 18.5.2015

Dostalová

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydávalečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) *Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.*

(3) *Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.*

²⁾ *zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:*

(3) *Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).*

³⁾ *zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:*

(1) *Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.*

(2) *Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.*

(3) *Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.*

ABSTRAKT

Teoretická část předložené diplomové práce se zabývá základním popisem kosmetických přípravků a jejich formami. Dále jsou v práci rozebrány možné mikrobiální kontaminace způsobené grampozitivními, gramnegativními bakteriemi, kvasinkami a plísněmi, ze kterých vyplývá účinná konzervace chránící kosmetické přípravky před jejich znehodnocením mikroorganismy a následným ohrožením spotřebitele. Poslední kapitola rozebírá syntézu chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionů nesoucí v poloze 1 a 3 různě substituované 1,2,3-triazolové kruhy. V praktické části práce jsou popsány průběhy reakcí vedoucí k požadovaným triazolovým derivátům, které byly následně z mikrobiologického hlediska zkoumány, zda-li se potvrdí předpoklad, že alespoň některé z nich budou vykazovat antibakteriální nebo antifungální účinky na běžně se vyskytující mikroorganismy, jejichž přítomnost v kosmetických přípravcích je závadná.

Klíčová slova: mikrobiální kontaminace, konzervace, chinolin, triazol, cykloadice

ABSTRACT

The theoretical portion of the Master's thesis describes cosmetic products and their formulation. It examines the possible microbial contamination caused by Gram-positive and Gram-negative bacteria, yeasts and fungi; and describes the effective preservative components which protect cosmetics against contamination by microorganisms and the subsequent threat to consumers. The last chapter discusses the synthesis of quinoline-2,4(1*H*,3*H*)-diones bearing in position 1 and 3 differently substituted 1,2,3-triazole rings. The practical component of the thesis describes the reaction leading to the desired triazole derivatives which were microbiologically examined. This confirmed that at least some of the triazole derivatives will exhibit antibacterial or antifungal effects to commonly occurring microorganisms.

Keywords: microbial contamination, conservation, quinoline, triazole, cycloaddition

„ Když říkáš, že to nejde, říkáš, že to neumíš. Všechno jde, jen chtít se musí. “

Na prvním místě bych chtěla velmi poděkovat vedoucímu diplomové práce Ing. Romanu Kimmelovi, Ph.D. za jeho cenné rady, připomínky a veškerý čas, který byl ochoten věnovat mé práci. Děkuji za jeho trpělivost, podporu a neutuchající optimismus.

Dále děkuji prof. Dr. Janezi Košmrljovi z Univerzity v Ljublaně za naměření NMR spekter, Dr. Damijaně Urankar taktéž z Univerzity v Ljublaně za naměření HRMS spekter a Ing. Lence Trhlíkové za naměření EI-MS spekter a za provedení elementárních analýz.

Poděkování patří také paní doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za konzultace a odbornou pomoc při vytváření mikrobiologické části této práce a Bc. Veronice Kučabové za asistenci při její realizaci.

Děkuji mé rodině a nejbližším za trpělivost a oporu, kterou mi dávali po celý čas mého studia.

Speciální poděkování patří mému partnerovi Petru Suchoňovi, který mi velkou měrou usnadnil mé studium. Děkuji taktéž za jeho trpělivost, podporu a vytvoření klidných domácích podmínek. Tímto bych mu tuto práci ráda věnovala.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	11
I. TEORETICKÁ ČÁST	12
1. KOSMETIKA A KOSMETICKÉ PŘÍPRAVKY	13
1.1 KATEGORIZACE KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVKŮ	13
1.1.1 Dle použití kosmetického přípravku	14
1.1.2 Dle formy kosmetického přípravku	16
2. MIKROORGANIZMY V KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVCÍCH	19
2.1 KONTAMINACE KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVKŮ	19
2.1.1 Primární kontaminace	20
2.1.2 Sekundární kontaminace	21
2.2 MIKROBIOLOGICKÉ KONTROLY	21
2.3 BAKTERIE	21
2.3.1 Rod <i>Staphylococcus</i>	23
2.3.2 Rod <i>Micrococcus</i>	24
2.3.3 Rod <i>Bacillus</i>	24
2.3.4 Rod <i>Escherichia</i>	24
2.3.5 Rod <i>Pseudomonas</i>	25
2.4 KVASINKY	25
2.4.1 Rod <i>Candida</i>	26
2.5 PLÍSNĚ	26
2.5.1 Rod <i>Aspergillus</i>	27
2.6 MIKROBIOLOGIE VYBRANÝCH KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVKŮ	28
2.6.1 Pleťové krémy a mléka	28
2.6.2 Zubní pasty	28
2.6.3 Pudry a zásypy	29
2.6.4 Rtěnky	29
2.6.5 Parfémy a toaletní vody	29
3. KONZERVACE KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVKŮ	30
3.1 FAKTORY PŮSOBÍCÍ NA ÚČINNOST KONZERVACE	31
3.2 FAKTORY PRO VÝBĚR KONZERVAČNÍ LÁTKY	31
3.3 PŘEHLED KONZERVAČNÍCH LÁTEK	32
3.3.1 Organické kyseliny, jejich soli a estery.....	32

3.3.2	Aldehydy a formaldehydy.....	32
3.3.3	Aminy, amidy, pyridiny a benzalkoniové soli	32
3.3.4	Deriváty fenolu.....	33
3.3.5	Alkoholy.....	33
3.3.6	Deriváty isothiazolinonu	33
3.3.7	Jiné konzervační látky.....	33
4.	CHARAKTERIZACE A SYNTÉZA TRIAZOLŮ.....	34
4.1	BIOLOGICKÉ ÚČINKY TRIAZOLOVÝCH SLOUČENIN.....	34
4.2	KOMERČNĚ DOSTUPNÁ TRIAZOLOVÁ CHEMOTERAPEUTIKA.....	34
4.3	SYNTÉZA TRIAZOLOVÝCH SLOUČENIN	37
4.3.1	Termicky a katalyticky indukované [3+2] cykloadice.....	37
II.	PRAKTICKÁ ČÁST	39
5.	VÝSLEDKY A DISKUZE	40
5.1	SYNTÉZA TRIAZOLOVÝCH DERIVÁTŮ.....	40
5.2	BIOLOGICKÉ TESTY PŘIPRAVENÝCH SLOUČENIN	48
5.2.1	Disková difuzní metoda	49
5.2.2	Jamková difuzní metoda	56
6.	CHARAKTERISTIKA PŘÍSTROJOVÉHO VYBAVENÍ A INSTRUMENTÁLNÍCH METOD	60
7.	DETAILNÍ POPIS SYNTETICKÝCH POSTUPŮ A STRUKTURNÍ CHARAKTERISTIKY PŘIPRAVENÝCH SLOUČENIN.....	61
7.1	SYNTÉZA 4-HYDROXYCHINOLIN-2(1 <i>H</i>)-ONŮ 1	61
7.2	SYNTÉZA 3-CHLORCHINOLIN-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-DIONŮ 2	62
7.3	SYNTÉZA 3-AZIDochinolin-2,4-DIONŮ 3	64
7.4	SYNTÉZA 3-TRIAZOLYLCHINOLIN-2,4-DIONŮ 4	65
7.5	SYNTÉZA <i>N</i> -PROPARGYL-3-TRIAZOLYLCHINOLIN-2,4-DIONŮ 5	68
7.6	SYNTÉZA AZIDŮ PRO PŘÍPRAVU SLOUČENIN 6	71
7.7	SYNTÉZA <i>N</i> -(TRIAZOL-4-YLMETHYL)-3-TRIAZOLYLCHINOLIN-2,4-DIONŮ 6	72
7.8	SYNTÉZA 3-TRIAZOLYLKARBOXYLOVÝCH KYSELIN CHINOLIN-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-DIONŮ 7	75
7.9	SYNTÉZA 3-TRIAZOLYLOXYLOVÝCH DERIVÁTŮ CHINOLIN-2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i>)-DIONŮ 8	77
8.	MIKROBIOLOGICKÉ TESTY	78
8.1	DISKOVÁ DIFUZNÍ METODA.....	79

8.2 JAMKOVÁ DIFUZNÍ METODA.....	80
ZÁVĚR	82
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	84
SEZNAM OBRÁZKŮ	86
SEZNAM TABULEK.....	87
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	88

ÚVOD

Člověk přichází do styku s kosmetickými přípravky od svého narození, kdy se staly nedílnou součástí života každého z nás. Jejich vlastností využíváme za účelem čištění, úpravy vzhledu a pachu na zevních částech těla a sliznic. Z tohoto důvodu je nezbytné nutné zajistit, aby tyto výrobky byly po všech stránkách bezpečné. Zejména mikrobiologická kontaminace kosmetiky je pro člověka vysoce riziková. Proto výrobci hledají a přidávají do produktů vhodné konzervační látky, které brání růstu mikroorganismů v produktech a zároveň nenaruší jejich účinek, vzhled, vůni a konzistenci.

Od doby, kdy byly poprvé Meldalem a Sharplessem objasněny 1,3-dipolární cykloadice organických azidů s deriváty acetyleny katalyzované mědnými ionty, byl zaznamenán relativně vysoký nárůst za různým účelem syntetizovaných sloučenin obsahujících 1,2,3-triazolovou jednotku. Jedna skupina chemiků směřuje svůj výzkum ke koordinaci kovových iontů a u získaných asociátů jsou studovány jejich katalytické schopnosti. Pro snadnost provedení, značnou rychlost a toleranci vůči funkčním skupinám je, velmi často označovaná pojmem „click reakce“, využitelná pro přípravu velmi rozmanitých derivátů 1,2,3-triazolu, a proto bývá tento heterocykl také využíván jako snadno získatelný linker spojující například dvě molekuly za účelem skloubení jejich vlastností. Poslední významnou oblastí je příprava potenciálně biologicky aktivních triazolových derivátů. U řady z nich byly prokázány antifungální, antibakteriální, antioxidační účinky. Několik zástupců této skupiny bylo dokonce v osmdesátých letech 20. století zavedeno jako širokospektrá antimykotika do klinické praxe.

Zmiňované vlastnosti triazolových sloučenin nás evokovali k syntéze nejen chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionů nesoucích ve své molekule v poloze 3 4-substituovaný 1,2,3-triazol-1-ylový substituent, ale i k jejich derivátům majícím připojený k heterocyklickému atomu dusíku chinolinového kruhu přes methylenový můstek 1-substituovaný 1,2,3-triazol-4-ylovou skupinou. U vybraných, kompletně strukturně identifikovaných představitelů poměrně početné skupiny připravených látek, byly testovány jejich antimikrobní účinky, jež jsou uvedeny v mikrobiologické části práce, na nejběžnějších patogenech vyskytujících se v kosmetických přípravcích. Konkrétně byla studována jejich toxicita na bakteriích *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Escherichia coli*. Z kvasinek byla sledována pouze *Candida albicans*.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1. KOSMETIKA A KOSMETICKÉ PŘÍPRAVKY

Pojem „kosmetika“ pochází z řeckého slova *kosmeo* a v překladu znamená péči o zachování tělesné krásy a o odstranění či zakrytí tělesných nedostatků. Kosmetika také může být již názvem pro komerční prostředky a látky, které jsou ke kosmetickým účelům určeny. Kosmetologie patří mezi moderní vědní disciplíny a pro její vývoj jsou využívány poznatky z nejrůznějších vědeckých oborů, mezi které se řadí například lékařství, biologie a chemie.¹ Od července 2013 platí v celé Evropské unii definice kosmetického přípravku podle Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. 11. 2009 o kosmetických přípravcích. Pod kosmetickou činností vyplývající z této legislativy si lze představit úpravu lidského těla (pokožka, nehty, rty, vlasový systém a vnější pohlavní orgány), zubů a sliznice dutiny ústní pouze za účelem změny jejich vzhledu nebo udržování v dobrém stavu, čištění, parfemace, jejich ochrany či úpravy tělesných pachů.²

Kosmetický průmysl zaujímá v populaci velmi široký záběr použití, jak se lze přesvědčit v **Tabulce 1**. Díky tomu, že si každý člověk z nabídky kosmetických přípravků najde do každodenního života své „stálice“ a že se téměř nedá bez kosmetických přípravků žít kvalitní a plnohodnotný život, a protože kosmetika zasahuje také do oblasti sociologické, psychologické i pedagogické, patří kosmetický průmysl k těm nejziskovějším. Vzhledem k tomu, že si výrobci kosmetických přípravků neustále konkurují, snaží se nejenom si udržet zákazníka, ale také mu nabídnout něco nového, řadí se také kosmetický průmysl mezi nejrychleji a nejdynamičtěji se rozvíjející.³

1.1 Kategorizace kosmetických přípravků

Jak již napovídá definice, kosmetické přípravky jsou na trhu k dostání v rozmanitých fyzikálních formách, mají různý způsob použití i rozdílnou účinnost. Také s pokročilou moderní dobou a vzrůstajícím technologickým a vědeckým pokrokem, roste počet kosmetických přípravků, které jsou na trhu dostupné. Tato fakta vedou k tomu, že je nezbytnou nutností systematizovat a kategorizovat kosmetické přípravky a zlepšit tak jejich přehlednost nejen pro spotřebitele a výrobce, ale i pro dozorové orgány vykonávající kontrolu nad kosmetickými prostředky.

1.1.1 Dle použití kosmetického přípravku

Jednou z možností kategorizace kosmetických přípravků je rozdělení dle míst a cílů jejich použití pro účely statistik v Evropské unii.³

Tabulka 1. Klasifikace kosmetických přípravků dle jejich použití.^{3,4}

Klasifikace	Produkty
Kosmetika pro péči o pleť a kůži	Pleťová kosmetika (peelingy, krémy, balzámy, masky - denní, noční, antiaging, hydratační, výživné, exfoliační, po holení, ...) Pleťové a oční odličovače, pěny a vody (tonery, tonika) Kosmetika pro péči o ruce (krémy, masky, peelingy, ...) Tělová kosmetika (mléka, krémy, balzámy, másla, oleje, masky, peelingy) Masážní kosmetické prostředky Vody (po holení, minerální pro osvěžení pleti) Dětská pleťová a tělová kosmetika
Toaletní potřeby	Mýdla a tekutá mýdla (i speciální) Přípravky orální hygieny (zubní pasty a vody, spreje) Přípravky intimní hygieny (mýdla, deodoranty, zásypy) Depilační a holicí prostředky (krémy, gely, pěny) Pudry a zásypy Koupelové přípravky (pěny, oleje, soli, gely) Deodoranty a antiperspiranty Kosmetika pro péči o nohy (krémy, masky, peelingy, pudry) Repelenty Dětské toaletní potřeby

Klasifikace	Produkty
Vlasová kosmetika	Šampony a 2 v 1 šampony Kondicionéry Masky a kůry Vlasová tonika a lotiony Přípravky pro podporu růstu vlasů Pěny, krémy, gely, brilantiny Přípravky pro trvalou ondulaci Dětská vlasová kosmetika
Vlasová barviva	Vlasová barviva Barvicí šampony Odbarvovací prostředky
Dekorativní kosmetika	Pudry Make-upy a báze pod make-upy Tvářenky a bronzery Přípravky pro úpravu obočí (tužky, gely, řasenky, vosky, stíny) Oční tužky a stíny Řasenky Rtěnky, lesky, balzámy na rty Nehtová kosmetika (laky na nehty, péče o nehty, odlakovače) Dětská dekorativní kosmetika
Parfémy a vonné látky	Parfémy, parfémové extrakty a toaletní vody Tělové vonné spreje Vlasové vonné mlhy After shave lotiony Dětská vonná kosmetika
Opalovací přípravky	Krémy, balzámy, oleje, spreje, ...

1.1.2 Dle formy kosmetického přípravku

V posledních několika desetiletích z důvodů usnadnění použití kosmetického prostředku spotřebiteli a podle jeho účelu výrobci upravují formy svých produktů do nejrůznějších podob.⁵

Účinné látky mohou být zabudovány do kapalných alkoholických nebo vodných systémů s nízkou viskozitou. Tato **tonika, tonery a vody** jsou buď bezbarvá nebo mohou být zbarvená. Bývají také často parfémovaná, ale kvůli spotřebitelům s citlivější pleť se setkáváme i s přípravky bez parfemace, které tolik nedráždí pokožku. Tonika mají buď adstringentní, tzv. stahující, nebo prokrvující účinek vhodný ke stažení pórů nebo k vypnutí pleti. Make-up removery a micelární vody jsou určeny k odstranění dekorativní kosmetiky a nečistot z pleti a očí a obsahují mírné tenzidy, hydratační a zklidňující látky.³ Micelární vody se staly velmi populárními v posledních dvou letech, jelikož nenarušují přirozenou kožní bariéru a jsou vhodné i pro citlivou pokožku, protože odstraňují nečistoty z pleti šetrným způsobem. Právě molekuly povrchově aktivních látek obsažených v micelárních vodách mají schopnost se samostatně agregovat do micel,⁶ které na sebe efektivně navážou všechny nečistoty, aniž bychom museli pleť silně mechanicky namáhat.

Lotiony a emulze jsou kapalné silně zředěné emulze typu olej ve vodě, kde je jejich stabilita podpořena emulgátorem. Jejich vlastností lze využít v oblasti čistící, adstringentní, změkčovací a lze je také vyrábět ve formě mikroemulzí.³ Mikroemulze jsou termodynamicky stabilní systémy tvořící kapalnou roztok skládající se z vody, oleje a povrchově aktivní látky. Mikroemulze mohou rozpustit velké množství olejových sloučenin, čímž se zvyšuje jejich emoliační efekt. Další výhodou je snadnost jejich přípravy.^{3,4,6}

Krémy patří mezi nejširší formu kosmetického přípravku nejen pro pleťovou, ale také tělovou péči. Lze je připravit jako emulze typu olej ve vodě nebo voda v oleji za použití vhodného emulgátoru pro zabránění vyvstávání jednotlivých účinných složek ze systému. Krémy mohou disponovat rozličnými účinky a funkcemi, které se odvíjejí od použitých ingrediencí.³

Pro ošetření pokožky se také používají **oleje**, které na ni vytvoří souvislý film. Pro výrobu se používají všechny přírodní látky tukové povahy a také synteticky připravené estery mastných kyselin, mastné alkoholy, deriváty tuků a parafinové oleje. Z důvodu nebezpečí oxidace je zde důležitý přídavek antioxidantů.⁵

Dále se tukové látky používají při výrobě **mastí**, do kterých se zabudují jiné specifické ingredience.⁵

Masti jsou základem pro **pasty**, do kterých se přimíchají nerozpustné látky, např. pudry.⁵

Gely se mohou v kosmetice vyskytovat ve formě hydrogelů mající vyšší obsah vody nebo gelů na olejové bázi, které v kombinaci s čistící složkou hladce odstraňují z pleti nečistoty. Gely se skládají z disperzního prostředí a disperzním podílem tvořeným částicemi, což jsou často ve vodě rozpustné polymerní látky.⁴ Spojováním těchto částic koloidní velikosti vzniká síťovitá struktura gelu, která vytváří souvislou strukturu. Lyogel je označení pro systém tvořený kapalným disperzním prostředím, zpravidla touto kapalinou bývá voda. Odstraněním kapalného disperzního prostředí vznikne xerogel, který však může zpětně přijímat vodu.^{5,7}

Dalším koloidním disperzním systémem jsou **pěny**, které se vytváří aerosolovou technikou. Disperzní prostředí je opět kapalina s rozpuštěnými účinnými látkami, která vytváří velmi tenký film okolo disperzního podílu - hnacího plynu.³

V **aerosolech** je naopak disperzní prostředí hnací plyn a disperzním podílem rozpustné nebo nerozpustné tuhé a kapalně částice, které se po uvolnění ventilu na nádobě, ve kterých jsou plněny, volně rozptýlí.⁵

Disperzním prostředím v **suspenzích** je kapalina a dispergovaný podíl je tvořen částicemi pevné látky, které by neměly sedimentovat. Při výrobě se tak volí částice koloidních rozměrů a pro zabránění sedimentace se přidává i dispergátor nebo zahušťovadlo.⁵

Pro časté mytí pokožky jsou určena **mýdla**, což jsou alkalické soli mastných kyselin. Pro výrobu mýdel je dnes využíváno široké množství různých tuků a olejů s ohledem na konečné použití a vlastnosti mýdla. Tak, jak známe mýdla dnes, se vyrábí zmýdelněním tuků a olejů hydroxidem sodným (tzv. jádrová nebo klišová) nebo hydroxidem draselným (tzv. mazlavá).⁴

Mezi **roztoky tenzidů** řadíme například sprchové gely, šampony, tekutá mýdla a mnoho dalších. Tyto kosmetické přípravky jsou určeny k omytí pokožky pouze roztoky povrchově aktivních látek na vodné či alkoholové bázi a mohou také obsahovat specifické látky.³

Tyčinky a tužky jsou ideální formou kosmetického přípravku mající funkci nosiče pevných nerozpustných ingrediencí, především pigmentů. Tato forma kosmetického přípravku se může chovat buď jako hydrofobní systém na bázi směsi vosků a olejů

s rozpuštěnými aktivními látkami přípravku nebo jako hydrofilní systém tvořený vodou nebo roztoky alkoholů.³

Pudry jsou složeny z práškovitých komponent a mohou být k dostání v několika kosmetických formách – tekuté, kompaktní nebo aerosolové.⁵

Požadovaným efektem **laků** je vytvořit na nehtech, pokožce nebo vlasech souvislý a nelepivý film, který zlepšuje vzhled nebo mechanické vlastnosti. Tento efekt je podpořen filmotvornými komponenty, které laky obsahují.⁵

2. MIKROORGANIZMY V KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVCÍCH

Přítomnost mikrobů v kosmetice je v první řadě nebezpečná pro zdraví spotřebitele. Míra nebezpečí pak závisí na několika faktorech. Nejdůležitějším z nich je patogenita mikroorganismů. Druhým je skupina lidí, která přípravek užívá, která se zpravidla dělí na děti do 3 let, děti a dospělé. Třetím faktorem je místo, kam má být přípravek aplikován - nejcitlivější bývají oči, sliznice a intimní partie.⁸ Poslední možností potenciálního nebezpečí spočívá v možné změně kosmetického výrobku.⁹ Nežádoucí jsou také organoleptické změny kosmetického prostředku. Vlivem mikrobiálních metabolitů a rozkladu složek kosmetického přípravku může dojít k jeho změně barvy, vůně, viskozity a účinku.¹⁰ Neméně je důležitý dopad mikrobiologického znehodnocení produktů pro samotného výrobce. Dojde-li k závažné mikrobiální kontaminaci již během výrobního procesu, ekonomické dopady bývají katastrofální.¹¹

2.1 Kontaminace kosmetických přípravků

Drtivá většina kosmetických přípravků představuje zvýšené riziko pro usídlení a množení patogenních, oportunně patogenních a toxinogenních mikroorganismů.^{3,12} Kompozice přípravků s vyšším obsahem vody nebo nutričních látek jsou k mikrobiální kontaminaci nejnáchylnější. Další skupinou nejhroženějších přípravků jsou ty, které si ve své receptuře vyžadují nedokonalý a neúčinný konzervační systém nebo ty, jejichž obal nezamezuje kontaktu mezi samotným přípravkem a pokožkou spotřebitele či vnějším prostředím. V poslední řadě představuje velké riziko také fakt, že jeden kosmetický prostředek je používán více spotřebiteli, např. celou rodinou. Všechny tyto faktory mohou vést k iniciaci zvýšené mikrobiální kontaminace, která je počátkem možného infekčního onemocnění bakteriálního nebo plísňového původu a je zde možnost přenosu i na další osoby. Úplně zamezit mikrobiální kontaminaci v kosmetických přípravcích není možné. Lze však učinit preventivní opatření, která by vedla k jejímu potlačení. Jedno z nich začíná již ve výrobním závodě, který produkuje bezpečné kosmetické přípravky v souladu se správnou výrobní praxí. Druhým opatřením je pak výběr vhodných konzervačních systémů pro každý kosmetický přípravek s ohledem na jeho balení, konzistenci a způsob používání.⁸

V kosmetických přípravcích je důležité prokázat, respektive neprokázat přítomnost tří hlavních patogenů – *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Candida*

albicans, jelikož způsobují závažné infekce očí a kůže. Předmětem zkoumání se však stávají i další mikroorganismy, protože indikují hygienické nedostatky při výrobním procesu. Zde můžeme zahrnout mikroorganismus *Escherichia coli* mající význam jako indikátor fekální kontaminace.⁹

Nejen přítomnost mikroorganismů vede ke znehodnocení přípravku. Nevhodným činitelem je také kyslík obsažený ve vzduchu zejména pro produkty kosmetické péče obsahující snadno oxidační složky nebo sluneční záření pro přípravky obsahující složky citlivé na světlo. Do zmíněných přípravků se přidávají antioxidanty a látky s lehkými absorpčními vlastnostmi, které prodlouží jejich životnost.¹⁰ Triazolové deriváty jsou významnou skupinou heterocyklických sloučenin s rozmanitou biologickou aktivitou, mezi které řadíme také antioxidační účinky.¹³ Tato diplomová práce bude zaměřena na účinky antimikrobní¹⁴, zpracované v praktické části, tedy na kontaminaci kosmetických prostředků způsobené patogenními i nepatogenními mikroorganismy.

2.1.1 Primární kontaminace

K primární kontaminaci kosmetického přípravku dochází již při jeho výrobě, kdy se při sestavování jejich surovinové skladby objevuje nepřehledné množství přírodních i syntetických ingrediencí. Nejčastější rizikovou surovinou bývá voda z důvodů velké obliby produktů na její bázi (např. lotiony, emulze, ...), které představují příznivé prostředí pro růst mikroorganismů. Voda pro výrobu kosmetiky je destilovaná, neionizovaná nebo upravena reverzní osmózou a i tak představuje dobré prostředí pro růst bakterie rodu *Escherichia* a *Pseudomonas*.¹¹ Zdrojem kontaminace jsou dále materiály mající biologický původ jako extrakty získané z živočišných tkání nebo deriváty na bázi proteinů nebo suroviny rostlinného původu – extrakty z rostlin, pryskyřice a další. Posledním surovinovým zdrojem mikrobiální kontaminace jsou látky anorganického charakteru a vybrané tenzidy.⁵ Suroviny syntetického původu bývají po mikrobiologické stránce čisté.³ Ke kontaminaci může dojít i vlivem nedostatečně sterilním zařízením, jež je používáno ve všech částech výroby a nedbalou prací zaměstnance výrobního provozu.⁵

2.1.2 Sekundární kontaminace

Mezi sekundární elementy znečištění kosmetických přípravků patří výrobní prostory, zařízení a lidé. K růstu a množení mikroorganismů dochází zpravidla ve štěrbinách a koutech výrobního zařízení, které jsou znečištěné látkami tukového charakteru a obtížně se čistí. Proto je důležité správně zvolit uspořádání a tvar výrobního zařízení, aby se riziko mikrobiální kontaminace snížilo na minimum. Dalším faktorem jsou výrobní prostory, jejichž čistota a hygienické zajištění se vždy odrazí ve kvalitě finálního kosmetického přípravku. Pro dodržování čistoty jsou vypracovávány sanitační řády určující způsoby, frekvenci a druhy sanitace každého dílčího výrobního prostoru a zařízení. Hlavním zdrojem mikrobiální kontaminace jsou lidé, ať již pracovníci ve výrobním závodě, kteří jsou nedostatečně proškoleni, se špatnou pracovní disciplínou nebo spotřebitelé kontaminující výrobek nesprávnou manipulací.¹⁵

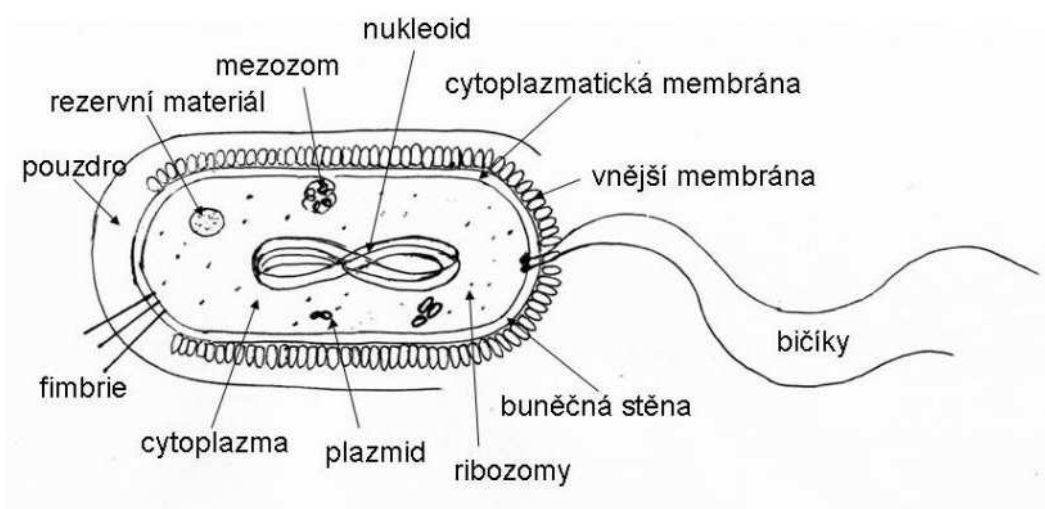
2.2 Mikrobiologické kontroly

Každý výrobce kosmetických přípravků provádí pravidelné mikrobiologické kontroly zahrnující zjištění produkce čerstvě vyrobených přípravků vysoké mikrobiální kvality, dále zjištění mikrobiální odolnosti přípravku vystaveného vnějšímu působení mikroorganismů a také zjištění vlivu skladování kosmetického přípravku a jeho používání na jeho mikrobiální kvalitu. Pro zabezpečení záruky, že byly provedeny všechny výrobní kroky v souladu s bezpečností a byl vyroben kvalitní mikrobiologicky nezávadný výrobek, zavádí se do výroby Správná výrobní praxe dle normy ČSN EN ISO 22 716 zabývající se procesem výroby, kontroly a dodávání kosmetických přípravků na trh. Touto normou výrobce dokazuje správné dodržování legislativních požadavků na Správnou výrobní praxi, stálost a rovnováhu výrobního procesu a kvalitu vyrobených produktů.¹⁵

2.3 Bakterie

Bakterie, řadící se mezi mikroorganismy s prokaryotickým typem buňky, jež je znázorněn na **Obrázku 1**, jsou velmi starou a úspěšnou formou života lišící se od eukaryotických mikroorganismů. Mezi základní odlišnosti patří struktura jejich buněk, která je jednodušší. Bakterie zcela postrádají některé z buněčných organel, jež jsou charakteristické pro eukaryotní mikroorganismy, jako jsou mitochondrie, Golgiho aparát,

lysozomy či endoplasmatické retikulum. Další odlišnost spočívá v umístění DNA, která je u bakterií jen v jednom cyklickém chromozomu umístěném volně v buněčné cytoplazmě nazývajícím se nukleoid,¹⁶ zatímco DNA eukaryot je obklopena buněčnou membránou. Bakteriální buňka je malá a její velikost se odvíjí od jejího rodu i druhu. Tvar jí dává buněčná stěna zároveň sloužící jako mechanická a osmotická bariéra. Na jejím povrchu jsou antigeny se schopností vyvolat imunitní reakci hostitele. Nad buněčnou stěnou může být pouzdro, tzv. kapsule.^{16,17}



Obrázek 1. Stavba prokaryotické bakteriální buňky.¹⁸

Jednotlivé druhy bakterií mají specifické složení buněčné stěny, což má praktický význam v jejich diagnostice. Dle složení, struktury buněčné stěny a Gramovy reakce dělíme bakterie na grampozitivní a gramnegativní.^{16,17} Základní rozdíl spočívá v tom, že grampozitivní bakterie (G+) po usmrcení, obarvení krystalovou violetí a moření v Lugolově roztoku (jodid draselný) udržují komplex barviva a Lugolova roztoku v buněčné stěně a i po promytí organickými rozpouštědly (ethanol, aceton) zůstávají modře zbarvená. Gramnegativní bakterie (G-) se po odbarvení barví červeně v důsledku odstranění komplexu barviva a Lugolova roztoku z buněčné stěny.^{16,19} Buněčná stěna u G+ bakterií se skládá z velmi silné vrstvy peptidoglykanu, skrze který prostupují lineární řetězce teikoových kyselin vázaných kovalentní vazbou na *N*-acetylmuramovou kyselinu.¹⁶ Na peptidoglykanovou vrstvu se také váží polysacharidy, jejichž složení je charakteristické pro jednotlivé skupiny bakterií a zodpovídají za antigenní vlastnosti. Grampozitivní bakterie neobsahují ve své stěně lipidy (výjimkou jsou bakteriální rody

Corynebacterium, *Nocardia* a *Mycobacterium*). O něco tenčí a komplikovanější je buněčná stěna G- bakterií. Neobsahuje teikoové kyseliny, vnitřní vrstva je tvořena nízkým obsahem peptidoglykanu a vnější silnější membrána se skládá z dvojvrstvy fosfolipidů a bílkovin. Antigenní vlastnosti jsou zde zajištěny pomocí lipopolysacharidů. Mezi vnější a vnitřní membránou leží periplazmatický prostor. Dále jsou na peptidoglykanu vázány proteinové kanálky, tzv. poriny, prostupující celou vnější membránou pro transport hydrofilních látek.^{16,19}

Po fyziologické stránce jsou bakterie různorodé. Z hlediska morfologie neexistuje mezi jednotlivými druhy mnoho rozdílů. Bakteriální buňky mohou být tyčinkovitého, kulovitého či vláknitého tvaru. Tyčinkovité buňky mohou být rovné, zakřivené (vibrio) nebo mohou tvořit pravidelné či nepravidelné spirály (spirily a spirochety). Koky jsou kulovité buňky a při rozmnožování mohou vytvářet řetízky, tetrády, sarciny nebo mohou vznikat nepravidelné shluky buněk hrozníčkovitého tvaru.^{19,20} Bakterie se v přírodě vyskytují buď ve formě izolovaných buněk nebo ve společenstvech a shlucích.^{16,17}

Velikost bakteriálních buněk je rozmanitá a závisí na rodu i druhu. Také se mění podle stáří kultury. Starší buňky jsou menší a mladé silnější a větší. U tyčinkovitých bakterií dosahuje tloušťka 0,3–2,0 μm a délka 1,0–7,0 μm . Průměr koků se pohybuje v rozmezí 0,5–5,0 μm .¹⁹

Bakterie jsou schopny během relativně krátké doby vzhledem k enormní rychlosti rozmnožování a vysoké intenzitě metabolismu umožňující za vhodného pH, teploty a přístupu vody porušit velké množství kosmetického produktu.²⁰

Ačkoliv je pro bakterie pohyb výhodný, některé bakterie se nepohybují. Pohyblivé bakterie se snadněji dostanou k potravě, uniknou z nebezpečí nebo se dostanou v těle hostitele tam, kam potřebují. Jako motor pro pohyb jim slouží bičíky, fimbrie a nebo se mohou pohybovat smršťováním těla. Bakterie mohou mít jeden bičík nebo může být bičíky pokryto celé tělo jako u bakterie *Escherichia coli*.²¹

2.3.1 Rod *Staphylococcus*

Mikroorganizmy mají tvar G+ nepohyblivých sférických koků vyskytujících se jednotlivě nebo seskupených do hloučků.²² Vytváří neprůhledné, bílé nebo krémové, žluté až oranžově zbarvené kolonie.^{22,23} Ideální teplota pro růst je 30–37 °C, i když rozmezí teplotního růstu je 7–48 °C. Roste lépe v aerobních podmínkách než anaerobních,

kde je růst limitován, přesto ho řadíme do fakultativně anaerobních mikroorganismů. Optimální pH je 7,0–7,5.²⁴ Patří mezi velmi rozšířené mikroorganismy.^{22,25} Je původcem mnoha kožních a orgánových onemocnění, způsobuje nemoci žláz a sliznic.^{22,23} Běžně se také vyskytují v potravinách (maso, mléko, sýry), vodě, prachu, písku nebo půdě.²²

2.3.2 Rod *Micrococcus*

Buňky jsou nepohyblivé sferické s buněčnou stěnou G+ typu rostoucí při aerobních podmínkách. Buňky vytvářejí koky nebo tyčinky vyskytující se po dvou, ve čtveřicích nebo v nepravidelných shlucích. Jejich růstová teplota se pohybuje v rozmezí 25–37 °C. Lze je najít na kůži člověka a savců, v mase nebo v půdě, vzduchu a vodě. *Micrococcus luteus* produkuje žluté až oranžové karotenoidní pigmenty.²²

2.3.3 Rod *Bacillus*

Bacillus je aerobní a fakultativně anaerobní G+ rovná tyčinka různé délky. Buňky jsou uspořádány ve dvojicích nebo v řetězcích. Pohyb vykonává pomocí bičíků a optimální růstová teplota je 15–55 °C. Některé druhy jsou patogenní a způsobují potravinové otravy.²²

2.3.4 Rod *Escherichia*

Tyto G- krátké rovné tyčinky jsou nepohyblivé nebo se pohybují pomocí bičíků.²⁶ Vyskytují se jednotlivě nebo ve dvojicích.²² Rozsah teplotního růstu je 7–45 °C, přičemž optimum je 37 °C. *Escherichia coli* je fakultativně anaerobní, roste při aerobních i anaerobních podmínkách. Pouze vysoké hladiny oxidu uhličitého mohou inhibovat její růst. Při optimálních podmínkách je minimální pH prostředí pro růst 4,0–4,5.²⁴ *Escherichia coli* je jednou z nejvýznamnějších bakterií osídlující střevní mikroflóru člověka a savců, kde je užitečným komenzálem.²² Některé kmeny *Escherichia coli* produkující enterotoxin způsobují průjemová onemocnění a močové infekce zejména u žen trpících záněty močového měchýře, které se opakují.^{22,23}

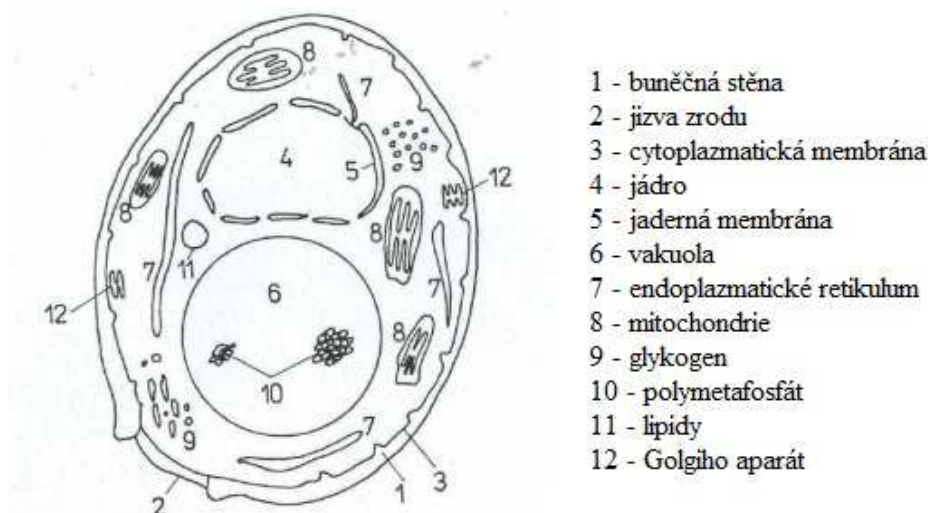
2.3.5 Rod *Pseudomonas*

Tyto striktně aerobní bakterie jsou G- rovné či zakřivené tyčinky pohyblivé pomocí bičíků.²² Teplotní optimum růstu je 42 °C. *Pseudomonas aeruginosa* je nejběžnější pseudomonádou u člověka, kde je přítomna v tlustém střevě. Její primární výskyt je ve formě biofilmu nebo planktonu v půdě, v přírodních i odpadních vodách, na rostlinách, u volně žijících i domácích zvířat a také v mase a některých ostatních potravinách. *Pseudomonas aeruginosa* je odolná k fyzikálním i chemickým vlivům. Je původcem velmi závažných lokálních i systémových infekcí. Infekce má buď původ ve stolici nebo přichází od ostatních nemocných pacientů. Může infikovat bércové vředy, proleženiny, popálené plochy nebo kůži. Jakmile se dostane do krevního oběhu, dochází k sepsi nebo meningitidě.²³ *Pseudomonas aeruginosa* způsobuje chronické plicní infekce a infekce močových cest.²⁷

2.4 Kvasinky

Kvasinky, jejichž buňka je schematicky znázorněná na **Obrázku 2**, se řadí již mezi eukaryotní mikroorganismy a náleží do skupiny hub (*Fungi*).²⁸ Jejich tvar je elipsoidní, vejčitý nebo kulovitý. Rozmnožují se nejčastěji pučením, dělením nebo pomocí pohlavních spor. Buňka se skládá z velmi pevné buněčné stěny, která určuje tvar kvasinky a chrání ji před mechanickým namáháním a osmotickým šokem. V buněčné stěně jsou silné póry, skrze které mohou procházet nízkomolekulární sloučeniny. Polysacharidy tvoří 80 % sušiny buněčné stěny a jsou její hlavní částí, které jsou seřazeny do hustých spletených vláken. Tato vlákna jsou vyplněna bílkoviny. Další složkou buněčné stěny je malé množství lipidů, fosfolipidů a fosforečnanů. Cytoplazmatická membrána kvasinek je jemná. V cytoplazmě je obsažena řada membránových struktur včetně jádra odděleného dvojitou jadernou membránou. Z membránových struktur jsou důležité ribozomy pro syntézu bílkovin agregovaných do tzv. polyzomů, které se nacházejí na vnějším povrchu endoplazmatického retikula. Mitochondrie jsou sídlem dýchacích enzymů a obsahují malé množství RNA a DNA sloužící jako mimojaderná genetická informace kvasinek. Součástí cytoplazmy je také vakuola a Golgiho aparát s předpokládanou funkcí transportu stavebních kamenů buněčné stěny z cytoplazmy přes cytoplazmatickou membránu. Cytoskelet kvasinek je tvořen sítí proteinových vláken zprostředkovávající

vnitrobuněčný pohyb organel. Většina druhů kvasinek disponuje schopností zkvašovat monosacharidy a některé disacharidy na ethanol a oxid uhličitý.²⁰



Obrázek 2. Průřez buňkou kvasinek.²⁰

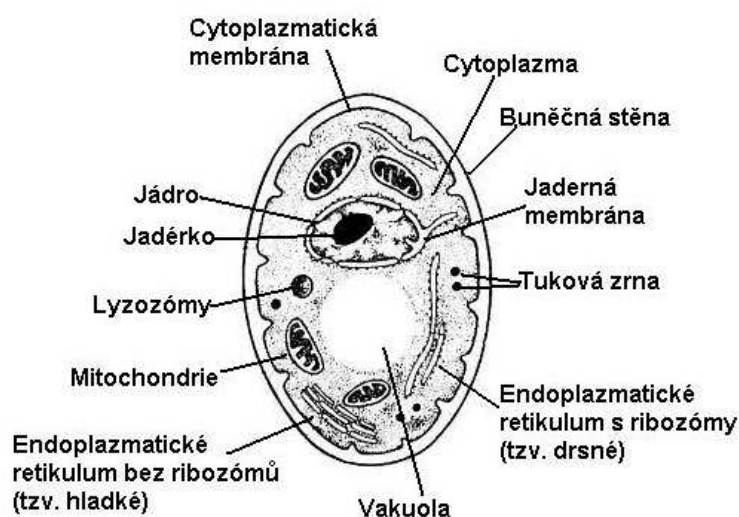
2.4.1 Rod *Candida*

Tento rod obsahuje osm druhů, které způsobují onemocnění člověka. *Candida* se běžně vyskytuje u člověka v ústní dutině, ovšem *Candida albicans* je původcem kožních onemocnění především v krajinách vlhké zapářky. Infekce mají nejčastěji endogenní charakter. Způsobují také systémová onemocnění, například plicní kandidózu. Při prostupu do oběhu prorůstáním pseudomycelií do cév postihují kandididy ledviny, játra, slezinu a mozek a komplikují tak stavy se sníženou imunitou.²³

2.5 Plísně

Do skupiny hub řadíme také mikroskopické vláknité plísně s eukaryotickým typem buňky, který je na **Obrázku 3**. Stélka plísni je tvořena vlákny (hyfy) jednobuněčného nebo vícebuněčného typu. Hyfy se větví do mycelia, které dále tvoří spletené útvary zvané sklerocium tmavé barvy odolné nepříznivým podmínkám. Hlavní složkou buněčné stěny jsou polysacharidy, bílkoviny, lipidy a malé množství vosků způsobující nízkou smáčitelnost plísni. Buňka obsahuje jedno nebo více haploidních jader. V cytoplazmě je obsaženo endoplazmatické retikulum, mitochondrie a vakuoly. Z chemického hlediska

je cytoplazma plísni velmi podobná kvasinkám. Rezervní látkou jsou lipidy. Rozmnožování probíhá rozrůstáním hyf nebo pomocí spor. Barva plísni je zelená až modrozelená, hnědá až černá nebo růžová. Některé druhy obsahují také melaninové barvivo, které je chrání před ultrafialovými paprsky slunečního záření.²⁰



Obrázek 3. Eukaryotický typ buňky.²⁹

2.5.1 Rod *Aspergillus*

Infekce člověka může být způsobena několika druhy rodu *Aspergillus*. Nejznámější jsou *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* a *Aspergillus fumigatus*. Konidie umístěné na konidioforech mohou být vdechnuty a po vyklíčení spustí v těle člověka infekční proces. Postižený bývá centrální nervový systém, ledviny, játra, trávicí trakt a ostatní orgány. Nejpostiženější jsou lidé se sníženou imunitou. Mezi zdroje infekce patří prach a ptačí trus, někdy také hnilý ovoce či chleba.²³

2.6 Mikrobiologie vybraných kosmetických přípravků

Pro nastínění představy mikrobiální kontaminace bylo vybráno z nepřeberného množství kosmetických přípravků pár produktů, které budou popsány z hlediska jejich základní surovinové skladby, ze které vyplývá přítomnost možných mikrobiálních kontaminantů.

U kosmetiky pro děti do tří let je povolen mikrobiální limit dle testování pomocí Critical Path Method 10^2 CFU/g (ml) při 0,5 g (ml) vzorku. Pro ostatní výrobky je povolen mikrobiální limit dle testování pomocí Critical Path Method 10^3 CFU/g (ml) při 0,1 g (ml).³⁰

2.6.1 Pleťové krémy a mléka

Tuky, mastné kyseliny a jejich estery, uhlovodíky, bílkoviny, emulgátory, mýdla, steroly a glycerin - kromě vody je to jen základní výčet ingrediencí dávající vznik pleťovým krémům a mlékům. Tyto složky poskytují vhodné prostředí pro růst plísní rodu *Aspergillus* a *Penicillium*, které identifikujeme na povrchu produktu jako nažloutlé, nazelenalé až hnědočerné skvrny prostupující do hlubších vrstev přípravku. Ve vzácných případech byla zjištěna přítomnost také *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Pseudomonas fluorescens*.³¹

2.6.2 Zubní pasty

Zubní pasty jsou složeny z pevných, tekutých a jiných látek. Z pevných je to uhličitan vápenatý, kaolin a fosforečnan vápenatý. Z tekutých složek zubní pasty obsahují kromě vody glycerin. Pektin, tragant a tylóza mají funkci pojiva. Dalšími složkami jsou barviva. Aroma zubním pastám dodávají éterické oleje – mentolový, anýzový, skořicový a mnoho jiných. Z chuťových látek se využívá např. cukr nebo vanilin. Nejčastěji se v zubních pastách vyskytují bakterie rodu *Proteus*, *Pseudomonas* (nejčastěji *Pseudomonas fluorescens*) a koliformní bakterie.³¹

2.6.3 Pudry a zásypy

Práškové pudry se skládají z mastku, kaolinu, uhličitanu vápenatého a hořečnatého, škrobu, zinkové běloby a stearátu hořečnatého. Jako barviva se využívají uměle vyrobené látky nebo barviva přírodní. Pudry tekuté mají stejné složení jako práškové, navíc ale obsahují vodu, ethanol, glycerin a látky, které jsou schopny vytvářet slizy z důvodu lepší výdrže na pleti. V zásypech je obsažen mastek a antiseptikum, např. kyselina boritá. Pudrům a zásypům je třeba věnovat z mikrobiologického hlediska zvýšenou pozornost. Nepřípustná je přítomnost koliformních a patogenních mikroorganismů. Mohou se zde vyskytnout i kvasinky a plísně.³¹

2.6.4 Rtěnky

Výběr surovin pro rtěnky a jiné produkty k aplikaci na rty je velmi náročný na jakost, jelikož i minimální závady v surovině mohou způsobit iritaci rtů. Základem je směs tuků a vosků a zdravotně nezávadných barviv. V rtěnkách nejčastěji pozorujeme kontaminaci plísněmi. Kontaminace jinými mikroorganismy nebyly dosud závažné.³¹

2.6.5 Parfémy a toaletní vody

Základem parfémů a toaletních vod bývá různé objemové množství etanolu, ve kterém jsou zabudovány vonné látky. Protože však tyto produkty obsahují vysoké množství alkoholu, nejsou známy žádné mikrobiální kontaminace a lze konstatovat, že jsou mikrobiologicky nezávadné.³¹

3. KONZERVACE KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVKŮ

Mezi lety 1960–1970 byla většina kosmetiky kontaminována mikroorganismy.¹² Od této doby se konzervační látky staly nedílnou součástí kosmetiky pro zabránění mikrobiální kontaminace, následné degradace kosmetického přípravku, jeho znehodnocení a ohrožení zdraví spotřebitele. Při výběru konzervačního systému je nutno dbát zvýšené opatrnosti, jelikož se spousta konzervačních látek chová jako alergen a způsobuje tak značné množství dermatitid.³² Relevantní je množství použité konzervační látky, které by nemělo být příliš vysoké, aby nezvyšovalo riziko vzniku alergií.

Je-li výrobce ve stádiu vývoje nebo před uvedením na trh nového kosmetického přípravku, může využít možnosti otestování účinnosti konzervačního prostředku, kterou jako jediné pracoviště v České republice ověřuje Národní referenční laboratoř pro mikrobiologii potravin, předmětů běžného užívání a prostředí. Laboratoř vyhodnotí mikrobiální odolnost kosmetického přípravku pomocí zátěžových neboli přežívacích testů. Principem je zavedení standardních bakterií, kvasinek a plísní do testovaného výrobku a jeho sledování v daných intervalech během 4 týdnů.³³

Mezi biocidy řadíme všechny látky, které hubí a omezují růst nežádoucích mikroorganismů v jakémkoliv průmyslu a při všech činnostech, kde jsou biocidy žádoucí. Dle Směrnice Evropského parlamentu a Rady 98/8/EC o uvádění biocidních přípravků na trh se biocidy dělí na dezinfekční a biocidní látky, konzervační přípravky, přípravky pro regulaci živočišných škůdců a ostatní biocidní přípravky.^{15,34}

Biocidy jsou velmi rozmanitá skupina přírodních nebo syntetických chemických látek, které mohou na mikroorganismy působit dvěma mechanismy. První trvale usmrtí daný mikroorganismus a v názvu je vyjádřen příponou -cidní (např. baktericidní, fungicidní, tuberkulocidní, mykobaktericidní, virucidní či sporicidní). Druhý mechanismus způsobí pokles růstové aktivity nebo dočasnou ztrátu schopnosti se rozmnožovat. Takový mechanismus vyjadřujeme příponou -statický (např. bakteriostatický, fungistatický či sporistatický).¹⁵

Pro složité a rozmanité kompozice kosmetických přípravků jsou použity různé konzervační systémy, které tvoří několik konzervačních látek v rozdílných koncentracích poskytující ochranu produktu po celou dobu jeho skladování i používání.³⁰

3.1 Faktory působící na účinnost konzervace

Je-li výrobce na začátku vývoje nového kosmetického přípravku a vybírá pro něj ideální konzervační systém, musí brát v potaz okolnosti, které by mohly proces konzervace ovlivnit. První je **faktor zředění**. Jelikož při naředění antimikrobní látky neklesá její účinek přímou úměrou, ale exponenciálně. To znamená, že naředíme-li konzervační látku na polovinu výchozí koncentrace, je její účinek 2η krát nižší, kde exponent η je pro každou konzervační látku jiný. Další vliv na účinnost konzervační látky má **teplota**, která je popsána faktorem θ_{10} . Účinnost konzervačního prostředku roste se vzrůstající teplotou. Faktor dále popisuje kolikrát je konzervant účinnější zvýší-li se teplota o $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. V úvahu je třeba také brát **velikost inokula**, které předpokládáme v kosmetickém přípravku. Při výrobě **vícefázových přípravků**, jako jsou zejména emulze, aplikujeme konzervační látku do vodné fáze produktu, kde působí na činnost mikroorganismů. Vliv na konzervaci mohou mít také některé **pomocné a inaktivující látky**, které inaktivují antimikrobní látku tím, že ji na sebe nasorbují. Častou inaktivující látkou jsou proteiny. V úvahu se musí brát také fakt, po jak dlouhou dobu má konzervační látka fungovat, tedy **doba expozice** konzervační látky. Při výběru antimikrobních látek má význam **pH a vodní aktivita** výrobku. V neposlední řadě je z legislativního hlediska důležité, zda je vybraná konzervační látka v zemi uvádění výrobku na trh povolena.^{16,30}

3.2 Faktory pro výběr konzervační látky

Přesto, že ideální konzervační látka neexistuje, musí splňovat alespoň několik z řady požadavků. Mezi tyto požadavky se řadí **aktivita vůči širokému spektru mikroorganismů již při nízkých koncentracích**. Ideální konzervační látka by měla být **bezbarvá a bez zápachu, stabilní** v různých rozmezích pH, teplot a **kompatibilní** s daným kosmetickým prostředkem. Dalšími požadavky je **rozpustnost ve vodě** a **nerozpustnost v olejích, dlouhá životnost, bezpečnost, snadná použitelnost a dohledatelnost** při analýze kosmetického přípravku. Pro kosmetické výrobce je také důležitý faktor **cenový**.^{15,30}

3.3 Přehled konzervačních látek

Hlavní funkcí konzervačních látek je ochrana kosmetických přípravků, léčiv, potravin, detergentů a dalších produktů před mikrobiální kontaminací a zachování jejich kvality. Důležitá je ochrana především produktů obsahujících vodu nebo organické látky. Použití těchto konzervantů je legislativně regulováno a pro každou látku existují koncentrační limity.¹⁵ Konzervační látky lze rozdělit do několika chemických skupin.^{30,35}

3.3.1 Organické kyseliny, jejich soli a estery

Antimikrobiní aktivita těchto látek je selektivní a poskytuje účinnost pro široké rozmezí mikroorganismů. Z tohoto důvodu jsou oblíbeným konzervantem kosmetiky parabeny, což jsou estery kyseliny *p*-hydroxybenzoové (nejčastěji methyl-, *n*-propyl- a *n*-butyl- estery) a jejich aktivita se zvyšuje s rostoucím počtem uhlíků v alkylovém řetězci. Patří zde také kyselina salicylová, která je však nevhodná pro děti do tří let, kyselina benzoová, jejichž účinnost se ztrácí v přítomnosti proteinů. Dalšími organickými kyselinami jsou kyselina sorbová, kyselina propionová a kyselina dehydrooctová.^{30,35}

3.3.2 Aldehydy a formaldehydy

Z těchto chemických látek je nejpoužívanější formaldehyd, polyoxymethylen (polyacetal), imidazolidinylmočovina, diazolidinylmočovina, quarternium 15 a bronopol. Snadno se rozpouští ve vodě a jsou cenově velmi dostupné. Jejich stinnou stránkou jsou jejich štiplavé, dráždivé a páchnoucí vlastnosti, které mohou způsobit slzení a pálení, nevolnosti a potíže při dýchání. Při vyšších koncentracích vyvolávají bolesti hlavy a astmatické záchvaty. V Evropské unii je povoleno tyto látky používat s koncentračními omezeními pro různé kosmetické přípravky.^{30,35}

3.3.3 Aminy, amidy, pyridiny a benzalkoniové soli

Aminy a amidy tvoří velkou skupinu konzervačních činidel. Mezi základní zástupce patří triklokarban, hexamidin, chlorhexidin, cetylpyridinium-chlorid a benzalkonium-chlorid.³⁵

3.3.4 Deriváty fenolu

Nejvýznamnějším zástupcem této málo používané skupiny je fenoxylethanol, který se často kombinuje s parabeny a inhibuje bakterie, kvasinky a plísně až při vyšších koncentracích. Deriváty fenolu jako benzylalkohol, *o*-fenylfenol, chloroxylethanol a resorcinol jsou málo kompatibilní s ostatními složkami kosmetického přípravku a jsou hůře rozpustné ve vodě.^{30,35}

3.3.5 Alkoholy

Alkoholy jako konzervační činidla vykazují aktivitu proti mikroorganismům až při vyšších koncentracích (60–80 %). Alifatické alkoholy jako ethanol nebo isopropanol mají rychlý nástup účinku proti bakteriím, o něco méně působí proti plísním.^{30,35}

3.3.6 Deriváty isothiazolinonu

Tyto látky mají iritační účinek a je nutné je kombinovat s biocidy fungujícími na plísně. Řadíme sem např. benzisothiazolinon, 1,2-benzisothiazolinon, octylisothiazolinon a methylisothiazolinon, který je zakázán v „leave on“ kosmetických přípravcích.^{30,35}

3.3.7 Jiné konzervační látky

Populární skupinou konzervantů se v současnosti stávají přírodní látky jako jsou éterické oleje (např. Tea Tree Oil, hřebíčkový olej, tymiánový olej, levandulový olej, rozmarýnový olej), extrakty z rostlin (např. levandule, rozmarýn, tymián, máta) nebo semen (např. grapefruitu). Tyto přírodní látky jsou oblíbené pro své specifické vůně a jsou používány především v přírodní kosmetice. Nevýhodou je však jejich vysoká cena.¹⁵

4. CHARAKTERIZACE A SYNTÉZA TRIAZOLŮ

4.1 Biologické účinky triazolových sloučenin

Triazoly se pro své různorodé biologické účinky staly velmi populárním objektem mnoha vědeckých výzkumů. Nejčastěji jsou tyto účinky využívány především v lékařské chemii, kde byl v posledních dvou desetiletích zaznamenán velký pokrok týkající se příprav rozmanitých modifikací triazolů.³⁶ Z významných biologických účinků užitých ve farmakologii jsou účinky antimikrobiální³⁷, antifungální³⁸, antioxidační³⁹, protizánětlivé⁴⁰, protinádorové⁴¹, antituberkulostatické⁴², antivirové⁴³, analgetické⁴⁴, antidepressivní⁴⁵, sedativní a hypnotické.⁴⁶

Jedním z častých předmětů zájmů je účinek antimikrobní. Existuje velké množství studií, které se zabývají antimikrobní různých druhů mikroorganismů. Z provedených vědeckých výzkumů vyplývá, že antimikrobní aktivitu poskytují triazolům jejich možné rozmanité substituenty, s jejichž obměnou se také mění účinek vůči konkrétním druhům mikroorganismů, na které inhibičně působí.⁴⁶

4.2 Komerčně dostupná triazolová chemoterapeutika

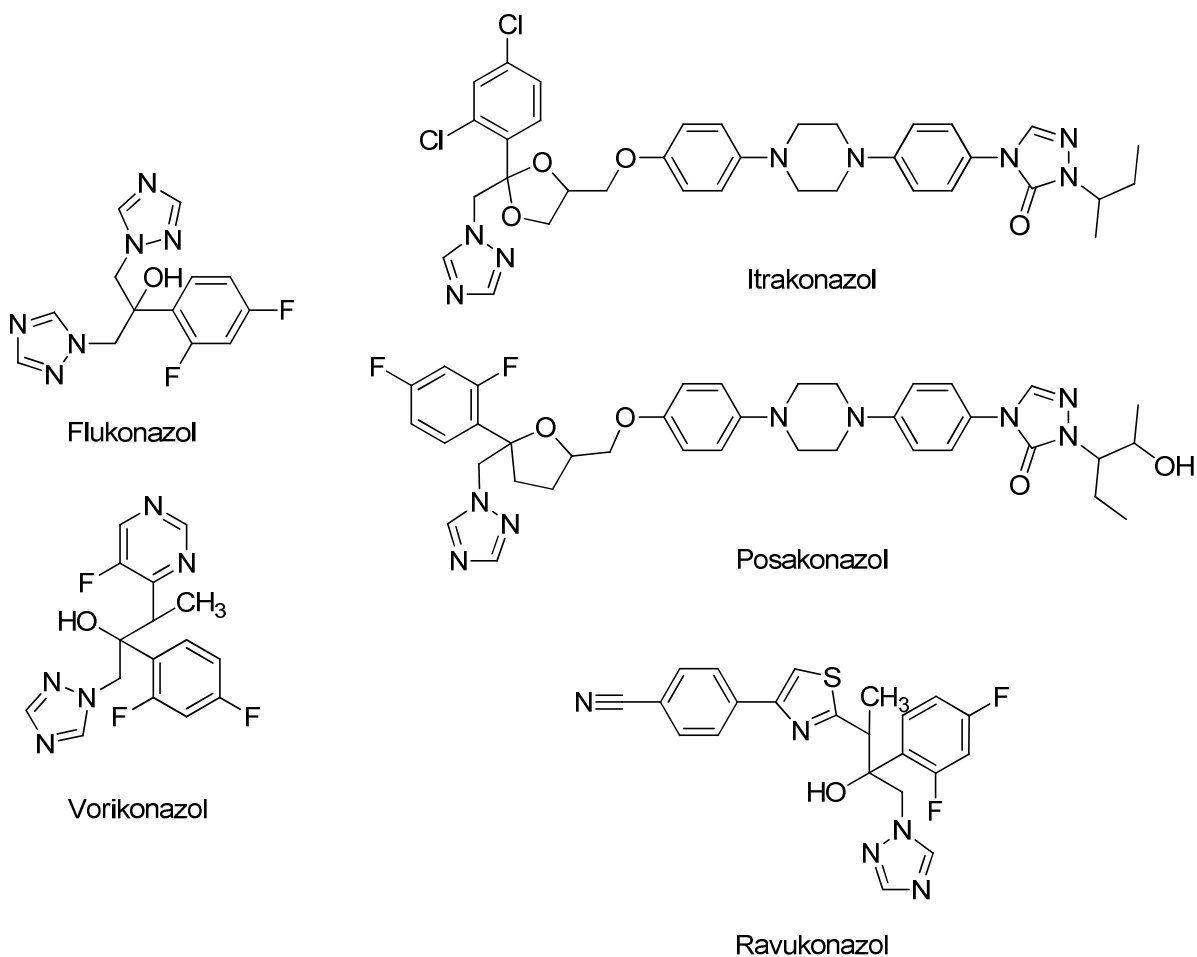
Přesto, že nejsou známy komerčně dostupné triazolové konzervanty s antimikrobními vlastnostmi, které by se daly bezpečně využít v kosmetických přípravcích, těší se triazolové deriváty značné pozornosti v oblasti antifungálních aktivit.

V uplynulém desetiletí se škála antimykotických přípravků bohatě rozšířila nejen z hlediska nahrazení starších preparátů modernějšími méně toxickými analogy triazolových derivátů, ale také z hlediska vývoje nových lékových forem.^{36,47} Bylo vypracováno mnoho studií zabývajících se antifungálními účinky triazolových derivátů sloužící jako předloha pro syntézu léčiv s triazolovým kruhem či kruhy mající antimykotické vlastnosti. Mezi nejznámější triazolová antimykotika patří flukonazol, vorikonazol, itrakonazol, posakonazol a ravukonazol,^{48,49} jejichž struktury jsou na **Obrázku 4**. Mechanismus jejich účinku se zakládá na inhibici enzymu odpovědného za přeměnu lanosinu na ergosterol,⁵⁰ který se nachází v buněčné stěně hub. Nedostatečné množství ergosterolu zabraňuje tvorbě buněčné stěny kvasinek a mikromycet.⁵¹

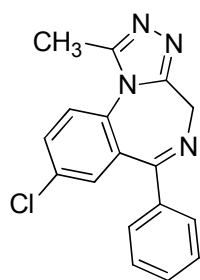
Známými a léty prověřenými látkami znázorněnými na **Obrázku 5**, které se používají při léčbách úzkosti, depresí a mají zklidňující účinek jsou alprazolam, estazolam,

etoperidon, nefazodon, trazodon, triazolam a rilmazafon fungující při neurotické nespavosti.⁴⁶

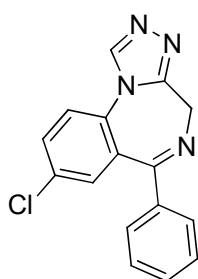
Z dalších látek vyskytujících se v medikamentech je rizatriptan působící proti migréně, antivirotický působící ribavirin či trapidil používající se při zmírnění hypotenze.⁴⁶



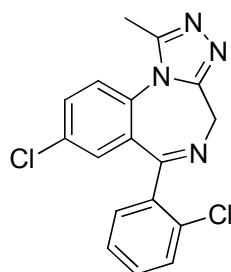
Obrázek 4. Struktury triazolových antimykotik.



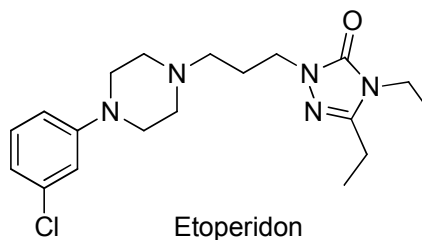
Alprazolam



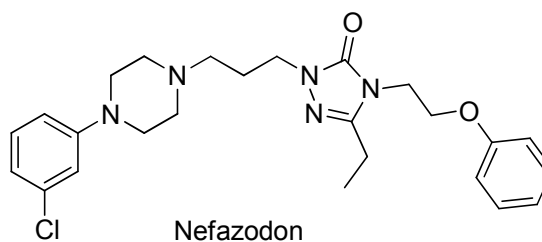
Estazolam



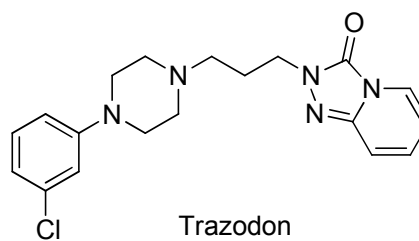
Triazolam



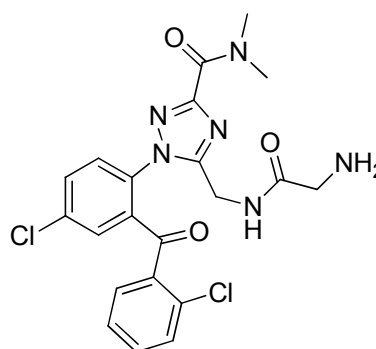
Etoperidon



Nefazodon

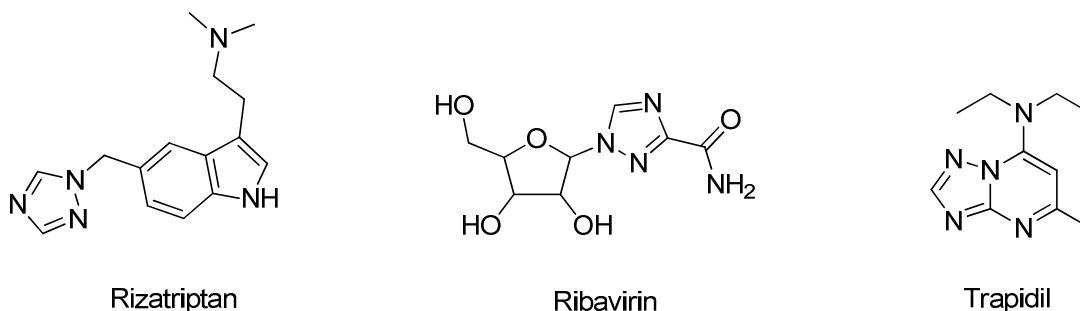


Trazodon



Rilmazafon

Obrázek 5. Struktury triazolových sedativ, hypnotik a antidepressiv.



Obrázek 6. Struktury rizatriptanu, ribavirinu a trapidilu.

4.3 Syntéza triazolových sloučenin

4.3.1 Termicky a katalyticky indukované [3+2] cykloadice

Existuje mnoho cest, jak lze triazolové deriváty syntetizovat. V roce 2002 však nezávisle na sobě Fokin se Sharplessem⁵² a Tornøe s Meldalem⁵³ objevili a popsali rychlou a v laboratorních podmínkách poměrně snadnou metodu s výbornou výtěžností spočívající v 1,3-dipolární cykloadici. Byly to reakce probíhající mezi deriváty acetylenu a organickými azidy s použitím měďných solí jako katalyzátoru, jejichž konečným produktem, těchto tzv. „click reakcí“, jsou 1,4-disubstituované 1,2,3-triazoly (**Schéma 1**). Kromě rychlosti, velké výtěžnosti a bezproblémového průběhu reakce v jakémkoliv rozpouštědle je nesporně velkou výhodou těchto reakcí poskytování produktu prakticky bez žádných vedlejších produktů.⁵⁴

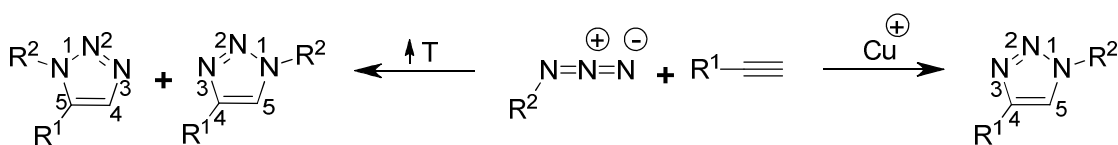
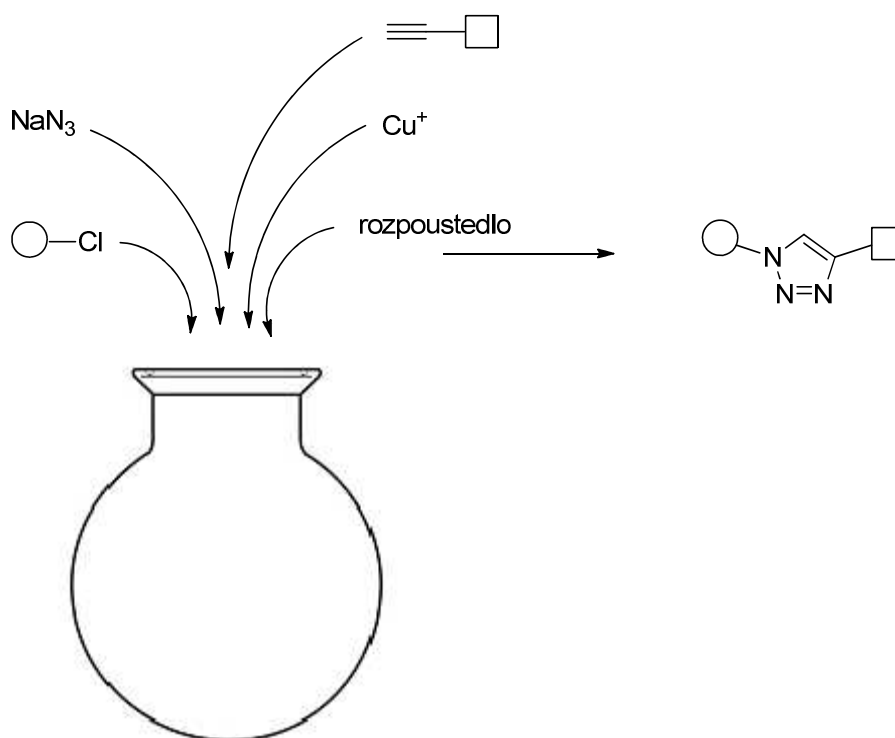


Schéma 1

Pro termodynamickou nestabilitu měďných solí, které se často vlivem oxidace mění na katalyticky neúčinné měďnaté kationty, se do reakcí přidávají s redukčním činidlem. Nejčastěji se používá katalytický systém složený z CuSO₄ · 5H₂O a askorbátu sodného jako redukčního činidla. Jsou známy ale i jiné kombinace poskytující Cu⁺ ionty v reakční směsi, jako je například nadbytek práškové elementární Cu s 10 % modré skalice.⁵⁴

Další zajímavou reakcí jsou „one pot click reakce“. Podstatou „click reakcí“ je, že je možné vytvořit triazolový kruh reakcí organických azidů s deriváty acetyleny. Anorganické azidy se této reakce za daných podmínek prakticky nezúčastňují. Proto je možné přímo do reakční nádoby nadávkovat halogenderivát, azid sodný, derivát acetyleny, měďný katalyzátor a vhodné rozpouštědlo, jak je znázorněno na **Obrázku 7**. V reakční směsi nejprve dojde k nukleofilní substituci atomu chloru na azidovou skupinu, čímž již dojde ke vzniku azidu organického, který se dále, jak je popsáno výše, zapojí běžným způsobem do 1,3-dipolárních cykloadičních reakcí s acetyleny. Velká výhoda „one pot click reakcí“ spočívá v tom, že není nutné nejprve syntetizovat a následně izolovat azidosloučeninu z reakční směsi.⁵⁴



Obrázek 7. Průběh „one pot click reakce“.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Syntéza triazolových derivátů

Dílo právě mající čtenář v rukou bezprostředně navazuje na bakalářskou práci, ve které byly studovány dvě možné syntetické cesty směřující k chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionu nesoucího v poloze 3 jeho heterocyklického kruhu triazolovou skupinu a na atomu dusíku triazolymethylovou skupinu. Z výsledků získaných při řešení zadaného problému zcela jasně vyplynulo, že pouze jedna z navržených a posléze realizovaných dvou syntetických variant relativně “bezproblémově“ vede k získání různě substituovaných derivátů chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionů obsahující dva triazolové kruhy v molekule.

Tento ověřený a do jisté míry optimalizovaný sled jednotlivých reakčních kroků byl aplikován pro přípravu malé knihovny látek vycházející ze dvou základních 4-hydroxychinolin-2(1*H*)-onů **1**, které se vzájemně lišily pouze substitucí v poloze 3 chinolinového kruhu, kde byly vybrány methylová skupina, jako zástupce alkyly, a fenylová skupina, jako zástupce arylu. Ty byly připraveny známou metodou⁵⁵ spočívající v tepelně indukované kondenzaci anilínu s diethyl-methylmalonátem respektive s diethyl-fenylmalonátem (**Schéma 2**), u které byla chemická rovnováha posouvána ve prospěch žádaných produktů postupným oddestilováním reakcí uvolňovaného ethanolu.

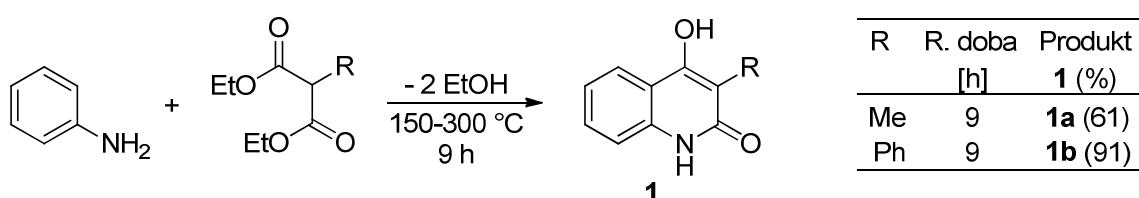


Schéma 2. Příprava substituovaných 4-hydroxychinolin-2(1*H*)-onů **1**.

I když byla příprava 4-hydroxy-3-methylchinolin-2(1*H*)-onu (**1**) provedena třikrát, byl za identických reakčních podmínek získán žádaný produkt s prakticky shodnými výtěžky okolo 60 %, což je pro analogické sloučeniny nesoucí alifatický zbytek v poloze 3 běžné (např. pro 3-ethyl-4-hydroxychinolin-2(1*H*)-onu se výtěžek pohybuje v rozmezí 52⁵⁶–69^{57,58} %, pro 3-butyl-4-hydroxychinolin-2(1*H*)-onu 65⁵⁷–69⁵⁹ %). Naproti tomu u 3-arylderivátů 4-hydroxychinolonu jsou výtěžky výrazně vyšší. Například výtěžnost

3-fenyl-4-hydroxychinolin-2(1*H*)-onu se pohybuje v rozmezí 88⁵⁷–97⁵⁹ %, popřípadě u 3-benzyl-4-hydroxychinolin-2(1*H*)-onu je 83⁶⁰–90⁶¹ %.

V ověřeném sledu reakcí vedoucí zdárně k bis-triazolovým sloučeninám bylo nutné nejprve syntetizovat sloučeniny s různě substituovanými triazolovými kruhy v poloze 3, následně alkynylovat chinolinový atom dusíku a v závěrečné fázi „click reakcemi“ s variabilními organickými azidy vytvořit druhý triazolový kruh.

Drtivá většina azidových derivátů je připravována klasickou nukleofilní substitucí příslušných halogenderivátů azidovými ionty. Pro tuto substituci jsme dali přednost 3-halogenderivátům chinolindionů oproti jejich 3-brom analogům a to z toho důvodu, že jejich příprava je snadnější, obzvláště z hlediska izolace čistých produktů. Při bromaci 4-hydroxychinolonů dochází k tvorbě nejen požadovaných 3-brom derivátů, ale nastává současně substituce atomu vodíku na benzenovém kruhu chinolinu. Tyto neselektivní halogenace obvykle poskytují mimo hlavního produktu (3-bromchinolin-2,4-dionu) i různé dibromované izomery s velmi podobným *R_f* a tím znesnadňují separaci a izolaci čistých chemických individuí.

Již prověřenou a dobře známou metodou⁵⁵ byly provedeny reakce, ve kterých byl do molekuly 4-hydroxychinolonu do polohy 3 zaveden atom chloru účinkem sulfurylchloridu v nadbytku 1,4-dioxanu při teplotě 45–50 °C. Sulfurylchlorid zde slouží jako zdroj molekuly chloru, která se aduje na dvojnou vazbu mezi C-3 a C-4 chinolinového skeletu a z vytvořeného meziprojektu dojde k eliminaci HCl a k tvorbě požadovaného chlorderivátu **2**, jehož většina byla z reakční směsi izolována pouhým naředěním reakční směsi ledovou vodou, filtrací vzniklé sraženiny a jeho překrytalizováním z benzenu.

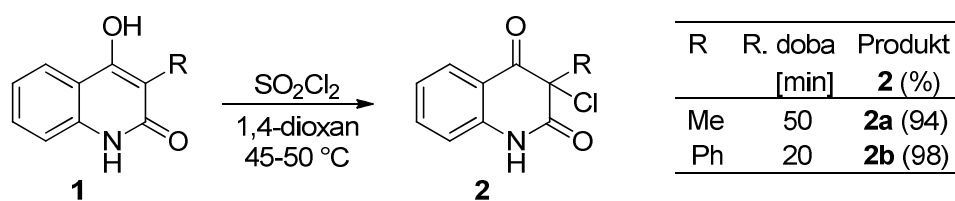


Schéma 3. Chlorace derivátů 4-hydroxychinolin-2(1*H*)-onů **1**.

U obou 3-chlorchinolin-2,4-dionů **2a,b**, získaných ve vysokých výtěžcích a čistotě, byly halogenidové ionty za klasických podmínek bimolekulární nukleofilní substituce (*S_N2*) nahrazeny azidovým aniontem pocházejícím z azidu sodného, který byl v reakční

směsi v půl molárním nadbytku. Obě konverze provedené v dimethylformamidu (DMF) proběhly během 2 h prakticky kvantitativně.

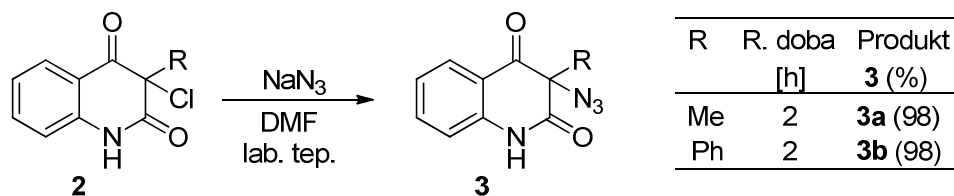


Schéma 4. Konverze 3-chlorchinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionů **2** na azidoderiváty **3**.

3-Azidochinolin-2,4-diony **3** byly vystaveny podmínkám 1,3-dipolárních cykloadičních reakcí katalyzovaných měďnými ionty. Již v dříve provedených experimentech, kdy jsem v rámci své bakalářské práce optimalizovala podmínky „click reakcí“, se ukázalo, že nejvhodnější je dvojnásobný nadbytek elementární mědi vůči 3-azidochinolindionu **3**, který je z hlediska výtěžků a reakčních časů optimální pro zdárný průběh syntézy triazolového derivátu. Proto byly tyto poměry u všech cykloadičních reakcí zachovány. V případě, kdy byl vůči výchozí látce použit přibližně čtyřnásobek mědi, reakce proběhla sice během 1 h prakticky se 100% konverzí, ovšem bylo problematické veškerou měď z reakční směsi odstranit. Oproti tomu bylo-li použito ekvivalentní množství mědi, byl získán produkt rovněž ve vysokém výtěžku (82 %), ale i po 25 hodinách byl ve směsi stále přítomen výchozí azid.

Všechny 3-triazolylchinolin-2,4-diony **4** byly tedy získány ve výtěžku 86–99 % reakcí směsi tvořené z příslušných 3-azidoderivátů chinolin-2,4-dionu **3** s 5% nadbytkem fenylacetyleny nebo s propargylalkoholu a dvou molárního přebytku mědi s katalytickým množstvím modré skalice v DMF při laboratorní teplotě. Jelikož jsou obecně azidové sloučeniny fotosenzitivní, byly reakce prováděny v temnu.

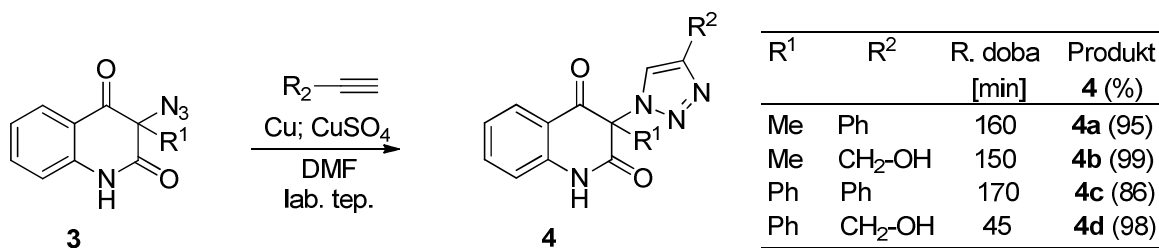


Schéma 5. Cykloadice 3-azidochinolin-2,4-dionů na 3-triazolylchinolin-2,4-diony **4**.

V následném kroku vedoucím k finálním látkám bylo nutné na atom dusíku chinolinového kruhu zavést prop-2-yn-1-ylovou skupinu. Tato nukleofilní substituce byla provedena reakcí propargylbromidu se sloučeninami **4a** a **4c** v přítomnosti tří ekvivalentů potaše v DMF při laboratorní teplotě během 1,5 hodiny.

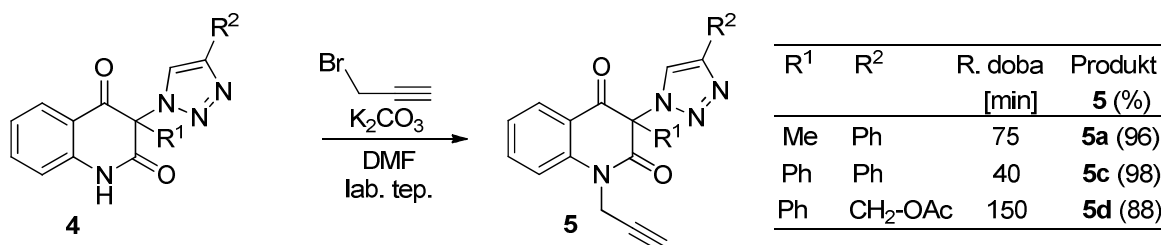
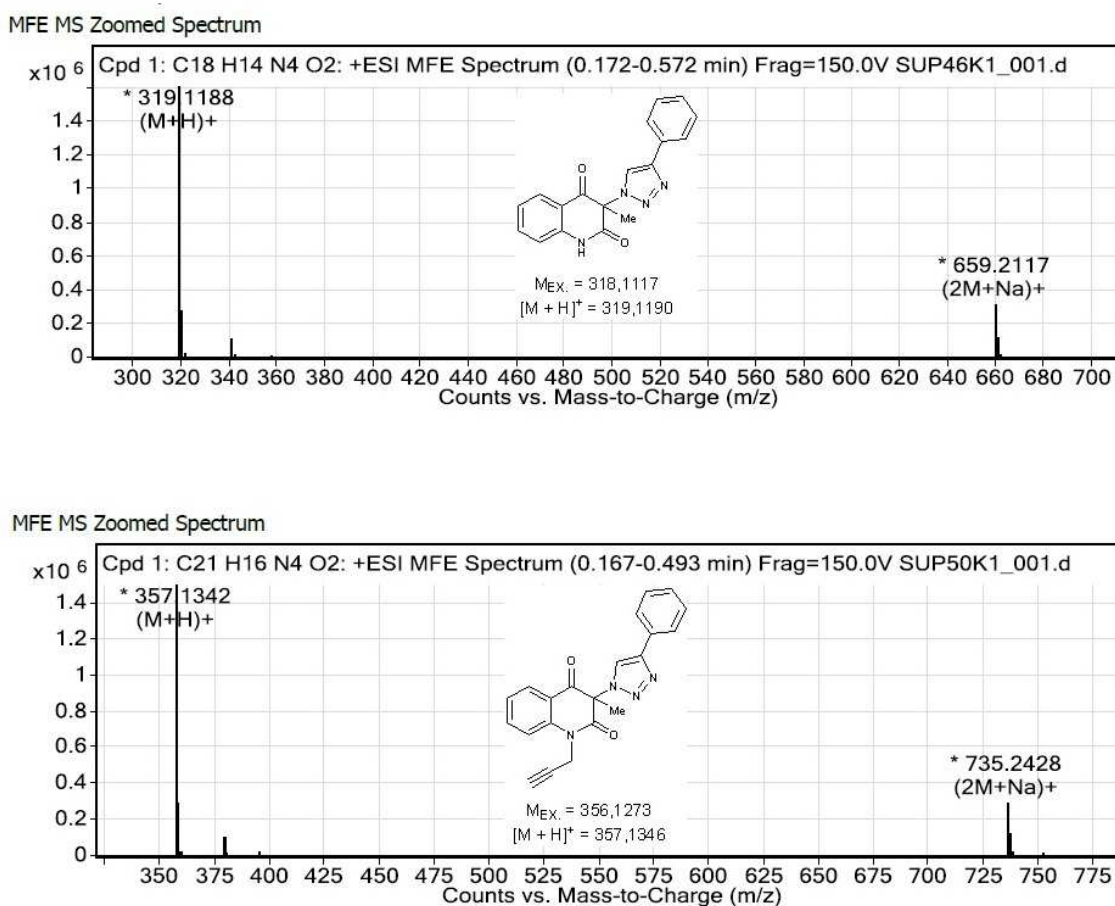


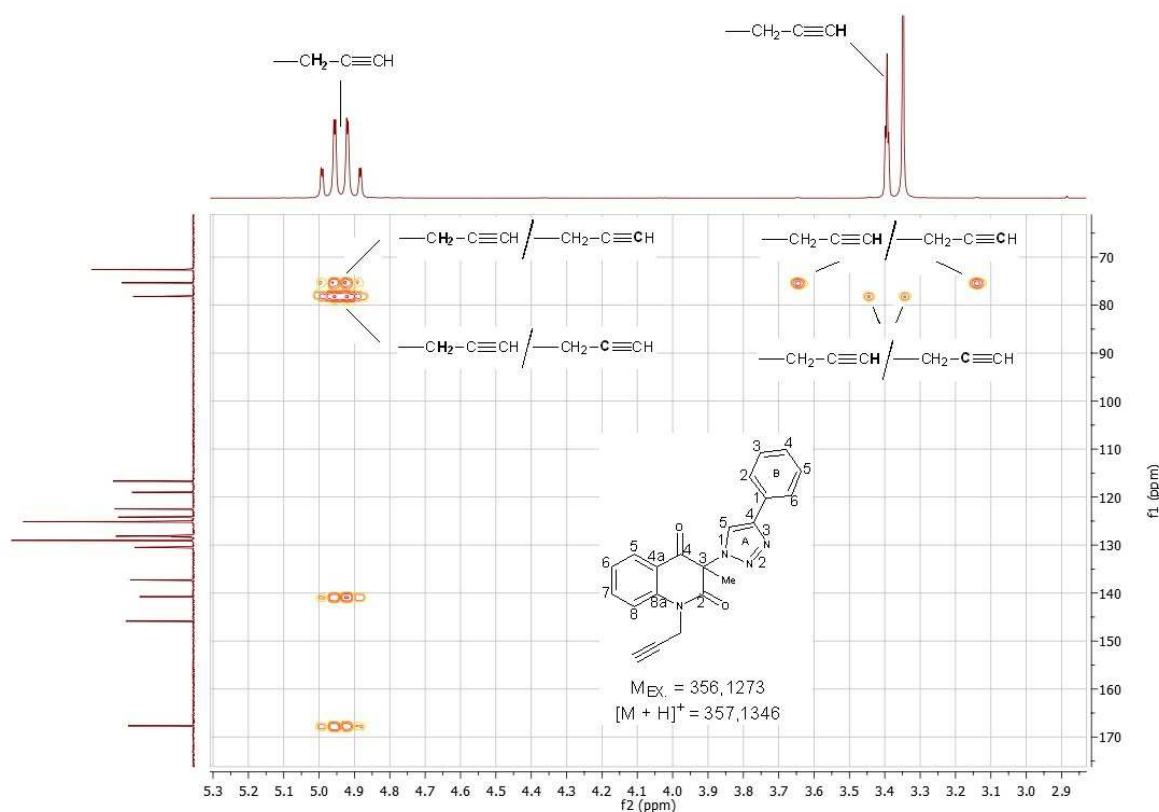
Schéma 6. Příprava a struktura *N*-propargyl-3-triazolylchinolin-2,4-dionů **5**.

Z výsledků poskytnutých ESI-MS analýzou, jejichž spektra jsou uvedena na **Obrázku 8**, je patrné, že výchozí látka **4a**, která má hodnotu m/z protonované molekuly 319,1188, byla ve výše diskutované reakci obohacena jedním prop-2-yn-1-ylovým substituentem. V obou spektrech se současně s výrazně nižší intenzitou vyskytují také signály pocházející ze sodných aduktů dimerů sloučenin **4a** (659,2117 m/z) a **5a** (735,2428 m/z).



Obrázek 8. HRMS spektra sloučenin **4a** a **5a**.

Propargylová skupina mohla být v závislosti na struktuře substrátu teoreticky zavedena do dvou možných míst v molekule. A to do námi očekávané polohy 1, to je na atom dusíku chinolinového kruhu. Je ovšem neméně nutné polemizovat s myšlenkou, že tato substituce může stejně snadno probíhat na hydroxylové skupině v poloze 2 druhé tautomerní formy téže látky. Nezvratný důkaz o poloze propargylové skupiny poskytují výsledky získané 2D NMR experimenty, jejichž výřez, a to konkrétně výřez z HMBC NMR spektra, je uveden na **Obrázku 9**.



Obrázek 9. 2D NMR spektrum sloučeniny **5a**.

Je možné vidět, že geminální atomy vodíku z ($-\text{CH}_2-$) korelují nejen se zbylými atomy uhlíku propargylové skupiny, ale i s C-8a a C-2. Z těchto faktů jasně plyne, že byl-li by propargylový zbytek poutaný přes atom kyslíku k C-2, byla by korelace geminálních atomů vodíku s C-8a pětivazebná, což je i při pohledu na její intenzitu absolutně vyloučená.

Aby bylo možné připravit *N*-propargylový derivát sloučením **4b** a **4d** je nutné ve výchozím substrátu nejprve hydroxylovou skupinu ochránit, a to z důvodu poměrně snadné substituce atomu vodíku hydroxylové skupiny primárního alkoholu, alkylačními činidly. Tato záštita sloučeniny **4d** byla provedena hojně používanou směsí acethanhydridu v pyridinu.

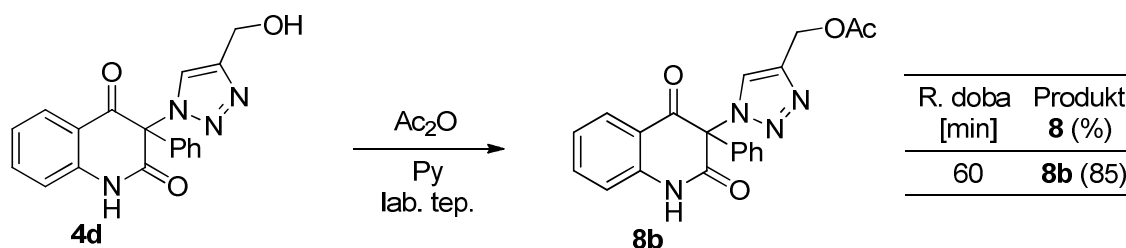


Schéma 7. Acetylace 4-hydroxymethyl-3-fenylchinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionu **4d**.

Jedna ze dvou takto získaných, krystalizací přečištěných sloučenin **8** byla za identických reakčních podmínek, jako tomu bylo u látek **4a,c**, podstupena reakci s propargylbromidem. Reakce proběhla dle očekávání a sloučenina **5d** byla získána vysokým výtěžkem 88 %. Bohužel se se sloučeninou **5d** do nynější doby neuskutečnily žádné experimenty směřující k odstranění acetylové chránící skupiny, ani žádné „click reakce“.

Závěrečným krokem v několika stupňové syntéze vedoucí k vytvoření druhého triazolového kruhu, jež by byl připojen k atomu dusíku chinolinu methylenovým můstkem v poloze 4, byla cykloadiční reakce *N*-propargylderivátu s vybranými organickými azidy. Jelikož „click reakcí“ sloučenin **3** s acetyleny byly velmi úspěšné, nebyl důvod měnit reakční podmínky. Jejich zachováním byly připraveny chromatograficky čisté bis-triazolové deriváty chinolin-2,4-dionů **6** s výtěžky přesahující 90 %. Pouze v případě přípravy sloučeniny **6f** o 30 % nižší.

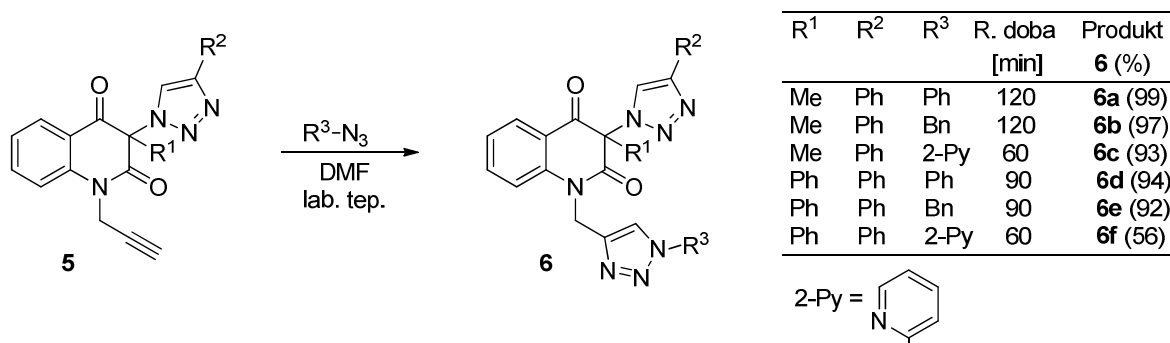


Schéma 8. Příprava a struktura *N*-(triazolylmethyl)-3-triazolylchinolin-2,4-dionů **6**.

Byly provedeny také pokusy vedoucí k dalším atraktivním látkám, které jednak v sobě skrývají značné syntetické možnosti obměny jejich struktur a jednak zavedením karboxylové skupiny je do jisté míry zvýšena rozpustnost ve vodě, což by mohlo být využito při následném mikrobiologickém testování. Byly připraveny dvě karboxylové kyseliny, jež byly získány oxidací triazolových derivátů nesoucí v poloze 4 hydroxymethylovou skupinu Jonesovým činidlem, což je roztok oxidu chromového ve 2M-H₂SO₄. Reakce vychlazených, postupně zkapaných roztoků alkoholů **4b** a **4d** v acetonu a Jonesova činidla proběhly v krátkém čase uvedeném ve **Schématu 9** s uspokojivými výtěžky karboxylových kyselin **7**. V jednom případě a to u syntézy látky **7b** byl jako vedlejší produkt v desetinném množství izolován i příslušný aldehyd **9**. V druhém případě, jelikož byl produkt čištěný „pouze“ krystalizací surové směsi z ethanolu, aldehyd izolován nebyl.

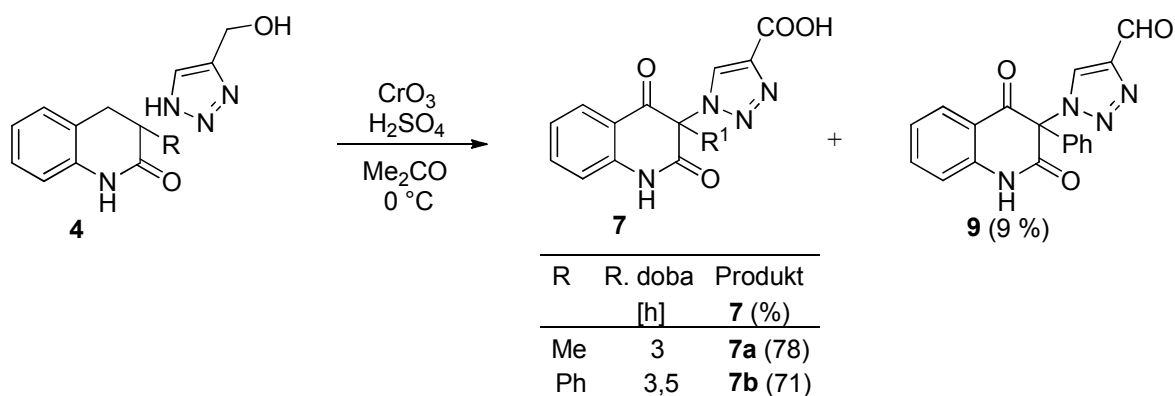
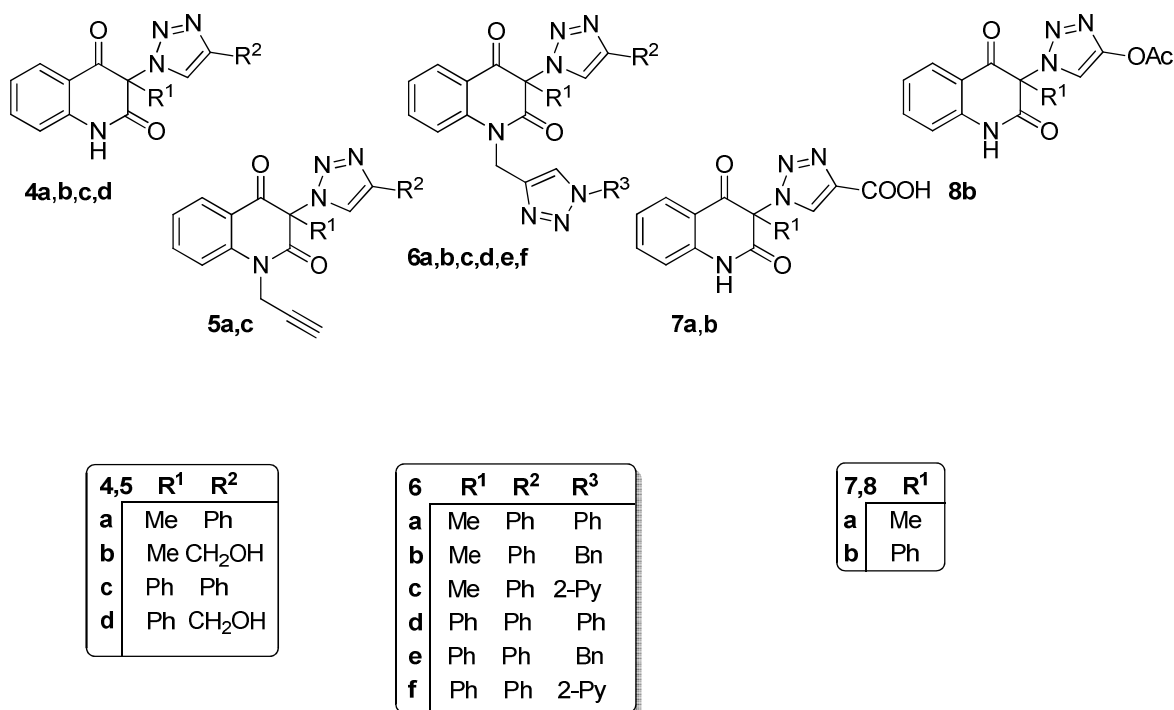


Schéma 9. Syntéza 3-triazolylylkarboxylových kyselin chinolin-2,4-dionů **7**.

5.2 Biologické testy připravených sloučenin

Nejen triazolové deriváty, ale i deriváty chinolinů, velmi často disponují rozmanitým množstvím biologických účinků. Proto nás napadla myšlenka pokusit se připravit triazolové deriváty chinolindionů, které by mohly být potenciálně přidávány do kosmetických přípravků jako konzervační činidla a mohly by tak inhibovat nebo zastavovat množení gram pozitivních (G+) i gram negativních (G-) bakterií a kvasinek. Samozřejmě pouze za předpokladu, že by se u nich projevil výrazný inhibiční účinek na mikroorganismy a současně, zda-li by byla prokázána jejich zdravotní nezávadnost vůči uživatelům. Tím by eliminovaly možné zdravotní ohrožení spotřebitele vlivem samotných mikroorganismů či jejich toxických produktů.

Pro provedení mikrobiologických testů byly vybrány látky, jejichž struktury jsou znázorněny v **Obrázku 10**. Antimikrobní účinek triazolových sloučenin byl testován na bakteriích *Staphylococcus aureus* (G+), *Micrococcus luteus* (G+), *Pseudomonas aeruginosa* (G-) a *Escherichia coli* (G-). Z kvasinek byla jako reprezentativní zástupce vybrána *Candida albicans*.



Obrázek 10. Struktury použitých látek k mikrobiologickému testování.

Tabulka 2. Koncentrace testovaných triazolových derivátů.

Vzorek	Molární hmotnost [g/mol]	Konc. [g/l]	Konc. [mmol/l]	Konc. [g/l]	Konc. [mmol/l]	Konc. [g/l]	Konc. [mmol/l]	Konc. [g/l]	Konc. [mmol/l]
4a	318,329	14,43	45,32	5,77	18,13	2,89	9,06	1,44	4,53
4b	272,259	12,34	45,32	4,94	18,13	2,47	9,06	1,23	4,53
4c	380,399	17,24	45,32	6,90	18,13	3,45	9,06	1,72	4,53
4d	334,329	15,15	45,32	6,06	18,13	3,03	9,06	1,52	4,53
5a	356,377	16,15	45,32	6,46	18,13	3,23	9,06	1,62	4,53
5c	418,447	18,97	45,32	7,59	18,13	3,79	9,06	1,90	4,53
6a	475,501	21,55	45,32	8,62	18,13	4,31	9,06	2,15	4,53
6b	489,528	22,19	45,32	8,87	18,13	4,44	9,06	2,22	4,53
6c	476,489	21,60	45,32	8,64	18,13	4,32	9,06	2,16	4,53
6d	537,571	24,36	45,32	9,75	18,13	4,87	9,06	2,44	4,53
6e	551,597	25,00	45,32	10,00	18,13	5,00	9,06	2,50	4,53
6f	538,559	24,41	45,32	9,76	18,13	4,88	9,06	2,44	4,53
7a	286,243	12,97	45,32	5,19	18,13	2,59	9,06	1,30	4,53
7b	348,312	15,79	45,32	6,31	18,13	3,16	9,06	1,58	4,53
8b	376,365	17,06	45,32	6,82	18,13	3,41	9,06	1,71	4,53

5.2.1 Disková difuzní metoda

Jednou z metod ke zjištění citlivosti zkoušených mikroorganismů je difuzní metoda s využitím sterilních papírových disků. Tato metoda se řadí mezi kvalitativní a je založena na naočkování jednoho mikroorganismu na povrch média (mezi nejčastěji používané médium patří Mueller-Hinton agar), kde je následně rozloženo několik papírových disků napuštěných roztoky zkoumaných inhibičních látek. Po inkubaci je zjištěno, zda došlo k vytvoření inhibičních zón, popřípadě je změřen jejich průměr.⁶² Výsledky testů jsou zaznamenány v **Tabulkách 3–7**.

Tabulka 3. Inhibiční účinek triazolových derivátů na bakterie *Staphylococcus aureus*; 24 h inkubace při 30 °C; disková difuzní metoda.

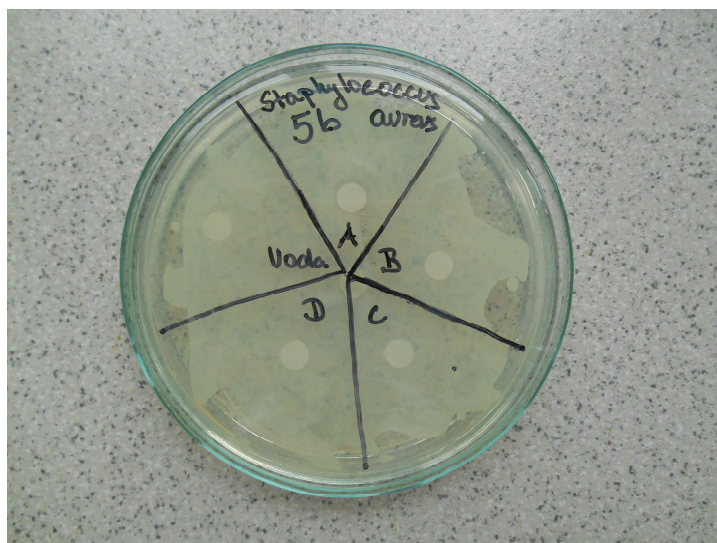
Konc. [mmol/l]	4a	4b	4c	4d	5a	5c	6a	6b	6c	6d	6e	6f	7a	7b	8a
45,32	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18,13	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9,06	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4,53	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voda	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DMSO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : růst bakterií

- : bez růstu bakterií



Obrázek 11. Inhibiční účinek látky **4a** při koncentracích 45,32 mmol/l a 18,13 mmol/l na bakterie *Staphylococcus aureus*.



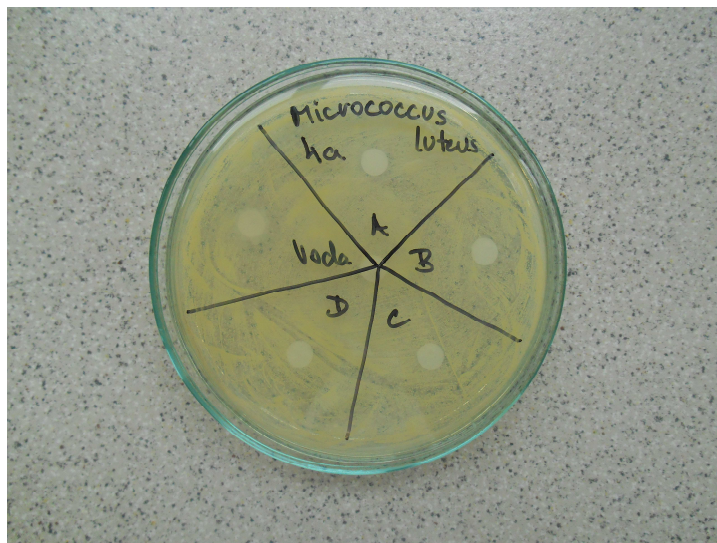
Obrázek 12. Inhibiční účinek látky **5c** při koncentraci 45,32 mmol/l na bakterie *Staphylococcus aureus*.

Tabulka 4. Inhibiční účinek triazolových derivátů na bakterie *Micrococcus luteus*; 48 h inkubace při 30 °C; disková difuzní metoda.

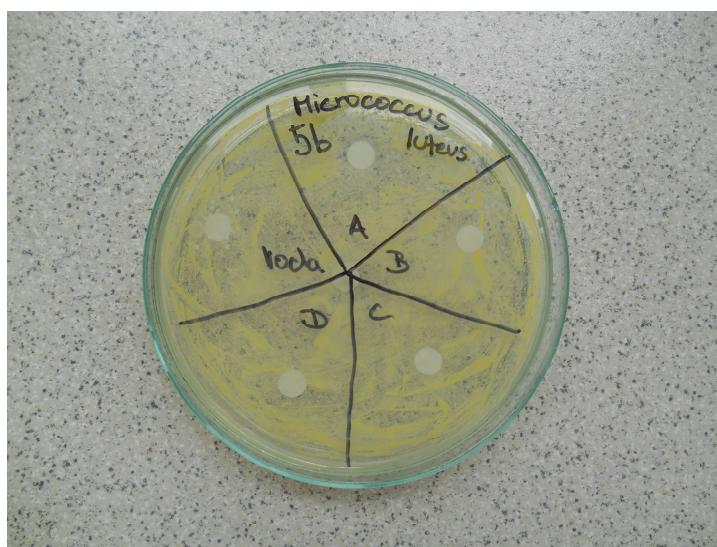
Konc. [mmol/l]	4a	4b	4c	4d	5a	5c	6a	6b	6c	6d	6e	6f	7a	7b	8a
45,32	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18,13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9,06	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4,53	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voda	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DMSO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : růst bakterií

- : bez růstu bakterií



Obrázek 13. Inhibiční účinek látky **4a** při koncentraci 45,32 mmol/l na bakterie *Micrococcus luteus*.



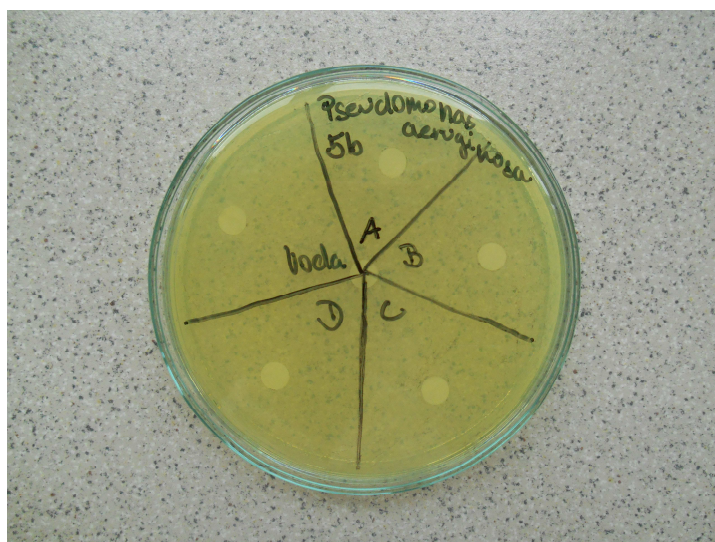
Obrázek 14. Inhibiční účinek látky **5c** při koncentraci 45,32 mmol/l na bakterie *Micrococcus luteus*.

Tabulka 5. Inhibiční účinek triazolových derivátů na bakterie *Pseudomonas aeruginosa*; 24 h inkubace při 30 °C; disková difuzní metoda.

Konc. [mmol/l]	4a	4b	4c	4d	5a	5c	6a	6b	6c	6d	6e	6f	7a	7b	8a
45,32	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18,13	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9,06	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4,53	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voda	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DMSO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : růst bakterií

- : bez růstu bakterií



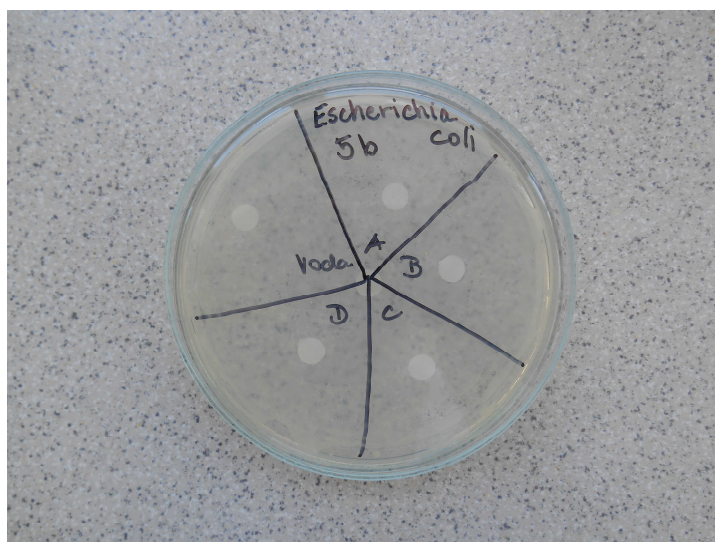
Obrázek 15. Inhibiční účinek látky **5c** při koncentracích 45,32 mmol/l, 18,13 mmol/l a 9,06 mmol/l na bakterie *Pseudomonas aeruginosa*.

Tabulka 6. Inhibiční účinek triazolových derivátů na bakterie *Escherichia coli*; 24 h inkubace při 30 °C; disková difuzní metoda.

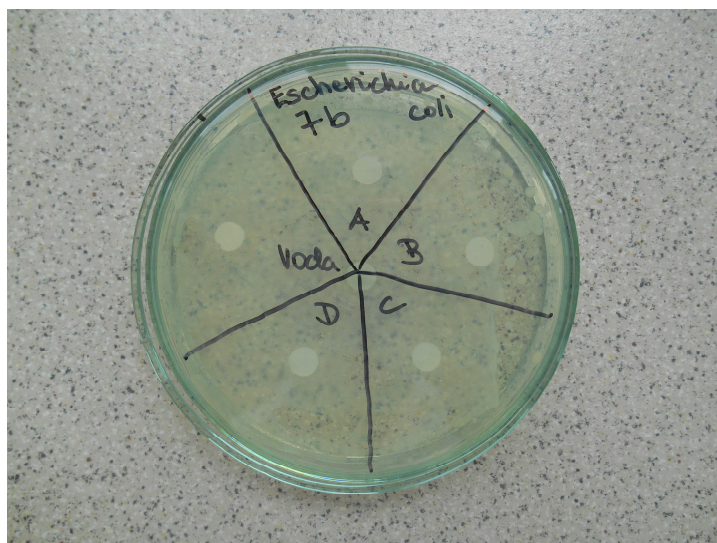
Konc. [mmol/l]	4a	4b	4c	4d	5a	5c	6a	6b	6c	6d	6e	6f	7a	7b	8a
45,32	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
18,13	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9,06	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4,53	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voda	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DMSO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : růst bakterií

- : bez růstu bakterií



Obrázek 16. Inhibiční účinek látky **5c** při koncentracích 45,32 mmol/l a 18,13 mmol/l na bakterie *Escherichia coli*.



Obrázek 17. Inhibiční účinek látky **7b** při koncentraci 45,32 mmol/l na bakterie *Escherichia coli*.

Tabulka 7. Inhibiční účinek triazolových derivátů na kvasinky *Candida albicans*; 24 h inkubace při pokojové teplotě v temnu; disková difuzní metoda.

Konc. [mmol/l]	4a	4b	4c	4d	5a	5c	6a	6b	6c	6d	6e	6f	7a	7b	8a
45,32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18,13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9,06	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4,53	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voda	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DMSO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : růst kvasinek

- : bez růstu kvasinek

K vytvoření inhibičních zón došlo pouze v několika případech. Triazolový derivát **4a** mírně inhiboval růst bakterií *Micrococcus luteus* v nejvyšší koncentraci, tj. 45,32 mmol/l. K vyššímu inhibičnímu účinku na bakterie *Micrococcus luteus* došlo při aplikaci látky **5c** v koncentraci 45,32 mmol/l. Růst bakterií *Staphylococcus aureus* inhibuje látka **4a** v koncentracích 45,32 mmol/l a 18,13 mmol/l a látka **5c** jen v koncentraci 45,32 mmol/l. K zastavení růstu koliformních bakterií *Escherichia coli* došlo při aplikaci látky **7b** v koncentraci 45,32 mmol/l. Derivát **5c** inhiboval růst *Escherichia coli* již při koncentraci 18,13 mmol/l a 45,32 mmol/l. Zastavení růstu bylo zaznamenáno

u bakterií *Pseudomonas aeruginosa* při koncentracích 45,32 mmol/l, 18,13 mmol/l a 9,06 mmol/l látky **5c**. Antifungální účinek žádné z látek nebyl zaznamenán, jelikož nebyl zastaven růst kvasinek *Candida albicans* ani jednou z testovaných látek. Obecně lze říci, že nejvíce antibakteriálně aktivní jsou látky **4a**, **5c** a **7b**.

Větší a lépe okem pozorovatelné inhibiční zóny byly vytvořeny na živné půdě naočkované mikroorganizmem *Micrococcus luteus*, kde byl průměr zóny látky **5c** 5 mm. Další větší inhibiční zóna vznikla okolo látky **4a** při největší koncentraci na *Staphylococcus aureus*. Ostatní vytvořené inhibiční zóny byly jen malé prstence okolo papírového disku v rozmezí 1–2 mm.

5.2.2 Jamková difuzní metoda

Druhá zvolená metoda je dostatečně rychlá a citlivá. Její velkou výhodou je, že není nutno dodržet sterilní podmínky při práci s testovanou látkou, protože difuze účinné konzervační látky není nijak ovlivněna ostatními případnými látkami. Nevýhodou je pak náročná a pracná příprava jamek a možné vylití testované látky při manipulaci s miskami.⁶³ Výsledky testování látek touto metodou jsou uvedeny v **Tabulkách 8–12**.

Tabulka 8. Inhibiční účinek triazolových derivátů na bakterie *Staphylococcus aureus*; 24 h inkubace při 30 °C; jamková difuzní metoda.

Konc. [mmol/l]	4a	4b	4c	4d	5a	5c	6a	6b	6c	6d	6e	6f	7a	7b	8a
45,32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18,13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9,06	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4,53	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voda	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DMSO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : růst bakterií

– : bez růstu bakterií

Tabulka 9. Inhibiční účinek triazolových derivátů na bakterie *Micrococcus luteus*; 48 h inkubace při 30 °C; jamková difuzní metoda.

Konc. [mmol/l]	4a	4b	4c	4d	5a	5c	6a	6b	6c	6d	6e	6f	7a	7b	8a
45,32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18,13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9,06	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4,53	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voda	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DMSO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : růst bakterií - : bez růstu bakterií

Tabulka 10. Inhibiční účinek triazolových derivátů na bakterie *Pseudomonas aeruginosa*; 24 h inkubace při 30 °C; jamková difuzní metoda.

Konc. [mmol/l]	4a	4b	4c	4d	5a	5c	6a	6b	6c	6d	6e	6f	7a	7b	8a
45,32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18,13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9,06	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4,53	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voda	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DMSO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : růst bakterií - : bez růstu bakterií

Tabulka 11. Inhibiční účinek triazolových derivátů na bakterie *Escherichia coli*; 24 h inkubace při 30 °C; jamková difuzní metoda.

Konc. [mmol/l]	4a	4b	4c	4d	5a	5c	6a	6b	6c	6d	6e	6f	7a	7b	8a
45,32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18,13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9,06	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4,53	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voda	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DMSO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : růst bakterií - : bez růstu bakterií

Tabulka 12. Inhibiční účinek triazolových derivátů na kvasinky *Candida albicans*; 24 h inkubace při pokojové teplotě v temnu; jamková difuzní metoda.

Konc. [mmol/l]	4a	4b	4c	4d	5a	5c	6a	6b	6c	6d	6e	6f	7a	7b	8a
45,32	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18,13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9,06	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4,53	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voda	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DMSO	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ : růst kvasinek - : bez růstu kvasinek

Při testování inhibičních účinků triazolových derivátů jamkovou difuzní metodou nebyla zjištěna žádná koncentrace ani jedné testované látky, která by inhibovala růst zkoumaných bakterií nebo kvasinek. Po celém povrchu agarů i kolem vyřezaných jamek docházelo k neomezenému růstu mikroorganismů. Výjimkou byl *Micrococcus luteus*, který tvořil samostatné kolonie. Tato metoda je citlivější při testování na tenčí agarové půdě. Je možnost, že agaru bylo příliš mnoho a látka nenaplnila celou jamku. Citlivost by se dala zvýšit také větší koncentrací látky či pipetováním většího objemu do jamky.

Srovnání metod

Malá úspěšnost provedených metod může být způsobena nízkými koncentracemi testovaných látek nebo byly připraveny příliš koncentrované suspenze mikroorganismů, které bylo potřeba více zředit a snížit tak počet životaschopných bakterií nebo kvasinek ve vytvořené suspenzi v daném objemu. Z výsledků lze říci, že úspěšnější a citlivější v testování byla disková difuzní metoda, kde došlo k vytvoření inhibičních zón u všech bakteriálních kultur alespoň jednou testovanou látkou. Růst kvasinek *Candida albicans* neinhibovala žádná z látek.

Úspěšnost diskové difuzní metody je dána tím, že papírový filtr nasáklý testovanou látkou byl v přímém kontaktu s živnou půdou, na které byly naočkovány mikroorganismy. V jamkové difuzní metodě je mikroorganismus rozptýlen v zatuhlém agaru a testovaná látka tak nemusí být v bezprostředním kontaktu s mikroorganizmem, ale difunduje skrze živnou půdu s rozmíchanou příslušnou kulturou.

6. CHARAKTERISTIKA PŘÍSTROJOVÉHO VYBAVENÍ A INSTRUMENTÁLNÍCH METOD

Rozpouštědla a reagenty jsou komerčního původu firmy Sigma Aldrich. Použitá prášková měď při přípravě triazolů měla velikost zrn 0,2–0,7 mm (čistota 99,9 %; Fluka). Monitorování průběhu reakcí bylo pomocí chromatografie na tenké vrstvě (TLC), pro kterou byly použity komerční hliníkové folie s nanesenou vrstvou silikagelu (Alugram® SIL G/UV254; 220–240 mesh; Macherey-Nagel) s použitím fluorescenčního indikátoru pro UV 254 nm. Ve sloupcové chromatografii byl použit silikagel Fluka Silica gel 60, 220–440 mesh. Teploty tání byly naměřeny na Koflerově bloku a nejsou nijak korigovány. Technikou KBr tablet byla měřena infračervená spektra na spektrometru Nicolet iS10 Avatar 380. NMR spektra byla měřena při frekvencích 500,13 MHz (^1H) a 125,77 MHz (^{13}C), při použití tetramethylsilanu jako vnitřního standardu a při teplotě 296 K na spektrometru Bruker Avance III 500 MHz. Chemické posuny jsou vyjádřeny ve stupnici δ ppm. Multiplicity jsou označeny takto: s (singlet), d (doublet), dd (doublet doubletu), ddd (doublet doubletu doubletu), t (triplet), m (multiplet), br (rozšířený). Objasnění struktury a přiřazení protonových a uhlíkových signálů bylo provedeno pomocí 2D NMR spektrálních analýz (^1H – ^1H gs-COSY, ^1H – ^{13}C gs-HSQC a ^1H – ^{13}C gs-HMBC). Označení jednotlivých signálů vodíkových a uhlíkových atomů ve výpisu NMR spekter bylo provedeno systematickým označením kruhů tvořících substituenty chinolinového skeletu písmeny a jejich číslováním dle pravidel IUPAC. Hmotnostní spektra a hmotnostní spektra s vysokým rozlišením byla změřena na zařízeních VG-Analytical AutospecQ a Q-TOF Premier. Hmotnostní spektra s nárazovou ionizací byla změřena na spektrometru GC-MS QP2010 Shimadzu s DI sondou pro termodesorpci látek do 350 °C a s GC kolonou Supelco SLB-MS (30 m, 0,25 mm), při použití helia jako nosného plynu s konstantní lineární rychlostí 38 cm·s⁻¹. Naměřená data jsou uvedena jako m/z (relativní intenzita). Elementární analýza sloučenin (C, H, N) byla uskutečněna na přístroji Flash EA 1112 Automatic Elemental Analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc.).

7. DETAILNÍ POPIS SYNTETICKÝCH POSTUPŮ A STRUKTURNÍ CHARAKTERISTIKY PŘIPRAVENÝCH SLOUČENIN

7.1 Syntéza 4-hydroxychinolin-2(1H)-onů 1

Směs anilinu (100 mmol) a diethyl-methylmalonátu (110 mmol) nebo diethyl-fenylmalonátu (110 mmol) byla zahřívána v baňce, která byla spojena 10 cm trubicí s destilačním nástavcem opatřeným trubicí pro odvod vznikajícího EtOH. Podle rychlosti destilace uvolňovaného EtOH byla teplota kovové lázně postupně zvyšována od 150 °C do 300 °C. Reakce byla ukončena ve chvíli, kdy nebyl pozorován další přírůstek oddestilovaného EtOH. Takto získané velmi surové taveniny produktů a zbylých nezreagovaných výchozích látek byly za horka (přibližně 300 °C) opatrně nality do 200 ml toluenu, kde se ihned vyloučila pevná krystalická hmota, která byla za varu několikrát macerována toluenem (3 × 100 ml). Pevná látka byla rozpuštěna v 0,5 M NaOH (300 ml), k roztoku bylo přidáno aktivní uhlí (dvě laboratorní lžíce). Získaná suspenze byla 10 min míchána, následně byla přefiltrována. Po slabém okyselení prakticky bezbarvého filtrátu 10% HCl došlo k vyloučení jemného bílého surového produktu. Surový produkt **1** byl přefiltrován přes fritu, opakovaně promyt vodou do neutrálního pH filtrátu, vysušen a za horka překrystalizován z EtOH nebo z AcOH.

3-Methyl-4-hydroxychinolin-2(1H)-on (1a)

Bezbarvá pevná látka, $t_f = 270\text{--}273\text{ }^\circ\text{C}$ (EtOH), *lit.* 274-275 °C⁵⁷ (EtOH); výtěžek: 61 % (krystal. 57 %); $R_f = 0,10$ (5 % EtOH v CHCl_3); $R_f = 0,24$ (10 % EtOH v CHCl_3).

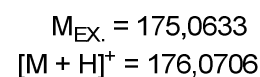
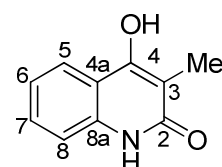
IČ spektrum (tableta KBr), cm^{-1} : 1643, 1607, 1501, 1478, 1401, 1342, 1284, 1274, 1225, 1160, 752.

¹H NMR spektrum (CDCl_3), ppm: δ 2,02 (s, 3H, C-3-CH₃); 7,15 (ddd, 1H, H-6); 7,27 (d, 1H, H-8); 7,44 (ddd, 1H, H-7); 7,89 (dd, 1H, H-5); 10,13 (br s, 1H, C-4-OH); 11,36 (br s, 1H, NH).

¹³C NMR spektrum (CDCl_3), ppm: δ 9,4; 106,8; 114,8; 115,4; 121,0; 122,4; 129,6; 137,2; 157,1; 163,8.

GC-EI-MS (m/z , %): 51(6), 65(11), 77(9), 91(6), 92(24), 93(13), 118(5), 119(30), 120(57), 128(6), 146(23), 147(6), 174(11), 175(M⁺, 100), 176(11).

HRMS (ESI+) pro C₁₀H₁₀NO₂⁺ ([M+H]⁺) vypočteno: 176,0706; nalezeno: 176,0709.



Pro C ₁₀ H ₉ NO ₂ :	vypočteno:	68,56 % C	5,18 % H	8,00 % N
	nalezeno:	68,52 % C	5,16 % H	7,81 % N

3-Fenyl-4-hydroxychinolin-2(1H)-on (1b)

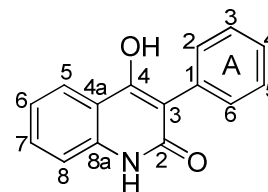
Bezbarvá pevná látka, $t_f = 320\text{--}328\text{ }^\circ\text{C}$ (AcOH), *lit.* $318\text{ }^\circ\text{C}$ ⁶⁴ (AcOH), $325\text{--}327\text{ }^\circ\text{C}$ ⁶⁵ (DMF); výtěžek: 91 % (krystal. 83 %); $R_f = 0,41$ (10 % EtOH v CHCl₃).

IČ spektrum (tableta KBr), cm⁻¹: 3286, 2964, 1645, 1588, 1497, 1407, 1366, 1289, 1112, 875, 854, 757, 696, 661, 555, 511, 456, 476.

¹H NMR spektrum (CDCl₃), ppm: δ 7,16–7,21 (m, 1H); 7,28–7,33 (m, 2H); 7,37–7,43 (m, 4H); 7,49–7,53 (m, 1H); 7,96 (dd, 1H, H-5); 10,10 (br s, 1H, C-4–OH); 11,49 (br s, 1H, NH).

¹³C NMR spektrum (CDCl₃), ppm: δ 112,6; 114,9; 115,4; 121,1; 123,1; 126,9; 127,7; 130,6; 131,2; 133,4; 138,0; 157,3; 162,7.

HRMS (ESI+) pro C₁₅H₁₂NO₂⁺ ([M+H]⁺) vypočteno: 238,0863; nalezeno: 238,0864.



$$M_{EX.} = 237,0790$$

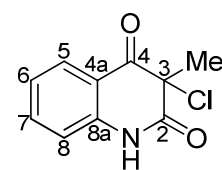
$$[M + H]^+ = 238,0863$$

7.2 Syntéza 3-chlorchinolin-2,4(1H,3H)-dionů 2

K vytemperované (teplota reakční směsi udržována v rozmezí 45–50 °C) bílé suspenzi 4-hydroxychinolonu **1** (15 mmol) ve 45 ml dioxanu bylo během 10 min přikapáno 3 ml (37,5 mmol) SO₂Cl₂ a vzniklý žlutý reakční roztok byl dále po dobu uvedenou ve **Schématu 3** míchán při teplotě 45–50 °C. Poté byl roztok ochlazen na laboratorní teplotu a nalit na 600 ml ledové tříště, kde se vyloučilo značné množství pevné žluté látky. Po rozpuštění veškerého ledu byla suspenze přefiltrována přes fritu, promyta vodou do neutrálního pH filtrátu a vysušena. Takto byl získán první podíl surového produktu. Veškeré vodné podíly byly spojeny a extrahovány 4 × 100 ml CHCl₃. Organické podíly z extrakce byly spojeny, vysušeny Na₂SO₄, přefiltrovány a odpařeny na RVO, čímž byl získán druhý surový produkt. Krystalizací spojených surových produktů z Be byly získány čisté sloučeniny **2a,b**.

3-Chlor-3-methylchinolin-2,4(1H,3H)-dion (2a)

Žlutá krystalická látka, $t_f = 178\text{--}181\text{ }^\circ\text{C}$ (Be), *lit.* $172\text{ }^\circ\text{C}^{66}$;
 výtěžek: 94 % (krystal. 89 %); $R_f = 0,63$ (10 % EtOH v CHCl_3);
 $R_f = 0,52$ (30 % EtOAc v CHCl_3).



$M_{EX.} = 209,0244$

$[M + H]^+ = 210,0316$

IČ spektrum (tableta KBr), cm^{-1} : 3203, 3072, 3004, 2941, 2348, 1709, 1674, 1614, 1600, 1511, 1439, 1379, 1255, 1239, 1156, 1050, 966, 917, 770, 665, 601, 440.

^1H NMR spektrum (CDCl_3), ppm: δ 1,99 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); 7,06 (d, 1H, H-8); 7,22 (dd, 1H, H-6); 7,62 (ddd, 1H, H-7); 8,02 (d, 1H, H-5); 9,41 (s, 1H, $-\text{NH}$).

^{13}C NMR spektrum (CDCl_3), ppm: δ 20,99 ($-\text{CH}_3$); 62,65 (C-3), 116,52; 117,91 (C-4a); 124,34; 128,95; 136,63; 139,40 (C-8a); 169,08; 188,21.

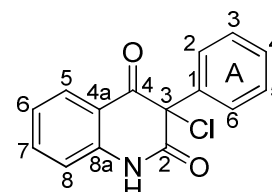
GC–EI–MS (m/z , %): 50(6), 51(6), 55(12), 63(12), 64(13), 65(10), 76(7), 77(12), 89(7), 90(13), 91(15), 92(32), 117(11), 118(8), 119(59), 120(18), 128(17), 146(68), 147(7), 174(36), 175(15), 208(18), 209(M^+ ; 100), 210(17), 211(33), 212(4).

HRMS (ESI+) pro $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{ClNO}_2^+$ ($[M+H]^+$) vypočteno: 210,0316; nalezeno: 210,0313.

Pro $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{ClNO}_2$:	vypočteno:	57,30 % C	3,85 % H	6,68 % N
	nalezeno:	57,64 % C	3,90 % H	6,47 % N

3-Chlor-3-fenylchinolin-2,4(1H,3H)-dion (2b)

Bezbarvá krystalická látka, $t_f = 180\text{--}182\text{ }^\circ\text{C}$ (Be), *lit.* $181\text{ }^\circ\text{C}^{67}$,
 $178\text{--}180\text{ }^\circ\text{C}^{61}$ (EtOH); výtěžek: 98 % (krystal. 96 %); $R_f = 0,57$
 (30 % EtOAc v CHCl_3), $R_f = 0,48$ (5 % EtOH v CHCl_3).



$M_{EX.} = 271,0400$

$[M + H]^+ = 272,0473$

IČ spektrum (tableta KBr), cm^{-1} : 3201, 3137, 2992, 2925, 2872, 1612, 1595, 1485, 1364, 1318, 1251, 1224, 1159, 906, 874, 778, 755, 690, 664, 607, 512, 440.

Pro $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{ClNO}_2$:	vypočteno:	66,31 % C	3,71 % H	5,16 % N
	nalezeno:	66,07 % C	3,62 % H	5,29 % N

7.3 Syntéza 3-azidochinolin-2,4(1H,3H)-dionů 3

K intenzivně míchanému roztoku 3-chlorchinolin-2,4(1H,3H)-dionu **2** (40 mmol) ve 200 ml DMF bylo za laboratorní teploty během 10 min postupně přisypáno 60 mmol NaN₃. Reakční směs byla 2 h intenzivně míchána za laboratorní teploty v temnu. Po ukončení reakce byl nazelenalý roztok nalit na 500 ml ledové tříště, kde okamžitě došlo k vyloučení velkého množství surového produktu **3**, který byl po rozpuštění ledu odfiltrován přes fritu, důkladně promyt vodou a vysušen v sušárně. Veškeré vodné podíly byly převedeny do děličky a extrahovány 4 × 30 ml CHCl₃. Organické podíly po extrakci byly spojeny, vysušeny Na₂SO₄ a odpařeny na RVO při 47 °C. Dimethylformamid byl z baňky odpařován jako azeotropická směs s toluenem. Jelikož byly oba surové produkty stejné kvality, byly spojeny a překrystalizovány z Be, čímž byly získány čisté krystalické produkty **3a,b**.

3-Azido-3-methylchinolin-2,4(1H,3H)-dion (3a)

Bílá krystalická látka, $t_f = 158\text{--}161\text{ }^\circ\text{C}$ (Be); výtěžek: 98 % (krystal. 84 %); $R_f = 0,24$ (20 % EtOAc v Be); $R_f = 0,30$ (38 % EtOAc v PE); $R_f = 0,56$ (30 % EtOAc v CHCl₃).

IČ spektrum (tableta KBr), cm⁻¹: 3368, 3204, 3005, 2938, 2879, 2348,

2109, 1709, 1614, 1598, 1509, 1485, 1437, 1392, 1285, 1157, 982, 851, 755, 612, 460.

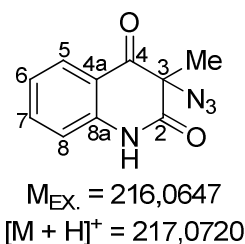
¹H NMR spektrum (CDCl₃), ppm: δ 1,86 (s, 3H, -CH₃); 7,10 (d, 1H, H-8); 7,23 (dd, 1H, H-6); 7,63 (ddd, 1H, H-7); 7,98 (d, 1H, H-5); 9,86 (br s, 1H, -NH).

¹³C NMR spektrum (CDCl₃), ppm: δ 23,43 (-CH₃); 69,83 (C-3); 77,00; 116,75; 117,87 (C-4a); 124,43; 128,47; 137,01; 139,87 (C-8a); 171,40 (C-2); 191,57 (C-4).

GC-EI-MS (m/z , %): 42(5), 50(6), 63(9), 64(12), 76(7), 91(11), 92(35), 119(100), 120(11), 146(6), 147(15), 216(2), 217(0,24).

HRMS (ESI+) pro C₁₀H₉N₄O₂⁺ ([M+H]⁺) vypočteno: 217,0720; nalezeno: 217,0724.

Pro C ₁₀ H ₈ N ₄ O ₂ :	vypočteno:	55,55 % C	3,73 % H	25,91 % N
	nalezeno:	55,81 % C	3,77 % H	26,29 % N

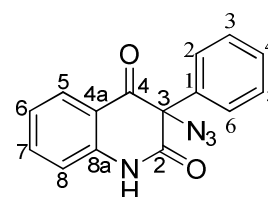


3-Azido-3-fenylchinolin-2,4(1H,3H)-dion (3b)

Nažloutlá krystalická látka, $t_f = 186\text{--}189\text{ }^\circ\text{C}$ (Be), *lit.* 173–181 $^\circ\text{C}^{68}$; výtěžek: 98 % (krystal. 96 %); $R_f = 0,70$ (5 % EtOH v CHCl_3), $R_f = 0,64$ (2 % EtOH v CHCl_3).

IČ spektrum (tableta KBr), cm^{-1} : 3243, 3065, 2921, 2495, 2104, 1705, 1685, 1611, 1596, 1484, 1447, 1355, 1255, 1229, 1159, 1073, 1029, 962, 922, 877, 773, 744, 671, 611, 550, 445.

Pro $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$:	vypočteno:	64,74 % C	3,62 % H	20,13 % N
	nalezeno:	64,54 % C	3,56 % H	20,38 % N



$M_{\text{EX.}} = 278,0804$
 $[M + H]^+ = 279,0877$

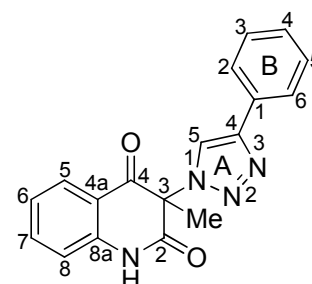
7.4 Syntéza 3-triazolylchinolin-2,4(1H,3H)-dionů 4

K intenzivně míchané suspenzi 3-azidochinolin-2,4(1H,3H)-dionu **3** (12 mmol), $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (1,2 mmol) a práškové Cu (24 mmol) ve 24 ml DMF byl za laboratorní teploty přikapán roztok propargylalkoholu (12,6 mmol) nebo fenylacetyleny (12,6 mmol) ve 4 ml DMF. Reakční směs byla dále míchána v temnu při laboratorní teplotě po dobu uvedenou ve **Schématu 5**. Následně byl do hnědočerné reakční směsi přidán NH_4CO_3 (36 mmol) a 12 ml vody. Vše bylo 10 minut mícháno a nalito na úzkou kolonu (průměr 1 cm, výška silikagelu 20 cm) s 15 g silikagelu, ze které byl organický podíl vymyt cca 450 ml směsí $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ (9/1; v/v). Žlutý eluent z kolony byl opakovaně extrahován (6×50 ml) nasyceným roztokem NH_4Cl . Organická fáze byla vysušena bezvodým Na_2SO_4 , přefiltrována a odpařena na RVO do sucha. Surové produkty byly spojeny a překrystalizovány z EtOH, čímž byly získány čisté produkty **4a–d**.

3-Methyl-3-(4-fenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)chinolin-2,4(1H,3H)-dion (4a)

Bílá pevná látka, $t_f = 217\text{--}219\text{ }^\circ\text{C}$ (EtOH); výtěžek: 95 % (krystal. 81 %); $R_f = 0,12$ (38 % EtOAc v Hex); $R_f = 0,35$ (30 % EtOAc v CHCl_3); $R_f = 0,56$ (10 % EtOH v CHCl_3).

IČ spektrum (tableta KBr), cm^{-1} : 3137, 2983, 2856, 1713, 1683, 1612, 1501, 1483, 1430, 1386, 1355, 1238, 1155, 1089, 1023, 977, 808, 794, 759, 690, 594, 520, 449.



$M_{\text{EX.}} = 318,1117$
 $[M + H]^+ = 319,1190$

^1H NMR spektrum (DMSO), ppm: δ 2,15 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); 7,17–7,30 (m, 2H, H-6 a H-8); 7,36 (dd, 1H, H-B4); 7,48 (dd, 2H, H-B3 a H-B5); 7,76 (ddd, 1H, H-7); 7,84–7,89 (m, 3H, H-5, H-B2 a H-B6); 8,89 (s, 1H, H-A5); 11,48 (s, 1H, N1-H).

^{13}C NMR spektrum (DMSO), ppm: δ 23,12 ($-\text{CH}_3$), 72,16 (C-3); 116,97 (C-6 nebo C-8); 117,34 (C-4a); 122,37 (C-A5); 123,45 (C-6 nebo C-8); 125,08 (C-B2 a C-B6); 127,65 (C-5); 127,99 (C-B4); 129,00 (C-B3, C-B5); 130,55 (C-B1); 137,32 (C-7); 141,59 (C-8a); 145,80 (C-A4); 168,51 (C-2); 190,69 (C-4).

HRMS (ESI+) pro $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_2^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) vypočteno: 319,1190; nalezeno: 319,1188.

Pro $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$:	vypočteno:	67,91 % C	4,43 % H	17,60 % N
	nalezeno:	67,80 % C	4,47 % H	17,89 % N

3-[4-(Hydroxymethyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl]-3-methylchinolin-2,4(1H,3H)-dion (4b)

Bílá pevná látka, $t_f = 189\text{--}191$ °C (EtOH); výtěžek: 99 % (krystal. 83 %); $R_f = 0,12$ (38 % EtOAc v Hex); $R_f = 0,35$ (30 % EtOAc v CHCl_3); $R_f = 0,56$ (10 % EtOH v CHCl_3).

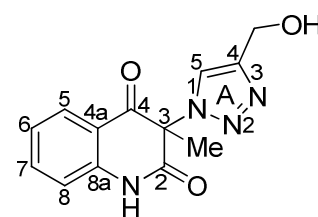
IČ spektrum (tableta KBr), cm^{-1} : 3449, 3148, 2919, 1730, 1613, 1509, 1486, 1377, 1325, 1277, 1190, 1051, 1008, 975, 843, 814, 750, 666, 591, 484, 428.

^1H NMR spektrum (DMSO), ppm: δ 2,08 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); 4,55 (d, 2H, $-\text{CH}_2\text{--OH}$); 5,28 (t, 1H, $-\text{CH}_2\text{--OH}$); 7,13–7,29 (m, 2H, H-6 a H-8); 7,73 (ddd, 1H, H-7); 7,83 (dd, 1H, H-5); 8,26 (s, 1H, H-A5); 11,39 (s, 1H, N1-H).

^{13}C NMR spektrum (DMSO), ppm: δ 23,11 ($-\text{CH}_3$); 55,01 ($-\text{CH}_2\text{--OH}$); 71,91 (C-3); 116,88 (C-6 nebo C-8); 117,50 (C-4a); 123,29 (C-6 nebo C-8); 123,69 (C-A5); 127,55 (C-5); 137,10 (C-7); 141,59 (C-8a); 147,33 (C-A4); 168,69 (C-2); 190,79 (C-4).

HRMS (ESI+) pro $\text{C}_{13}\text{H}_{13}\text{N}_4\text{O}_3^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) vypočteno: 273,0982; nalezeno: 273,0981.

Pro $\text{C}_{13}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_3$:	vypočteno:	57,35 % C	4,44 % H	20,58 % N
	nalezeno:	57,20 % C	4,42 % H	20,83 % N



$M_{\text{EX.}} = 272,0909$
 $[\text{M} + \text{H}]^+ = 273,0982$

3-Fenyl-3-(4-fenyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (4c)

Bílá krystalická látka, $t_f = 280\text{--}283\text{ }^\circ\text{C}$ (EtOH);
výtěžek: 86 % (krystal. 78 %); $R_f = 0,33$ (38 % EtOAc v PE);
 $R_f = 0,37$ (30 % EtOAc v CHCl_3); $R_f = 0,23$ (5 % EtOH
v CHCl_3).

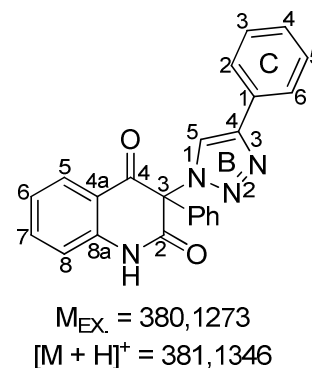
IČ spektrum (tableta KBr), cm^{-1} : 3275, 3169, 3060, 2915, 1969,
1824, 1721, 1613, 1595, 1485, 1424, 1353, 1231, 1184, 1118,
1059, 972, 871, 854, 756, 698, 607, 521, 439.

^1H NMR (DMSO), ppm: δ 7,12 (d, 1H, H-8); 7,18 (ddd, 1H, H-6); 7,34 (ddd, 1H, H-C4);
7,40–7,48 (m, 4H, H-A2, H-A6, H-C3 a H-C5); 7,49–7,55 (m, 3H, H-A3, H-A4 a H-A5);
7,64 (ddd, 1H, H-7); 7,83 (dd, 2H, H-C2 a H-C6); 7,86 (dd, 1H, H-5); 8,49 (s, 1H, H-B5);
11,68 (s, 1H, N1-H).

^{13}C NMR (DMSO), ppm: δ 80,00 (C-3); 116,69 (C-8); 119,13 (C-4a); 123,41 (C-B5);
123,51 (C-6); 125,15 (C-C2 a C-C6); 127,56 (C-5); 127,93 (C-C4); 128,85 (C-A2 a C-A6
nebo C-C3 a C-C5); 128,95 (C-A2 a C-A6 nebo C-C3 a C-C5); 129,58 (C-A3 a C-A5);
129,92 (C-A1); 130,51 (C-C1); 130,56 (C-A4); 136,95 (C-7); 140,50 (C-8a); 145,32
(C-B4); 166,79 (C-2), 188,91 (C-4).

HRMS (ESI+) pro $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_2^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) vypočteno: 381,1346; nalezeno: 381,1341.

Pro $\text{C}_{23}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2$:	vypočteno:	72,62 % C	4,24 % H	14,73 % N
	nalezeno:	72,40 % C	4,23 % H	14,90 % N

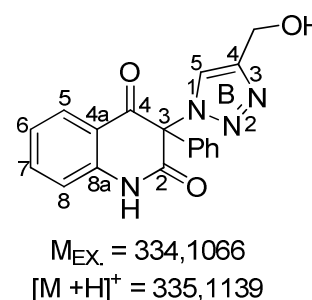
**3-[4-(Hydroxymethyl)-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl]-3-fenylchinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (4d)**

Bílá pevná látka, $t_f = 139\text{--}143\text{ }^\circ\text{C}$ (EtOH); výtěžek: 98 %
(krystal. 91 %); $R_f = 0,27$ (10 % EtOH v CHCl_3).

IČ spektrum (tableta KBr), cm^{-1} : 3136, 3057, 2988, 2925, 2866,
2348, 1724, 1692, 1613, 1593, 1485, 1438, 1353, 1228, 1104,
857, 769, 665, 603, 519, 439.

^1H NMR spektrum (CDCl_3), ppm: δ 4,52 (d, 2H, $-\text{CH}_2\text{--OH}$);
5,22 (t, 1H, $-\text{CH}_2\text{--OH}$); 7,09 (d, 1H, H-8); 7,15 (ddd, 1H, H-6); 7,32–7,44 (m, 2H, H-A2
a H-A6); 7,46–7,54 (m, 3H, H-A3, H-A5 a H-A4); 7,62 (ddd, 1H, H-7); 7,77 (s, 1H,
H-B5); 7,83 (dd, 1H, H-5); 11,60 (s, 1H, N1-H).

^{13}C NMR spektrum (DMSO), ppm: δ 54,98 ($-\text{CH}_2\text{--OH}$); 79,64 (C-3); 116,64 (C-8);
119,19 (C-4a); 123,40 (C-6); 124,73 (C-B5); 127,49 (C-5); 128,77 (C-A2 a C-A6); 129,54



(C-A3 a C-A5); 130,19 (C-A1); 130,51 (C-A4); 136,83 (C-7); 140,53 (C-8a); 146,81 (C-B4); 166,83 (C-2); 188,96 (C-4).

GC–EI–MS (*m/z*, %): 51(9), 65(6), 76(11), 77(34), 89(8), 90(10), 92(23), 102(5), 103(16), 104(23), 119(15), 120(33), 128(17), 129(6), 130(13), 152(12), 153(6), 158(11), 165(7), 180(20), 181(6), 190(7), 208(18), 218(35), 219(8), 220(7), 235(6), 236(100), 237(50), 238(8), 247(27), 248(9), 249(30), 250(10), 275(18), 276(7), 277(7), 278(7), 288(16), 289(7), 305(37), 306(11), 334(4), 335(1).

HRMS (ESI+) pro $C_{18}H_{15}N_4O_3^+$ ($[M+H]^+$) vypočteno: 335,1139; nalezeno: 335,1138.

7.5 Syntéza *N*-propargyl-3-triazolylocholin-2,4(1*H*,3*H*)-dionů 5

Žlutá suspenze vzniklá smícháním 3-triazolylocholin-2,4(1*H*,3*H*)-dionů **4a** nebo **4c** (1,5 mmol) a K_2CO_3 (4,5 mmol) v 10 ml DMF byla po čas uvedený ve **Schématu 6** míchána za laboratorní teploty, přičemž reakční suspenze lehce ztmavla a zoranžověla. Poté byl k suspenzi během 1 minuty nakapán roztok propargylbromidu (2,3 mmol) v 5 ml DMF. Takto vzniklá reakční směs byla poté míchána po dobu uvedenou ve **Schématu 6**. Po ukončení reakce, směs bylo DMF odstraněno opakovaným zředováním reakční směsi toluenem a odpařováním na RVO při teplotě 49 °C. Pevný světle hnědý odparek byl rozpuštěn v emulzi $CHCl_3$ (70 ml) v 0,5 M-HCl (16 ml), přičemž docházelo k uvolňování CO_2 . Emulze byla přelita do děličky, vše bylo zředěno 50 ml H_2O , promíseno a organická vrstva byla oddělena. Vodná fáze byla extrahována $CHCl_3$ (3 × 40 ml). Organické podíly byly spojeny, vysušeny Na_2SO_4 , přefiltrovány a odpařeny na RVO. Krystalizací surového produktu z Be nebo EtOAc vznikla čisté sloučeniny **5a,c**.

Sloučenina **5d** byla připravena smícháním roztoku 3-triazolylocholin-2,4-dionu **8b** (1 mmol) v 5 ml DMF a K_2CO_3 (3 mmol). Získaná žlutá suspenze byla 40 min míchána při laboratorní teplotě a k suspenzi přikapán roztok propargylbromidu (1,5 mmol) ve 3 ml DMF. Vzniklá reakční směs byla 2,5 hodiny míchána při laboratorní teplotě, poté byla nalita do 150 ml ledové vody. Opalescenční roztok byl převeden do děličky a extrahován $CHCl_3$ (5 × 75 ml). Organické podíly byly spojeny, vysušeny Na_2SO_4 , přefiltrovány a odpařeny na RVO do sucha. Dimethylformamid byl vyhnán z baňky odpařováním s toluenem (3 × 50 ml). Vodný podíl byl následně extrahován EtOAc (4 × 75 ml). Organické podíly byly spojeny, vysušeny Na_2SO_4 , přefiltrovány a odpařeny na RVO do sucha. Dimethylformamid byl vyhnán z baňky odpařováním s toluenem (3 × 50 ml).

Oba dva surové produkty byly spojeny, rozpouštěny ve vřoucí EtOAc a byly nechány volně krystalizovat.

3-Methyl-3-(4-fenyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-1-(prop-2-yn-1-yl)chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dion

(5a)

Bílá pevná látka, $t_f = 187\text{--}189\text{ }^\circ\text{C}$ (Be); výtěžek: 96 % (krystal. 80 %); $R_f = 0,30$ (38 % EtOAc v PE); $R_f = 0,62$ (30 % EtOAc v CHCl_3).

IČ spektrum (tableta KBr), cm^{-1} : 3650, 3261, 3173, 2995, 2122, 1714, 1602, 1509, 1469, 1427, 1381, 1353, 1306, 1234, 1189, 1169, 1087, 1020, 976, 847, 755, 704, 620, 518, 410.

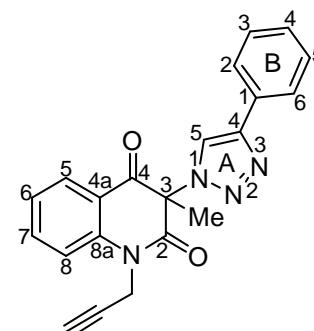
^1H NMR spektrum (DMSO), ppm: δ 2,16 (s, 3H, $-\text{CH}_3$); 3,39

(t, 1H, $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$); 4,90 (dd, 1H, $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2\alpha$); 4,97 (dd, 1H, $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2\beta$); 7,33–7,42 (m, 2H, H-6 a H-B4); 7,48 (dd, 2H, H-B3 a H-B5); 7,61 (d, 1H, H-8); 7,87 (d, 2H, H-B2 a H-B6); 7,92 (ddd, 1H, H-7); 8,00 (dd, 1H, H-5); 8,89 (s, 1H, H-A5).

^{13}C NMR spektrum (DMSO), ppm: δ 23,30 ($-\text{CH}_3$); 32,63 ($-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$); 72,56 (\square -3); 75,36 ($-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$); 78,16 ($-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$); 116,68 (\square -8); 119,00 (C-4a); 122,47 (C-A5); 124,17 (C-6); 125,10 (C-B2, C-B6); 128,03 (C-B4); 128,15 (C-5); 129,02 (C-B3, C-B5); 130,49 (C-B1); 137,27 (C-7); 140,75 (C-8a); 145,86 (C-A4); 167,67 (C-2); 189,65 (C-4).

HRMS (ESI+) pro $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_2^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) vypočítané: 357,1346; nalezené: 357,1342.

Pro $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_2$:	vypočítané:	70,77 % C	4,53 % H	15,72 % N
	nalezené:	70,81 % C	4,58 % H	15,82 % N



$M_{\text{EX.}} = 356,1273$

$[\text{M} + \text{H}]^+ = 357,1346$

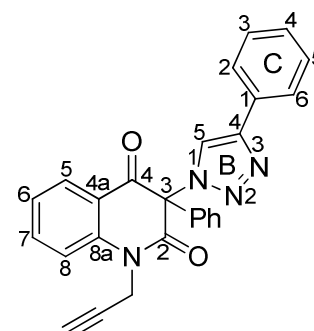
3-Fenyl-3-(4-fenyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-1-(prop-2-yn-1-yl)chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dion

(5c)

Bílá krystalická látka, $t_f = 229\text{--}232\text{ }^\circ\text{C}$ (EtOAc); výtěžek: 98 %;

$R_f = 0,38$ (38 % EtOAc v PE); $R_f = 0,61$ (30 % EtOAc v CHCl_3).

IČ spektrum (tableta KBr), cm^{-1} : 3214, 2122, 1715, 1685, 1602, 1468, 1425, 1375, 1305, 1219, 1185, 1129, 1037, 871, 825, 624, 521.



$M_{\text{EX.}} = 418,1430$

$[\text{M} + \text{H}]^+ = 419,1503$

^1H NMR spektrum (CDCl_3), ppm: δ 2,34 (t, 1H, $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$); 4,50 (dd, 1H, $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2\alpha-$); 5,37 (dd, 1H, $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2\beta-$); 7,22 (dd, 1H, H-6); 7,26 (s, 1H, H-B5); 7,27–7,32 (m, 1H, H-C4); 7,32–7,40 (m, 3H, H-8, H-C3 a H-C5); 7,43–7,51 (m, 3H, H-A3, H-A4 a H-A5); 7,51–7,56 (m, 2H, H-A2 a H-A6); 7,65 (ddd, 1H, H-7); 7,74–7,80 (m, 2H, H-C2 a H-C6); 8,05 (dd, 1H, H-5).

^{13}C NMR spektrum (CDCl_3), ppm: δ 33,43 ($\text{CH}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-$); 73,44 ($\text{CH}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-$); 77,90 ($\text{CH}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-$); 79,50 (C-3); 115,68 (C-8); 120,82 (C-4a); 122,17 (C-B5); 124,44 (C-6); 125,89 (C-C2 a C-C6); 127,98 (C-C4); 128,63 (C-C3 a C-C5); 128,80 (C-A2 a C-A6); 129,09 (C-5); 129,85 (C-A1); 129,95 (C-A3 a C-A5); 130,52 (C-C1); 131,15 (C-A4); 136,72 (C-7); 140,44 (C-8a); 145,87 (C-B4); 165,63 (C-2); 187,39 (C-4).

^{15}N NMR spektrum (CDCl_3), ppm: δ 136,01 (N-1); 249,22 (N-B1); 351,57 (N-B3); 366,27 (N-B2).

GC–EI–MS (m/z , %): 44(99), 50(6), 73(10), 76(14), 116(95), 145(52), 153(8), 217(21), 230(10), 235(53), 236(20), 236(5), 248(46), 249(9), 256(7), 258(17), 259(70), 260(5), 272(6), 274(28), 275(100), 276(25), 284(12), 285(31), 287(22), 291(11), 313(19), 323(8), 324(6), 351(8), 361(13), 362(13), 389(19), 390(43), 391(10), 418(M^+ , 75), 419(13).

HRMS (ESI+) pro $\text{C}_{26}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_2^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) vypočteno: 419,1503; nalezeno: 419,1502.

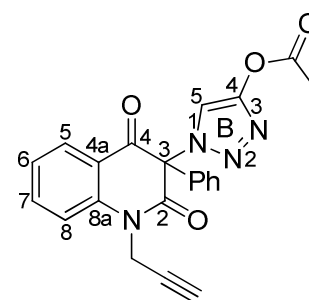
Pro $\text{C}_{26}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_2$:	vypočteno:	74,63 % C	4,34 % H	13,39 % N
	nalezeno:	74,15 % C	4,37 % H	13,45 % N

[1-(2,4-Dioxo-3-fenyl-1-(prop-2-yn-1-yl)-1,2,3,4-tetrachinolin-3-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-yl]methylacetát (5d)

Bílá pevná látka, $t_f = 210\text{--}214\text{ }^\circ\text{C}$ (EtOAc); výtěžek: 88 % (krystal. 41 %); $R_f = 0,42$ (12 % EtOAc v CHCl_3); $R_f = 0,54$ (30 % EtOAc v CHCl_3); $R_f = 0,66$ (5 % EtOH v CHCl_3); $R_f = 0,64$ (10 % EtOH v CHCl_3).

IČ spektrum (tableta KBr), cm^{-1} : 3227, 2116, 1715, 1683, 1602, 1468, 1379, 1303, 1177, 1124, 1036, 975, 873, 826, 764, 727, 694, 628, 608, 521, 415.

^1H NMR spektrum (CDCl_3), ppm: δ 2,05 (s, 3H, $\text{CH}_3-\text{CO}-$); 3,41 (t, 1H, $-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$); 4,80 (dd, 1H, $-\text{CH}_2\alpha-\text{C}\equiv\text{CH}$); 5,14 (s, 2H, $-\text{CH}_2-\text{O}-$); 5,16 (dd, 1H, $-\text{CH}_2\beta-\text{C}\equiv\text{CH}$); 7,24–7,33 (m, 3H, H-6, H-A2 a H-A6); 7,37–7,55 (m, 4H, H-8, H-A3, H-A5 a H-A4); 7,76 (ddd, 1H, H-7); 7,92 (dd, 1H, H-5); 8,15 (s, 11H, H-B5).



$M_{\text{EX.}} = 414,1328$
 $[\text{M} + \text{H}]^+ = 415,1401$

^{13}C NMR spektrum (CDCl_3), ppm: δ 20,62 ($\text{CH}_3\text{-CO-}$); 33,08 ($\text{-CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$); 57,08 ($\text{CH}_2\text{-O-}$); 75,44 ($\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$); 77,84 ($\text{CH}_2\text{-C}\equiv\text{CH}$); 79,98 (C-3); 116,30 (C-8); 120,86 (C-4a); 124,14 (C-6); 127,05 (C-B5); 127,82 (C-5); 128,60 (C-A2 a C-A6); 129,50 (C-A3 a C-A5); 129,85 (C-A1); 130,65 (C-A4); 136,68 (C-7); 139,93 (C-8a); 140,86 (C-B4); 165,77 (C-2), 171,11 ($\text{CH}_3\text{-CO-}$); 187,71 (C-4).

HRMS (ESI+) pro $\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_4^+$ ($[\text{M}+\text{H}]^+$) vypočítané: 415,1401; nalezené: 415,1403.

Pro $\text{C}_{23}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4$:	vypočítané:	66,66 % C	4,38 % H	13,52 % N
	nalezené:	66,45 % C	4,39 % H	13,35 % N

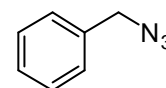
7.6 Syntéza azidů pro přípravu sloučenin 6

Benzylazid

K roztoku benzylbromidu (10 mmol) ve 200 ml směsi voda/acetón (1/4; v/v) byl za laboratorní teploty během 2 min přidán NaN_3 (15 mmol). Reakční směs byla 22 h míchána v temnu. Poté bylo k reakčnímu roztoku přidáno 50 ml CHCl_3 , vše bylo převedeno do děličky a byla oddělena organická vrstva. Vodná fáze byla extrahována CHCl_3 (4 × 40 ml). Organické podíly byly spojeny, vysušeny Na_2SO_4 , přefiltrovány a odpařeny na RVO do sucha.

Světle žlutá kapalina, výtěžek: 68 %; $R_f = 0,75$ (Be); $R_f = 0,68$ (CHCl_3).

GC-EL-MS (m/z , %): 50(19), 51(34), 52(15), 63(6), 65(14), 75(5), 76(7), 77(69), 78(27), 91(100), 92(9), 104(52), 105(11), 133(M^+ , 29).

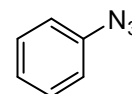


$M_{\text{EX.}} = 133,0640$

Fenylazid

K vychlazenému roztoku anilinu (100 mmol) bylo přidáno 62,5 ml zředěné HCl (1/1; v/v). Ke vzniklé bílé suspenzi byl během 5 min přidán vychlazený roztok NaNO_2 (102 mmol) v 62,5 ml vody. Následně byl do roztoku během 10 min nadávkován vychlazený roztok NaN_3 v 62,5 ml vody. Reakční směs byla míchána 3 h na ledové lázni. Poté byla směs převedena do děličky a extrahována Et_2O (5 × 100 ml).

Veškeré organické podíly byly spojeny, vysušeny Na_2SO_4 , přefiltrovány a odpařeny na RVO do sucha.



Světle hnědá kapalina, výtěžek: 48 %; $R_f = 0,72$ (3 % EtOAc v CHCl_3).

$M_{\text{EX.}} = 119,0483$

7.7 Syntéza *N*-(triazol-4-ylmethyl)-3-triazolylocholin-2,4(1*H*,3*H*)-dionů 6

K roztoku *N*-propargylchinolin-2,4-dionu (1,5 mmol) v 5 ml DMF byly postupně přidány $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (0,15 mmol) a prášková Cu (3 mmol). K takto připravené, cca 15 min míchané, hnědočerné suspenzi byl na závěr za laboratorní teploty během 2 min přidán roztok fenylazidu (1,65 mmol; pro sloučeniny **6a** a **6d**), benzylazidu (1,65 mmol; pro sloučeniny **6b** a **6e**) a tetrazolo[1,5- α]pyridinu (1,575 mmol; pro sloučeniny **6c** a **6f**) ve 4 ml DMF. Reakční směs byla při přípravě sloučenin **6a,b,d,e** dále míchána při laboratorní teplotě po dobu uvedenou ve **Schématu 8**. Sloučeniny **6c** a **6f** byly ohřívány na vytemperované olejové lázni (teplota lázně 95–105 °C) po dobu 1 h. Následně bylo do reakční směsi přidáno (4,5 mmol) $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ a 2 ml vody. Vše bylo 15 min mícháno a nalito na kolonu. Produkt byl z kolony vymyt (100 ml) směsí $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ v poměru 9/1 (v/v). Nažloutlý eluent z kolony byl extrahován nasyceným roztokem NH_4Cl (dokud se barví; 2×50 ml). Organické podíly byly spojeny, vysušeny na bezvodém Na_2SO_4 , přefiltrovány a odpařeny na RVO do sucha. Dimethylformamid byl vyhnán z baňky odpařováním s toluenem. Získané surové produkty byly podrobeny krystalizaci z EtOH nebo Be. Takto byly připraveny všechny sloučeniny 6.

3-Methyl-3-(4-fenyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-1-[(1-fenyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (**6a**)

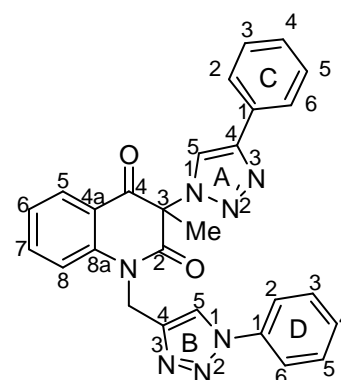
Bílá pevná látka, $t_f = 194\text{--}197$ °C (Be); výtěžek: 99 % (krystal. 72 %); $R_f = 0,79$ (10 % EtOH v CHCl_3); $R_f = 0,48$ (30 % EtOAc v CHCl_3).

IČ spektrum (tableta KBr), cm^{-1} : 3854, 3568, 2345, 1707, 1676, 1601, 1507, 1470, 1378, 1289, 1232, 1172, 1050, 1026, 988, 760, 689, 589, 486.

^1H NMR spektrum (DMSO), ppm: δ 2,23 (s, 3H, CH_3); 5,33 (d, 1H, $-\text{CH}_2\alpha-$); 5,63 (d, 1H, $-\text{CH}_2\beta-$); 7,32–7,39 (m, 2H,

H-6 a H-C4); 7,45–7,52 (m, 3H, H-C3, H-C5 a H-D4); 7,59 (dd, 2H, H-D3 a H-D5), 7,70 (d, 1H, H-8); 7,82–7,91 (m, 5H, H7, H-C2, H-C6, H-D2 a H-D6); 7,98 (dd, 1H, H-5); 8,75 (s, 1H, H-B5); 8,87 (s, 1H, H-A5).

^{13}C NMR spektrum (DMSO), ppm δ 23,38 ($-\text{CH}_3$); 38,70 ($-\text{CH}_2-$); 72,94 (C-3); 116,75 (C-8); 119,15 (C-4a); 120,16 (C-D2 a C-D6); 121,74 (C-B5); 122,49 (C-A5); 123,99 (C-6); 125,13 (C-C2 a C-C6); 128,05 (C-5 nebo C-C4); 128,10 (C-5 nebo C-C4); 128,82



$M_{EX.} = 475,1757$
 $[M + H]^+ = 476,1829$

(C-D4); 129,05 (C-C3 a C-C5); 129,91 (C-D3 a C-D5); 130,53 (C-C1); 136,49 (C-D1); 137,30 (C-7); 141,54 (C-8a); 143,25 (C-B4); 145,96 (C-A4); 168,26 (C-2); 190,02 (C-4).

HRMS (ESI+) pro $C_{27}H_{22}N_7O_2^+$ ($[M+H]^+$) vypočítané: 476,1829; nalezené: 476,1825.

Pro $C_{27}H_{21}N_7O_2$:	vypočítané:	68,20 % C	4,45 % H	20,62 % N
	nalezené:	68,48 % C	4,53 % H	20,60 % N

1-[(1-Benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]-3-methyl-3-(4-fenyl-1H-1,2,3-triazol-1-yl)chinolin-2,4(1H,3H)-dion (6b)

Bílá pevná látka, $t_f = 202\text{--}204\text{ }^\circ\text{C}$ (EtOH); výtěžek: 97 % (krystal. 84 %); $R_f = 0,28$ (30 % EtOAc v $CHCl_3$).

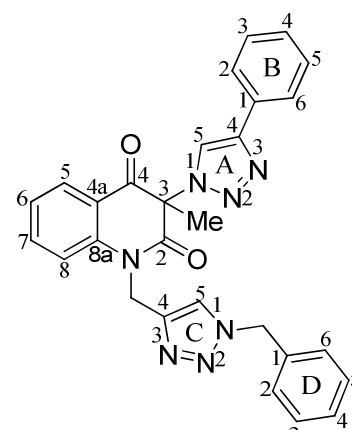
IČ spektrum (tableta KBr), cm^{-1} : 3128, 2984, 1711, 1674, 1600, 1544, 1471, 1424, 1387, 1372, 1312, 1236, 1216, 1184, 1122, 1051, 1026, 980, 854, 791, 761, 718, 694, 661, 596, 485.

1H NMR spektrum (DMSO), ppm: δ 2,18 (s, 3H, $-CH_3$); 5,24 (d, 1H, N1- $\underline{CH}_2\alpha$); 5,49 (d, 1H, N1- $\underline{CH}_2\beta$); 5,58 (s, 2H, N-C1- \underline{CH}_2-); 7,28 (dd, 2H, H-D2 a H-D6); 7,30–7,40 (m, 5H, H-6, H-B4, H-D3, H-D4 a H-D5); 7,49 (dd, 2H, H-B3 a H-B5); 7,67 (d, 1H, H-8); 7,80–7,90 (m, 3H, H-B2, H-B6 a H-7); 7,96 (dd, 1H, H-5); 8,16 (s, 1H, H-C5); 8,87 (s, 1H, H-A5).

^{13}C NMR spektrum (DMSO), ppm δ 23,35 ($-CH_3$); 38,71 (N1- \underline{CH}_2-); 52,81 (NC1- \underline{CH}_2-); 72,78 (C-3); 116,70 (C-8); 119,05 (C-4a); 122,46 (C-A5); 123,82 (C-C5); 123,90 (C-6); 125,09 (C-B2 a C-B6); 127,84 (C-D2 a C-D6); 128,02 (C-D4); 128,06 (C-B4); 128,10 (C-5); 128,72 (C-D3 a C-D5); 129,03 (C-B3 a C-B5); 130,53 (C-B1); 135,98 (C-D1); 137,18 (C-7); 141,50 (C-8a); 142,22 (C-C4); 145,89 (C-A4); 168,18 (C-2); 189,94 (C-4).

HRMS (ESI+) pro $C_{28}H_{24}N_7O_2^+$ ($[M+H]^+$) vypočítané: 490,1986; nalezené: 490,1981.

Pro $C_{28}H_{23}N_7O_2$:	vypočítané:	68,70 % C	4,74 % H	20,03 % N
	nalezené:	68,71 % C	4,78 % H	20,36 % N

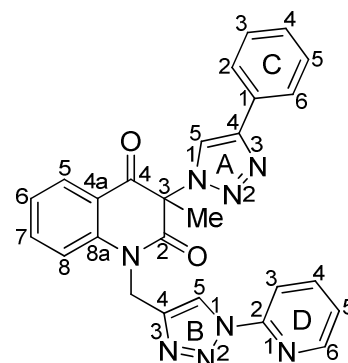


$M_{EX} = 489,1913$
 $[M + H]^+ = 490,1986$

3-Methyl-3-(4-fenyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-1-[(1-pyridin-2-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl methyl]chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (6c)

Bílá tuhá látka, $t_f = 286-192\text{ }^\circ\text{C}$ (Be); výtěžek: 93 % (krystal. 52 %); $R_f = 0,29$ (30 % EtOAc v CHCl_3), $R_f = 0,53$ (5 % EtOH v CHCl_3).

IČ spektrum (tableta KBr), cm^{-1} : 3126, 2972, 2360, 2342, 1706, 1673, 1471, 1420, 1378, 1310, 1232, 1171, 1041, 988, 879, 764, 696, 590, 486.



$M_{EX} = 476,1709$

$[M + H]^+ = 477,1782$

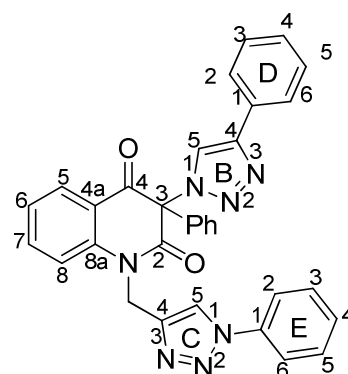
HRMS (ESI+) pro $\text{C}_{26}\text{H}_{21}\text{N}_8\text{O}_2^+$ ($[M+H]^+$) vypočítané: 477,1782; nalezené: 477,1773.

Pro $\text{C}_{26}\text{H}_{20}\text{N}_8\text{O}_2$:	vypočítané:	65,54 % C	4,23 % H	23,52 % N
	nalezené:	65,81 % C	4,28 % H	23,12 % N

3-Fenyl-3-(4-fenyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-1-[(1-fenyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (6d)

Okrová pevná látka, $t_f = 152-157\text{ }^\circ\text{C}$ (EtOH); výtěžek: 94 % (krystal. 70 %); $R_f = 0,39$ (12 % EtOAc v CHCl_3), $R_f = 0,54$ (30 % EtOAc v CHCl_3), $R_f = 0,73$ (5 % EtOH v CHCl_3).

IČ spektrum (tableta KBr), cm^{-1} : 3142, 3061, 1716, 1679, 1600, 1468, 1449, 1375, 1305, 1240, 1182, 1040, 871, 758, 693, 665, 521, 437.



$M_{EX} = 537,1913$

$[M + H]^+ = 538,1986$

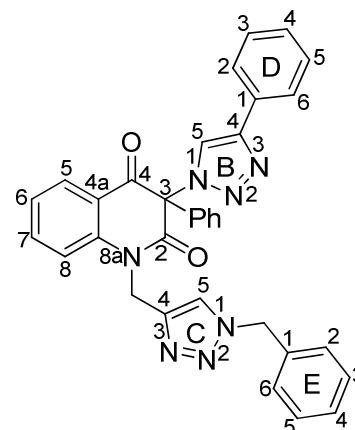
HRMS (ESI+) pro $\text{C}_{32}\text{H}_{24}\text{N}_7\text{O}_2^+$ ($[M+H]^+$) vypočítané: 538,1986; nalezené: 538,1976.

Pro $\text{C}_{32}\text{H}_{23}\text{N}_7\text{O}_2$:	vypočítané:	71,50 % C	4,31 % H	18,24 % N
	nalezené:	71,20 % C	4,32 % H	17,94 % N

1-[(1-Benzyl-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]-3-fenyl-3-(4-fenyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (6e)

Okrová pevná látka, $t_f = 142\text{--}145\text{ }^\circ\text{C}$ (EtOH); výtěžek: 92 % (krystal. 75 %); $R_f = 0,28$ (12 % EtOAc v CHCl_3), $R_f = 0,42$ (30 % EtOAc v CHCl_3), $R_f = 0,64$ (5 % EtOH v CHCl_3).

IČ spektrum (tableta KBr), cm^{-1} : 3138, 3062, 1716, 1678, 1601, 1489, 1468, 1375, 1307, 1223, 1183, 1128, 1035, 971, 870, 761, 723, 695, 665, 609, 519, 437.



$$M_{\text{EX.}} = 551,2070$$

$$[M + H]^+ = 552,2142$$

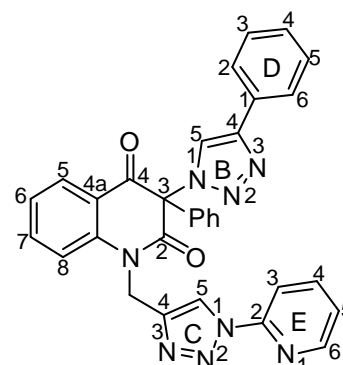
HRMS (ESI+) pro $\text{C}_{33}\text{H}_{26}\text{N}_7\text{O}_2^+$ ($[M+H]^+$) vypočítané: 552,2142; nalezené: 552,2133.

Pro $\text{C}_{33}\text{H}_{25}\text{N}_7\text{O}_2$:	vypočítané:	71,86 % C	4,57 % H	17,78 % N
	nalezené:	71,48 % C	4,58 % H	17,73 % N

3-Fenyl-3-(4-fenyl-1*H*-1,2,3-triazol-1-yl)-1-[(1-(pyridin-2-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dion (6f)

Žlutá pevná látka, $t_f = 188\text{--}192\text{ }^\circ\text{C}$ (Be); výtěžek: 56 %; $R_f = 0,76$ (10 % EtOH v CHCl_3), $R_f = 0,50$ (30 % EtOAc v CHCl_3).

IČ spektrum (tableta KBr), cm^{-1} : 2284, 1718, 1679, 1597, 1467, 1450, 1383, 1347, 1273, 1154, 1074, 1049, 1032, 995, 873, 757, 700, 664, 613, 523, 430.



$$M_{\text{EX.}} = 538,1866$$

$$[M + H]^+ = 539,1938$$

Pro $\text{C}_{31}\text{H}_{22}\text{N}_8\text{O}_2$:	vypočítané:	69,13 % C	4,12 % H	20,81 % N
	nalezené:	68,91 % C	4,17 % H	20,66 % N

7.8 Syntéza 3-triazolylkarboxylových kyselin chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionů 7

K bezbarvému vychlazenému roztoku výchozího alkoholu **4b** (3,5 mmol) a **4d** (1,5 mmol) v 80 ml acetonu byl během 10 min přikapán, opět vychlazený, roztok CrO_3 (36 mmol) ve 36 ml 2 M- H_2SO_4 . Následně bylo vše mícháno při laboratorní teplotě po dobu uvedenou ve **Schématu 9**. Po ukončení reakce byla reakční směs nalita na

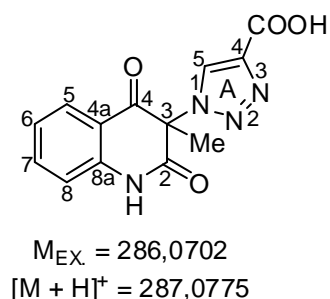
400 ml ledové vody, kde došlo k vysrážení jemných krystalků, které byly odfiltrovány přes fritu a vysušeny. Vodný filtrát byl převeden do dělicí nálevky a extrahován EtOAc (6 × 50 ml) a CHCl₃ (2 × 50 ml). Organické podíly byly spojeny, vysušeny na bezvodém Na₂SO₄, přefiltrovány a odpařeny na RVO do sucha. Čisté sloučeniny **7a** a **7b** byly získány krystalizací spojených surových produktů z EtOH.

1-(3-Methyl-2,4-dioxo-1,2,3,4-tetrachinolin-3-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-karboxylová kyselina (7a)

Nazelenalá pevná látka, $t_f = > 350$ °C (EtOH); výtěžek: 78 % (krystal. 52 %); $R_f = 0,50$ (10 % EtOH v CHCl₃).

IČ spektrum (tableta KBr), cm⁻¹: 3430, 2976, 2349, 1723, 1684, 1614, 1485, 1386, 1300, 1163, 1047, 974, 878, 788, 757, 665, 527, 569, 434.

HRMS (ESI+) pro C₁₃H₁₁N₄O₄⁺ ([M+H]⁺) vypočítané: 287,0775; nalezené: 387,0774.

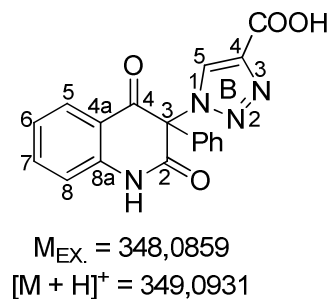


1-(2,4-Dioxo-3-fenyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-3-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-karboxylová kyselina (7b)

Bílá pevná látka, $t_f = 180-184$ °C (EtOH); výtěžek: 71 % (krystal. 40 %); $R_f = 0,26$ (50 % EtOH v CHCl₃).

IČ spektrum (tableta KBr), cm⁻¹: 3356, 3157, 2348, 1735, 1679, 1614, 1485, 1363, 1275, 1204, 1189, 1160, 1040, 857, 759, 690, 643, 524.

HRMS (ESI+) pro C₁₈H₁₃N₄O₄⁺ ([M+H]⁺) vypočítané: 349,0931; nalezené: 349,0932.

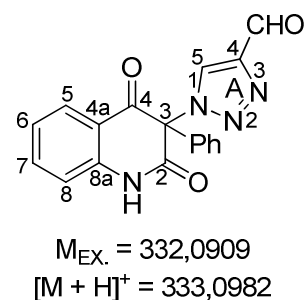


1-(2,4-Dioxo-3-fenyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-3-yl)-1H-1,2,3-triazol-4-karbaldehyd (9)

Žlutý tuhý olej; výtěžek: 9 %; $R_f = 0,35$ (5 % EtOH v CHCl₃); $R_f = 0,54$ (10 % EtOH v CHCl₃); $R_f = 0,83$ (50 % EtOH v CHCl₃).

HRMS (ESI+) pro C₁₈H₁₃N₄O₃⁺ ([M+H]⁺) vypočítané: 333,0982;

nalezené: 333,0990.



7.9 Syntéza 3-triazolyloxylových derivátů chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionů 8

Ke světle žlutému roztoku 3-triazolylchinolin-2,4-dionů (6 mmol) v 18 ml pyridinu bylo během 2 min přikapáno 12 ml Ac₂O (126 mmol). Reakční směs byla dále míchána 1 h. Následně byl reakční roztok opakovaným odpařováním s ethanolem (6 × 40 ml) odpařen na RVO do sucha. K získanému odparku bylo přidáno 300 ml vody. Tím došlo k vytvoření emulze, jejímž roztíráním se stala bílá suspenze, která byla přefiltrována přes fritu. Surový produkt byl na fritě opakovaně promyt vodou do neutrálního pH filtrátu, rozpuštěn ve vroucím EtOH, za horka překrytalizován a nechán krystalizovat. Takto byla připravena sloučenina **8b**.

[1-(2,4-Dioxo-3-fenyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin-3-yl)-1*H*-1,2,3-triazol-4-yl]methyl acetát (**8b**)

Bílá krystalická látka, *t*_f = 130–134 °C (EtOH); výtěžek: 85 % (krystal. 80 %); *R*_f = 0,40 (5 % EtOH v CHCl₃); *R*_f = 0,56 (10 % EtOH v CHCl₃)

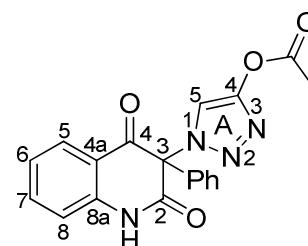
IČ spektrum (tableta KBr), cm⁻¹: 3504, 3155, 2922, 2347, 1706, 1686, 1615, 1483, 1358, 1253, 1145, 1064, 960, 858, 760, 698, 583, 495.

¹H NMR spektrum (CDCl₃), ppm: δ 2,04 (s, 3H, CH₃-CO-); 5,13 (s, 2H, -CH₂-O-); 7,09 (d, 1H, H-8); 7,15 (ddd, 1H, H-6); 7,34–7,42 (m, 2H, H-A2 a H-A6); 7,46–7,54 (m, 3H, H-A3, H-A5 a H-A4); 7,62 (ddd, 1H, H-7); 7,83 (dd, 1H, H-5); 8,07 (s, 1H, H-B5); 11,62 (br s, 1H, N1-H).

¹³C NMR spektrum (CDCl₃), ppm: δ 20,63 (CH₃-CO-); 57,07 (-CH₂-O-); 79,92 (C-3); 116,65 (C-8); 119,25 (C-4a); 123,42 (C-6); 126,93 (C-B5); 127,48 (C-5); 128,81 (C-A2 a C-A6); 129,58 (C-A3 a C-A5); 129,97 (C-A1); 130,58 (C-A4); 136,83 (C-7); 140,50 (C-8a); 140,75 (C-B4); 166,76 (C-2); 170,12 (CH₃-CO-); 188,80 (C-4).

GC-EI-MS (*m/z*, %): 43(16), 76(6), 77(19), 92(14), 103(6), 104(9), 119(7), 120(24), 129(8), 130(7), 141(14), 152(7), 158(6), 159(8), 180(14), 190(7), 208(10), 218(34), 219(7), 235(7), 236(100), 237(50), 238(7), 246(11), 260(7), 263(15), 275(10), 288(54), 289(18), 306(16), 348(5), 376(6), 377(1).

HRMS (ESI+) pro C₂₀H₁₇N₄O₄⁺ ([M+H]⁺) vypočítané: 377,1244; nalezené: 377,1241.



M = 377,1244
*M*_{EX.} = 376,1172

8. MIKROBIOLOGICKÉ TESTY

Příprava roztoků triazolových sloučenin

Vypočítaná množství připravených triazolových derivátů, která jsou v **Tabulce 13**, byla navážena do vialek o objemu 2 ml. Látky byly rozpuštěny v 1 ml dimethylsulfoxidu (DMSO), jelikož se v něm triazolové deriváty snadno rozpouští a zároveň nemá DMSO inhibiční účinek vůči zkoumaným mikroorganismům.

Antimikrobní účinek triazolových sloučenin byl testován při hmotnostních koncentracích 25 g/l, 10 g/l, 5 g/l a 2,5 g/l, které korespondují s látkou s nejvyšší molární hmotností, tj. sloučeniny **6e**, podle níž byly navážky všech dalších látek spočteny.

Tabulka 13. Navažovaná množství testovaných triazolových derivátů.

Vzorek	Teoretická navážka [mg]				Praktická navážka [mg]			
	A	B	C	D	A	B	C	D
4a	14,428	5,771	2,886	1,443	14,401	5,868	2,832	1,448
4b	12,340	4,936	2,468	1,234	12,370	4,839	2,431	1,211
4c	17,241	6,896	3,448	1,724	17,253	6,897	3,490	1,735
4d	15,153	6,061	3,031	1,515	15,320	6,045	3,098	1,576
5a	16,152	6,461	3,231	1,615	16,143	6,421	3,288	1,666
5c	18,965	7,586	3,793	1,896	188,884	7,642	3,775	1,856
6a	21,551	8,620	4,310	2,155	21,836	8,600	4,658	2,208
6b	22,187	8,875	4,438	2,219	22,006	8,864	4,427	2,222
6c	21,596	8,638	4,319	2,159	21,573	8,736	4,333	2,164
6d	24,364	9,746	4,873	2,436	24,570	9,682	4,945	2,418
6e	25,000	10,000	5,000	2,500	24,992	9,990	5,043	2,580
6f	24,409	9,764	4,882	2,441	24,409	9,701	4,827	2,496
7a	12,973	5,189	2,595	1,297	12,980	5,103	2,588	1,341
7b	15,787	6,315	3,157	1,579	15,758	6,290	3,208	1,501
8b	17,058	6,823	3,412	1,706	17,055	6,803	3,489	1,688

A : konc. 25 g/l

B : konc. 10 g/l

C : konc. 5 g/l

D : konc. 2,5 g/l

8.1 Disková difuzní metoda

Příprava živné půdy pro kultivaci bakterií

Pro kultivaci bakterií byl připraven Mueller Hinton agar, který je používán pro testování inhibičních látek.

<u>Složení:</u>	Mueller Hinton Broth, 21 g/l (HiMedia).....	8,4 g
	• Beef, infusion from.....	300,0 g/l
	• Casein acid hydrolysate	17,5 g/l
	• Starch	1,5 g/l
	Agar Agar, Type I, 15 g/l (HiMedia)	6,0 g
	Voda.....	400 ml

Do čtyř infuzních láhví o objemu 400 ml byl navážen Mueller Hinton Broth a Agar Agar, Type I. Složky byly zality 400 ml destilované vody a důkladně protřepány. Poté byly láhve vloženy do autoklávu, kde byla živná půda sterilizována 15 min při 121 °C. Po ochlazení byla živná půda nalita na sterilní Petriho misky a ponechána ztuhnout.

Příprava živné půdy pro kultivaci kvasinek

Pro kultivaci kvasinky *Candida albicans* byl použit Chloramphenicol Yeast Glucose Agar.

<u>Složení:</u>	Chloramphenicol Yeast Glucose Agar, 40 g/l (HiMedia)	16,0 g
	Voda.....	400 ml

Do 400 ml infuzní láhve byl navážen Chloramphenicol Yeast Glucose Agar, který byl suspendován ve 400 ml destilované vody. Živná půda byla v infuzní láhvi sterilizována 15 min při 121 °C. Poté byl roztok rozlit do sterilních Petriho misek, kde po ochlazení ztuhl.

Očkování živných půd kulturami a aplikace roztoků látek

Po zatuhnutí agaru bylo na Petriho misce mikropipetou nanášeno 100 µl bakteriální či kvasinkové suspenze, která byla připravena centrifugací mikrobiální kultury ve 4 ml

fyziologického roztoku (0,5–1,0 stupeň McFarlandovy stupnice). Pomocí jednorázové mikrobiologické hokejky byla bakteriální suspenze rozetřena po povrchu agaru.

Na povrch agaru po zaschnutí naočkované mikrobiální suspenze byly v plameni vyžíhanou a na vzduchu ve sterilním boxu ochlazenou jehlou aplikovány sterilní papírové disky, které byly 30 min při pokojové teplotě napuštěny v testovaných inhibičních látkách. Pro kontrolu byly použity sterilní papírové disky s vodou a DMSO.

Inkubace

Bakterie *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* byly inkubovány 24 h při 30 °C. Bakterie *Micrococcus luteus* byly inkubovány 48 h při teplotě 30 °C. Kvasinky *Candida albicans* byly inkubovány 24 h při pokojové teplotě v temnu.

Vyhodnocení

Vytvoření inhibičních zón a zastavení tak růstu určitého mikroorganismu bylo po inkubaci vizuálně hodnoceno a bylo srovnáno s kontrolními pokusy.

8.2 Jamková difuzní metoda

Příprava živné půdy pro kultivaci bakterií

Pro kultivaci bakterií byl připraven Mueller Hinton agar, který je používán pro testování inhibičních látek. V této metodě bylo pro přípravu použito větší množství Agar Agar, Type I z toho důvodu, aby byla živná půda hustší a tužší a lépe se z ní sterilním nástrojem vyřezávaly jamky.

<u>Složení:</u>	Mueller Hinton Broth, 21 g/l (HiMedia).....	8,4 g
	Beef, infusion from.....	300,0 g/l
	Casein acid hydrolysate	17,5 g/l
	Starch	1,5 g/l
	Agar Agar, Type I, 20 g/l (HiMedia)	8,0 g
	Voda.....	400 ml

Ve 400 ml destilované vody ve čtyřech infuzních láhvích o objemu 400 ml byl navážen Mueller Hinton Broth a Agar Agar, Type I. Po protřepání byly láhve vloženy do autoklávu, kde byl roztok sterilizován 15 min při 121 °C. Na sterilní Petriho misku bylo mikropipetou

naneseno 1000 μ l příslušné suspenze mikroorganismu (0,5–1,0 stupeň McFarlandovy stupnice), který byl zalit ochlazeným agarem. Krouživým pohybem celé misky byl mikroorganismus rozmíchán s živnou půdou.

Příprava živné půdy pro kultivaci kvasinek

Pro kultivaci kvasinky *Candida albicans* byl použit Chloramphenicol Yeast Glucose Agar.

Složení: Chloramphenicol Yeast Glucose Agar, 40 g/l (HiMedia)16,0 g
Voda.....400 ml

Do infuzní láhve o objemu 400 ml byl navážen Chloramphenicol Yeast Glucose Agar, který byl zalit 400 ml destilované vody. Živná půda v infuzní láhvi po protřepání byla sterilizována 15 min při 121 °C. Mikropipetou bylo na sterilní Petriho misky napipetováno 1 ml kultury kvasinek. Po rozlití vychladlého agaru byl mikroorganismus s agarem rozmíchán krouživým pohybem.

Aplikace roztoků látek

Pomocí plastového sterilního nástroje byly do ztuhlého agaru vyřezány jamky, do kterých bylo mikropipetou dávkováno 20 μ l roztoků testovaných látek v DMSO o příslušné koncentraci. Pro kontrolu bylo do dvou jamek pipetováno 20 μ l vody a DMSO.

Inkubace

Bakterie *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa* byly inkubovány 24 h při 30 °C. Bakterie *Micrococcus luteus* byly inkubovány 48 h při teplotě 30 °C. Kvasinky *Candida albicans* byly inkubovány 24 h při pokojové teplotě v temnu.

Vyhodnocení

Vizuálně bylo sledováno vytvoření inhibičních zón okolo každé jamky. Inhibiční zóny byly srovnávány s kontrolními pokusy.

ZÁVĚR

Hlavní náplní diplomové práce bylo připravit, již v dříve provedených experimentech prověřenou syntetickou cestou několik bis-triazolových derivátů chinolin-2,4-dionů, které nesou v poloze 3 4-substituované 1,2,3,-triazolylové skupiny a k atomu dusíku chinolinového skeletu prostřednictvím methylenového můstku připojené 1-substituované 1,2,3-triazol-4-ylové substituenty. Úkolem byly nejen tyto triazolové deriváty, ale také téměř všechny meziprodukty, přes které byly syntetizovány podrobit mikrobiologickým testům, z důvodu v mnoha publikacích zmiňovaných antimikrobních účinků. Sumárně vzato bylo připraveno 16 různě substituovaných triazolových derivátů izolovaný z různých reakčních mezistupňů, jejichž struktury byly plně charakterizovány a potvrzeny metodami instrumentální analýzy, elementární analýzou a v neposlední řadě také body tání. Prakticky všechny jednotlivé mezistupně byly natolik během studia reakcí optimalizovány, že poskytovaly své produkty ve vysokých výtěžcích. Pro představu, výtěžek totální syntézy například bis-triazolových sloučenin **6a** popřípadě **6d** uvažovaný od chlorace 4-hydroxychinolin-2-onů **1a** popřípadě **1b**, činí 82 % popřípadě 75 %. To je pro vícekrokovou syntézu čítající 5 mezistupňů, vynikající výsledek.

U patnácti z nich bylo sledováno inhibiční působení na bakterie a kvasinky vyskytující se v kosmetických prostředcích. Z bakterií byly vybrány dva G+ mikroorganismy, konkrétně *Micrococcus luteus* a *Staphylococcus aureus* a dále dva G- mikroorganismy, konkrétně *Escherichia coli* a *Pseudomonas aeruginosa*. Z kvasinek byla testována *Candida albicans*. Z metod byly vybrány dva difuzní testy, disková difuzní a jamková difuzní metoda. Jako citlivější byla zhodnocena disková difuzní metoda, ve které byl určitý mikroorganismus v přímém kontaktu s testovanou látkou. Byly zde zaznamenány negativní výsledky růstu mikroorganismů. U jamkové difuzní metody docházelo k neomezenému růstu bakterií a kvasinek při aplikaci každé látky i při její nejvyšší koncentraci. Z hlediska antimikrobní aktivity je možné konstatovat, že z připravených sloučenin byly účinné pouze tři látky, které inhibovaly růst bakterií. K inhibici kvasinek *Candida albicans* u žádné z látek nedošlo. Jako nejúčinnější byla vyhodnocena látka označena jako **5c**, která inhibovala růst všech bakterií a výrazná toxicita byla zaznamenána na bakterie *Pseudomonas aruginosa*, kde došlo k inhibici již při koncentraci 9 mmol/l (3,8 g/l). Aby mohli být učiněny závěry, jaká substituce a v jaké poloze na témže skeletu je z hlediska zvýšení toxicity vůči mikroorganismům nejvhodnější, bylo by patrně nezbytné ještě sérii testovaných látek rozšířit o další

kombinace. Z výsledků testů je ovšem zřejmé, že vytvořením druhého triazolového kruhu připojeného k atomu dusíku chinolindionového jádra antimikrobní ani antifungální aktivitu nijak nezvyšují, ba naopak u jejich analogů **4a**, **5c** a **7b** inhibiční aktivitu na mikrobi ruší.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

2-Py	Pyridin-2-yl
Ac ₂ O	Acetanhydrid
AcOH	Kyselina octová
Be	Benzen
Bn	Benzyl
CDCl ₃	Deuterovaný chloroform
CHCl ₃	Chloroform
COSY	Correlation Spectroscopy
CrO ₃	Oxid chromový
CuSO ₄ · 5H ₂ O	Modrá skalice
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EI-MS	Electron Ionization Mass Spectrometry
ESI-MS	Electrospray Ionization Mass Spectrometry
Et ₂ O	Diethylether
EtO	Ethylenoxid
EtOAc	Ethylacetát
EtOH	Ethanol
GC	Gas Chromatography
GC-MS	Gas Chromatography Mass Spectrometry
H ₂ SO ₄	Kyselina sírová
HCl	Kyselina chlorovodíková
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HRMS	High Resolution Mass Spectrometry
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
IČ	Infračervená spektroskopie
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
K ₂ CO ₃	Uhličitan draselný
Konc.	Koncentrace
Lab. tep.	Laboratorní teplota
Me	Methyl
Me ₂ CO	Aceton

m/z	Mass number/charge number
NaN ₃	Azid sodný
NaNO ₂	Dusitan sodný
NaOH	Hydroxid sodný
Na ₂ SO ₄	Síran sodný
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
OAc	Acetyloxylová skupina
Ph	Fenyl
ppm	Parts per Million
Py	Pyridin
Q-TOF	Quadrupole Time-of-flight
R _f	Retenční faktor
RVO	Rotační vakuová odparka
SLB-MS	Supelco Low Bleed Mass Spectrometry
S _N 2	Nukleofilní substituce
SOCl ₂	Sulfurylchlorid
TLC	Thin-layer Chromatography
v/v	Volume/volume

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Stavba prokaryotické bakteriální buňky.	22
Obrázek 2. Průřez buňkou kvasinek.	26
Obrázek 3. Eukaryotický typ buňky.	27
Obrázek 4. Struktury triazolových antimykotik.	35
Obrázek 5. Struktury triazolových sedativ, hypnotik a antidepresiv.	36
Obrázek 6. Struktury rizatriptanu, ribavirinu a trapidlu.	37
Obrázek 7. Průběh „one pot click reakce“ 38	38
Obrázek 8. HRMS spektra sloučenin 4a a 5a	44
Obrázek 9. 2D NMR spektrum sloučeniny 5a	45
Obrázek 10. Struktury použitých látek k mikrobiologickému testování.	48
Obrázek 11. Inhibiční účinek látky 4a při koncentracích 45,32 mmol/l a 18,13 mmol/l na bakterie <i>Staphylococcus aureus</i>	50
Obrázek 13. Inhibiční účinek látky 5c při koncentraci 45,32 mmol/l na bakterie <i>Staphylococcus aureus</i>	51
Obrázek 14. Inhibiční účinek látky 4a při koncentraci 45,32 mmol/l na bakterie <i>Micrococcus luteus</i>	52
Obrázek 15. Inhibiční účinek látky 5c při koncentraci 45,32 mmol/l na bakterie <i>Micrococcus luteus</i>	52
Obrázek 16. Inhibiční účinek látky 5c při koncentracích 45,32 mmol/l, 18,13 mmol/l a 9,06 mmol/l na bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	53
Obrázek 17. Inhibiční účinek látky 5c při koncentracích 45,32 mmol/l a 18,13 mmol/l na bakterie <i>Escherichia coli</i>	54
Obrázek 18. Inhibiční účinek látky 7b při koncentraci 45,32 mmol/l na bakterie <i>Escherichia coli</i>	55

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Klasifikace kosmetických přípravků dle jejich použití.	14
Tabulka 2. Koncentrace testovaných triazolových derivátů.....	49
Tabulka 3. Inhibiční účinek triazolových derivátů na bakterie <i>Staphylococcus aureus</i> ; 24 h inkubace při 30 °C; disková difuzní metoda.....	50
Tabulka 4. Inhibiční účinek triazolových derivátů na bakterie <i>Micrococcus luteus</i> ; 48 h inkubace při 30 °C; disková difuzní metoda.....	51
Tabulka 5. Inhibiční účinek triazolových derivátů na bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; 24 h inkubace při 30 °C; disková difuzní metoda.....	53
Tabulka 6. Inhibiční účinek triazolových derivátů na bakterie <i>Escherichia coli</i> ; 24 h inkubace při 30 °C; disková difuzní metoda.....	54
Tabulka 7. Inhibiční účinek triazolových derivátů na kvasinky <i>Candida albicans</i> ; 24 h inkubace při pokojové teplotě v temnu; disková difuzní metoda.	55
Tabulka 8. Inhibiční účinek triazolových derivátů na bakterie <i>Staphylococcus aureus</i> ; 24 h inkubace při 30 °C; jamková difuzní metoda.	56
Tabulka 9. Inhibiční účinek triazolových derivátů na bakterie <i>Micrococcus luteus</i> ; 48 h inkubace při 30 °C; jamková difuzní metoda.	57
Tabulka 10. Inhibiční účinek triazolových derivátů na bakterie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; 24 h inkubace při 30 °C; jamková difuzní metoda.....	57
Tabulka 11. Inhibiční účinek triazolových derivátů na bakterie <i>Escherichia coli</i> ; 24 h inkubace při 30 °C; jamková difuzní metoda.....	58
Tabulka 12. Inhibiční účinek triazolových derivátů na kvasinky <i>Candida albicans</i> ; 24 h inkubace při pokojové teplotě v temnu; jamková difuzní metoda.....	58
Tabulka 13. Navažovaná množství testovaných triazolových derivátů.	78

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ¹ Hlava, B.; Starý, F.; Pospíšil, F. *Rostliny v kosmetice*. Praha: Artia, **1987**.
- ² Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 o kosmetických přípravcích. *Access to European Union law*. **2009** [cit. 2015-04-01]. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX:32009R1223>.
- ³ Krejčí, J. *Kosmetika a kosmetologie*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati - Fakulta technologická, **2012**, 198 s. Registrační číslo CZ 1.07/2.2.00/28.0132.
- ⁴ Mitsui, T. *New Cosmetic Science*. New York: Elsevier Science, **1997**, 499. ISBN 978-0-444-82654-1.
- ⁵ Langmaier, F. *Základy kosmetických výrob*. 1. vyd. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, **2001**, 160. ISBN 80-731-8016-2.
- ⁶ Malmstein, M. *Surfactants and Polymers in Drug Delivery*. Hoboken: Informa Healthcare, **2002**. ISBN 9780824743758.
- ⁷ Bartovská, L.; Šišková, M. *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze*. Vydavatelství VŠCHT Praha, **2005** [cit. 2015-04-21]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-001/hesla/gel.html.
- ⁸ Tiskové centrum: Informace o prověření deklarované doby minimální trvanlivosti kosmetických prostředků po otevření. *Ministerstvo zdravotnictví České republiky*. **2007** [cit. 2015-04-22].
- ⁹ ČSN ISO 18415. *Kosmetika - Mikrobiologie - Průkaz specifických a nespecifických mikroorganismů*. 1. vyd. **2007**.
- ¹⁰ Salvador, A.; Chisvert, A. *Analysis of Cosmetic Products*. London: Elsevier, **2007**, 487. ISBN 0444522603.
- ¹¹ Brannan, D.K.; Geis, P.A. Cosmetics Microbiology. *Encyclopedia of Microbiology*. Elsevier, **2009**, 270. DOI: 10.1016/B978-012373944-5.00142-5.
- ¹² Lundov, M. D.; Moesby, L.; Zachariae, C.; Johansen, J. D. Contamination versus Preservativ of Cosmetics: a Review on Legislation, Usage, Infections, and Contact Allergy. *Contact Dermatitis*. **2009**, 60(2), 70-78. [cit. 2015-04-22]. DOI: 10.1111/j.1600-0536.2008.01501.
- ¹³ Khan, I.; Ali, S.; Hameed, S.; Rama, N. H.; Hussain, M. T.; Wadood, A.; Uddin, R.; Ul-Haq, Z.; Khan, A.; Choudhary, M. I.; *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 5200–5207.

- ¹⁴ Plech, T.; Wujec, M.; Siwek, A.; Kosikowska, W.; Malm, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 241–248.
- ¹⁵ Krs, V.; Hanek, R. *Materiály I pro studijní obor Kosmetička. 2.*, aktualiz. vyd. Praha: Informatorium, **2011**, 136. ISBN 978-80-7333-085-9.
- ¹⁶ Buchta, V.; Jílek, P.; Horáček, J.; Horák, V. *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*. 1. vyd. Praha: Karolinum, **1998**, 192. ISBN 80-7184-565-5.
- ¹⁷ *Klinicky významné bakterie*. 1. vyd. Praha: Triton, **2012**, 123. ISBN 978-80-7387-588-6.
- ¹⁸ *Fytopatogenní prokaryota*. Brno: Mendelova univerzita, **2013**. Registrační číslo CZ 1.07/2.2.00/28.0020.
- ¹⁹ Buňková, L.; Doležalová, M. *Obecná mikrobiologie*. Vyd. 2., nezměn. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, **2010**, 190. ISBN 978-80-7318-973-0.
- ²⁰ Šilhánková, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3. Praha: Academia, **2008**, 363. ISBN 978-80-200-1703-1.
- ²¹ Schindler, J. *Ze života bakterií*. Vyd. 1. Praha: Academia, **2008**, 143. ISBN 978-80-200-1666-9.
- ²² Sedláček, I. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, **2007**, 270. ISBN 978-80-210-4207-0.
- ²³ Schindler, J. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada, **2014**, 215. ISBN 978-80-247-4771-2.
- ²⁴ Fernandes, R. *Microbiology Handbook*. Cambridge: Leatherhead Pub., and Royal Society of Chemistry, **2009**, 173. ISBN 1905224621.
- ²⁵ Gillapsy, A.F.; Iandolo, J.J. Staphylococcus. *Encyclopedia of Microbiology*. Elsevier, **2009**, 293. DOI: 10.1016/B978-012373944-5.00237-6.
- ²⁶ Schaechter, M. Escherichia Coli. *Encyclopedia of Microbiology*. Elsevier, **2009**, 125. DOI: 10.1016/B978-012373944-5.00059-6.
- ²⁷ Zago, A.; Chugani, S. *Encyclopedia of Microbiology*. Elsevier, **2009**. DOI: 10.1016/B978-012373944-5.00203-0.
- ²⁸ Walker, G.M.; Iandolo, J.J. Yeasts. *Encyclopedia of Microbiology*. Elsevier, **2009**, 478. DOI: 10.1016/B978-012373944-5.00335-7.
- ²⁹ Říhová Ambrožová, Jana. *Vysoká škola chemicko-technologická v Praze*. Vydavatelství VŠCHT Praha, **2006** [cit. 2015-04-23]. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-006/ebook.help.htm.

- ³⁰ Hauerlandová, Iva. *Kosmetika a kosmetologie*, přednášky, **2014**.
- ³¹ Buňková, L. *Mikrobiologie potravin a kosmetiky*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati - Fakulta technologická, **2012**, 136. Registrační číslo 1.07/2.2.00/28.0132.
- ³² Machovcová, A. Skryté a neočekávané alergeny v kosmetických přípravcích. *Solen: Medical education* [online]. **2007**, *1*, 6-9 [cit. 2015-04-22]. Dostupné z: http://www.solen.sk/index.php?page=pdf_view&pdf_id=2564&magazine_id=11.
- ³³ Národní referenční laboratoř pro mikrobiologii potravin, PBU a prostředí. *Státní zdravotní ústav*. [cit. 2015-04-22]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/ucinnost-konzervace-kosmetiky>.
- ³⁴ Směrnice Evropského parlamentu a Rady 98/8/EC o uvádění biocidních přípravků na trh. **1998**. *Access to European Union Law*. [cit. 2015-05-10]. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/HTML/?uri=CELEX:31998L0008&>.
- ³⁵ Polati, S.; Gosetti, F.; Gennaro, M. Preservatives in Cosmetics. Regulatory Aspects and Analytical Methods. *Analysis of Cosmetic Products*. Elsevier. **2007**, 211–241. DOI: 10.1016/B978-044452260-3/50034-6. ISBN 978-0-44-452260-3.
- ³⁶ Veliyath, S. K.; Kumar, M.; Sahoo, S. *Int. J. Res. Pharm. Sci.* **2012**, *3(2)*, 326-333.
- ³⁷ Plech, T.; Wujec, M.; Siwek, A.; Kosikowska, W.; Malm, A. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, *46*, 241–248.
- ³⁸ Eswaran, S.; Adhikari, A. V.; Shetty, N. S. *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 4637–4647.
- ³⁹ Khan, I.; Ali, S.; Hameed, S.; Rama, N. H.; Hussain, M. T.; Wadood, A.; Uddin, R.; Ul-Haq, Z.; Khan, A.; Choudhary, M. I.; *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 5200–5207.
- ⁴⁰ Udupi, R. H.; Bheemachari, S.; Srinivasalu, N.; Varnekar, R.; Purushottamachar *Bull. Korean Chem. Soc.* **2007**, *28(12)*, 2235–2240.
- ⁴¹ Nair, H. K.; Peterson, A. C.; Yazdi, P. T.; Franzmair, R. *Bioorganic & Med. Chem. Lett.* **1996**, *6(12)*, 1335–1338.
- ⁴² Shiradkar, M. R.; Murakari, K. K.; Gangadasu, H. R.; Suresh, T.; Kalyan, Ch. A.; Panchal, D.; Kaur, R.; Burange, P.; Ghogare, J.; Mokale, V.; Raut, M. *Bioorganic & Med. Chem.* **2007**, *15*, 3997–4008.
- ⁴³ Kritsanida, M.; Mouroutsou, A.; Marakos, P.; Pouli, N.; Papakonstantinou-Garoufalias, S.; Pannecouque, C.; Witvrouw, M., De Clercq, E. Synthesis and Antiviral Activity Evaluation of Some New 6-Substituted 3-(1-Adamantyl)-1,2,4-triazolo[3,4-b][1,3,4]thiadiazoles. *Farmaco.* **2002**, *57(3)*.

- ⁴⁴ Demirbaş, N.; Demirbaş, A.; Ceylan, Ş.; Şahin, D. Synthesis and Characterizations of Some New 4*H*-1,2,4-Triazole Derivates. *Turk. J. Chem.* **2008**, *32*, 1–8.
- ⁴⁵ Przegaliński, E.; Lewandowska, A. The Effect of Etopridone, a New Potential Antidepressant Drug, on the Central Serotonin System. *J. Neural Transmission.* **1979**, *46*, 303–312.
- ⁴⁶ Khallil, NS. Efficient Synthesis of Novel 1,2,4-Triazole Fused Acyclic and 21–28 Membered Macrocyclic and/or Lariat Macrocyclic Oxaazathia Crown Compounds with Potential Antimicrobial Activity. *European Journal of Medicinal Chemistry.* **2010**, *45(11)*, 5265–5277. DOI: 10.1016/j.ejmech.2010.08.046.
- ⁴⁷ Skořepová, M. *Antimykotika z pohledu dermatologa.* II. kožní klinika 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. **2002**, *12(1)*.
- ⁴⁸ Kuklová, I. *Novinky v léčbě onychomykóz.* Dermatovenerologická klinika 1. Lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze. *Dermatol. praxi.* **2013**, *7(3)*, 121–122.
- ⁴⁹ Rozsypal, H. *Systémová antimykotika.* III. klinika infekčních a tropických nemocí 1 Lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice Na Bulovce v Praze. *Klin. Farmakol. Farm.* **2008**, *22(1)*, 40–44.
- ⁵⁰ Slíva, J.; Votava, M. *Farmakologie.* 1. vyd. Praha: Triton, 2010, 238. ISBN 978-80-7387-424-7.
- ⁵¹ Hynie, S. *Speciální farmakologie.* 2., přeprac. vyd. Praha: Karolinum, **2003**, 239. ISBN 80-246-0657-7.
- ⁵² Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 2596.
- ⁵³ Tornøe, C. W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 3057.
- ⁵⁴ Crowley, J. D.; McMorran, D. A. *Top Heterocycl. Chem.* **2012**, *67*, 7081.
- ⁵⁵ Baumgarten, P., Kärger, W. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1927**, *60*, 832–842.
- ⁵⁶ Rudolf, O.; Mrkvička, V.; Lyčka, A.; Rouchal, M.; a Klásek, A. Modified Riemschneider Reaction of 3-Thiocyanatoquinolinediones. *Helvetica Chimica Acta.* **2012**, *95(8)*, 1352–1372. DOI: 10.1002/hlca.201200049.
- ⁵⁷ Kafka, S.; Proisl, K.; Kašpárková, V.; Urankar, D.; Kimmel, R.; Košmrlj, J. Oxidative Ring Opening of 3-Hydroxyquinoline-2,4(1*H*,3*H*)-diones into *N*-(α -ketoacyl)anthranilic Acids. *Tetrahedron.* **2013**; *69(51)*, 10826–10835. DOI: 10.1016/j.tet.2013.10.092.

- ⁵⁸ Kimmel, R.; Kafka, S.; Košmrlj, J.; Urankar, D. Selective Formation of Glycosidic Linkages of *N*-unsubstituted 4-Hydroxyquinolin-2-(1H)-ones. *Carbohydrate Research*. 2010, *345*(6), 768-779. DOI: 10.1016/j.carres.2010.01.023.
- ⁵⁹ Ishida, T.; Kikuchi, S.; Yamada, T.; Urankar, D.; Kimmel, R.; Košmrlj, J. Efficient Preparation of 4-Hydroxyquinolin-2(1 H)-one Derivatives with Silver-Catalyzed Carbon Dioxide Incorporation and Intramolecular Rearrangement. *Organic Letters*. **2013**, *15*(14), 3710-3713. DOI: 10.1021/ol401571r.
- ⁶⁰ Klásek, A.; Polis, J.; Mrkvička, V.; Košmrlj, J.; Kimmel, R. Synthesis of 3-Thiocyanato-(1*H*,3*H*)-quinoline-2,4-diones. *Journal of Heterocyclic Chemistry*. **2002**, *39*(6), 1315–1320. DOI: 10.1002/jhet.5570390632.
- ⁶¹ Klásek, A.; Kafka, S.; Polis, J.; Košmrlj, J.; Kimmel, R. Synthesis of 3-Aminoquinoline-2,4(1*H*,3*H*)-diones. *Heterocycles*. **2002**, *57*(9) 1659–1682. DOI: 10.3987/COM-02-9522.
- ⁶² Buňková, L. *Srovnání metod pro stanovení mikrobicidních látek využívaných v potravinách a kosmetice: Laboratorní cvičení*. Zlín, **2011**.
- ⁶³ Jandová, B.; Kotoučová, L. *Praktikum z mikrobiologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, **1996**, 67 s. ISBN 80-210-1374-5.
- ⁶⁴ Diesbach, H.; Gross, J.; Tschannen, W. *Helvetica Chimica Acta* **1951**, *34*, 1050–1060.
- ⁶⁵ Bezuglyi, P. A.; Ukrainets, I. V.; Treskach, V. I.; Turov, A. V. *Chem. Heterocycl. Comp.* **1992**, *28*, 438–439.
- ⁶⁶ Stadlbauer, W.; Laschober, R.; Lutschouig, H.; Schindler, G.; Kappe, T. *Monatsh. Chem.* **1992**, *123*, 617–636.
- ⁶⁷ Malle, E.; Stadlbauer, W.; Ostermann, G.; Hofmann, B.; Leis, H.; Kostner, G. M. *Eur. J. Med. Chem.* **1990**, *25*, 137–142.
- ⁶⁸ Kafka, S.; Hauke, S.; Salcinovic, A.; Soidinsalo, O.; Urankar, D.; Košmrlj, J. *Molecules* **2011**, *16*, 4070–4081.