Univerzita Karlova v Praze

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra organické a bioorganické chemie

Diplomová práce

Detergenty na bázi kvarternizovaných dusíkatých heterocyklů

Detergents based on kvarternized nitrogenous heterocycles

Jan Marek

Vedoucí práce: Doc. PharmDr. Alexandr Hrabálek, CSc.

Hradec Králové 2007

Děkuji panu Doc. PharmDr. Alexandru Hrabálkovi, CSc. a panu Ing. Kamilu Kučovi, Ph.D. za odborné vedení a poučné připomínky při vypracování mé diplomové práce.

Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Kamilu Musílkovi, Martině Hrabinové a Petru Stodulkovi za odborné rady a zaškolení do některých analytických metod. Nakonec bych chtěl poděkovat celé katedře Toxikologie (fakulta Vojenského zdravotnictví, Univerzita Obrany) za poskytnutí pracovních prostor a přístrojů k vypracování diplomové práce.

Summary

This thesis is divided into three subsections. In the first part, there is described synthesis of seven already known benzalkonium homologues (C_8-C_{20}), which were used as a standard compounds for synthesis and analyzes of amphiphilic substances.

The second part deals with preparation for other series of quartenary detergents having heteroaromatic rings (pyridine, isoquinoline, quinoline, acridine) in their structures. According to the analysis of the newly prepared compounds, we have prepared all pyridinium, quinolinium, isoquinolinium homoloques only. Our future forts will by focus on acridinium salts, which we were not able to prepare. Moreover, further biological activity evaluation was managed and its results will be obtained within several month.

In the third part, the measurement of inhibition activity compared with acetylcholinesterase and critical micellar concentration was realized.

Souhrn

Byly syntetizovány isomerní kationické tenzidy *N*-benzyl-*N*,*N*-dimetyl-*N*-alkyl amonium bromidy (bezalkonia – BAK), kde alkyl je C_1-C_{20}, jako již známé a užívané povrchově aktivní látky.

Na základě zkušeností z výše uvedené práce byly dále syntetizovány *N*-alkylpyridinium bromidy, kde alkyl je C_1-C_{20}, *N*-alkylchinolinium bromidy, kde alkyl je C_1-C_{20}, *N*-alkylisochinolinium bromidy, kde alkyl je C_1-C_{20} a *N*-alkylakridinium bromidy, kde alkyl je C_1-C_{20}, jako nové povrchově aktivní látky.

Byly zjišťovány jejich čistoty a srovnávány pomocí TLC a HPLC, některé z nich nebyly dosud v literatuře popsány.

Měřil jsem také jejich inhibiční aktivity vůči acetylcholinesteráze a kritické micelární koncentrace.

Název práce:	Detergenty na bázi kvartenizovaných dusíkatých heterocyklů
Studijní program:	Farmacie
Zaměření :	Organická a bioorganická chemie
Diplomant:	Jan Marek
Vedoucí školitel:	Doc. PharmDr. Alexandr Hrabálek, CSc
Školitel specialista:	Ing. Kamil Kuča, Ph.D.
Oponent:	Mgr. Daniel Jun, Ph.D.

Obsah

1. **Úvod** *7*
2. **Teoretická část** 8
   2.1. **Povrchově aktivní látky** 8
   2.2 **Solubilizace** 14
   2.3. **Micelární katalýzy** 16
   2.4. **Detergence** 17
3. **Cíl práce** 18
4. **Metodická část** 20
   4.1. **Chemikálie** 20
   4.2. **Teploty tání** 20
   4.3. **Tenkovrstvá chromatografie** 20
   4.4. **Krystalizace** 20
   4.5. **Nukleární magnetická rezonance** 20
   4.6. **HPLC** 21
5. **Experimentální část** 22
   5.1. **Syntéza *N*-benzyl-*N*,*N*-dimetyl-*N*-alkyl bromidů benzalkonií (BAK)** 22
   5.2. **Syntéza homologů pyridinu (*N*-alkylpyridinium bromidů)** 24
      5.2.1. **Syntéza *N*-oktylpyridinium bromidu** 24
      5.2.2. **Syntéza *N*-decylpyridinium bromidu** 25
      5.2.3. **Syntéza *N*-dodecylpyridinium bromidu** 26
      5.2.4. **Syntéza *N*-tetradecylpyridinium bromidu** 27
      5.2.5. **Syntéza *N*-hexadecylpyridinium bromidu** 28
      5.2.6. **Syntéza *N*-oktadecylpyridinium bromidu** 29
      5.2.7. **Syntéza *N*-eikosylpyridinium bromidu** 30
   5.3. **Syntéza homologů isochinolinu (*N*-alkylisochinolinium bromidů)** 31
      5.3.1. **Syntéza *N*-oktylisochinolinium bromidu** 31
      5.3.2. **Syntéza *N*-decylisochinolinium bromidu** 32
      5.3.3. **Syntéza *N*-dodecylisochinolinium bromidu** 33
      5.3.4. **Syntéza *N*-tetradecylisochinolinium bromidu** 34
      5.3.5. **Syntéza *N*-hexadecylisochinolinium bromidu** 35
      5.3.6. **Syntéza *N*-oktadecylisochinolinium bromidu** 36
      5.3.7. **Syntéza *N*-eikosylisochinolinium bromidu** 37
   5.4. **Syntéza homologů chinolinu (*N*-alkylchinolinium bromidů)** 38
      5.4.1. **Syntéza *N*-oktylchinolinium bromidu** 38
      5.4.2. **Syntéza *N*-decylchinolinium bromidu** 39

5.4.3. Syntéza *N*-dodecylchinolinium bromidu 40
5.4.4. Syntéza *N*-tetradecylchinolinium bromidu 41
5.4.5. Syntéza *N*-hexadecylchinolinium bromidu 42
5.4.6. Syntéza *N*-oktadecylchinolinium bromidu 43
5.4.7. Syntéza *N*-eikosylchinolinium bromidu 44
5.5. Syntéza homologů akridinu (*N*-alkylakridinium bromidů) 45
6. Experimentální část II – měření inhibičních aktivit 46
6.1. Princip stanovení afinity inhibitorů k AChE 46
6.2. Experimentální stanovení afinity inhibitorů k AChE 47
7. Experimentální část III – měření CMC 50
7.1. Princip stanovení CMC 50
7.2 Experimentální stanovení CMC 50
6. Závěr a diskuse 52
Souhrnné tabulky a chromatogramy 54
Seznam použitých zkratek 60
Literatura 61

1. Úvod

Tenzidy jsou dlouhodobě známé látky široce užívané v mnoha průmyslových oborech (potravinářství, farmacie, chemický průmysl atd.). Ve své diplomové práci jsem se zaměřil na přípravu strukturně odlišných kationických tenzidů. Obsah diplomové práce je součástí dlouhodobého projektu na katedře toxikologie UO, který se zabývá přípravou a použitím povrchově aktivních látek.

Byly vybrány struktury podobné již používaným BAK, avšak obsahujících ve své molekule dusíkatý heterocyklický kruh. Jednalo se o soli odvozené od pyridinu (*N*-alkylpyridinium bromidy, alkyl C_8-C_{20}), chinolinu (*N*-alkylchinolinium bromidy, alkyl C_8-C_{20}), isochinolinu (*N*-alkylisochinolinium bromidy) a akridinu (*N*-alkylakridinium bromidy, alkyl C_8-C_{20}) (obr. 10). Látky se odlišují délkou hydrofobního alifatického řetězce.

S ohledem na struktury bych očekával, že látky budou tvořit při určité koncentraci (CMC) micely. Tato základní charakteristika PAL bude v průběhu práce zjišťována a porovnána s tabelovanými hodnotami. Dále bych chtěl změřit inhibiční aktivity vůči enzymu acetylcholinesterase (AChE), které ze struktury také očekáváme.

2. Teoretická část

2.1. Povrchově aktivní látky

Povrchově aktivní látky (někdy označovaná zkratkou PAL) neboli tenzidy či surfaktanty (z angl. surface active agents) jsou látky s amfifilním charakterem, tj. mají afinitu k vodě i k nepolárním rozpouštědlům. Jejich molekula obsahuje jak nepolární skupinu, která má afinitu k nepolárním rozpouštědlům, tak hydrofilní skupinu, která má afinitu k vodě [1,2].

Nejčastější hydrofobní skupinou je uhlovodíkový řetězec o dostatečné délce. Hydrofilní skupinou bývá většinou iontová či vysoce polární skupina. Přítomnost hydrofilních skupin umožňuje rozpouštění tenzidu ve vodě. Podle charakteru polárních skupin obsažených v molekule tenzidu (kation, anion, zwitter-ion, seskupení obsahující větší množství polárních vazeb) tenzidy dělíme na kationické, anionické, amfoterní a neionické [3].

Tenzidy vytvářejí v roztocích účinkem slabých mezimolekulových interakcí organizované supramolekulární útvary. Samotné tenzidy, jakožto i útvary jimi tvořené (micely, lyotropní kapalné krystaly, reverzní micely, membrány) jsou předmětem intenzivního výzkumu jak pro jejich význam v živé hmotě, tak k jejich každodennímu využití (smáčedla, detergenty, emulgátory) [4].

Během rozpouštění tenzidu ve vodě dochází díky přítomnosti hydrofobních skupin ke změnám orientace molekul tenzidu. Děj je provázen snížením entropie a díky tomu k nárůstu celkové Gibbsovy energie. Ve vodných roztocích dochází k adsorbci tenzidu na fázovém rozhraní. Hnací silou je pokles Gibbsovy energie. Orientace molekuly tenzidu je změněna tak, že hydrofobní část směřuje mimo vodnou fázi [5].

Po úplném obsazení fázového rozhraní voda/vzduch se molekuly tenzidu začnou shlukovat do agregátů přibližně kulovitého tvaru nazývaných micely.

Koncentrace, při níž se tyto útvary tvoří se nazývá kritická micelární koncentrace (CMC) [6].

Jak již bylo řečeno kritická micelární koncentrace (CMC) je koncentrace, při níž se v pravém roztoku tenzidu (micelárního koloidu) začínají tvořit micely. Její hodnota není vysoká, pro různé látky kolísá v rozmezí 10^{-5} až 10^{-3} mol.dm^{-3}. Pod touto koncentrací je micelární koloid v systému pouze ve formě unimerních molekul, nad ní všechny přidávané molekuly asociují do micel [7].

Kritická micelární koncentrace závisí:

- **na délce a struktuře uhlovodíkového řetězce**

Hodnota CMC s rostoucí délkou uhlovodíkového řetězce klesá. V homologické řadě ionogenních micelárních koloidů může být závislost CMC na počtu uhlíků n_C vyjádřena vztahem

$$ln\ CMC = A - B \bullet n_c$$

kde A je pro danou homologickou řadu konstanta závislá na teplotě, povaze a množství hydrofilních skupin a na substituentech v uhlovodíkovém řetězci. Konstanta B se mění s počtem iontových skupin. Konstanty lze nalézt v patřičných tabulkách [8].

Rozvětvení uhlovodíkového řetězce, přítomnost dvojných vazeb, polární substituce v alkylovém řetězci a přemístění iontové skupiny od konce do středu řetězce vedou ke zvýšení CMC, zatímco připojení benzenového jádra k alkylovému řetězci vede ke snížení CMC.

- **na vlastnostech hydrofilní skupiny**

Vliv hydrofilní skupiny na CMC je dán její povahou a zejména nábojem. Při stejné délce uhlovodíkového řetězce je CMC neionogenních PAL nižší než u ionogenních. Hodnoty CMC neionogenních PAL značně závisí na rozměrech

a povaze hydrofilní skupiny, u ionogenních PAL jsou mezi různými hydrofilními skupinami malé rozdíly.

- **na vlastnostech protiiontů vzniklých disociací (u ionogenních micelárních koloidů)**

Vliv protiiontů vzniklých disociací na hodnotu CMC závisí především na jejich mocenství. CMC klesá se zvyšujícím se nábojem protiiontů.

- **na přítomnosti dalších látek v roztoku**

Jednoduché anorganické elektrolyty snižují hodnotu CMC a to tím více, čím vyšší je koncentrace elektrolytu a čím vyšší je mocenství opačně nabitého iontu. Vliv elektrolytů na CMC neionogenních micelárních koloidů je méně výrazný než u ionogenních typů.

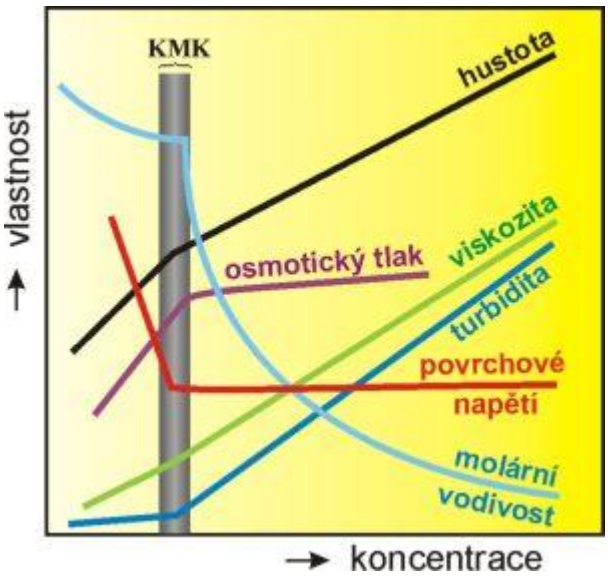
Přítomnost neelektrolytů se projevuje různě. Např. lineární alkoholy (samy o sobě tenzidy) s dlouhým řetězcem snižují CMC tím více, čím větší je koncentrace alkoholu a délka alifatického řetězce. Nepolární látky mají na CMC většinou malý vliv. Silně polární látky (dioxan, močovina) mají komplexotvorné účinky.

- **na teplotě a tlaku**

S rostoucí teplotou se hodnota CMC může zvyšovat (obvykle u kationogenních micelárních koloidů) nebo snižovat (obvykle u neionogenních typů) a teplotní závislost CMC může vykazovat i zřetelné minimum.Vliv tlaku na CMC je poměrně malý i v oblastech velmi vysokých tlaků [9,10,11].

Při kritické micelární koncentraci se v důsledku vzniku micel mění směrnice koncentračních závislostí mnohých fyzikálně-chemických vlastností roztoků micelárních koloidů. Jak ukazuje obr. 1, je tato změna zvláště výrazná u povrchového napětí, molární vodivosti, osmotického tlaku a turbidity.

Hodnoty CMC stanovené z koncentračních závislostí různých veličin nemusí však být úplně shodné, protože vlastnosti systému jsou tvorbou micel ovlivňovány různým způsobem [12].



Obr. 1 Fyzikální vlastnosti roztoků micelárních koloidů

Při vyšších koncentracích byl na křivce koncentrační závislosti fyzikálně-chemických vlastností v některých případech pozorován další zlom, který odpovídá tzv. druhé kritické micelární koncentraci a je vysvětlován změnami v typu agregace, interakcích micela-micela, monomer-micela apod.

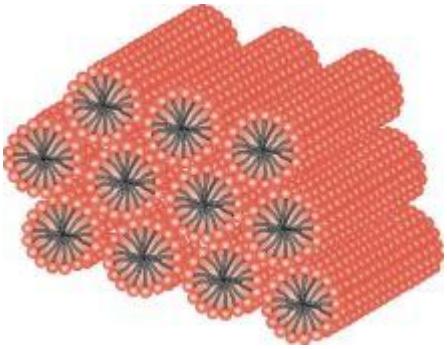
Existuje několik typů micel. Nejčastější uspořádání micel je, že hydrofobní alkylový řetězec směřuje dovnitř útvaru a hydrofilní skupina vně do vodné fáze, tzn. tvoří povrch micely. I zde je hnací silou pokles Gibbsovy energie. V případě kationických a anionických micel je povrchový náboj kompenzován protiionty z rozpouštědla (vody). Tyto tzv. asociativní micely nepotřebují umělou stabilizaci, jejich velikost a koncentrace je určena okamžitými stavovými veličinami, nikoliv minulostí systému. Tyto systémy jsou termodynamicky stabilní [13].

Ve zředěných roztocích (nad CMC) vznikají malé, kulovité, tzv. Hartleyovy micely (obr. 2), jejichž poloměr je přibližně roven délce molekuly PAL. Asociační číslo, jež odpovídá počtu molekul povrchově aktivní látky uspořádaných do micely, roste s délkou uhlovodíkového řetězce a klesá s velikostí plochy, kterou na povrchu micely zaujímá jedna polární skupina. Pohybuje se nejčastěji mezi 50 a 150 a závisí i na fyzikálních podmínkách [14].

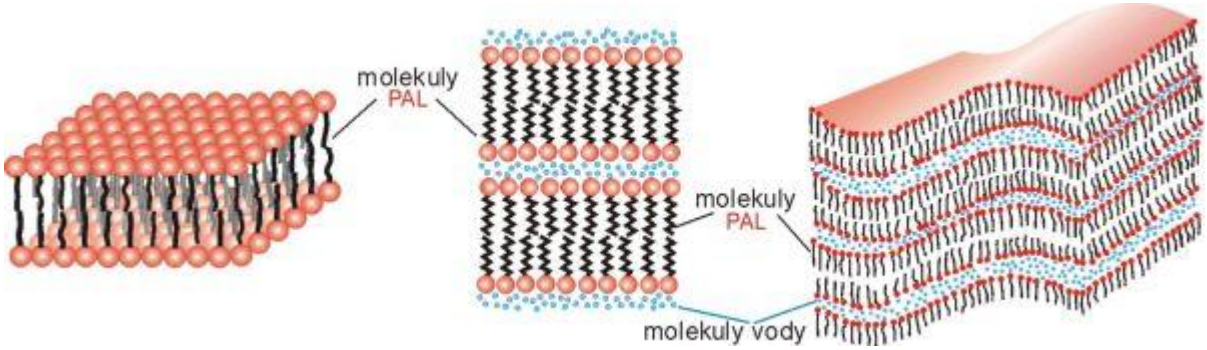
Obr. 2 Model malé (Hartleyovy) ionogenní micely

Při vyšších koncentracích roztoku se zvětšuje rozměr micel a uhlovodíkové řetězce se začínají orientovat navzájem rovnoběžně, vznikají válcovité útvary (obr. 3), které mohou při vyšších koncentracích vytvářet hexagonální kapalné krystaly (obr. 4). Při ještě větších koncentracích vznikají laminární, tzv. McBainovy micely (obr. 5), složené ze dvou vrstev PAL, které jsou k sobě obráceny uhlovodíkovými řetězci a polární skupiny směřují ven. V důsledku tvorby laminárních micel a jejich charakteristického uspořádání mohou dostatečně koncentrované roztoky přecházet v gel [15].

Obr. 3 Válcovité micely

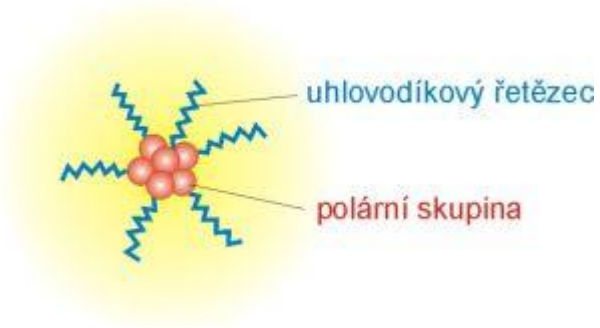


Obr. 4 Hexagonální kapalné krystaly



Obr. 5 Schéma McBainových laminárních micel

V některých případech se micely mohou tvořit i v nevodném prostředí - vznikají tzv.obrácené micely. Obrácená micela (obr. 6) je asociativní micela vznikající v nevodném prostředí. Její jádro tvoří polární skupiny, zatímco uhlovodíkové řetězce směřují ven do nepolárního prostředí. Asociační číslo obrácených micel nebývá větší než 10, kritická micelární koncentrace bývá obtížně definovatelná, neboť přechod z pravého roztoku na koloidní nastává v poměrně širokém intervalu koncentrací. Silně polární jádro snadno solubilizuje vodu, a umožňuje tak koloidní rozpouštění vody v oleji v přítomnosti PAL, což má významné uplatnění zvláště ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu. PAL jsou také obecně užívány k dekontaminaci nejrůznějších povrchů. [16]. Jako příklad užití micelárního prostředí ve vojenství můžeme hledat při odmořování povrchů nervově paralytickými látkami (NPL) [17].



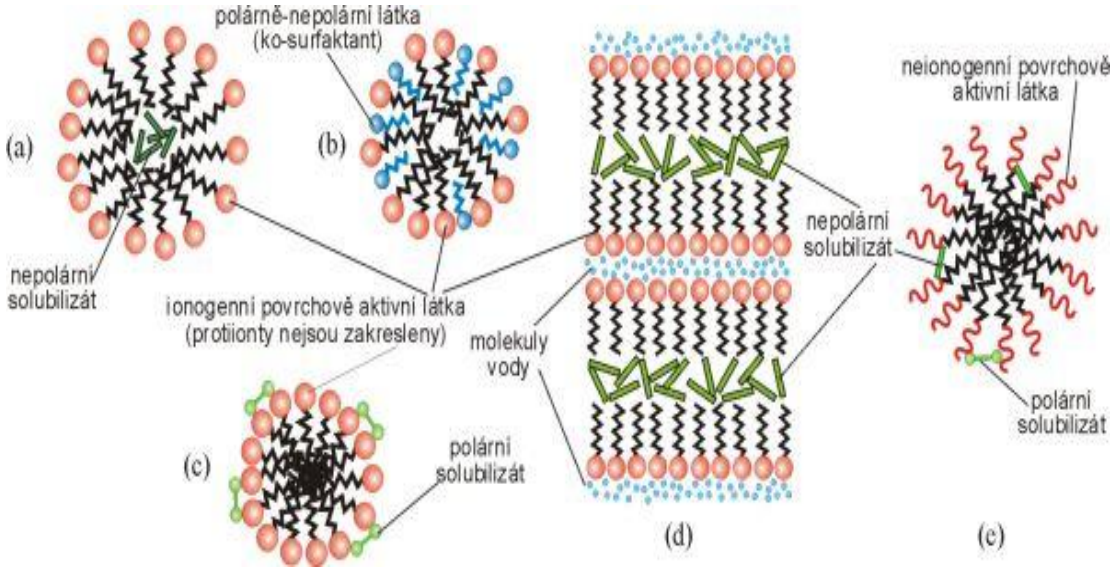
Obr. 6 Obrácená micela

2.2. Solubilizace

Děj, při němž jsou do micel surfaktantu včleňovány molekuly další látky (solubilizátu) [18].

- Přímá solubilizace
  - Nepolární látky které jsou v čistém vodném disperzním prostředí nerozpustné nebo slabě rozpustné, vstupují do jádra micely (obr. 7a).
  - Polárně-nepolární organické látky (alkoholy, aminy, tzv. ko-surfaktanty) se rozmísťují v micelách tak, že jejich uhlovodíkové řetězce směřují dovnitř micel a polární skupiny do vodné fáze (obr. 7b).
  - Polární látky jsou solubilizovány na povrchu micely nebo v těsné blízkosti povrchu (obr. 7c).
  - V laminárních micelách vstupují molekuly nepolární látky mezi uhlovodíkové řetězce molekul a tím se vrstvy molekul surfaktantu od sebe oddalují (obr. 7d).
  - U micel neionogenních surfaktantů, které obsahují polyoxyethylenové skupiny, se molekuly solubilizátu rozmisťují v okrajových částech micel mezi zohýbanými oxyethylenovými řetězci (solubilizace v rovině hydrofilních řetězců), molekuly nepolární povahy blíže jádru micely (obr. 7e) [19].

Při solubilizaci roste hmotnost micel surfaktantu nejen v důsledku zabudování molekul solubilizátu do micely, ale také proto, že solubilizací se zvětší objem hydrofobního jádra a musí se tedy zvětšit i počet molekul surfaktantu tvořících micelu.



Obr. 7 Přímá solubilizace (a) nepolárních látek, (b) polárně-nepolárních látek, (c) polárních látek v malých ionogenních micelách, (d) nepolárních látek v McBainových micelách, (e) nepolárních a polárních látek v neionogenních micelách

- Obrácená solubilizace nastává v systémech s nepolárním prostředím, kde vznikají obrácené micely s hydrofilním jádrem a hydrofobním povrchem, (tzv. - koloidní rozpouštění vody v olejové fázi) [20].

Solubilizace má velký praktický význam při detergenci, micelární katalýze a emulzní polymeraci a nachází uplatnění i v mnoha průmyslových odvětvích (v potravinářství, ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu, při výrobě herbicidních, insekticidních, fungicidních přípravků atd.) [21].

2.3. Micelární katalýza

Rychlost organických reakcí probíhajících ve vodných roztocích mohou být ovlivňovány jak kationickými, tak anionickými tenzidy. Při urychlování reakce se jedná o micelární katalýzu, naproti tomu při zpomalování reakce jde o micelární inhibici. Vždy jde o ovlivnění reakční rychlosti některých chemických reakcí za přítomnosti surfaktantů v koncentracích nad kritickou micelární koncentrací. Rychlost reakce se může zvýšit nebo snížit desetkrát až stokrát, v některých případech 10^3 až 10^4 krát. Zvýšení nebo snížení rychlosti organických reakcí v micelárních roztocích surfaktantů vyplývá jednak z různých reakčních rychlostí reagentů ve vodné fázi a v micelách, jednak z distribuce reagentů mezi obě fáze [22].

Katalytické působení micel je spojeno s několika ději, které spolu úzce souvisejí:

- místní koncentrování reagujících látek v povrchu micely nebo těsném okolí micely v důsledku solubilizace a elektrostatických interakcí – zvýšení pravděpodobnosti aktivní srážky oproti podmínkám v okolním roztoku
- sorpce na povrchu micely díky příznivé polarizaci molekul vede ke zvýšené reaktivitě
- změněná reakční schopnost reagentů při jejich přechodu z vodné fáze do micel, která může být vyvolána vlivem prostředí, především vzájemným elektrostatickým působením mezi reagujícími látkami a povrchovým nábojem micely
- hydrofobní interakce - účinnost micelární katalýzy a inhibice v těchto případech roste s hydrofóbností reagentů [23,24]

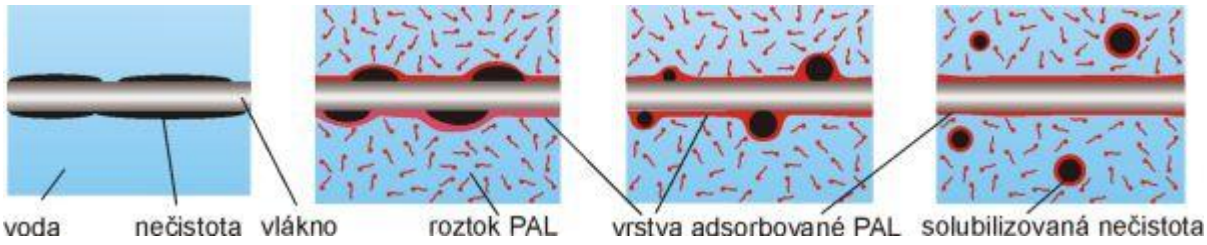
Mechanismus micelární katalýzy je v mnoha případech shodný s mechanismem působení enzymů, což vyvolává zvláštní zájem biochemiků, neboť micelární katalýza může sloužit jako model pro enzymovou katalýzu [25].

Přítomnost micel může měnit i hodnoty rovnovážných konstant organických reakcí, neboť rozdílně ovlivňují rychlost přímé a vratné reakce. Micelární mikroprostředí lze využít ke zvýšení selektivity reakcí, což je zvláště vhodné tam, kde mohou probíhat dvě paralelní reakce a micely preferují jednu z nich tím, že ji urychlují a druhou inhibují. Micely se uplatňují také jako stereoselektivní katalyzátory – využívá se různého prostorového zapojení izomerů do micely [26].

Katalytické účinky micel jsou využívány i v nepolárních prostředích, kde se tvoří obrácené micely s hydrofobními řetězci orientovanými do rozpouštědla a polárními skupinami uvnitř micely. Iontová síla v micelárních jádrech je pak výjimečně velká. Kovové ionty jsou v obrácených micelách reaktivnější, neboť jsou méně solvatované [27].

2.4. Detergence

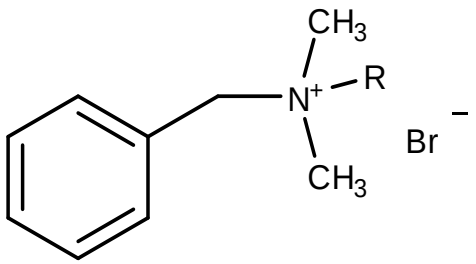
Obecně se jedná o odstraňování nečistot z pevných povrchů působením povrchově aktivních látek. Jejich molekuly se adsorbují na povrchu pevné látky a na vrstvu nečistot, tímto dochází ke změně velikost úhlu smáčení. Nečistoty se postupně sbalují a uvolňují z povrchu. Při přechodu do roztoku dochází ke stabilizaci uvolněných částic nečistot jejich solubilizací do micel, které mají hydrofilní povrch a nemohou se připoutat zpět k čistému povrchu pevné látky [28].



Obr. 8 Průběh odlučování nečistoty z textilního vlákna působením detergentu *

3. Cíl práce

Cílem mé práce bylo syntetizovat povrchově aktivní látky typu benzalkonia (BAK-obr. 9), které již byly naší skupinou připraveny. Měl jsem za úkol osvojit si znalosti reakčních mechanismů a analytických metod, které jsem později využil pro syntézu podobných povrchově aktivních látek.



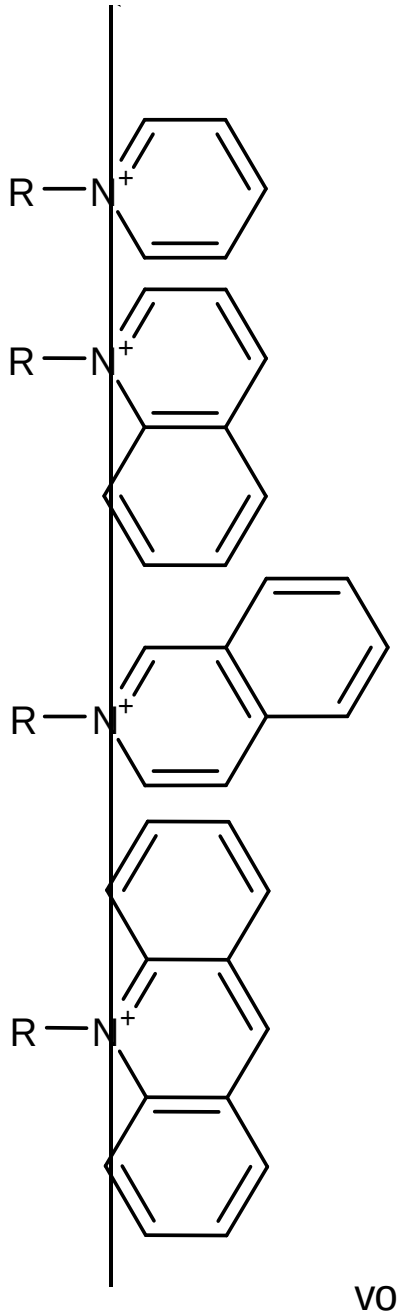
R= $-C_8H_{17}$
$-C_{10}H_{21}$
$-C_{12}H_{25}$
$-C_{14}H_{29}$
$-C_{16}H_{33}$
$-C_{18}H_{37}$
$-C_{20}H_{41}$

Obr. 9

Ve druhé části diplomové práce jsem se zabýval přípravou kationických tenzidů obsahujících ve své molekule dusíkatý heterocyklický kruh. Jednalo se o soli odvozené od pyridinu (*N*-alkylpyridinium bromidy, alkyl C_8-C_{20}), chinolinu (*N*-alkylchinolinium bromidy, alkyl C_8-C_{20}), isochinolinu (*N*-alkylisochinolinium bromidy) a akridinu (*N*-alkylakridinium bromidy, alkyl C_8-C_{20}) (obr. 10). Látky se lišily délkou hydrofobního alifatického řetězce.

Předpokládaná jednoduchost reakcí mi dovolila uskutečnit větší množství těchto syntéz a díky tomu získat i více materiálu na jednotlivá porovnávání. Dalším úkolem bylo provést analýzy jednotlivých produktů (TLC, HPLC, NMR) a ověřit tak jejich totožnost a čistotu.

Ve třetí části jsem se zabýval měřením CMC a inhibičních aktivit vůči AChE. Pro měření inhibičních aktivit byly syntetizovány také homology s délkou řetězce C_1-C_6. Ikdyž nepatří mezi povrchově aktivní látky, byly syntetizovány z důvodu porovnání inhibičních aktivit vůči narůstající lipofilitě látek.



jádra micel vodná fáze

R= $-C_8H_{17}$
$-C_{10}H_{21}$
$-C_{12}H_{25}$
$-C_{14}H_{29}$
$-C_{16}H_{33}$
$-C_{18}H_{37}$
$-C_{20}H_{41}$

Obr. 10

4. Metodická část

4.1 Chemikálie

Chemikálie použité v této práci byly zakoupeny od firmy Aldrich a Merck v kvalitě “čistý”.

4.2 Teploty tání

Teploty tání byly měřeny na bloku Boetius. Jejich hodnoty nebyly korigovány.

4.3 Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie (TLC) byla prováděna na deskách DC-Alufolien Silica gel 60 F_{254}, Silufol 254 a Alufol. Chromatogramy byly vyvíjeny vzestupným způsobem v chromatografických komorách nasycených parami mobilní fáze, nejdříve dvě hodiny po nalití eluční soustavy. Složení mobilní fáze – chloroform : metanol (100 : 1). K detekci kvarterních látek bylo použito *Dragendorffovo* činidlo. TLC sloužilo k monitorování průběhu reakce, ověření čistoty nově syntetizovaných látek a ke stanovení retenčního faktoru (R_f).

4.4 Krystalizace

Odstraňování nečistot z kvarterních produktu bylo prováděno rekrystalizací z etheru. Doba odstraňování nečistot musela být přizpůsobena individuálním reakcím se současnou kontrolou TLC.

4.5 Nukleární magnetická rezonance

Spektra ^{1}H NMR byla měřena na přístroji Varian Gemini 300 (pracovní frekvence 300.08 MHz) na katedře organické chemie Faf UK. Hodnoty chemických posunů jsou uvedeny v jednotkách ppm a jsou vztaženy k TMS.

Hodnoty interakčních konstant *J* jsou uvedeny v Hz. Spektra byla zpracována programem Mestrec (Mestrelab Research, verze 4.8.6.0).

4.6 HPLC

Přístrojové vybavení

HPLC systém se skládá z gradientové pumpy P200 (Spectra-Physics Analytical, Fremont, USA), a injekčního ventilu 7125 – smyčka 10 µl (Rheodyne, Cotati, USA), detektoru UV1000 (Spectra-Physics Analytical, Fremont, USA) a softwaru CSW Chromatography Station 1.5 (DataApex, Praha, Czech republic).

Chemikálie

Acetonitril LiChrosolv byl zakoupen od firmy Merck (Darmstadt, Germany) v kvalitě čistý.

Kyselina octová (99,5%) – Penta (Chrudim, Czech Republic)

Octan sodný (99%) – Lachema (Neratovice, Czech Republic)

H_2O – voda upravená reverzní osmózou.na katedře toxikologie UO

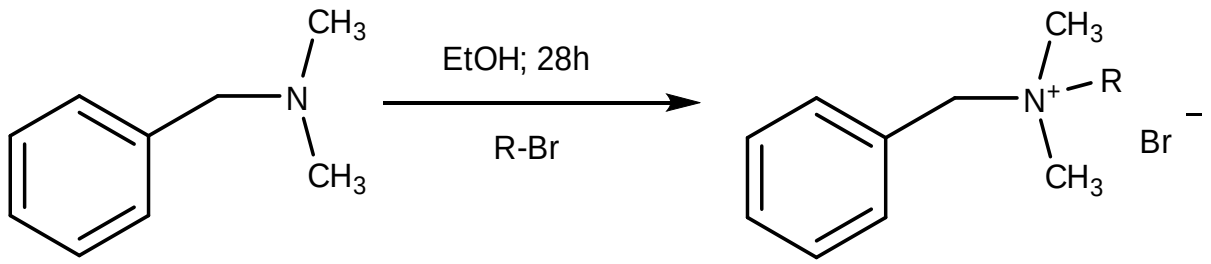
Chromatografické podmínky

Pro analýzu byla použita kolona Waters Spherisorb Cyano 250x4,6 mm I.D., 5 µm, (Supelco Inc., Bellefonte, USA). Mobilní fáze byla 45 % acetonitrilu a 55 % 0,1 M vodného roztoku octanu sodného, čímž bylo upraveno pH na 5,000. Isokratická eluce rychlostí toku 1 ml/min. Absorbance byla měřena v maximech příslušných látek.

5. Experimentální část I - syntéza

5.1. Syntéza *N*-benzyl-*N,N*-dimetyl-*N*-alkyl bromidů (benzalkonia–BAK)

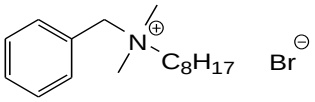
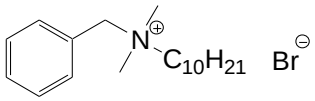
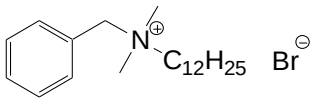
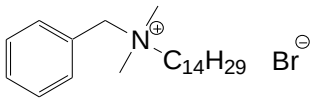
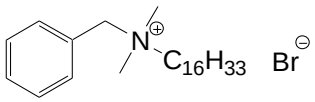
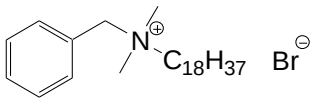
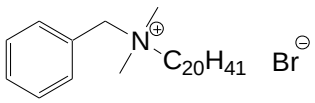
Benzalkonia (schéma 1) jsou známé a užívané desinfekční látky. Metoda jejich přípravy byla popsána v několika publikacích, které jsem pro přípravu také využil (viz lit. [29,30]) . Syntetické a analytické postupy osvojené při této přípravě jsem využil k přípravě a identifikaci nových látek. Neuvádím proto bližší rozbory problému syntézy a identifikace neboť jsem BAK použil pouze jako standard pro svoji další práci.



R= $-C_8H_{17}$
$-C_{10}H_{21}$
$-C_{12}H_{25}$
$-C_{14}H_{29}$
$-C_{16}H_{33}$
$-C_{18}H_{37}$
$-C_{20}H_{41}$

schéma 1

Výsledky (tab. 1) ke kterým jsem došel uvádím pouze v souhrnu a jsou v souladu s již dříve uvedenými.

	Vzorec	M_w	Teplota tání [ºC]	Výtěžek
1.		328,33	53-56	1,48g 61,15 %
2.		356,38	34-37,5	1,61g 61,21 %
3.		384,44	37-40	2,28g 80,3 %
4.		412,49	43,5-47,5	2,19g 71 %
5.		440,54	50-53	1,9g 58,28 %
6.		468,60	81-83	2,48g 71,47 %
7.		496,65	85-88	2,35g 64 %

Tab 1. Benzalkonia - souhrn

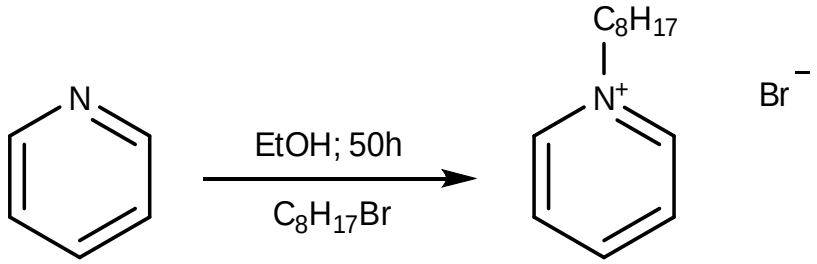
5.2. Syntéza homologů pyridiniových solí (*N*-alkylpyridinium bromidů)

5.2.3. Syntéza *N*-oktylpyridinium bromidu

Hodnoty: Výchozí látky a produkty

látka	Mr(g/mol)	n (mol)	m (g)	V (ml)	ρ(g/l)	b.v.(°C)
pyridin	79,10	0,0373	2,95	3,00	0,981	114-116
oktylbromid	193,13	0,0522	10,08	9,10	1,11	79-81
produkt	272,23	0,0373	10,15			

Rozpouštědlo: ethanol
Schéma reakce:



Pracovní postup: K roztoku 2,95g pyridinu v 50 ml ethanolu bylo přidáno 10,08g (9,1ml) alkyl bromidu, což je 1,4x více než látkového množství pyridinu. Mícháno za refluxu po dobu úplného zreagování pyridinu, což bylo pravidelně kontrolováno pomocí TLC na silikagelu. Po úplném zreagování bylo odpařeno rozpouštědlo a látka rekrystalována z etheru.

Výsledky:
kontrola pomocí TLC: Každé 2 hodiny
reakční doba: 50h
bod tání nalezený v odborné literatuře: nenalezeno
bod tání změřený: 28-30°C
množství produktu : 1,36g
výtěžek: 13,40 %
R_t = 3,98 min

1H NMR (300 MHz, *DMSO*□□) ppm 9.12 (d, *J* = 5.67 Hz, 2H), 8.61 (t, *J* = 7.63, 7.63 Hz, 1H), 8.18 (m, 2H), 4.58 (t, *J* = 7.45, 7.45 Hz, 2H), 1.98-1.80 (m, 2H), 1.22 (m, 12H), 0.82 (t, *J* = 6.56, 6.56 Hz, 3H)

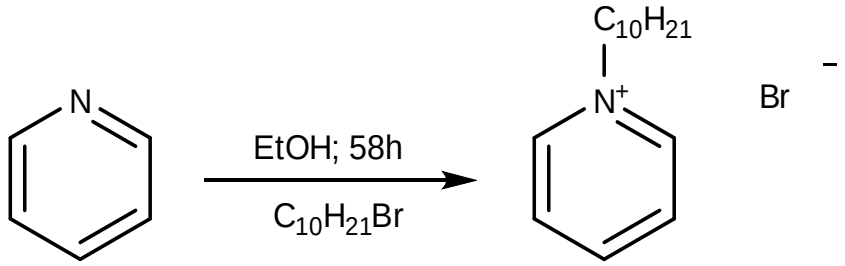
5.2.4. Syntéza *N*-decylpyridinium bromidu

Hodnoty: Výchozí látky a produkty

látka	Mr(g/mol)	n (mol)	m (g)	V (ml)	ρ(g/l)	b.v.(°C)
pyridin	79,10	0,0373	2,95	3,00	0,981	114-116
decylbromid	221,19	0,0522	11,55	10,80	1,069	111-113
produkt	300,29	0,0373	11,20			

Rozpouštědlo: ethanol

Schéma reakce:



Pracovní postup: K roztoku 2,95g pyridinu v 50 ml ethanolu bylo přidáno 11,55g (10,8ml) alkyl bromidu, což je 1,4x více než látkového množství pyridinu. Mícháno za refluxu po dobu úplného zreagování pyridinu, což bylo pravidelně kontrolováno pomocí TLC na silikagelu. Po úplném zreagování bylo odpařeno rozpouštědlo a látka rekrystalována z etheru.

Výsledky:

kontrola pomocí TLC: Každé 2 hodiny

reakční doba: 58h

bod tání nalezený v odborné literatuře: 36,5-37,8°C

bod tání změřený: 30-32°C

množství produktu : 4,82g

výtěžek: 43,06 %

R_t = 4,58 min

1H NMR (300 MHz, *DMSO*□□) ppm 9.14 (d, *J* = 5.63 Hz, 2H), 8.61 (t, *J* = 7.58, 7.58 Hz, 1H), 8.22-8.11 (m, 2H), 4.60 (t, *J* = 7.46, 7.46 Hz, 2H), 2.12 (m, 2H), 1.16 (m, 16H), 0.83 (t, *J* = 6.64, 6.64 Hz, 3H)

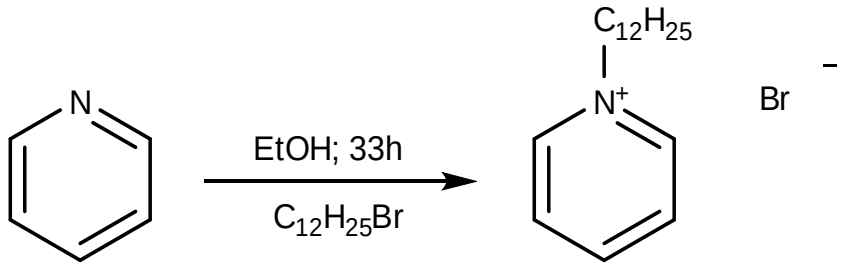
5.2.5. Syntéza *N*-dodecylpyridinium bromidu

Hodnoty: Výchozí látky a produkty

látka	Mr(g/mol)	n (mol)	m (g)	V (ml)	ρ(g/l)	b.v.(°C)
pyridin	79,10	0,0373	2,95	3,0	0,981	114-116
dodecylbromid	249,25	0,0522	13,01	12,5	1,04	
produkt	328,35	0,0373	12,45			

Rozpouštědlo: ethanol

Schéma reakce:



Pracovní postup: K roztoku 2,95g pyridinu v 50 ml ethanolu bylo přidáno 13,01g (12,5ml) alkyl bromidu, což je 1,4x více než látkového množství pyridinu. Mícháno za refluxu po dobu úplného zreagování pyridinu, což bylo pravidelně kontrolováno pomocí TLC na silikagelu. Po úplném zreagování bylo odpařeno rozpouštědlo a látka rekrystaluje z etheru.

Výsledky:

kontrola pomocí TLC: každé 2 hodiny

reakční doba: 33h

bod tání nalezený v odborné literatuře: 89-90°C, 47-48°C

bod tání změřený: 73-75°C

množství produktu: 10,23g

výtěžek: 82,13 %

R_t = 5,27 min

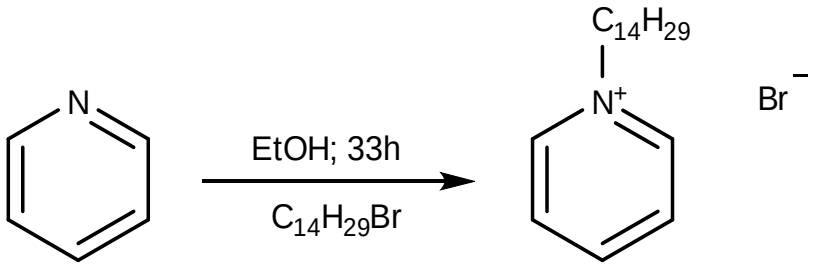
1H NMR (300 MHz, *DMSO*□□) ppm 9.14 (d, *J* = 5.63 Hz, 2H), 8.61 (t, *J* = 7.81, 8.02 Hz, 1H), 8.15 (m, 2H), 4.61 (t, *J* = 7.45, 7.45 Hz, 2H), 1.98-1.80 (m, 2H), 1.23 (m, 20H), 0.79 (t, *J* = 6.25, 6.25 Hz, 3H)

5.2.6. Syntéza *N*-tetradecylpyridinium bromidu

Hodnoty: Výchozí látky a produkty

látka	Mr(g/mol)	n (mol)	m (g)	V (ml)	ρ(g/l)	b.v.(°C)
pyridin	79,10	0,0373	2,95	3,0	0,981	114-116
tetradecylbromid	277,30	0,0522	14,48	14,25	1,016	181
produkt	356,4	0,0373	13,29			

Rozpouštědlo: ethanol
Schéma reakce:



Pracovní postup: K roztoku 2,95g pyridinu v 50 ml ethanolu bylo přidáno 14,48g (14,25ml) alkyl bromidu, což je 1,4x více než látkového množství pyridinu. Mícháno za refluxu po dobu úplného zreagování pyridinu, což bylo pravidelně kontrolováno pomocí TLC na silikagelu. Po úplném zreagování bylo odpařeno rozpouštědlo a látka rekrystalována z etheru.

Výsledky:
kontrola pomocí TLC: Každé 2 hodiny
reakční doba: 33h
bod tání nalezený v odborné literatuře: 54,5-55,5°C
bod tání změřený: 58-60°C
množství produktu: 10,05g
výtěžek: 75,61 %
R_t = 6,06 min

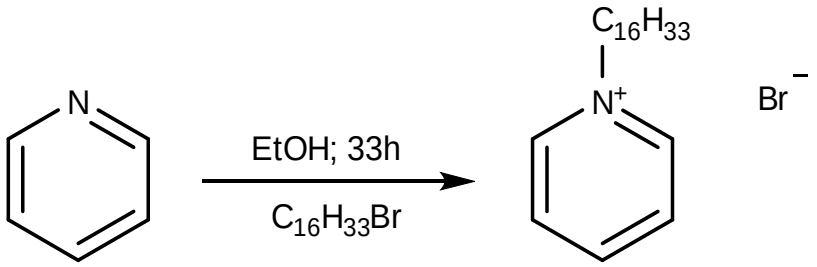
1H NMR (300 MHz, *DMSO*□□) ppm 9.14 (d, *J* = 5.63 Hz, 2H), 8.60 (t, *J* = 7.75, 7.75 Hz, 1H), 8.22-8.11 (m, 2H), 4.61 (t, *J* = 7.45, 7.45 Hz, 2H), 1.98-1.80 (m, 2H), 1.23 (m, 24H), 0.83 (t, *J* = 6.64, 6.64 Hz, 3H)

5.2.7. Syntéza *N*- hexadecylpyridinium bromidu

Hodnoty: Výchozí látky a produkty

látka	Mr(g/mol)	n (mol)	m (g)	V (ml)	ρ(g/l)	b.v.(°C)
pyridin	79,10	0,0373	2,95	3,0	0,981	114-116
hexadecylbromid	305,36	0,0522	15,94	16,0	0,992	
produkt	384,46	0,0373	14,34			

Rozpouštědlo: ethanol
Schéma reakce:



Pracovní postup: K roztoku 2,95g pyridinu v 50 ml ethanolu bylo přidáno15,94g (16,0ml) alkyl bromidu, což je 1,4x více než látkového množství pyridinu. Mícháno za refluxu po dobu úplného zreagování pyridinu, což bylo pravidelně kontrolováno pomocí TLC na silikagelu. Po úplném zreagování bylo odpařeno rozpouštědlo a látka rekrystalována z etheru.

Výsledky:
kontrola pomocí TLC: Každých 4-8 hodin.
reakční doba: 33h
bod tání nalezený v odborné literatuře: 78°C, 60,5-61,5°C
bod tání změřený: 63°C
množství produktu: 14,16g
výtěžek: 98,76 %
R_t = 6,98 min

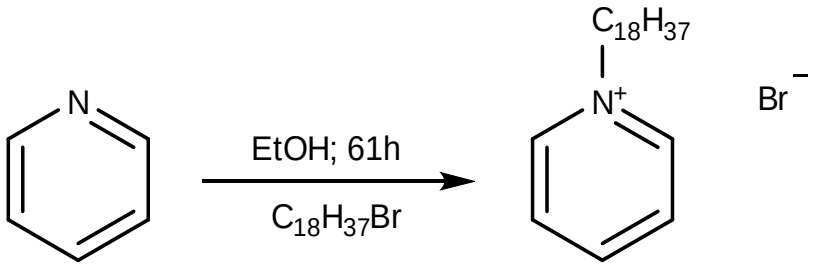
1H NMR (300 MHz, *DMSO*□□) ppm 9.13 (d, *J* = 5.69 Hz, 2H), 8.61 (s, 1H), 8.16 (t, *J* = 6.97, 6.97 Hz, 2H), 4.61 (t, *J* = 7.41, 7.41 Hz, 2H), 2.03-1.80 (m, 2H), 1.21 (m, 28H), 0.83 (t, *J* = 6.48, 6.48 Hz, 3H)

5.2.8. Syntéza *N*-oktadecylpyridinium bromidu

Hodnoty: Výchozí látky a produkty

látka	Mr(g/mol)	n (mol)	m (g)	V (ml)	ρ(g/l)	b.v.(°C)
pyridin	79,10	0,0373	2,95	3,0	0,981	114-116
oktadecylbromid	333,40	0,0522	17,40			150-152
produkt	412,5	0,0373	15,38			

Rozpouštědlo: ethanol
Schéma reakce:



Pracovní postup: K roztoku 2,95g pyridinu v 50 ml ethanolu bylo přidáno 17,40g alkyl bromidu, což je 1,4x více než látkového množství pyridinu. Mícháno za refluxu po dobu úplného zreagování pyridinu, což bylo pravidelně kontrolováno pomocí TLC na silikagelu. Po úplném zreagování bylo odpařeno rozpouštědlo a látka rekrystalována z etheru.

Výsledky:
kontrola pomocí TLC: Každé 2 hodiny
reakční doba: 61h
bod tání nalezený v odborné literatuře: 74-76°C
bod tání změřený: 65-67°C
množství produktu: 14,57g
výtěžek: 94,71 %
R_t = 8,05 min

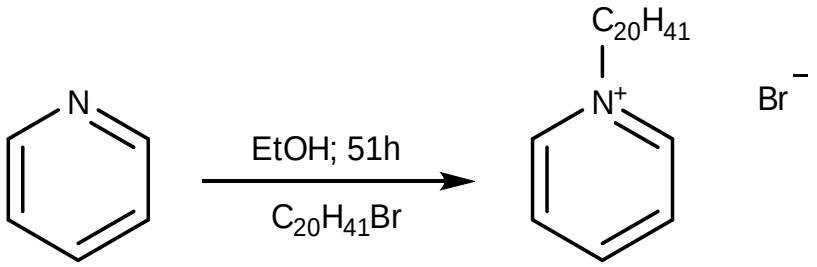
1H NMR (300 MHz, *DMSO*□□) ppm 9.12 (d, *J* = 5.41 Hz, 2H), 8.61 (s, 1H), 8.16 (t, *J* = 6.74, 6.74 Hz, 2H), 4.60 (t, *J* = 7.26, 7.26 Hz, 2H) 1.89 (t, 2H), 1.22 (m, 32H), 0.82 (d, *J* = 6.30 Hz, 3H)

5.2.9. Syntéza *N*-eikosylpyridinium bromidu

Hodnoty: Výchozí látky a produkty

látka	Mr(g/mol)	n (mol)	m (g)	V (ml)	ρ(g/l)	b.v.(°C)
pyridin	79,10	0,0373	0,98	1,0	0,981	114-116
eikosylbromid	361,45	0,0522	6,29			
produkt	440,55	0,0373	5,49			

Rozpouštědlo: ethanol
Schéma reakce:



Pracovní postup: K roztoku 0,98g pyridinu v 30ml ethanolu bylo přidáno 6,29g alkyl bromidu, což je 1,4x více než látkového množství pyridinu. Mícháno za refluxu po dobu úplného zreagování pyridinu, což bylo pravidelně kontrolováno pomocí TLC na silikagelu. Po úplném zreagování bylo odpařeno rozpouštědlo a látka rekrystalována z etheru.

Výsledky:
kontrola pomocí TLC: Každých 4-8 hodin.
reakční doba: 51h
bod tání nalezený v odborné literatuře: nenalezeno
bod tání změřený: 72-75°C
množství produktu: 4,32g
výtěžek: 78,69 %
R_t = 9,31 min

1H NMR (300 MHz, *DMSO*□□) ppm 9.14 (d, *J* = 5.63 Hz, 2H), 8.60 (t, *J* = 7.84, 7.81 Hz, 1H), 8.26 (m, 2H), 4.61 (t, *J* = 7.45, 7.45 Hz, 2H), 1.98-1.80 (m, 2H), 1.23 (m, *J* = 10.76 Hz, 36H), 0.83 (t, *J* = 6.64, 6.64 Hz, 3H)

5.3. Syntéza homologů isochinoliniových solí (*N*-alkylisochinolinium bromidů)

5.3.1. Syntéza *N*-oktylisochinolinium bromidu

Hodnoty: Výchozí látky a produkty

látka	Mr(g/mol)	n (mol)	m (g)	V (ml)	ρ(g/l)	b.v.(°C)
isochinolin	129,16	0,0232	3,00	2,75	1,099	243
oktylbromid	193,13	0,0325	6,30	5,70	1,110	79-81
produkt	322,29	0,0232	7,48	-	-	-

Rozpouštědlo: ethanol
Schéma reakce:

Pracovní postup: K roztoku 3,00g isochinolinu v 50 ml ethanolu bylo přidáno 6,30g (5,70ml) alkyl bromidu, což je 1,4x více než látkového množství isochinolinu. Mícháno za refluxu po dobu úplného zreagování isochinolinu, což bylo pravidelně kontrolováno pomocí TLC na silikagelu. Po úplném zreagování bylo odpařeno rozpouštědlo a látka rekrystalována z etheru.

Výsledky:
kontrola pomocí TLC: Každé 2 hodiny
reakční doba: 50h
bod tání nalezený v odborné literatuře: nenalezeno
bod tání změřený: 68-69°C
množství produktu : 6,81g
výtěžek: 91,04 %
R_t = 5,36 min

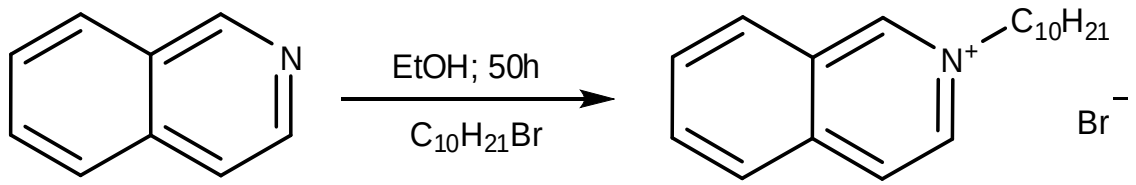
1H NMR (300 MHz, *DMSO* □□) ppm 10.25 (s, 1H), 8.88 (dd, *J* = 6.81, 1.32 Hz, 1H), 8.62 (d, *J* = 6.81 Hz, 1H), 8.50 (d, *J* = 8.31 Hz, 1H), 8.36 (d, *J* = 8.21 Hz, 1H), 8.24 (ddd, *J* = 8.72, 4.95, 1.46 Hz, 1H), 8.06 (ddd, *J* = 9.29, 5.22, 1.71 Hz, 1H), 4.74 (t, *J* = 7.42 Hz, 2H), 2.07-1.95 (m, 2H), 1.25 (dd, *J* = 21.43, 5.81 Hz, 12H), 0.80 (t, *J* = 6.75 Hz, 3H)

5.3.2. Syntéza *N*-decylisochinolinium bromidu

Hodnoty: Výchozí látky a produkty

látka	Mr(g/mol)	n (mol)	m (g)	V (ml)	ρ(g/l)	b.v.(°C)
isochinolin	129,16	0,0232	3,00	2,75	1,099	243
decylbromid	221,19	0,0325	7,20	6,70	1,069	111-113
produkt	350,35	0,0232	8,13	-	-	-

Rozpouštědlo: ethanol
Schéma reakce:



Pracovní postup: K roztoku 3,00g isochinolinu v 50 ml ethanolu bylo přidáno 7,20g (6,70ml) alkyl bromidu, což je 1,4x více než látkového množství isochinolinu. Mícháno za refluxu po dobu úplného zreagování isochinolinu, což bylo pravidelně kontrolováno pomocí TLC na silikagelu. Po úplném zreagování bylo odpařeno rozpouštědlo a látka rekrystalována z etheru.

Výsledky:
kontrola pomocí TLC: Každé 2 hodiny
reakční doba: 50h
bod tání nalezený v odborné literatuře: nenalezeno
bod tání změřený: 75-77°C
množství produktu : 6,37g
výtěžek: 78,35 %
R_t = 6,18 min

1H NMR (300 MHz, *DMSO)*□□ ppm 10.23 (s, 1H), 8.87 (d, *J* = 6.79 Hz, 1H), 8.62 (d, *J* = 6.78 Hz, 1H), 8.50 (d, *J* = 8.24 Hz, 1H), 8.36 (d, *J* = 8.30 Hz, 1H), 8.25 (dd, *J* = 7.97, 7.23 Hz, 1H), 8.07 (t, *J* = 7.61 Hz, 1H),
4.74 (t, *J* = 7.38 Hz, 2H), 2.12-1.89 (m, 2H), 1.41-0.96 (m, 16H), 0.81 (t, *J* = 6.57 Hz, 3H),

5.3.3. Syntéza *N*-dodecylisochinolinium bromidu

Hodnoty: Výchozí látky a produkty

látka	Mr(g/mol)	n (mol)	m (g)	V (ml)	ρ(g/l)	b.v.(°C)
isochinolin	129,16	0,0232	3,00	2,75	1,099	243
dodecylbromid	249,25	0,0325	8,10	7,79	1,040	145
produkt	378,41	0,0232	8,78	-	-	-

Rozpouštědlo: ethanol
Schéma reakce:

Pracovní postup: K roztoku 3,00g isochinolinu v 50 ml ethanolu bylo přidáno 8,10g (7,79ml) alkyl bromidu, což je 1,4x více než látkového množství isochinolinu. Mícháno za refluxu po dobu úplného zreagování isochinolinu, což bylo pravidelně kontrolováno pomocí TLC na silikagelu. Po úplném zreagování bylo odpařeno rozpouštědlo a látka rekrystalována z etheru.

Výsledky:
kontrola pomocí TLC: Každé 2 hodiny
reakční doba: 50h
bod tání nalezený v odborné literatuře: nenalezeno
bod tání změřený: 40-42°C
množství produktu : 6,05g
výtěžek: 68,91 %
R_t = 7,12 min

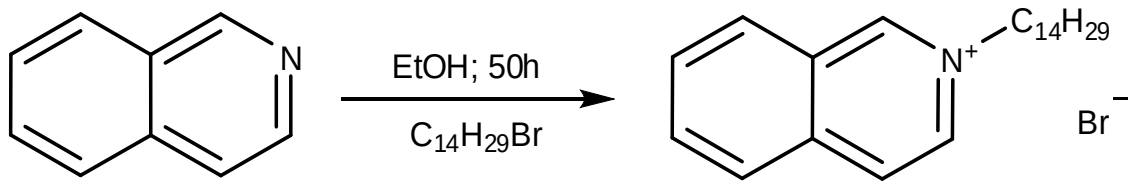
1H NMR (300 MHz, *DMSO)*□□ ppm 10.22 (s, 1H), 8.86 (dd, *J* = 6.79, 1.13 Hz, 1H), 8.62 (d, *J* = 6.80 Hz, 1H), 8.49 (d, *J* = 8.08 Hz, 1H), 8.36 (d, *J* = 8.23 Hz, 1H), 8.28-8.21 (m, 1H), 8.10-8.02 (m, 1H), 4.73 (t, *J* = 7.39 Hz, 2H), 2.08-1.91 (m, 2H), 1.36-1.08 (m, 20H), 0.82 (t, *J* = 6.66 Hz, 3H)

5.3.4. Syntéza *N*-tetradecylisochinolinium bromidu

Hodnoty: Výchozí látky a produkty

látka	Mr(g/mol)	n (mol)	m (g)	V (ml)	ρ(g/l)	b.v.(°C)
isochinolin	129,16	0,0232	3,00	2,75	1,099	243
tetradecylbromid	277,33	0,0325	9,00	8,88	1,016	181
produkt	406,46	0,0232	9,43	-	-	-

Rozpouštědlo: ethanol
Schéma reakce:



Pracovní postup: K roztoku 3,00g isochinolinu v 50 ml ethanolu bylo přidáno 9,00g (8,88ml) alkyl bromidu, což je 1,4x více než látkového množství isochinolinu. Mícháno za refluxu po dobu úplného zreagování isochinolinu, což bylo pravidelně kontrolováno pomocí TLC na silikagelu. Po úplném zreagování bylo odpařeno rozpouštědlo a látka rekrystalována z etheru.

Výsledky:
kontrola pomocí TLC: Každé 2 hodiny
reakční doba: 50h
bod tání nalezený v odborné literatuře: nenalezeno
bod tání změřený: 60-62°C
množství produktu : 8,24g
výtěžek: 87,38 %
R_t = 8,20 min

1H NMR (300 MHz, *DMSO)*□□ ppm 10.20 (s, 1H), 8.85 (dd, *J* = 6.79, 1.13 Hz, 1H), 8.62 (d, *J* = 6.77 Hz, 1H), 8.49 (d, *J* = 8.29 Hz, 1H), 8.36 (d, *J* = 8.25 Hz, 1H), 8.28-8.21 (m, 1H), 8.12-8.02 (m, 1H), 4.73 (t, *J* = 7.39 Hz, 2H), 2.00 (d, *J* = 6.71 Hz, 2H), 1.37-1.08 (m, 24H), 0.82 (t, *J* = 6.62 Hz, 3H)

5.3.5. Syntéza *N*-hexadecylisochinolinium bromidu

Hodnoty: Výchozí látky a produkty

látka	Mr(g/mol)	n (mol)	m (g)	V (ml)	ρ(g/l)	b.v.(°C)
isochinolin	129,16	0,0232	3,00	2,75	1,099	243
hexadecylbromid	305,36	0,0325	9,92	10,00	0,992	173-175
produkt	434,52	0,0232	10,08			

Rozpouštědlo: ethanol
Schéma reakce:

Pracovní postup: K roztoku 3,00g isochinolinu v 50 ml ethanolu bylo přidáno 9,92g (10,00ml) alkyl bromidu, což je 1,4x více než látkového množství isochinolinu. Mícháno za refluxu po dobu úplného zreagování isochinolinu, což bylo pravidelně kontrolováno pomocí TLC na silikagelu. Po úplném zreagování bylo odpařeno rozpouštědlo a látka rekrystalována z etheru.

Výsledky:
kontrola pomocí TLC: Každé 2 hodiny
reakční doba: 50h
bod tání nalezený v odborné literatuře: nenalezeno
bod tání změřený: 68-70°C
množství produktu : 8,42g
výtěžek: 83,53 %
R_t = 9,46 min

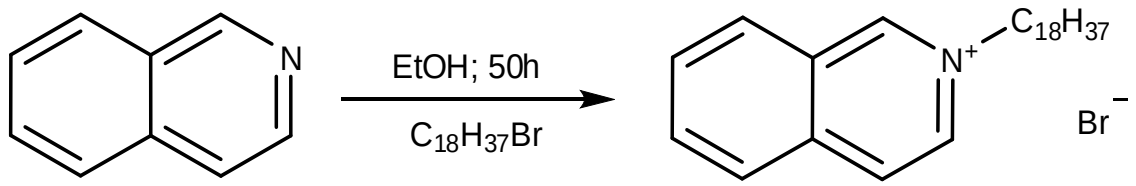
1H NMR (300 MHz, *DMSO)*□□ ppm 10.25 (s, 1H), 8.87 (d, *J* = 6.82 Hz, 1H), 8.63 (d, *J* = 6.77 Hz, 1H), 8.50 (d, *J* = 8.17 Hz, 1H), 8.36 (d, *J* = 8.32 Hz, 1H), 8.25 (t, *J* = 7.67 Hz, 1H), 8.12-8.03 (m, 1H), 4.74 (t, *J* = 7.39 Hz, 2H), 2.08-1.93 (m, 2H), 1.38-1.08 (m, 28H), 0.81 (t, *J* = 6.62 Hz, 3H)

5.3.6. Syntéza *N*-oktadecylisochinolinium bromidu

Hodnoty: Výchozí látky a produkty

látka	Mr(g/mol)	n (mol)	m (g)	V (ml)	ρ(g/l)	b.v.(°C)
isochinolin	129,16	0,0116	1,50	1,40	1,099	243
oktadecylbromid	333,40	0,0162	5,40	-	-	150-152
produkt	462,56	0,0116	5,37	-	-	-

Rozpouštědlo: ethanol
Schéma reakce:



Pracovní postup: K roztoku 1,50g isochinolinu v 50 ml ethanolu bylo přidáno 5,40g alkyl bromidu, což je 1,4x více než látkového množství isochinolinu. Mícháno za refluxu po dobu úplného zreagování isochinolinu, což bylo pravidelně kontrolováno pomocí TLC na silikagelu. Po úplném zreagování bylo odpařeno rozpouštědlo a látka rekrystalována z etheru.

Výsledky:
kontrola pomocí TLC: Každé 2 hodiny
reakční doba: 50h
bod tání nalezený v odborné literatuře: nenalezeno
bod tání změřený: 76-78°C
množství produktu : 4,52g
výtěžek: 84,17 %
R_t = 10,96 min

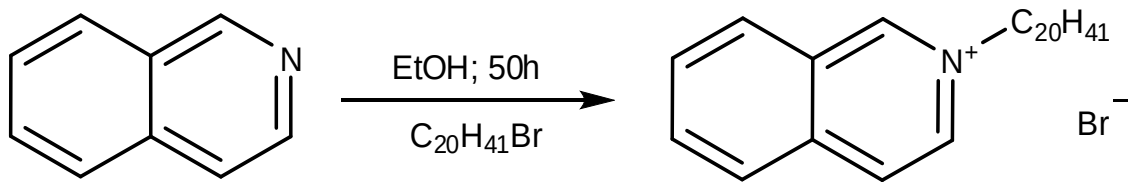
1H NMR (300 MHz, *DMSO)*□□ ppm 10.20 (s, 1H), 8.85 (d, *J* = 6.80 Hz, 1H), 8.61 (d, *J* = 6.75 Hz, 1H), 8.49 (d, *J* = 8.34 Hz, 1H), 8.36 (d, *J* = 8.32 Hz, 1H), 8.25 (t, *J* = 7.63 Hz, 1H), 8.08 (d, *J* = 7.08 Hz, 1H), 4.72 (t, *J* = 7.27 Hz, 2H), 1.99 (d, *J* = 6.10 Hz, 2H), 1.24 (d, *J* = 29.46 Hz, 32H), 0.82 (t, *J* = 6.08 Hz, 3H)

5.3.7. Syntéza *N*-eikosylisochinolinium bromidu

Hodnoty: Výchozí látky a produkty

látka	Mr(g/mol)	n (mol)	m (g)	V (ml)	ρ(g/l)	b.v.(°C)
isochinolin	129,16	0,0116	1,50	1,40	1,099	243
eikosylbromid	361,45	0,0162	5,87	-	-	113
produkt	490,61	0,0232	7,48	-	-	-

Rozpouštědlo: ethanol
Schéma reakce:



Pracovní postup: K roztoku 1,50g isochinolinu v 50 ml ethanolu bylo přidáno 5,87g alkyl bromidu, což je 1,4x více než látkového množství isochinolinu. Mícháno za refluxu po dobu úplného zreagování isochinolinu, což bylo pravidelně kontrolováno pomocí TLC na silikagelu. Po úplném zreagování bylo odpařeno rozpouštědlo a látka rekrystalována z etheru.

Výsledky:
kontrola pomocí TLC: Každé 2 hodiny
reakční doba: 50h
bod tání nalezený v odborné literatuře: nenalezeno
bod tání změřený: 81-83°C
množství produktu : 4,00g
výtěžek: 53,48 %
R_t = 12,82 min

1H NMR (300 MHz, *DMSO)* ppm 10.18 (s, 1H), 8.89-8.80 (m, 1H), 8.61 (d, *J* = 6.79 Hz, 1H), 8.49 (d, *J* = 8.50 Hz, 1H), 8.36 (d, *J* = 8.20 Hz, 1H), 8.27 (d, *J* = 7.05 Hz, 1H), 8.08 (d, *J* = 7.17 Hz, 1H), 4.72 (t, *J* = 7.38 Hz, 2H), 1.99 (d, *J* = 6.61 Hz, 2H), 1.20 (s, 36H), 0.82 (t, *J* = 6.65 Hz, 3H)

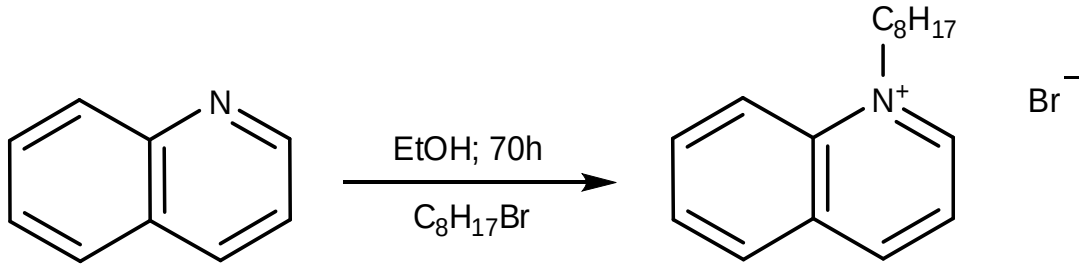
5.4. Syntéza homologů chinoliniových solí (*N*-alkylchinolinium bromidů)

5.4.1. Syntéza *N*-oktylchinolinium bromidu

Hodnoty: Výchozí látky a produkty

látka	Mr(g/mol)	n (mol)	m (g)	V (ml)	ρ(g/l)	b.v.(°C)
chinolin	129,16	0,0232	3,00	2,75	1,093	238
oktylbromid	193,13	0,0325	6,30	5,70	1,110	79-81
produkt	322,29	0,0232	7,48	-	-	-

Rozpouštědlo: ethanol
Schéma reakce:



Pracovní postup: K roztoku 3,00g chinolinu v 50 ml ethanolu bylo přidáno 6,30g (5,70ml) alkyl bromidu, což je 1,4x více než látkového množství chinolinu. Mícháno za refluxu po dobu úplného zreagování chinolinu, což bylo pravidelně kontrolováno pomocí TLC na silikagelu. Po úplném zreagování bylo odpařeno rozpouštědlo a látka rekrystalována z etheru.

Výsledky:
kontrola pomocí TLC: Každé 2-4 hodiny
reakční doba: 70h
bod tání nalezený v odborné literatuře: 88-89°C
bod tání změřený: 66-68°C
množství produktu : 3,04g
výtěžek: 40,64 %
R_t = 5,15 min

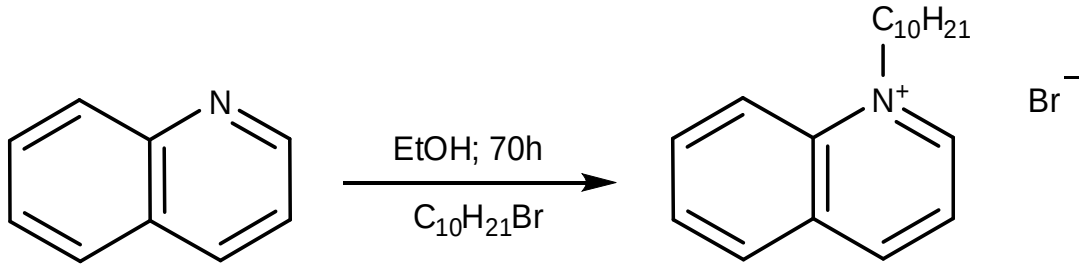
1H NMR (300 MHz, *DMSO)* □□ ppm 9.37 (dd, *J* = 5.25, 1.37 Hz, 1H), 9.22 (d, *J* = 8.20 Hz, 1H), 8.51 (d, *J* = 7.56 Hz, 1H), 8.30 (s, 1H), 7.95 (t, *J* = 7.62 Hz, 1H), 8.11-8.07 (m, 1H), 8.16 (d, *J* = 8.50 Hz, 1H), 5.09 (t, *J* = 7.55 Hz, 2H), 1.94 (t, *J* = 7.33 Hz, 2H), 1.45-1.08 (m, 10H), 0.80 (t, *J* = 6.59 Hz, 3H)

5.4.2. Syntéza *N*-decylchinolinium bromidu

Hodnoty: Výchozí látky a produkty

látka	Mr(g/mol)	n (mol)	m (g)	V (ml)	ρ(g/l)	b.v.(°C)
chinolin	129,16	0,0232	3,00	2,75	1,093	238
decylbromid	221,19	0,0325	7,20	6,70	1,069	111-113
produkt	350,35	0,0232	8,13	-	-	-

Rozpouštědlo: ethanol
Schéma reakce:



Pracovní postup: K roztoku 3,00g chinolinu v 50 ml ethanolu bylo přidáno 7,20g (6,70ml) alkyl bromidu, což je 1,4x více než látkového množství chinolinu. Mícháno za refluxu po dobu úplného zreagování chinolinu, což bylo pravidelně kontrolováno pomocí TLC na silikagelu. Po úplném zreagování bylo odpařeno rozpouštědlo a látka rekrystalována z etheru.

Výsledky:
kontrola pomocí TLC: Každé 2-4 hodiny
reakční doba: 70h
bod tání nalezený v odborné literatuře: 87-88°C
bod tání změřený: 48-50°C
množství produktu : 2,79g
výtěžek: 34,32 %
R_t = 5,94 min

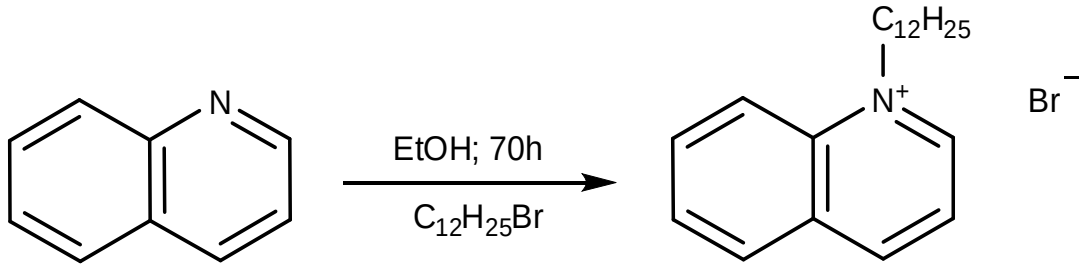
1H NMR (300 MHz, *DMSO)*□□ ppm 9.38 (d, *J* = 5.26 Hz, 1H), 9.23 (d, *J* = 8.34 Hz, 1H), 8.51 (d, *J* = 8.18 Hz, 1H), 8.32 (d, *J* = 8.61 Hz, 1H), 8.23-8.19 (m, 1H), 8.12-8.07 (m, 1H), 7.95 (t, *J* = 7.62 Hz, 1H), 5.09 (t, *J* = 7.51 Hz, 2H), 1.94 (t, *J* = 7.19 Hz, 2H), 1.44-1.10 (m, 14H), 0.80 (t, *J* = 6.59 Hz, 3H)

5.4.3. Syntéza *N*-dodecylchinolinium bromidu

Hodnoty: Výchozí látky a produkty

látka	Mr(g/mol)	n (mol)	m (g)	V (ml)	ρ(g/l)	b.v.(°C)
chinolin	129,16	0,0232	3,00	2,75	1,093	238
dodecylbromid	249,25	0,0325	8,10	7,79	1,040	145
produkt	378,41	0,0232	8,78	-	-	-

Rozpouštědlo: ethanol
Schéma reakce:



Pracovní postup: K roztoku 3,00g chinolinu v 50 ml ethanolu bylo přidáno 8,10g (7,79ml) alkyl bromidu, což je 1,4x více než látkového množství chinolinu. Mícháno za refluxu po dobu úplného zreagování chinolinu, což bylo pravidelně kontrolováno pomocí TLC na silikagelu. Po úplném zreagování bylo odpařeno rozpouštědlo a látka rekrystalována z etheru.

Výsledky:
kontrola pomocí TLC: Každé 2-4 hodiny
reakční doba: 70h
bod tání nalezený v odborné literatuře: 100
bod tání změřený: 73-75°C
množství produktu : 2,96g
výtěžek: 33,71 %
R_t = 6,84 min

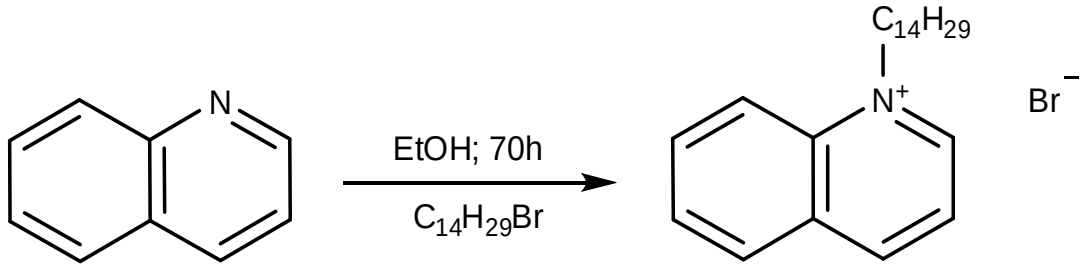
1H NMR (300 MHz, *DMSO)*□□ ppm 9.37 (d, *J* = 5.25 Hz, 1H), 9.22 (d, *J* = 8.32 Hz, 1H), 8.51 (d, *J* = 8.21 Hz, 1H), 8.16 (d, *J* = 7.31 Hz, 1H), 8.12-8.07 (m, 1H), 7.95 (t, *J* = 7.63 Hz, 1H), 8.30 (s, 1H), 5.08 (t, *J* = 7.50 Hz, 2H), 2.03-1.84 (m, 2H), 1.45-1.09 (m, 18H), 0.81 (t, *J* = 6.48 Hz, 3H)

5.4.4. Syntéza *N*-tetradecylchinolinium bromidu

Hodnoty: Výchozí látky a produkty

látka	Mr(g/mol)	n (mol)	m (g)	V (ml)	ρ(g/l)	b.v.(°C)
chinolin	129,16	0,0232	3,00	2,75	1,093	238
tetradecylbromid	277,33	0,0325	9,00	8,88	1,016	181
produkt	406,46	0,0232	9,43	-	-	-

Rozpouštědlo: ethanol
Schéma reakce:



Pracovní postup: K roztoku 3,00g chinolinu v 50 ml ethanolu bylo přidáno 9,00g (8,88ml) alkyl bromidu, což je 1,4x více než látkového množství chinolinu. Mícháno za refluxu po dobu úplného zreagování chinolinu, což bylo pravidelně kontrolováno pomocí TLC na silikagelu. Po úplném zreagování bylo odpařeno rozpouštědlo a látka rekrystalována z etheru.

Výsledky:
kontrola pomocí TLC: Každé 2-4 hodiny
reakční doba: 70h
bod tání nalezený v odborné literatuře: nenalezeno
bod tání změřený: 98-100°C
množství produktu : 3,30g
výtěžek: 34,99 %
R_t = 7,87 min

1H NMR (300 MHz, *DMSO)*□□ ppm 9.38-9.34 (m, 1H), 9.19 (d, *J* = 8.35 Hz, 1H), 8.51 (d, *J* = 8.16 Hz, 1H), 8.30 (d, *J* = 8.52 Hz, 1H), 8.25-8.19 (m, 1H), 8.15-8.09 (m, 1H), 7.94 (t, *J* = 7.61 Hz, 1H), 5.08 (t, *J* = 7.52 Hz, 2H), 1.94 (t, *J* = 7.16 Hz, 2H), 1.47-1.14 (m, 22H), 0.82 (t, *J* = 6.61 Hz, 3H)

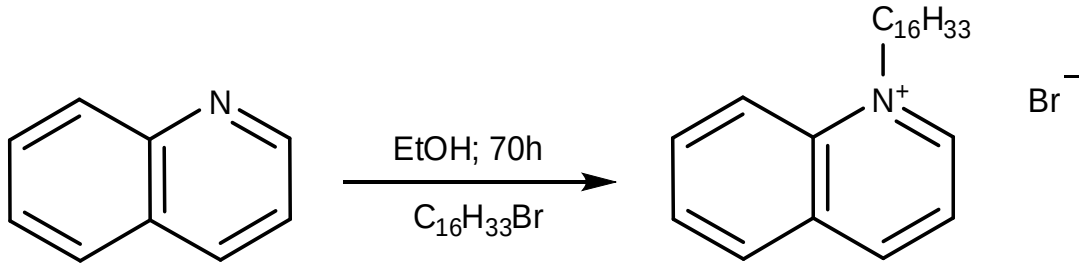
5.4.5. Syntéza *N*-hexadecylchinolinium bromidu

Hodnoty: Výchozí látky a produkty

látka	Mr(g/mol)	n (mol)	m (g)	V (ml)	ρ(g/l)	b.v.(°C)
chinolin	129,16	0,0232	3,00	2,75	1,093	238
hexadecylbromid	305,36	0,0325	9,92	10,00	0,992	173-175
produkt	434,52	0,0232	10,08			

Rozpouštědlo: ethanol

Schéma reakce:



Pracovní postup: K roztoku 3,00g chinolinu v 50 ml ethanolu bylo přidáno 9,92g (10,00ml) alkyl bromidu, což je 1,4x více než látkového množství chinolinu. Mícháno za refluxu po dobu úplného zreagování chinolinu, což bylo pravidelně kontrolováno pomocí TLC na silikagelu. Po úplném zreagování bylo odpařeno rozpouštědlo a látka rekrystalována z etheru.

Výsledky:

kontrola pomocí TLC: Každé 2-4 hodiny

reakční doba: 70h

bod tání nalezený v odborné literatuře: 92°C, 104-106°C

bod tání změřený: 90-92°C

množství produktu : 2,25g

výtěžek: 22,32 %

R_t = 9,07 min

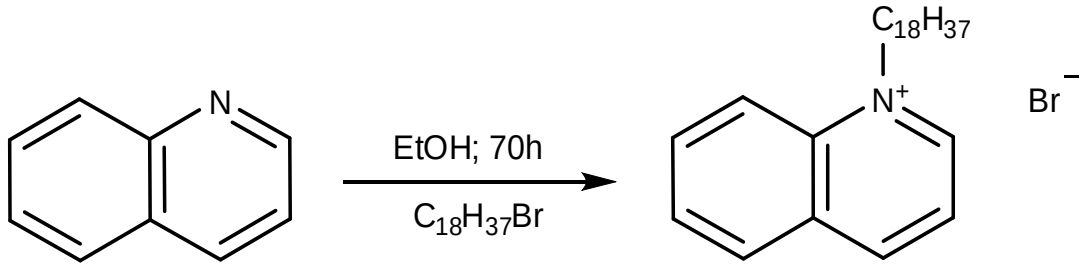
1H NMR (300 MHz, *DMSO)*□□ ppm 9.40-9.32 (m, 1H), 9.18 (d, *J* = 8.38 Hz, 1H), 8.51 (d, *J* = 8.25 Hz, 1H), 8.28 (d, *J* = 3.80 Hz, 1H), 8.21-8.16 (m, 1H), 8.12-8.08 (m, 1H), 7.99-7.89 (m, 1H), 5.08 (t, *J* = 7.23 Hz, 2H), 2.03-1.85 (m, 2H), 1.46-1.11 (m, 26H), 0.82 (t, *J* = 5.94 Hz, 3H)

5.4.6. Syntéza *N*-oktadecylchinolinium bromidu

Hodnoty: Výchozí látky a produkty

látka	Mr(g/mol)	n (mol)	m (g)	V (ml)	ρ(g/l)	b.v.(°C)
chinolin	129,16	0,0116	1,50	1,37	1,093	238
oktadecylbromid	333,40	0,0162	5,40	-	-	150-152
produkt	462,56	0,0116	5,37	-	-	-

Rozpouštědlo: ethanol
Schéma reakce:



Pracovní postup: K roztoku 1,50g chinolinu v 50 ml ethanolu bylo přidáno 5,40g alkyl bromidu, což je 1,4x více než látkového množství chinolinu. Mícháno za refluxu po dobu úplného zreagování chinolinu, což bylo pravidelně kontrolováno pomocí TLC na silikagelu. Po úplném zreagování bylo odpařeno rozpouštědlo a látka rekrystalována z etheru.

Výsledky:
kontrola pomocí TLC: Každé 2-4 hodiny
reakční doba: 70h
bod tání nalezený v odborné literatuře: 106°C
bod tání změřený: 92-94°C
množství produktu : 1,19g
výtěžek: 22,16 %
R_t = 10,48 min

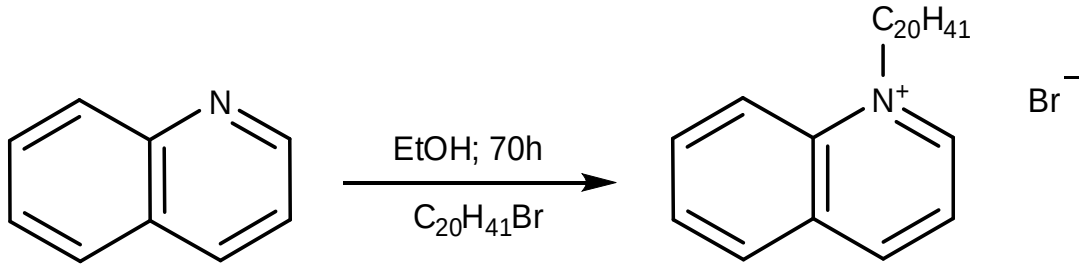
1H NMR (300 MHz, *DMSO)*□□ ppm 9.33 (d, *J* = 3.96 Hz, 1H), 9.15 (d, *J* = 8.31 Hz, 1H), 8.50 (d, *J* = 8.18 Hz, 1H), 8.20-8.16 (m, 1H), 8.09 (d, *J* = 2.70 Hz, 1H), 7.95 (d, *J* = 7.20 Hz, 1H), 8.27 (s, 1H), 5.07 (t, *J* = 7.50 Hz, 2H), 1.93 (d, *J* = 7.05 Hz, 2H), 1.47-1.12 (m, 30H), 0.82 (t, *J* = 6.51 Hz, 3H)

5.4.7. Syntéza *N*-eikosylchinolinium bromidu

Hodnoty: Výchozí látky a produkty

látka	Mr(g/mol)	n (mol)	m (g)	V (ml)	ρ(g/l)	b.v.(°C)
chinolin	129,16	0,0116	1,50	1,40	1,093	238
eikosylbromid	361,45	0,0162	5,87	-	-	113
produkt	490,61	0,0232	7,48	-	-	-

Rozpouštědlo: ethanol
Schéma reakce:

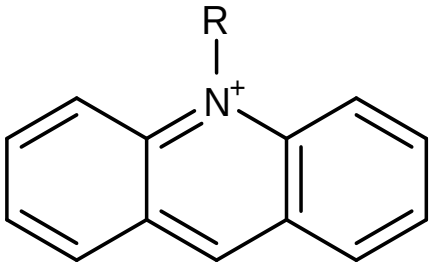


Pracovní postup: K roztoku 1,50g chinolinu v 50 ml ethanolu bylo přidáno 5,87g alkyl bromidu, což je 1,4x více než látkového množství chinolinu. Mícháno za refluxu po dobu úplného zreagování chinolinu, což bylo pravidelně kontrolováno pomocí TLC na silikagelu. Po úplném zreagování bylo odpařeno rozpouštědlo a látka rekrystalována z etheru.

Výsledky:
kontrola pomocí TLC: Každé 2-4 hodiny
reakční doba: 70h
bod tání nalezený v odborné literatuře: nenalezeno
bod tání změřený: 98-99°C
množství produktu : 0,55g
výtěžek: 7,35 %
R_t = 12,09 min

1H NMR (300 MHz, *DMSO)*□□ ppm 9.12 (s, 1H), 9.31 (s, 1H), 8.54-8.46 (m, 1H), 8.35 (d, *J* = 7.88 Hz, 1H), 8.25 (s, 1H), 8.06 (d, *J* = 3.03 Hz, 1H), 7.92 (d, *J* = 7.30 Hz, 1H), 5.10-5.01 (m, 2H), 2.02-1.86 (m, 2H), 1.21 (m, 34H), 0.83 (s, 3H)

5.5. Syntéza homologů akridiniových solí (*N*-alkylakridinium bromidů)



Br^-

R= $-C_8H_{17}$, $-C_{10}H_{21}$, $-C_{12}H_{25}$, $-C_{14}H_{29}$, $-C_{16}H_{33}$, $-C_{18}H_{37}$, $-C_{20}H_{41}$

Obr. 10 – Akridiniové soli

Pro přípravu homologů akridinia jsem použil totožné podmínky jako pro přípravu ostatních výše uvedených látek. Nepodařilo se mi bohužel tyto látky stejným způsobem připravit.

Vyzkoušel jsem proto řadu jiných rozpouštědel jako např. aceton, acetonitril, hexan, methanol. Jediný nadějně vyhlížející byl homolog akridinia s délkou řetězce C_{14}. Při užití acetonitrilu jako rozpouštědla došlo za snížené teploty ke krystalizaci. Krystaly však za laboratorní teploty okamžitě roztály na olejovitou kapalinu. Pomocí TLC se nedalo jednoznačně prokázat, že jde o kvarterní látku, neboť vysoká lipofilita výchozí látky i produktu nedovolila dokonalé rozdělení na chromatografické desce. Ani detekce Dragendorffovým činidlem nebyla objektivní, protože akridin sám o sobě způsobuje oranžové zabarvení skvrny.

Důvodem neúspěchu může být příliš malá reaktivita akridinu, způsobená sterickým bráněním dusíkového atomu. I když jsem při reakcích získal žluté krystaly jehlicovité struktury, nejednalo se bohužel o cílené látky. NMR spektra a retenční časy odpovídaly výchozí látce tj. akridinu. Příprava homologů soli akridinu bude předmětem dalšího výzkumu.

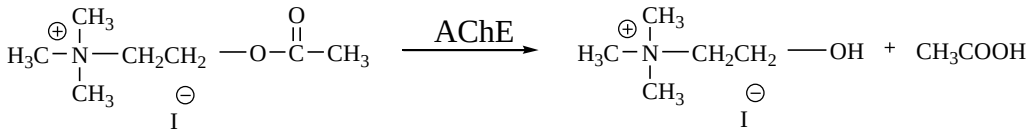
6. Experimentální část II – měření inhibičních aktivit

Před měřením afinit k AChE byly nasyntetizovány látky výše uvedeného typu, tj. soli pyridinu, isochinolinu a chinolinu, s délkou uhlíkatého řetězce C_1-C_6**.** Nejednalo se sice o povrchově aktivní látky, ale náš zájem byl směřován na vztah mezi inhibiční aktivitou a lipofilitou, proto byly tyto látky také zahrnuty do části diplomové práce.

6.1. Princip stanovení afinity inhibitorů k AChE

Afinita syntetizovaných látek k enzymu (AChE) byla testována standardním *in vitro* pokusem [32]. Byl sledován vliv koncentrace testované látky v reakčním médiu na aktivitu AChE. Afinita heteroareniových solí k AChE je reprezentována inhibiční konstantou (IC_{50}). Vyšší hodnota IC_{50} odpovídá úbytku afinity heteroareniových solí k enzymu.
Enzym AChE štěpí přidaný substrát – acetylcholin-jodid (AChI) za vzniku cholinu (Ch) a kyseliny octové (AA) (Schéma 2).

Schéma 2: Štěpení substrátu enzymem



Pomocí titrátoru je udržováno pH reakční směsi na hodnotě 8 dotitrováváním uvolněné kyseliny octové roztokem NaOH. Spotřeba NaOH je úměrná množství kyseliny octové, která vznikla rozkladem AChI enzymem (AChE). Při reakci AChE s inhibitorem se snižuje aktivita enzymu. Je-li aktivita AChE

snížena, sníží se i množství kyseliny octové vzniklé při rozkladu AChI a tím i spotřeba roztoku NaOH.

6.2. Experimentální stanovení afinity inhibitorů k AChE

Chemikálie

Enzym: Jako zdroj enzymu byl použit 10% (w/v) homogenát mozku bílého laboratorního potkana (kmen Wistar). Uspaná zvířata byla usmrcena dekapitací a mozek byl vyjmut a opláchnut studeným fyziologickým roztokem. Homogenizace byla provedena v destilované vodě pomocí Ultra-turrax homogenizéru při 20.000 ot./min. po dobu 1 min. 2 ml tohoto homogenátu byly vloženy do zkumavek a byly uchovány při -35°C. Rozmrazeny byly až těsně před použitím.

Roztoky: Byl připraven 0.01 M roztok NaOH na titraci kyseliny octové, 0.02 M roztok acetylcholin-jodidu (AChI) a 3 M roztok NaCl.

Vlastní postup měření

K 0.2 ml roztoku heteroareniových solí o dané koncentraci (od 10^{-6} do 10^{-2} mol/dm^3) bylo přidáno 19.8 ml vody, 2.5 ml roztoku chloridu sodného a 0.5 ml homogenátu potkaního mozku. Potom byly přidány 2.0 ml roztoku substrátu – acetylcholin-jodidu. Enzymová aktivita byla zjištěna pomocí automatického titrátoru RTS 822 (Radiometer Copenhagen) složeného z pH metru, automatického titrátoru a zapisovače.

Výpočty

Aktivity intaktního (a_0) a kvarterní látkou inhibovaného (a_i) enzymu byly odečteny ze závislosti spotřeby roztoku hydroxidu sodného na čase, která je přímo úměrná titrované kyselině octové uvolněné hydrolýzou acetylcholinu. Z naměřených hodnot aktivit bylo vypočítáno procento inhibice AChE podle vzorce:

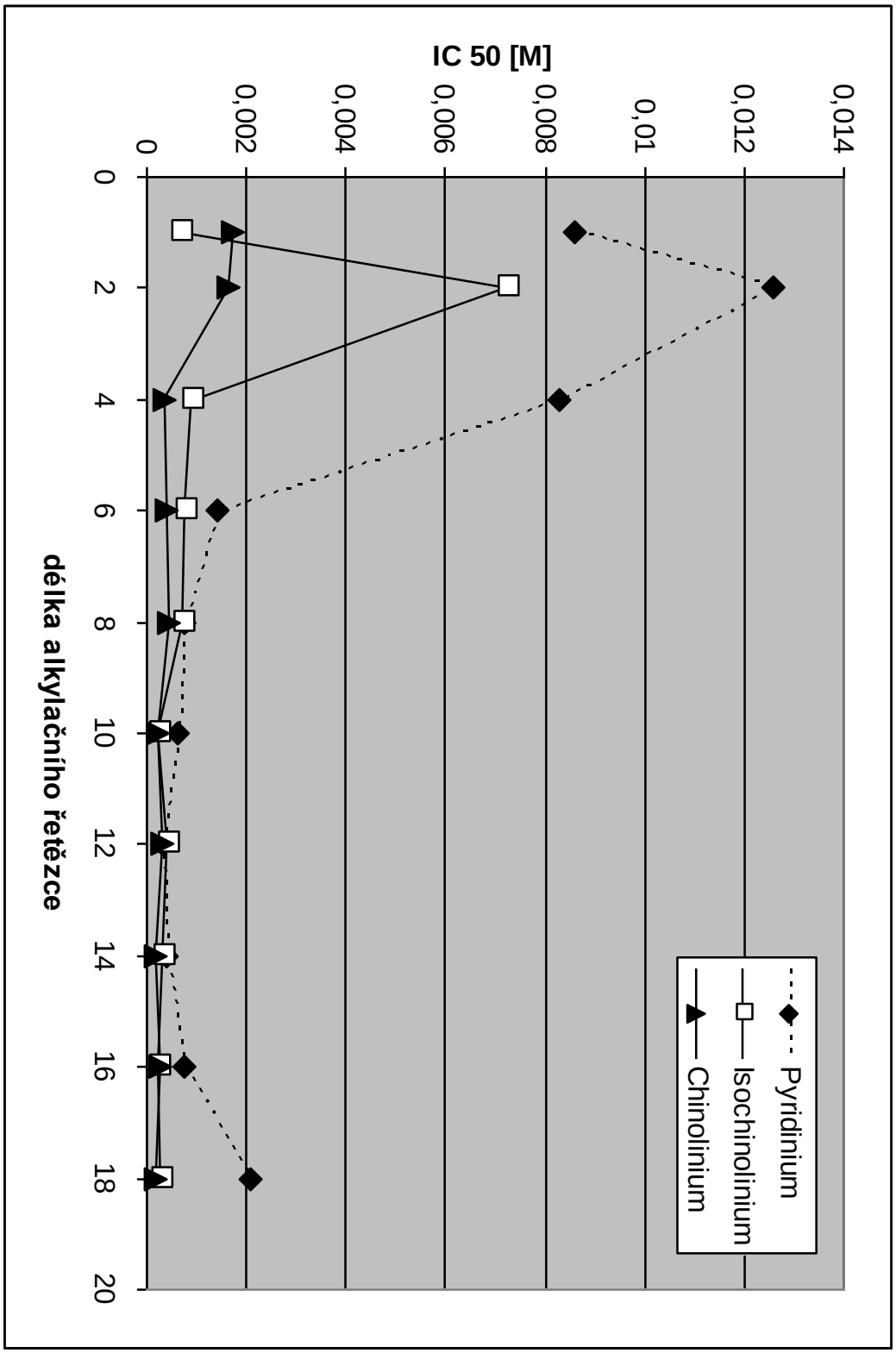
$$x = a_i / a_0 \ (\%)$$

Inhibiční koncentrace (IC_{50}) byla získána nelineární regresí ze závislosti enzymové aktivity na koncentraci heteroareniových solí. Pro výpočet byl použit program GraphPad Prism (verze 3.02 pro Windows; výrobce GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Výsledky měření: Byly měřeny inhibiční aktivity všech připravených látek, výsledky inhibic jsou uvedeny v tabulce 2 a v grafu 1.

Délka alkylačního řetězce	IC 50 - Pyridinium	IC 50 – Isochinolinium	IC 50 - Chinolinium
1	0,00859	0,00065	0,00172
2	0,01260	0,00723	0,00166
4	0,00829	0,00090	0,00035
6	0,00143	0,00078	0,00041
8	0,00077	0,00072	0,00046
10	0,00061	0,00023	0,00020
12	0,00029	0,00039	0,00031
14	0,00039	0,00033	0,00016
16	0,00074	0,00022	0,00025
18	0,00209	0,00028	0,00018

Tab. 2 Inhibiční koncentrace 50 (IC 50 [M])



graf 1 – výsledky IC 50

7. Experimentální část III – měření CMC

7.1. Princip stanovení CMC

Pro měření inhibičních aktivit byla zvolena spektrální metoda s použitím barviva Eosinu (Geigy, Basilej, Švýcarsko). Barvivo Eosin má absorbční maximum při 116 nm. Při zvyšující se koncentraci tenzidu, dochází k poklesu absorbance při 116 nm a naopak růstu absorbance při vyšší vlnové délce (vznik nového absorbčního maxima), což je zapříčiněno tvorbou asociátu tenzid-barvivo. Dostaneme dvě sigmoidei (každá pro jedno maximum). Z křivky nového absorbčního maxima zjišťujeme hodnotu log CMC.

7.2. Experimentální stanovení CMC

Byla připravena řada molárních koncentrací tenzidu 10^{-5}-10^{-2} v rozestupech 10^{-5}, 10^{-4}, $10^{3,7}$, $10^{-3,3}$, 10^{-3}, $10^{-2,7}$, $10^{-2,3}$, 10^{-2} . Použitá koncentrace barviva byla $3{,}1\times10^{-5}$. Bližší návod a popis metody viz. literatura [33, 34].

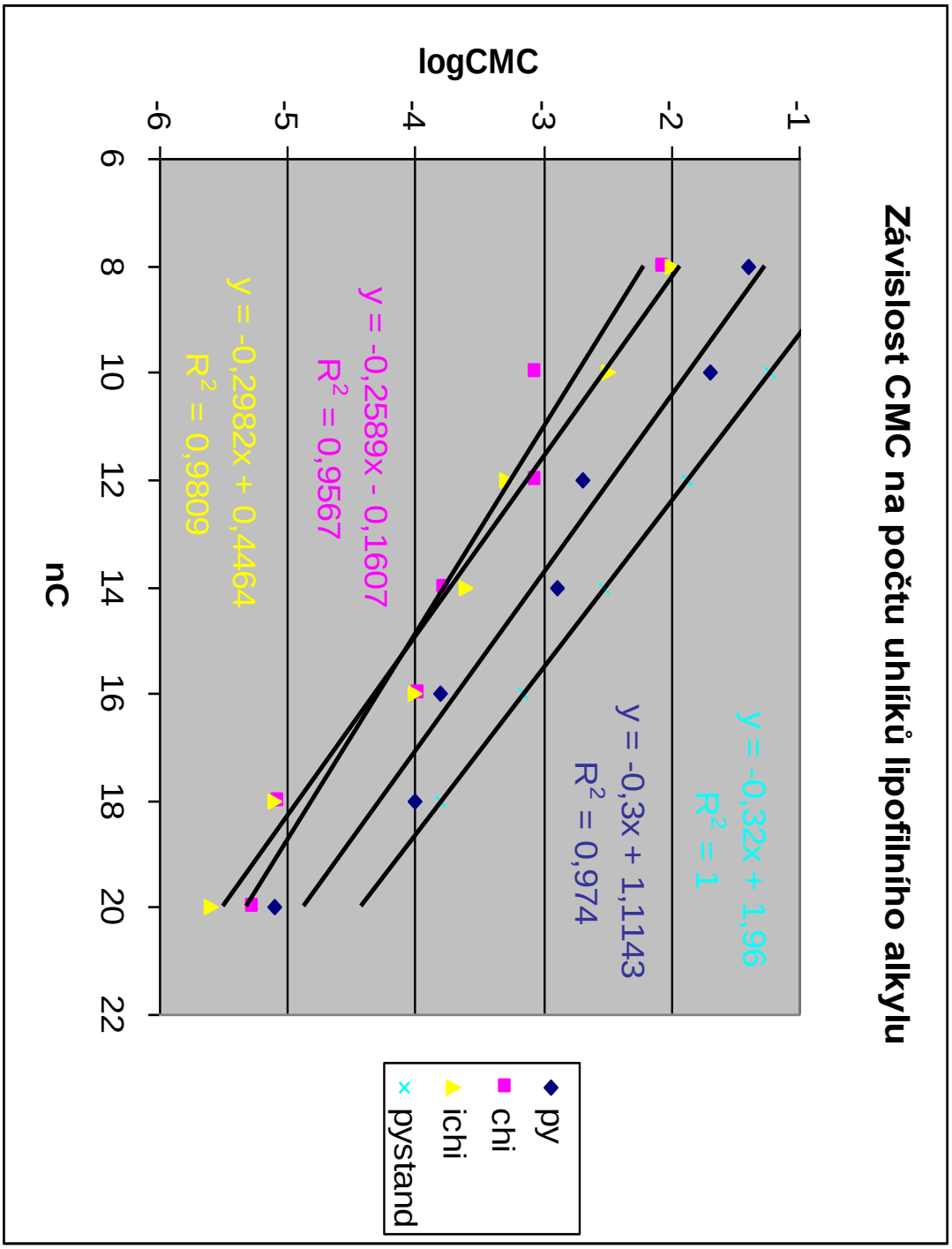
Přístrojové vybavení

Pro měření inhibičních aktivit byla zvolena spektrální metoda s použitím barviva Eosinu (Geigy, Basilej, Švýcarsko). Pro měření byl použit jednopaprskový spektrofotometr Nicolet Evolution 300 (USA) s programem Vision Pro (USA).

Výsledky měření

Délka alkylačního řetězce	pyridinium – log CMC	chinolinium – log CMC	isochinolinium – log CMC	pyridinium-standard
8	-1,4	-2,1	-2	-0,60
10	-1,7	-3,1	-2,5	-1,24
12	-2,7	-3,1	-3,3	-1,88
14	-2,9	-3,8	-3,6	-2,52
16	-3,8	-4,0	-4,0	-3,16
18	-4,0	-5,1	-5,1	-3,80
20	-5,1	-5,3	-5,6	

Tab. 3 – hodnoty log CMC



Graf 2 – Závislost CMC na počtu uhlíků lipofilního alkylu

8. Závěr a diskuse

Úspěšně byly připraveny tři homologické řady kvarterních látek. Souhrn jednotlivých řad je uveden v tabulkách 4, 5 a 6. V řadě pyridinu a isochinolinu se výtěžky až na výjimky pohybovaly v relativně vysokých hodnotách (60-90%). Naproti tomu v řadě homologů odvozené od chinolinia byly výtěžky znatelně nižší (20-30%). Důvodem byla pravděpodobně menší reaktivita chinolinového dusíku zapříčiněná jeho sterickým bráněním. Neúspěchem skončila příprava homologů akridinia, které se za stejných podmínek připravit nepodařilo (bližší komentář viz příslušná kapitola). Pravděpodobný důvod neúspěchu přípravy akridiniových solí je totožný s výše zmíněným důvodem diskutovaným pro chinoliniové sole.

Připravené látky s délkou uhlíkatého řetězce C_8-C_{16} byly za tepla dobře rozpustné ve vodě. Látky s délkou řetězce C_{18}-C_{20} byly spíše špatně rozpustné ve vodě. Roztoky všech těchto látek výrazně pěnily, což dokazovalo jejich povrchové aktivity.

U všech úspěšně připravených látek byla provedena analýza NMR a HPLC, a tím dokázána jejich totožnost a čistota. Při HPLC analýze byla použita mobilní fáze, která se osvědčila již při testování benzalkonia. Byly vytvořeny směsné chromatogramy (viz grafy 3, 4, 5), kde byly látky od sebe znatelně oddělené. Byly určeny retenční časy, které jsou uvedeny v jednotlivých protokolech.

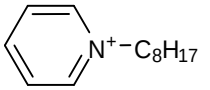
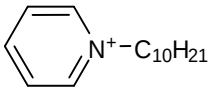
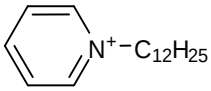
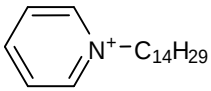
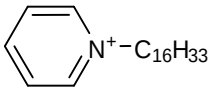
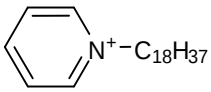
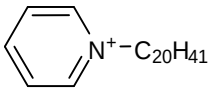
Byly syntetizovány i sole s délkou řetězce C_1-C_6. Vzhledem k tomu, že se nejedná o povrchově aktivní látky, nebyly uvedeny ani podrobné výsledky jako u ostatních látek. Látky byly využity při měření a srovnávání hodnot inhibičních aktivit (viz. tab. 2 a graf 1).

Po změření inhibičních aktivit vůči enzymu AChE byly zjištěny zajímavé výsledky. Z grafu 1 můžeme pozorovat nárůst inhibičních aktivit (tj. pokles IC 50) s rostoucí délkou alkylačního řetězce. Jelikož s délkou řetězce roste

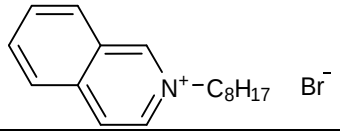
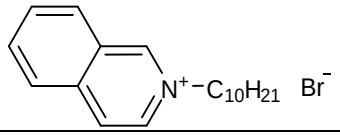
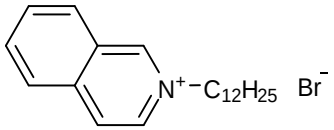
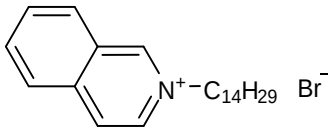
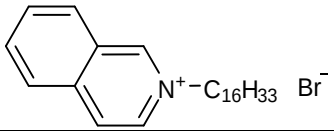
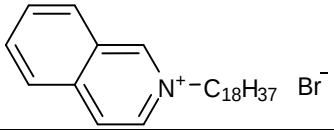
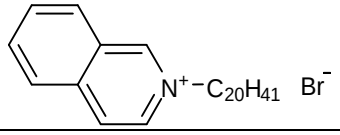
lipofilita molekuly lze od těchto látek očekávat i prostupnost hematoencefalickou bariérou, což by v budoucnu bylo velmi žádoucí, neboť látky by se daly teoreticky využít jako medikace při Alzheimerově nemoci či při Myasthenia gravis. U látek s délkou řetězce C_{20} nebylo bohužel měření inhibičních vlastností objektivní, neboť se látky nerozpouštěly ve vodě. Po rozpuštění v DMSO došlo ke zkreslení výsledků, protože samotné rozpuštědlo ovlivňuje aktivitu enzymu AChE. Z tohoto důvodu výsledky měření nebyly zahrnuty do této práce.

Stanovení CMC lze provést mnoha způsoby. V mé práci byla zvolena spektrofotometrická metoda, která byla vybrána jako nejšetrnější na spotřebu vzorku i citlivost. Z tabulky 3 a grafu 2 byla u všech tří řad kationických tenzidů prokázána lineární závislost logaritmu hodnoty CMC na délce lipofilního alkylu ve smyslu Traubeho pravidla, tzn. že s rostoucí délkou alkylu klesá hodnota log CMC. Pro jednotlivé sady tenzidů jsou charakteristické směrnice a absolutní členy rovnic proložených přímek (graf 2). Při srovnání jednotlivých řad nebyly pozorovány výraznější rozdíly, neboť se jednalo o strukturně podobné látky. Získané experimentální hodnoty bylo možno porovnat s referenčními z literatury pouze v případě pyridinií [35], protože další dvě řady nebyly v literatuře dohledatelné. U absolutních členů přímky je odlišnost větší, mohla jí způsobit chyba ve vyjadřování koncentrací a též odlišný způsob stanovení, referenční data byla získána z konduktometrického měření.

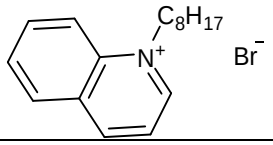
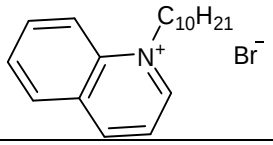
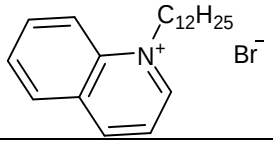
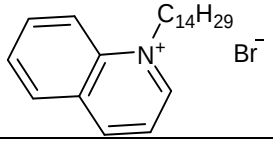
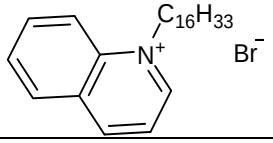
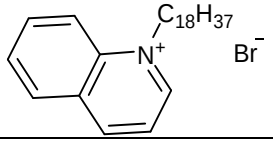
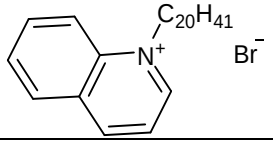
Tabulky a chromatogramy

	Vzorec	M_w	Teplota tání [ºC]	Výtěžek
3.		272,23	28-30	1,36g 13,40 %
4.		300,29	30-32	4,82g 43,06 %
5.		328,35	75	10,23g 82,13 %
6.		356,4	58-60	10,05g 75,61 %
7.		384,46	63	14,16g 98,76 %
8.		412,5	65-67	14,57g 94,71 %
9.		440,55	72-75	4,32g 78,69 %

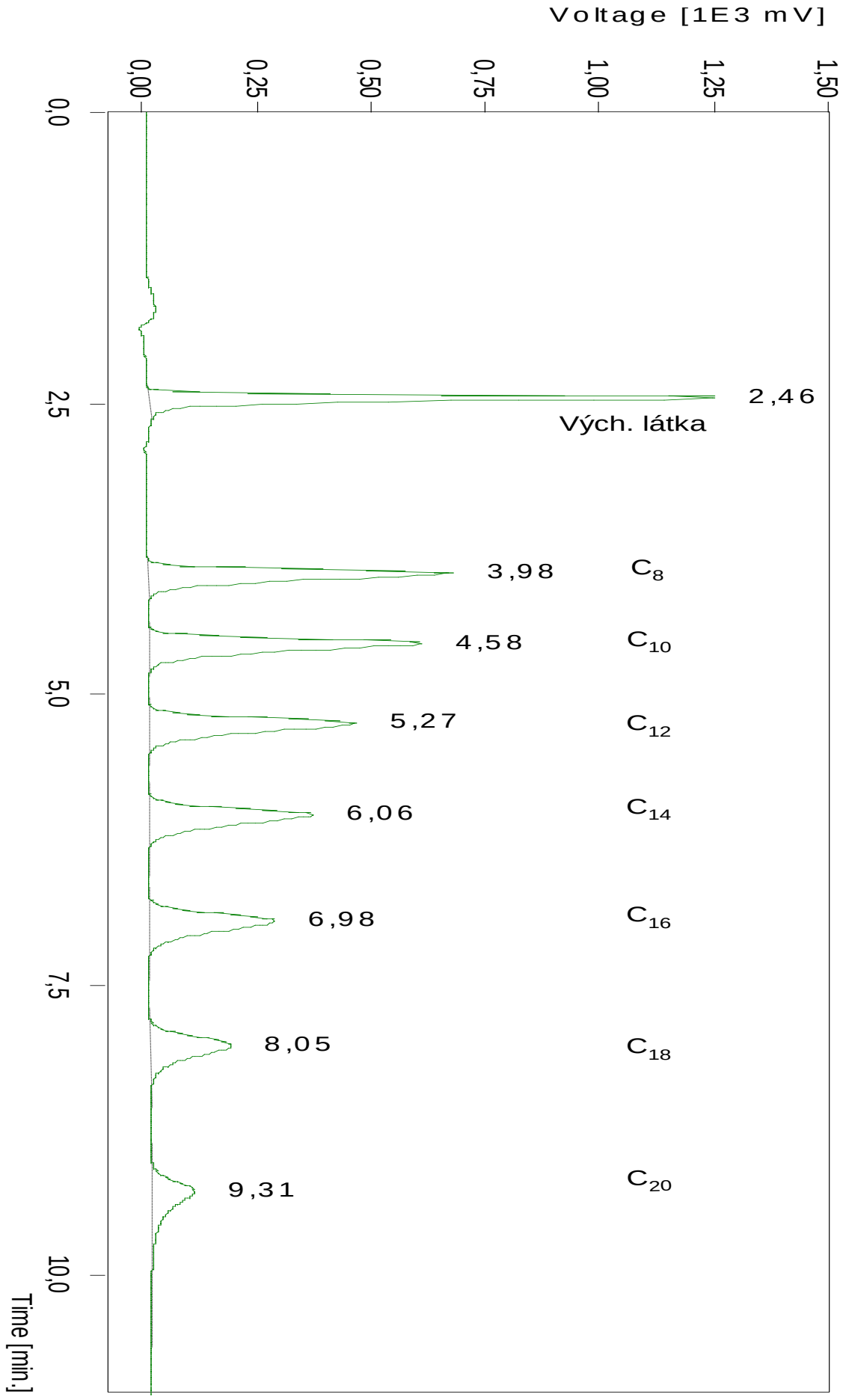
Tab. 4 Pyridiniové sole - souhrn

	Vzorec	M_w	Teplota tání [ºC]	Výtěžek
1.		322,29	68-69	6,81g 91,04 %
2.		350,35	75-77	6,37g 78,35 %
3.		378,41	40-42	6,05g 68,91 %
4.		406,46	60-62	8,24g 87,38 %
5.		434,52	68-70	8,42g 83,53 %
6.		462,56	76-78	4,52g 84,17 %
7.		490,61	81-83	4,00g 53,48 %

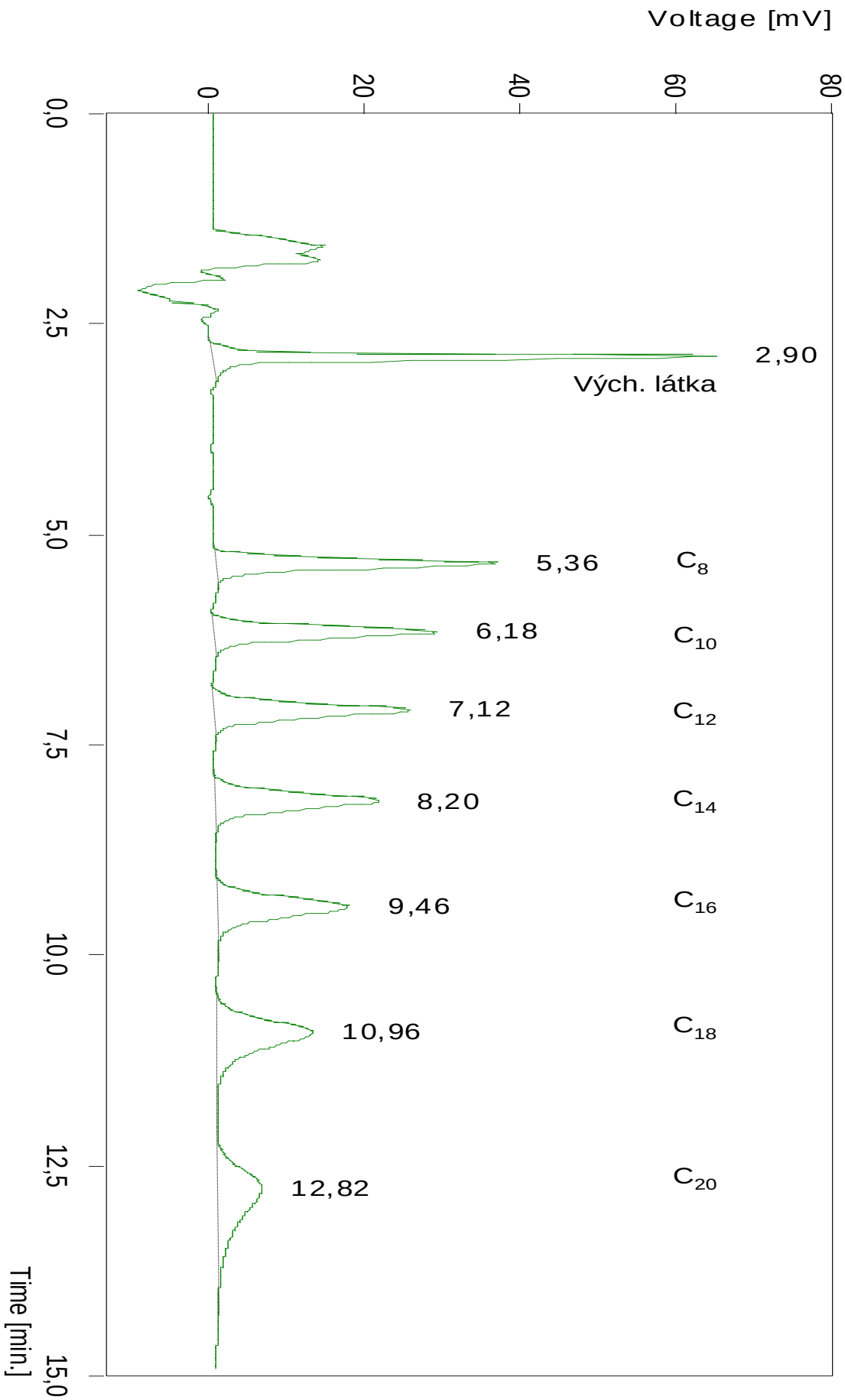
Tab. 5 Isochinoliniové sole - souhrn

	Vzorec	M_w	Teplota tání [ºC]	Výtěžek
1.		322,29	66-68	3,04g 40,64 %
2.		350,35	48-50	2,79g 34,32 %
3.		378,41	73-75	2,96g 33,71 %
4.		406,46	98-100	3,30g 34,99 %
5.		434,52	90-92	2,25g 22,32 %
6.		462,56	92-94	2,38g 22,16 %
7.		490,61	98-99	0,55g 7,35 %

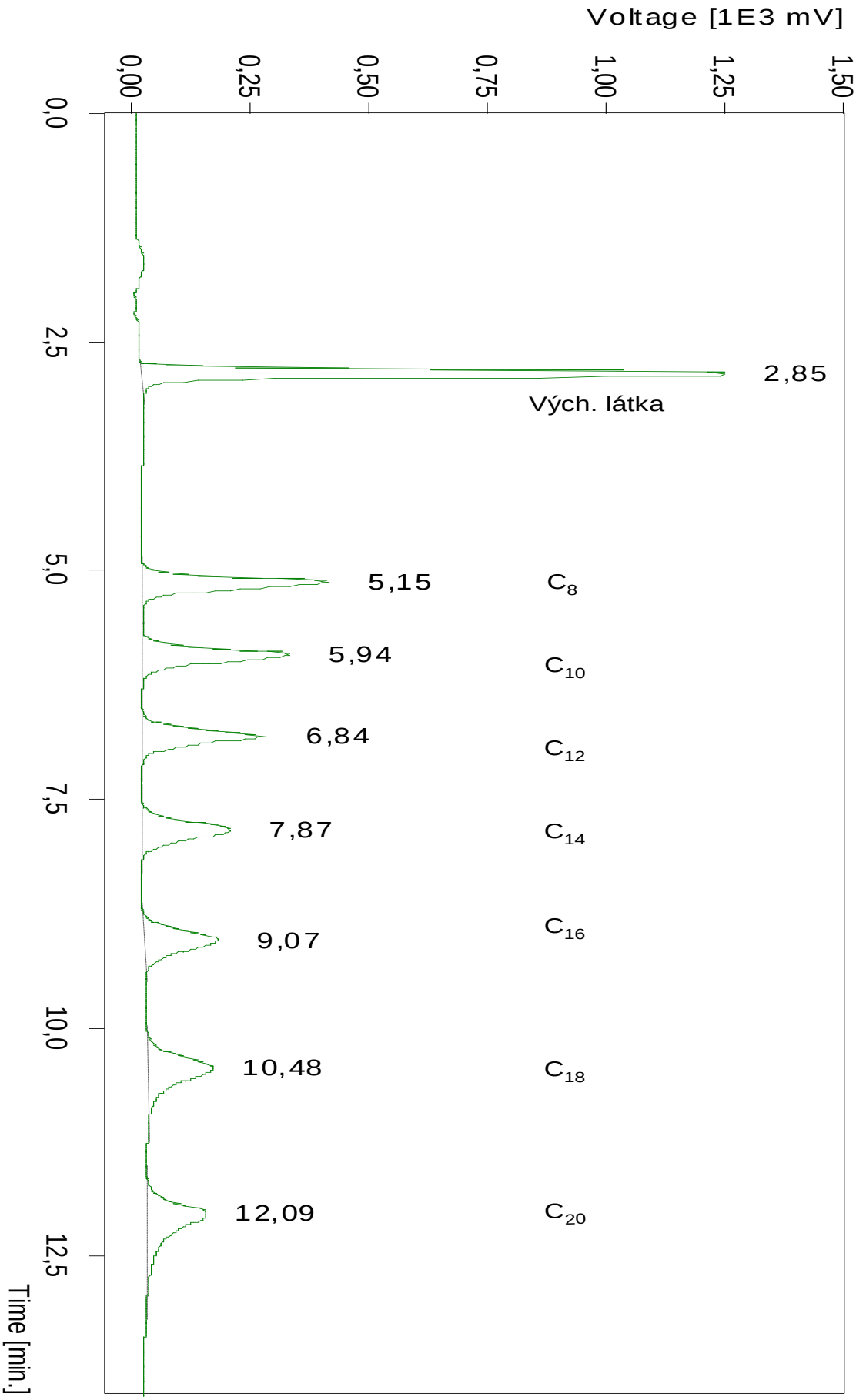
Tab. 6 Chinoliniové sole – souhrn



Směsný chromatogram 1 – pyridiniové sole



Směsný chromatogram 2 – isochinoliniové sole



Směsný chromatogram 3 – chinoliniové sole

Seznam zkratek:

NMR	nukleární magnetická rezonance
TLC	thin leyer chromatogrphy
t.t.	teplota tání
t.v.	teplota varu
CMC	kritická micelární koncentrace
BAK	benzalkonia
HPLC	high perfomence liquid chromatography
PAL	povrchově aktivní látka
R_f	retenční faktor
R_t	retenční čas
AChE	acetylcholinesterasa
IC_{50}	inhibiční koncentrace
AChI	acetylcholinjodid
AA	kyselina octová
Ch	cholin

Literatura:

[1] Meyers D.:Surfaces, Interfaces, and Colloids, Principles and Applications, VCH Publishers, Weinheim 1991

[2] Hampl F., Mazáč J., Liška F., Šrogl J., Kábrt L., Suchánek M., *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1995**, 60, 883

[3] Menger F. M.: *Acc.Chem. Res*,**1979**,12,111

[4] Peterka V.: *Chem. List*. **1984**, 78, 834

[5] Opluštil F., Skoumal M., Rádl Z.: Sborník *Proc. 4th. Int. Symp. Protection against Chemical Warfare vAgents*. **1992**, 143, Stockholm

[6] Boruvka L., Neumann A.W.: J. Chem. Phys. 66, 5464. **1988**

[7]Šmidrkal J.: *Chem. List*. **1999**, 93, 421-427

[8] Mukerje P., Mysels K.: *Critical Micelle Concentartions of Aqueous Surfactant Systems*, National bureau os standards, Washington 1971

[9] Cibulka R., Dvořák D., Hampl F., Liška F., *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **1997**, 62, 1342

[10] Pouchlý J.: *Fyzikální chemie makromolekulárních a koloidních soustav* SNTL , Praha 1998

[11] Moore W.J.: *Fyzikální chemie*. SNTL , Praha 1981.

[12] Pouchlý J., Vavruch I.: *Fyzikální chemie koloidních soustav*. SNTL, Praha 1960

[13] Kotoučivá H., Mazáč J., Cibulka R., Hampl F., Liška F., *Chem. lett.* **1998,** 649

[14] Budka J., Hampl F., Liška F., Scrimin P., Tecilla P., Tonellato U., *J. Mol. Catal.* **1996**, 104, 201

[15] Blažej A. a kol.: Tenzidy, ALFA-SNTL, Bratislava-Praha (1977)

[16] Peterka V.: Chem. Listy 78, 834 (**1984**).

[17] Cabal J.: Habilitační práce, **2003**

[18] Podlipný V.: Chem. Listy 59, 1223 (**1965**).

[19] Pouchlý J.: *Koloidní chemie*. SNTL , Praha 1980

[20] Morawetz H.: *Chování makromolekul v roztoku*. Academia , Praha 1971.

[21] Menger F. M.: *Angew. Chem.., Int. Ed. Engl.*, **1991**, 30, 1086 (solibilizace)

[22] Cheng P., Li D., Boruvka L., Rottenberg Y., Neumann A.W.: Colloids Surfaces 43, 151 (**1990**).

[23] Kuča K., diplomová práce, **2001**

[24] Ptáček A., Kulič J., Opluštil F.: *Chem. Listy*, **1993**, 87, 252-261

[25] Birdi K.S. (Edit.): *Handbook of Surface and Colloid Chemistry*. CRC Press, New York 1997.

[26] Cibulka R., Hampl F., Kotoučová H., Mazáč J., Liška F., *Collect. Czech. Chem. Commun.* **2000,** 65, 227

[27] Bunton C. A., Nome F. A., Quina F. H., Romsted L. S.:*Acc. Chem. Res* **1991**, 24, 357

[28] Scrimin P., Tecilla P., Tonellato U., Bunton C. A.: *Colloids and surfaces A* **1998,**144, 71

[29] Bareš M., Zajíc J.: Chemie a technologie tenzidů a detergentů, VŠCHT Praha (1982).

[30] Kuča K., Kivala M., Dohnal V.: General method for the quaternization of N,N-dimethyl benzylamines with long chain n-alkylbromides. Journal of Applied Biomedicine. **2004**, 2(4), 195-198. [1/0]

[31] Dohnal V., Kuča K., Bielavská M., Cabal J.: Stanovení homologů bromidu benzalkonia v dezinfekčních prostředcích pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie. *Zpravodaj Vojenske Farmacie*. **2003**, 13 (4), 5-8. [0/0]

[32] Kuča K., Cabal J., Patočka J., Dohnal V.: Quarternary heteroarenium salts as the competitive inhibitors of the brain acetylcholinesterase.*Lett. Drug Des. Discov*. **2004**; 1, 35-44.

[33] Corrin M. L.: Determination of the critical concentration for micelle formation in solutions of colloidal electrolytes by the spectral change of a dye. *I. Am. Chem. Soc.*, 69:679. **1947**

[34] Ledbetter JW, Bowen JR..: Integral spectrophotomitric titration using Eosin for determination of critical micelle concentration of alkyldimethylbenzylammonium. *Analytical chemistry* 43 (6): 773& **1971**

[35] Mukerje P., Mysels K.: Critical Micelle Concentartions of Aqueous Surfactant Systems. *National bureau of standards*. Washington **1971**