

# Studium přímé přeměny chinolindionů na pyrrolobenzodiazepiny

Barbara Gregorová

---

Bakalářská práce  
2019



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky  
akademický rok: 2018/2019

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Barbara Gregorová**  
Osobní číslo: **T15205**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie výroby tuků, kosmetiky a detergentů**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Studium přímé přeměny chinolindionů na pyrrolobenzodiazepiny**

Zásady pro vypracování:

### Teoretická část:

1. Na základě dostupné literatury přehledně vypsát výskyt pyrrolobenzodiazepinových derivátů v přírodě, popřípadě uvést jejich biologické účinky.
2. Zpracovat literární rešerši zaměřenou na syntézu derivátů pyrrolobenzodiazepinů.

### Praktická část:

1. Pokusit se nalézt vhodné reakční podmínky pro přímou konverzi vybraného 3-propargylaminochinolin-2,4-dionu na pyrrolbenzodiazepin.
2. Vystavit několik dalších 3-propargylaminochinolin-2,4-dionů podmínkám poskytujícím nejlepší výsledek z optimalizačních reakcí.
3. Izolované produkty charakterizovat dostupnými metodami instrumentální analýzy.
4. Vyhodnotit výsledky experimentů a sepsat bakalářskou práci.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

- 1) Kovář, J.; Hudlický M.; Ernest I Preparativní reakce v organické chemii – VIII. Molekulární přesmyky, 1964, 1. vyd., Nakladatelství Československé akademie věd.
- 2) Kovář, J.; Krutošíková, A.; Kada, R Chémia heterocyklických zlúčenin, 1982, 1. vyd., Bratislava: VEDA, vydavateľstvo Slovenskej akadémie vied.
- 3) Červinka, O.; a kolektiv Mechanismy organických reakcí, 1981, 2. vyd., SNLT–Nakladatelství technické literatury.
- 4) McMurry, J. Organická chemie, 2005, 1. vyd., VŠCHT Praha.
- 5) López–Munoz, F.; Álamo C.; García–García P. Journal of Anxiety Disorders 2011, 25, 554?562.
- 6) Griffin, C. E.; Kaye A. M.; Bueno, F. R.; Kaye, A. D. Ochsner J. 2013, 13, 214?223.

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Roman Kimmel, Ph.D.**

Ústav chemie

Datum zadání bakalářské práce:

**2. ledna 2019**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**20. května 2019**

Ve Zlíně dne 12. března 2019

L.S.

doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*

doc. Ing. Marián Lehocký, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

## 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 obhajoby <sup>1)</sup>;
- 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. 3 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> 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 § 60 <sup>3)</sup> 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 .....

.....

---

I <sup>1)</sup> 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 nevýdělečně 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.

II <sup>2)</sup> 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 vzdělávacího zařízení (školní dílo).

III <sup>3)</sup> 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 výtěžku 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 přihlídně k výši výtěžku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## **ABSTRAKT**

Bakalářská práce se ve své teoretické části zabývá formou kosmetických přípravků a jejich kontaminací mikroorganismy přirozeně produkující sekundární produkty. Tyto izolované sekundární metabolity se vyznačují baktericidním nebo fungicidním účinkem. Jsou výjimečné jejich strukturou, která je tvořena ze tří vzájemně spojených cyklů, tzv. pyrrolobenzodiazepinů. Dále je popisována biologická aktivita a syntéza těchto pozoruhodných organických derivátů. Praktická část si klade za cíl nalézt vhodné reakční podmínky pro přímou syntézu vybraných 3-(propargylamino)chinolin-2,4-dionů na žádané pyrrolobenzodiazepiny.

Klíčová slova: biologická aktivita, pyrrolobenzodiazepin, pyrrolidinový kruh, propargylová skupina, allenyl

## **ABSTRACT**

Theoretical part of this thesis pursue certain form of cosmetic products and their contamination by microorganisms, which naturally produce secondary products. These isolated products are distinguished by bactericidal or fungicidal effects. They are known by name pyrrolobenzodiazepines and they are unique due to their structure, which is created by three mutually connected cycles. Next part of this work describes biological activity of these remarkable organic products and their synthesis. Purpose of practical part is to find suitable reaction conditions for direct synthesis of selected products 3-(propargylamino)quinoline-2,4-dione to desired pyrrolobenzodiazepines.

Keywords: biological activity, pyrrolobenzodiazepine, pyrrolidine ring, propargyl group, allenyl

Velmi ráda bych touto cestou vyjádřila své poděkování Ing. Romanu Kimmelovi, Ph.D., za jeho odborné rady, podporu a za trpělivost při vedení mé bakalářské práce.

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

## OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>8</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>9</b>
<b>1 KOSMETIKA A KOSMETICKÉ PŘÍPRAVKY</b> .....	<b>10</b>
1.1 FORMY KOSMETICKÝCH PREPARÁTŮ .....	11
1.2 FUNKČNÍ KOSMETIKA .....	14
<b>2 MIKROORGANIZMY</b> .....	<b>15</b>
2.1 BAKTERIE.....	15
2.2 KVASINKY.....	16
2.3 PLÍSNĚ.....	17
<b>3 KONTAMINACE KOSMETICKÉHO PŘÍPRAVKU</b> .....	<b>18</b>
<b>4 MIKROBIOLOGIE KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVKŮ</b> .....	<b>19</b>
<b>5 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ RŮST MIKROORGANISMŮ V KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVCÍCH</b> .....	<b>21</b>
5.1 VODNÍ AKTIVITA .....	21
5.2 TEPLOTA .....	23
5.3 VLIV PH NA RŮST MIKROORGANISMŮ .....	23
<b>6 VÝSKYT PYRROLOBENZODIAZEPINOVÝCH DERIVÁTŮ V PŘÍRODĚ</b> .....	<b>25</b>
<b>7 SYNTÉZA DERIVÁTŮ PYRROLOBENZODIAZEPINŮ</b> .....	<b>33</b>
7.1 EKOLOGICKÁ SYNTÉZA V IONTOVÉ KAPALINĚ.....	33
7.2 REAKCE KYSELINY BENZOOVÉ S PROLINOLEM .....	33
7.3 ACYLOVÝ RADIKÁLOVÝ POSTUP .....	34
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>36</b>
<b>8 DISKUZE A VÝSLEDKY</b> .....	<b>37</b>
8.1 SHRnutí VÝSLEDKŮ PŘEDCHOZÍCH KOLEGŮ .....	37
8.2 DISKUSE K ŘEŠENÍ ZADANÉ PROBLEMATIKY .....	38
<b>9 CHARAKTERISTIKA PŘÍSTROJOVÉHO VYBAVENÍ A INSTRUMENTÁLNÍCH METOD</b> .....	<b>43</b>
<b>10 DETAILNÍ POPIS SYNTETICKÝCH POSTUPŮ A STRUKTURNÍ CHARAKTERISTIKY PŘIPRAVENÝCH SLOUČENIN</b> .....	<b>44</b>
10.1 BAZICKY INDUKOVANÉ PŘESMYKY 3-(PROPARGYLAMINO)CHINOLIN- 2,4(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> )-DIONŮ .....	44
<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>46</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK</b> .....	<b>47</b>
<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b> .....	<b>49</b>
<b>SEZNAM TABULEK</b> .....	<b>50</b>
<b>SEZNAM SCHÉMÁT</b> .....	<b>51</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>52</b>



## ÚVOD

První polovina bakalářské práce je věnována mikroorganismům a jejich schopnosti kontaminace kosmetického přípravku. Mikroorganismy jsou přirozeně vyskytující se organizmy v přírodě a jsou producenty sekundárních metabolitů. Sekundární metabolity lze jinými slovy označit jako antibiotika. Tyto látky jsou schopny v minimálním množství potlačit růst mikroorganismů, anebo je rovnou usmrtit. Z toho důvodu je pozornost zaměřena na organické sloučeniny pyrrolbenzodiazepinů, které jsou významnými medikamenty využívající se hojně v lékařském odvětví. Deriváty pyrrolbenzodiazepinu jsou považovány za velmi silná protinádorová terapeutika. Protinádorové medikamenty z řad sloučenin na bázi pyrrolbenzodiazepinů vyvolávají svůj účinek jejich interakcí s DNA sekvenčně selektivním způsobem.

Nejvíce významný objev v této oblasti byl učiněn Williamem Leimgruberem a jeho spolupracovníky, kteří v roce 1963 izolovali přírodní protinádorové antibiotikum anthramycin z mikroorganismu *Streptomyces refuineus*. Neothramycin, další z řad rodu *Streptomyces*, má značnou protinádorovou aktivitu proti myším nádorům, konkrétně na nádor Walker carcinosarcoma-256. Další významné deriváty pyrrolbenzodiazepinů jsou zmíněny dále v teoretické části bakalářské práce.

Tyto velmi zajímavé sloučeniny lze získávat nejen izolací z živých organismů, ale i cestou syntetickou. Při vypracovávání rešeršní části bylo dohledáno nespočet postupů, kterými lze tyto látky syntetizovat, ale pro jejich komplikovanou přípravu byly vybrány pouze některé, jež vedou k vysokým výtěžkům.

Druhá polovina práce je zaměřena na hledání optimálních reakčních podmínek, které vedou k přímým přeměnám 3-(propargylamino)chinolin-2,4-dionů na požadované pyrrolbenzodiazepindiony.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 KOSMETIKA A KOSMETICKÉ PŘÍPRAVKY

Slovo „kosmetika“ pochází z řeckého „*Kosm tikos*“ ve znění „mít dovednost někoho zdobit“.<sup>1</sup> Využití kosmetiky není pouhým objevem nynějšího století. Archeologické důkazy naznačují, že zdobíme své tělo téměř půl milionu let. Malování lidské pokožky je zjevně součástí lidské přirozenosti už od nepaměti. Ať už se jednalo o rituál, posílení sexuality nebo o propagaci sociálního statusu.<sup>2</sup>

Evropa se stala světovým producentem a masovým trhem kosmetických přípravků a rovněž regulačním modelem pro ostatní regiony po celém světě. Udržení této pozice je závislé především na schopnosti evropského průmyslu pokračovat v inovacích. Protože právě inovace v tomto průmyslu hrají klíčovou roli.<sup>3</sup>

Jak již bylo zmíněno, kosmetický průmysl expandoval v Evropě a s ohledem na ochranu spotřebitele byla vydána vyhláška o kosmetickém přípravku. Znění tohoto nařízení vzešlo v účinnost v srpnu roku 2013 a je platné pro všechny členské státy Evropské Unie. Definice kosmetického přípravku je dána Nařízením Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích daného zákonem č. 258/2000 Sb, kde je uvedeno, že kosmetickým přípravkem je jakákoliv látka nebo směs určena pro styk s vnějšími částmi lidského těla (pokožkou, vlasovým systémem, nehty, rty, vnějšími pohlavními orgány) nebo se zuby a sliznicemi ústní dutiny, výhradně nebo převážně za účelem jejich čištění, parfemace, změny jejich vzhledu, jejich ochrany, jejich udržování v dobrém stavu nebo úpravy tělesných pachů.<sup>4</sup>

Kosmetické přípravky mají především význam hygienický. Poněvadž pokožka hraje roli důležitého kontaktního orgánu, ovlivňuje estetické vědomí jedince a je potřeba jim přisoudit významnou roli v oblasti sociologické, psychologické a pedagogické.<sup>5</sup>

## 1.1 Formy kosmetických preparátů

V posledních několika letech ze strany spotřebitelů vzrostl zájem o účinné látky v kosmetických přípravcích. Kosmetický průmysl vychází těmto požadavkům vstříc a snaží se tyto látky aplikovat ve speciálních formách kosmetických přípravků.

### Roztoky

Jednou z forem kosmetických přípravků jsou roztoky, jimiž se rozumí vody, tonika nebo lotiony. Roztoky mohou být bezbarvé nebo zbarvené, často parfémované, vodné nebo vodně alkoholické roztoky obsahující jednu nebo více specificky účinných látek. Tyto přípravky jsou v praxi nazývány jako vody (pleťová, po holení), nebo tonika, pokud vyvolávají subjektivní pocit osvěžení či prokrvení.

### Koloidní roztoky a gely

V koloidních roztocích jsou obsaženy látky, které jsou schopny tvořit s vodou nebo s jinými rozpouštědly koloidní suspence, které jsou schopny malou změnou vnějších podmínek přejít v (tuhé) gely. Gely jsou dispergované částice prostorově fixované a nepohyblivé.

### Suspenze

Jako suspenze jsou charakterizovány přípravky, jejichž systém tvoří kontinuální kapalnou fázi, v níž jsou dispergovány pevné částice. Dispergované částice nesmějí při skladování sedimentovat. To je důvod, proč jsou přidávány dispergátory (povrchově aktivní látky) nebo zahušťovadla (zvýšení viskozity disperzního prostředí).

### Oleje

Termín oleje označuje jak kapalnou tuky, tak i tukovité látky. Přírodní oleje vykazují v závislosti na obsahu a typu nenasycených mastných kyselin větší nebo menší sklon k oxidaci. Z toho důvodu jsou do přípravku přidávány antioxidanty, které tuto nepříjemnou vlastnost potlačují.

### Masti

V kosmetickém průmyslu se pod označením masti rozumí směs tuků a tukovin (základ masti), ke kterým jsou přidávány látky se specifickými účinky na pokožku.

## **Emulze**

Emulze jsou heterogenní disperzní systémy dvou nemísitelných nebo omezeně mísitelných kapalných látek. Podle polarit jsou rozlišovány dva typy emulzí. Přímé emulze O/V (olej ve vodě) a emulze obrácené V/O (voda v oleji).

## **Pasty**

Základem pasty jsou masti, ve kterých jsou zabudovány práškovité, ve vodě a v rozpouštědlech nerozpustné, komponenty. V kosmetice jsou aplikovány omezeně. Příkladem mohou být přípravky určené k ošetření pokožky kojenců, resp. malých dětí.

## **Mýdla**

Mýdla jsou definovány, jako alkalické soli (především sodné) vyšších mastných kyselin. Jsou široce rozšířené pro denní čištění pokožky. Dnes jsou do formulací přípravku zařazeny látky s promašťujícím účinkem, čímž je redukována iritace pokožky mýdly.

## **Roztoky tenzidů**

Roztoky tenzidů jsou v mnoha případech přípravky určené pro důkladné čištění pokožky. Jedná se tedy o povrchově aktivní látky. Podle koncentrace aktivní látky mohou mít konzistenci nízkoviskozních až vysokoviskozních kapalin. Vzhledově jsou transparentní nebo opaleskující. Jsou založeny na vodné nebo na vodně alkoholické bázi.

## **Tyčinky**

Obvyklým tvarem tyčinek jsou tužky. Jedná se o typy kosmetických výrobků, jako např. rtěnky, deodoranty a tužky na obočí. Tyto přípravky jsou určeny zejména ke zvýraznění malých detailů pokožky.

## **Pudry**

Pudry jsou jemně práškovité kompozice, založené na jednom nebo více typech práškovitých substancí, obsahují navíc účinné látky vhodných vlastností. V závislosti na složení dělíme pudry na tekuté a kompaktní. Tekuté pudry tvoří jako základ především mastek, oxid zinečnatý nebo oxid titaničitý, další složkou bývá glycerol a voda. Kompaktní pudry jsou připravovány briketováním základních komponent.

## Aerosoly

Koloidní systémy jsou označovány jako aerosoly. Jejich kontinuální fáze je tvořena plynem (vzduch), v němž jsou rozptýleny kapalné částice. Průměr rozptýlených částic se pohybuje v mezích koloidních rozměrů (tj. 0,1—100  $\mu\text{m}$ ). Aerosoly používané v péči o pokožku jsou obvykle plněny do kovových nebo plastových nádob, vybavených ventilovým systémem. Nádoby jsou plněny stlačeným, případně zkapalněným hnacím médiem (hnačí plyn). Aerosoly umožňují jemně rozptylovat rozpouštědla i účinné látky, čímž zvyšují jejich účinnost.

## Laky

Kompozice obsahující filmotvorné komponenty, především přírodní nebo syntetické polymerní pryskyřice, dále změkčovadla a rozpouštědla a většinou i speciální barviva. Jejich cílem je vytvořit na pokožce, nehtech a vlasech plastický, nelepivý a dostatečně odolný film. Tyto vlastnosti zlepšují vzhled a mechanické vlastnosti povrchu.

## Granuláty

Kosmetické granuláty (př. prášky na čištění zubů) se v kontaktu s vodou snadno rozpadají a vytváří dobře roztíratelné pasty nebo suspenze. Jsou často využívány v případech, kdy se jejich účinné složky uvolňují, nebo vznikají teprve při kontaktu s vodou.<sup>5</sup>

## 1.2 Funkční kosmetika

Bez ohledu na formu lze kosmetiku seskupit podle použití produktu do následujících sedmi kategorií:<sup>6</sup>

- Péče o pleť včetně přípravků, jež pokožku zjemňují (emolienty a lubkrikanty), hydratují (zvlhčovače), tonizují (astringenty), ochraňují (opalovací krémy) a přípravky s protizánětlivými účinky.
- Čisticí přípravky včetně mýdla, koupelových přípravků, šamponů a přípravků na zuby.
- Zlepšení tělesných pachů, deodoranty a antiperspiranty.
- Odstranění chloupků, pomocí holicích přípravků nebo depilací.
- Péče o vlasy včetně přípravků na vlnění, rovnání, styling, proti lupům, kondicionování a barvení.
- Ošetření a udržování sliznice ústní pomocí ústní vody, produkty intimní hygieny a přípravky na ochranu rtů.
- Dekorativní kosmetika, krášlení očí, rtů, kůže a nehtů.

## 2 MIKROORGANIZMY

Většinu mikroorganismů je možné charakterizovat jako jednobuněčná individua, která jsou v přírodě schopná samostatné existence a rozmnožování. Mezi mikroorganismy jsou řazeny prokaryotické organizmy (bakterie, cyanobakterie (sinice), *Archea*) a eukaryotické organizmy (houby, zelené řasy, prvoci). K mikroorganismům jsou někdy řazeny i viry, třebaže nesplňují základní podmínku organismu – autoreprodukci.<sup>7,8</sup>

### 2.1 Bakterie

Bakterie lze charakterizovat jako mikroskopické jednobuněčné organismy, které na rozdíl od eukaryot nemají jádro v obvyklém cytologicko-morfologickém významu, stejně tak chybí ostatní membránové struktury uvnitř buňky (mitochondrie, chloroplasty, apod.). Funkce enzymatické a syntetizující u nich plní cytoplazmatická membrána.

Bakteriální buňka je řádově menší než rostlinná nebo živočišná buňka. Typickými tvary bakterií jsou koule (kokus), válce (tyčinka) nebo ohnuté či stočené do šroubovice. Mohou se často vyskytovat v uskupení a tvořit řetízky (streptokoky) nebo shluky.<sup>9</sup> Rosolovitý roztok, který tvoří prostředí jak bakteriální, tak eukaryotické buňky je cytoplazma. V této enzymaticky aktivní struktuře, ve které probíhá syntéza bílkovin, replikace jádra a dělení buňky, je uložen jaderný materiál a ribozomy, drobné lysozomové vakuoly a inkluze.<sup>10</sup> Jádro (nukleoid, bakteriální chromozom) bakterie je tvořeno jednou molekulou dvoušroubovicové DNA.<sup>8</sup> Buňka je obehnaná cytoplazmatickou membránou, která je tenká, semipermeabilní a je nezbytnou součástí živé bakteriální buňky.<sup>10</sup>

Nad cytoplazmatickou membránou se nachází buněčná stěna. Buněčná stěna bakterií je pevná a elastická. Na rozdíl od cytoplazmatické membrány je buněčná stěna plně propustná. Zejména pro soli a nízkomolekulární sloučeniny. Uděluje buňce tvar a jako tuhý obal mechanicky chrání vnitřní prostředí buňky. Základní složkou buněčné stěny bakterií, která plní funkci opěrné kostry je peptidoglykan (murein). Dle stavby buněčné stěny rozlišujeme buněčnou stěnu grampozitivních a gramnegativních mikroorganismů.<sup>8</sup>

U grampozitivních bakterií, označovány jako G<sup>+</sup>, obsahuje peptidoglykanová složka velmi mnoho vrstev a na její vnější stranu jsou navázány vláknité molekuly kyseliny teikoové, v nichž se střídají zbytky cukrů a kyseliny fosforečné. Oproti tomu gramnegativní bakterie, označovány jako G<sup>-</sup>, mají ještě delší vnější membránu s vysokou propustností. Vnější vrstva této membrány obsahuje lipopolysacharidy, které často určují antigenní



vlastnosti bakteriálního povrchu.<sup>11</sup> K určení typu buněčné stěny napomáhá Gramovo barvení. Gram pozitivní bakterie po obarvení trifenylnitrobofenylovým barvivem (krystalová violet) a moření roztokem jodidu draselného (Lugolův roztok) zadržují komplex krystalové violeti a jodidu draselného v buněčné stěně a neodbarvují se organickými rozpouštědly (ethanol nebo aceton), kdežto u gramnegativních bakterií se tento komplex z buněčné stěny vymývá. Jestliže se po odbarvovacím procesu (vymývání ethanolem) použije druhé barvivo (např. Safranin), zbarví se gramnegativní bakterie červeně a grampozitivní zůstávají zbarveny fialově.<sup>12</sup> Povrch bakteriální buňky bývá často chráněn pouzdem – kapsulí a slizovou vrstvou. Některé bakteriální buňky mají bičíky a pili (fimbrie). Pouzdro bakterií je vnějším obalem, jehož přítomnost chrání před vysycháním. Bičíky zodpovídají za pohyb. Tyto orgány jsou složeny z proteinových vláken. U některých bakterií může být počet bičků větší jak jeden. Fimbrie mají oproti bičkům vlákna kratší a umožňují adhezi bakterie na buňky hostitele.<sup>10</sup>

## 2.2 Kvasinky

Kvasinky jsou heterotrofní eukaryotní mikroorganismy náležící mezi houby (Fungi). Tvar kvasinek je nejčastěji elipsoidní, případně vejčitý až kulovitý. Vyskytuje se ovšem i tvar citrónovitý, trojúhelníkovitý a válcovitý. Některé rody nebo kmeny kvasinek vytvářejí protáhlé buňky, které pučí pouze na pólech a zůstávají po pučení spojeny v dlouhá zaškrcovaná vlákna, tzv. pseudomycelium. V určitých místech pseudomycelia vznikají svazky kratších elipsoidních buněk – blastospor. U některých rodů nebo kmenů kvasinek se vytváří tzv. pravé mycelium, tj. vlákno vznikající příčným dělením protáhlých buněk. Kvasinky se rozmnožují vegetativním způsobem a to pučením nebo dělením.

Vegetativní kvasinková buňka je složena ze silné a pevné buněčné stěny, která má pevnou a silnou strukturu, jež dává buňce tvar, chrání ji před mechanickými vlivy a před osmotickým šokem. Hlavní složkou buněčné stěny kvasinek jsou polysacharidy. Ve stěně kvasinek je přítomno kolísavé množství lipidů, fosfolipidů a fosforečnanů, které jsou esterově vázány na polysacharidy. Hlavní složkou stěnových polysacharidů kvasinek jsou glukany. Na povrchu stěn, jsou patrné jizvy po pučení. Tyto jizvy jsou nazývány jako jizvy zrodu. Jedná se o jizvy, které zůstávají v místě dřívějšího spojení buňky s buňkou mateřskou. Pod povrchem buněčné stěny se nachází jemná cytoplazmatická membrána, někdy také nazývána jako plazmolema. Je volně propustná pouze pro malé molekuly bez náboje. Z toho důvodu tvoří osmotické rozhraní mezi buňkou a vnějším prostředím. Na rozdíl od

bakterií však neobsahuje dýchací enzymy. Vnitřní prostředí buňky je tvořeno cytoplazmou, ve které jsou uloženy strukturální útvary velmi rozmanitého tvaru, složeny hlavně z bílkovin, lipidů a fosfolipidů. Syntézu bílkovin zajišťují ribozomy, které se nacházejí na vnějším povrchu endoplazmatického retikula. Vakuola je většinou kulovitý útvar obklopený jednoduchou membránou. Na tomto místě dochází k rozpadu těch struktur buněk, které se v buňce rozkládají a obnovují a mají krátký poločas rozpadu. Organela, která je schopna transportu prekurzorů (tj. stavební kameny) buněčné stěny z cytoplazmy přes cytoplazmatickou membránu, je nazývána Golgiho aparát. Podobně jako ostatní eukaryota obsahují kvasinky také tzv. cytoskelet, což je síť proteinových vláken (protein – tubulin), jež se rozprostírá v cytoplazmě i v jádře a umožňuje vnitrobuněčný pohyb. Kromě strukturálních útvarů se v cytoplazmě kvasinek vyskytují i rezervní látky jako je glykogen a volutin. Jádro je od cytoplazmy odděleno dvojitou jadernou membránou s velkými póry. V jádře se vyskytuje jadérko, které leží těsně pod jadernou membránou a vycházejí z něj vlákna, mikrotubuly.<sup>13</sup>

### 2.3 Plísně

Plísně jsou označovány jako mikroskopické vláknité eukaryotní mikroorganizmy, náležící mezi houby (Fungi). Stélka plísni je tvořena vlákny (hyfy), které mohou být jak jednobuněčné, tzn. bez přepážek (třída *Zygomycetes*), tak vícebuněčné neboli septované. Hyfy plísni větvením vytvářejí spleť, jež se nazývá mycelium. Tvrdý polokulatý útvar tvořený hustou spleť hyf je označován jako sklerocium. V každé buňce se nachází jedno nebo více jader. Cytoplazma buněk obsahuje strukturální útvary, tj. endoplazmatické retikulum, mitochondrie, vakuoly. Hlavní rezervní látkou plísni jsou lipidy, které tvoří v buňkách různě velké kapičky. Cytoplazmatická membrána má podobné složení i funkci jako u kvasinek. Buněčná stěna plísni je složena hlavně z polysacharidů. Kromě chitinu a chitosanu jsou zde přítomny také glukany a polysacharidy složené z galaktosaminu nebo z 6-deoxyhexos, hlavně z fruktosy a rhamnosy. Kromě polysacharidů jsou přítomny i bílkoviny. Stěny konidií obsahují různá barviva. Nejčastější je barva zelená až zelenomodrá (rody *Penicillium* a *Aspergillus*), běžné jsou i barvy béžová až hnědá a černá (*Aspergillus*).<sup>13</sup>

### 3 KONTAMINACE KOSMETICKÉHO PŘÍPRAVKU

Obvykle je nízký obsah mikrobiální kontaminace v kosmetickém přípravku nevyhnutelný, ale nemusí představovat výraznou hrozbu. Naopak neřízená kontaminace přípravků mikroorganismy v kosmetice může způsobit znehodnocení produktu. Budou-li mikroorganismy patogenní, tak představují vážné zdravotní riziko pro spotřebitele po celém světě.<sup>14</sup>

Mikroby mohou infiltrovat přípravky pro osobní péči několika následujícími způsoby:

- **Přenosu do šarže během výroby ze zpracovatelského zařízení nebo surovin**

Kontaminace je způsobena převážně mikroorganismy, jež se vyskytují právě ve stádiu spor. Ty jsou schopny přežít v nepříznivých podmínkách i několik let. V okamžiku kdy se ocitnou ve vhodném prostředí, nastane jejich růst a množení. Kontaminace ze zpracovatelského prostředí může nastat nejen ve výrobní šarži, ale také v jakémkoli potrubí a přenosových nádobách použitých pro výrobu šarže.

Do produktů mohou vniknout mikroorganismy i za pomoci kontaminovaných surovin, které byly použity pro výrobu přípravku. Voda, nejběžněji využívaná surovina, je pravděpodobně nejvíce náchylná ke kontaminaci. Dokonce ingredience obsahující malé množství vody jsou potenciálními zdroji kontaminace. Těmito materiály mohou být například cukry, glykosidy nebo surfaktanty.<sup>18</sup>

- **Kontaminace z kontaktu se znečištěnými obaly**

Přestože byl výrobek úspěšně zpracován a během výroby nedošlo ke znečištění, může dojít ke kontaminaci právě díky obalovým materiálům nebo skladovacím nádobám.<sup>18</sup> Na obalech byla zjištěna přítomnost *E.coli*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* nebo *Bacillus subtilis*. Téměř vždy bývají přítomny plísně rodů *Pencillium*, *Aspergillus* a *Mucor*.<sup>15</sup>

- **Proniknutím do produktu jako důsledek použití spotřebitelem.**

Dokonce i po úspěšné výrobě a balení produktu může být výrobek kontaminován. Ke kontaminaci dochází právě stykem pokožky prstů s přípravkem. Mikroorganismy, jež spočívají na pokožce, proniknou do přípravku. Podobným způsobem může spotřebitel například kontaminovat šampon, doplněním nesterilní vodou.<sup>18</sup>

## 4 MIKROBIOLOGIE KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVKŮ

V následujících podkapitolách jsou pro představu uvedeny jedny z nejvíce využívaných kosmetických přípravků. U každého přípravku je uvedeno složení, které vytváří vhodné podmínky pro růst mikroorganismů. Zejména pro bakterie, kvasinky a plísně.

U kosmetiky pro děti do tří let je povolen mikrobiální limit dle testování pomocí Critical Path Method 102 CFU/g (ml) při 0,5 g (ml) vzorku. Pro ostatní výrobky je povolen mikrobiální limit dle testování pomocí Critical Path Method 103 CFU/g (ml) při 0,1 g (ml).<sup>16</sup>

### Pleťové krémy a pleťová mléka

Základními surovinami při výrobě krémů jsou tuky, mastné kyseliny, uhlovodíky, mýdla, emulgátory, bílkoviny, některé steroly, estery vyšších mastných kyselin s jednomocnými alkoholy a glycerin. Takové složení tvoří optimální prostředí pro růst mnoho škodlivých bakterií, kvasinek a plísní. Plísně rodů *Penicillium* a *Aspergillus* jsou charakteristické tvorbou barvených skvrn (zelené, žluté až hnědočerné) na povrchu krému. Tyto skvrny mají tendence prostupovat i do hlubších vrstev a tím krém znehodnocují. V pleťových krémech je typický výskyt *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Pseudomonas fluorescens*.<sup>19</sup>

### Pudry a zásypy

Základní surovinou práškových pudrů jsou kaolín, mastek, škrob, uhličitan vápenatý, uhličitan hořečnatý, zinková běloba, stearát hořečnatý. K barvení jsou používána barviva přírodní nebo umělá a nerozpustná ve vodě. Složení tekutých pudrů je obdobné pudrům práškovým, s výjimkou přídavku vody, ethanolu, glycerinu a látek tvořící slizy z důvodu lepší přilnavosti pudru na pleť. Hlavní složkou zásypu je mastek a antiseptikum v podobě kyseliny borité. Z důvodu velké pravděpodobnosti výskytu mikroorganismů v surovinách, z nichž jsou pudry a zásypy připravovány, je nutné věnovat těmto prostředkům zvýšenou mikrobiologickou pozornost. Nepříjemný je výskyt koliformních a patogenních mikroorganismů. Mimo jiné se zde mohou vyskytovat jak kvasinky, tak i plísně.<sup>19</sup>

### Zubní pasty

Zubní pasty jsou složeny z pevných a tekutých látek a dalších přísad. Z pevných látek bývá přítomen uhličitan vápenatý, koloidní kaolín a fosforečnan vápenatý. Z tekutých látek je přidávána voda a glycerin. Funkci pojidla zastává například pektin. Aroma zubní pasty

mohou vytvářet éterické oleje jako anýzový, skořicový nebo mentol. Dalšími složkami jsou barviva a chuťové látky. Zubní pasty jsou svým složením příznivé pro růst mikroorganismů, a to zejména pro bakterie rodů *Proteus* a *Pseudomonas*.<sup>19</sup>

### **Rtěnky**

Základ rtěnky je tvořen tukovou a voskovou směsí a nezávadných barviv. Při výběru suroviny pro výrobu, je kladen velký důraz na jejich kvalitu, protože i malé závady mohou způsobit iritaci rtů. U rtěnek je nejčastěji zaznamenána povrchová kontaminace plísněmi.<sup>19</sup>

### **Kolínské vody a parfémy**

Základní surovinou parfémů a kolínských vod je ethanol a v něm rozpuštěné vonné látky. Ethanol je alkohol, který je běžně využíván jako konzervační činidlo v kosmetických přípravcích. Z důvodu jeho vysoké koncentrace jsou tyto výrobky mikrobiologicky nezávadné.<sup>19</sup>

Mikrobiální kontaminace znehodnocuje kvalitu kosmetického výrobku jako je například konzistence, barva nebo stabilita výrobku. Z toho důvodu jsou do přípravků přidávány konzervační látky, jinými slovy antimikrobiální látky. Konzervační látka je jedna z forem biocidu. Biocidy mohou na mikroorganismy působit biocidním (trvalé usmrcení) nebo biostatickým (pokles růstové aktivity) mechanismem. Antimikrobiální látky jsou využívány k prevenci mikrobiálního růstu nejen v kosmetických, ale i ve farmaceutických přípravcích.<sup>17</sup> Konzervační látky jsou považovány za jeden z hlavních alergenů v kosmetických přípravcích.<sup>18</sup> Mohou způsobovat jak kontaktní, tak i alergickou dermatitidu.<sup>19</sup> Používání těchto látek je legislativně regulováno a musí být dodržovány přípustné koncentrační limity.<sup>20</sup>

## 5 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ RŮST MIKROORGANIZMŮ V KOSMETICKÝCH PŘÍPRAVCÍCH

### 5.1 Vodní aktivita

Všechny mikroorganismy vyžadují dostupný zdroj vody pro jejich buněčný metabolismus a jejich růst.<sup>21</sup> Jedná se o jeden z nejvíce kritických faktorů určujících kvalitu a bezpečnost zboží uváděného na trh. Tato fyzikální veličina může výrazně ovlivnit trvanlivost, bezpečnost, texturu, chuť a vůni jídla. A mimo jiné může mít významný vliv na účinnost a soudržnost kosmetického přípravku.<sup>22</sup>

Z tohoto důvodu je v kosmetických přípravcích měřena vodní aktivita. Vodní aktivita je označována jako ( $A_w$ ), která se obvykle počítá ze vztahu Raoultova, kde je vyjádřena jako poměr tlaku vodní páry produktu k tlaku par destilované vody při specifické teplotě.<sup>14</sup>

$$A_w = \frac{P}{P_0} = \frac{n_1}{n_1 + n_2}$$

Kde  $P$  je tlak vodní páry produktu,  $P_0$  je tlak destilované vody,  $n_1$  je látkové množství vody,  $n_2$  je látkové množství rozpuštěné látky.

Vodní aktivita destilované vody je rovna 1, zatímco látka, která neobsahuje žádnou vodu, má vodní aktivitu 0, tzv. absolutně suché prostředí.<sup>15,23</sup>

Měřením vodní aktivity lze předpovědět, který z mikroorganismů může být potenciálním zdrojem kontaminace. Tato měření jsou prováděna pomocí přístrojů, které měří množství volné vody ve vzorku produktu. Z naměřených hodnot lze stanovit minimální množství vody v systému, ve kterém jsou mikroorganismy schopny růst nebo proliferovat. Přibližné hodnoty pro bakterie, kvasinky a plísně byly publikovány kolem roku 1960 a v každé dostupné literatuře se mírně liší. Je nutné brát v úvahu, že tyto hodnoty nejsou zcela hraniční.<sup>14,15</sup>

Jak již bylo zmiňováno výše, hodnoty vodní aktivity se staly významným prostředkem k určení růstu mikroorganismů v kosmetických přípravcích. Z toho důvodu Evropská Unie dle Nařízení 1223/2009 vyžaduje mikrobiologické testy, kterými mohou vyhodnotit vodní aktivitu daného přípravku. Jestliže se vodní aktivita pohybuje v rozmezí, v němž jsou

schopny proliferovat jen kvasinky a plísně, tak nejsou přidávány syntetické konzervační látky. Do formule zaváděny ingredience, které jsou schopny snižovat vodní aktivitu solí (sůl z Mrtvého moře), glykoly a polyoly (glycerol, propylen glykol a polyethylen glykol). Tyto látky jsou schopny navázat vodu a tím vytvářet méně optimální prostředí pro růst mikroorganismů. Snížení vodní aktivity ve formulaci může způsobit prodloužení lagové fáze mikrobiálního růstového cyklu, což způsobuje pokles rychlosti mikrobiálního růstu u kontaminovaného mikroorganismu.

Měření vodní aktivity je zvláště užitečné pro atypické formulace, kterými mohou být emulze voda v oleji, bezvodé produkty jako rtěnky nebo pudry, nebo vodní extrakty. V **Tabulce 1** jsou uvedeny příklady typických hodnot vodní aktivity v kosmetických přípravcích a výskyt typických mikroorganismů pro dané prostředí.<sup>14, 16</sup>

**Tabulka 1.** Hodnoty vodní aktivity.

Vodní aktivita	Kosmetické přípravky	Mikroorganismy schopny proliferace
0,96—0,99	Šampony, emulze, krémy, odličovače	Gram+ a Gram- bakterie ( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> ), plísně, kvasinky
0,90—0,95	Šampony, vlasové kondicionéry, lotiony, krémy, některé druhy zubních past	Několik Gram- a většina Gram+ bakterií ( <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Bacillus species</i> ), plísně, kvasinky
0,80—0,89	Většina zubních past, krém na ruce, rtěnky, mýdlo	Gram+ bakterie ( <i>Staphylococcus aureus</i> ), plísně, kvasinky
0,70—0,79	Mýdla	Halofilní bakterie, plísně, kvasinky
0,65—0,69	Antiperspiranty	Osmotolerantní kvasinky
< 0,60	Pudry	—

Bakterie vyžadující vodní aktivitu pohybující se v prostředí od 0,99—0,86. Hodnota 0,86 je zcela typická pro *Staphylococcus aureus*. Oproti tomu může nastat opačný případ, kdy mnoho grampozitivních a gramnegativních bakterií různých druhů není schopno proliferovat

v přípravku, jehož vodní aktivita je nižší než 0,91. Minimální vodní aktivita plísní je pozorována v rozmezí 0,61–0,62, růst při tak nízké hodnotě vodní aktivity je extrémně pomalý. Obecně je hodnota vodní aktivity 0,6 považována za hraniční bod proliferace všech mikrobiálních druhů.<sup>14</sup>

## 5.2 Teplota

Teplota zasahuje do života mikroorganismů tak, že může stimulovat nebo inhibovat růst, měnit morfologii organismu, jeho metabolismus, jejich patogenitu a v některých případech působí jako sterilizační a konzervační činidlo. Zrychlení metabolických procesů syntézy i štěpení a vzrůst inaktivace enzymů bakterií zásadně ovlivňuje zvyšování teploty.<sup>24</sup> Pro každý organismus jsou klíčové tři body:

- Teplotní minimum – organismus se rozmnožuje nejnižší detekovatelnou rychlostí růstu
- Optimální teplota – charakteristická nejvyšší rychlostí růstu a metabolických pochodů
- Maximální teplota – maximální možná teplota, při níž je organismus schopen vykonávat životní funkce

Podle vztahu k teplotě je možné mikroorganismy rozdělit do tří skupiny, pro něž jsou charakteristické právě průměrné teploty pro aktivitu buňky:

- Psychofilní organismy – optimální teplota růstu pod 20 °C. Poměrně intenzivní růst při 0–5 °C.
- Mezofilní organismy – rostou nejlépe v teplotním rozmezí 20–40 °C. Jedná se o nejpočetnější skupinu mikroorganismů.
- Termofilní organismy – jsou charakteristické optimální teplotou růstu nad 45 °C, avšak většina z nich vyžaduje teplotu 50–60 °C. Mikroorganismy striktně termofilní nerostou při teplotách pod 30 °C.<sup>7</sup>

## 5.3 Vliv pH na růst mikroorganismů

Růst mikroorganismů i jejich biochemická činnost jsou silně ovlivněny koncentrací vodíkových iontů v prostředí. Každý mikrobiální druh se může rozmnožovat pouze v určitém rozmezí pH. Mikrobiologové kosmetického průmyslu se nejvíce zabývají neutrofilními



mikroorganismy. Neutrofilny rostou při pH 5,5 až 8 a jsou považovány za potenciální patogeny.<sup>2</sup>

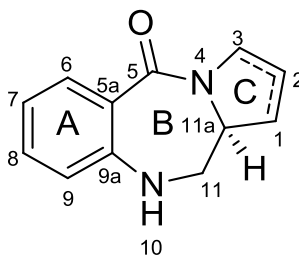
Mnoho mikroorganismů je ochotno proliferovat v rozmezí pH 4 až 10. Optimální rozmezí hodnot pH pro růst bakterií je 5,5 až 8,5. Příkladem typické bakteriální buňky je *Escherichia coli* s optimální hodnotou pH 6 až 8,5. Oproti tomu, vhodné prostředí pro růst plísní a kvasinek se nachází v rozmezí pH hodnot 4 až 6.

Formulace s pH nižším než 4 nebo pH vyšší jak 10 je schopna zabránit proliferacím nebo dlouhodobému přežívání mikroorganismů v přípravku. Takové extrémní pH přípravku zabraňuje mikrobiální proliferaci nebo přežití tím, že způsobí buď metabolické poškození mikrobiálních buněk, nebo buněčný stres, kterým mikroorganismy vynakládají větší množství energie pro udržení intracelulárního pH. A z těchto důvodů plyne, že do formulací s extrémním pH není nutné přidávat konzervační činidla<sup>14</sup>, protože přípravek s extrémním pH může mikroorganismy usmrtit.<sup>13</sup>

## 6 VÝSKYT PYRROLOBENZODIAZEPINOVÝCH DERIVÁTŮ V PŘÍRODĚ

Živá příroda je, pomineme-li samotnou cílenou syntézu jednotlivých chemických individuí, významným zdrojem molekul, které mnohdy vykazují různorodé a velmi zajímavé biologické účinky. Jelikož z říše rostlin nebylo doposud izolováno mnoho sloučenin s pyrrolobenzodiazepinovou strukturou, bude tato část věnována sekundárním metabolitům mikroorganismů. V mnoha případech jsou tyto sekundární metabolity využívány jako výchozí bod k objevování a vývoji mnoha dalších medikamentů.<sup>25</sup>

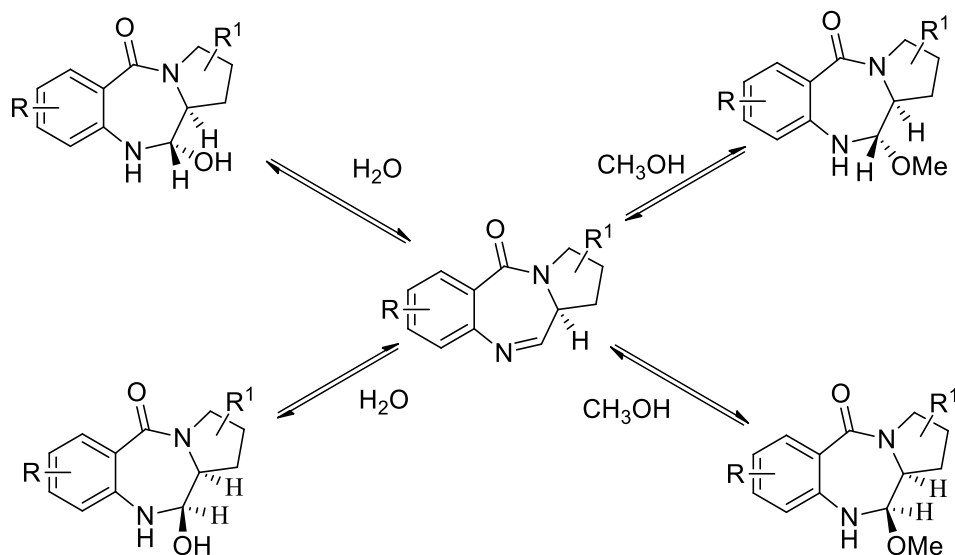
Všechny izolované deriváty pyrrolobenzodiazepinu (PBD) ve svých strukturách obsahují vzájemně spojené tři cykly (**Obrázek 1**), a to (ne)substituované aromatické jádro (A), diazepin-5-onový kruh (B) a pyrrolidinový kruh (C).



**Obrázek 1.** Obecná struktura izolovaných PBD.

S různým množstvím a typem substituentů kruhů A, B a C poskytují PBD jak chemickou, tak i biologickou rozmanitost. Další klíčovou roli v různorodosti PBD hraje přítomnost a uspořádání dvojných vazeb v pyrrolidinovém kruhu. V tomto spojení se PBD obvykle dělí na nasycené (v pyrrolidinovém kruhu nejsou násobné vazby), nenasycené (v pyrrolidinovém kruhu se vyskytují, nejčastěji mezi atomy uhlíku C-2 a C-3, dvojně vazby) a exocyklicky nenasycené. Zvláštní pozornost je také nutné věnovat uspořádání mezi atomy N-10 a C-11, respektive povaze substituentů vázaných v poloze C-11. Nejčastěji se v přírodě vyskytují deriváty PBD s iminovým uskupením (atomy N-10 a C-11). Ovšem tato dvojná vazba je v protických rozpouštědlech značně nestabilní. Bylo zjištěno, že voda a methanol s ní relativně snadno interagují a nastává tak rovnováha mezi iminovou formou a produkty jejich adice (**Schéma 1**). Z toho důvodu je nezbytné se při izolaci neznámých PBD z přírodních zdrojů při jejich následné identifikaci vyvarovat protickým rozpouštědlům. Před tímto

zjištěním, byla mnohdy špatně určena struktura PBD, a proto je množné ve starší literatuře najít pro stejnou sloučeninu různé vzorce. Nejvíce stabilní jsou deriváty PBD ve formě hemiaminalu (v poloze C-11 je vázaná hydroxylová skupina).



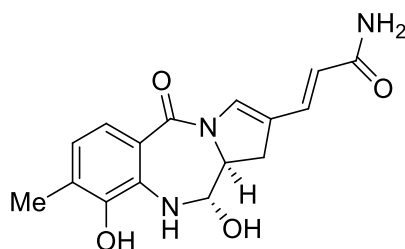
**Schéma 1.** Epimerizace C-11 v přítomnosti protického rozpouštědla.

Kombinací různých analytických metod bylo ustanoveno, že například struktura sibiromycinu a anthramycinu obsahuje v poloze C-11 hydroxylovou skupinu, oproti tomu neothramycin má v molekule uskupení iminové.<sup>26</sup> Jak již bylo zmíněno výše, deriváty pyrrolobenzodiazepinů jsou převážně sekundárními produkty mikroorganismů. Tyto látky, jelikož jsou produkovány mikroorganismy, můžeme v pravém slova smyslu zahrnout mezi antibiotika. Antibiotika jsou látky, které dokáží v minimálním množství usmrtit či potlačit růst bakterií nebo plísní za poměrně krátkou dobu. Mají-li tyto látky schopnost zabíjet bakterie nebo plísně, označují se také jako sloučeniny s baktericidním nebo fungicidním účinkem. Pokud pouze potlačují růst bakterií či plísní, hovoří se o bakteriostatickém nebo fungistatickém účinku. PBD sloučeniny jsou považovány také jako silná protinádorová terapeutika. Mimo jiné bylo zjištěno, že vykazují antibakteriální účinnost proti některým gram pozitivním bakteriím.

Mezi producenty známých sekundárních metabolitů lze zakomponovat mikroorganismy z rodu *Streptomyces*. Tyto mikroorganismy tvoří vzdušné mycelium a v době zralosti vytváří řetízky ze tří i více spor. Spory jsou nepohyblivé a produkují řadu pigmentů. Ten je

zodpovědný za zbarvení vegetativního a vzdušného mycelia. Jsou aerobní, grampozitivní a chemoorganotrofní s oxidativním typem metabolismu. Většinou jsou mezofilní, optimální růstová teplota je 25 až 30 °C. Některé druhy jsou psychrofilní nebo dokonce termofilní. Vyskytují se hojně v půdě a ve vodním prostředí.<sup>27</sup>

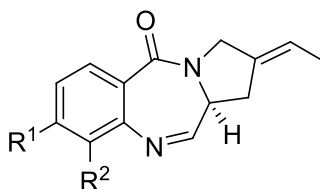
Pyrrolobenzdiazepinová antibiotika byla poprvé objevena v roce 1963, když William Leimgruber a jeho spolupracovníci izolovali anthramycin (**Obrázek 2**) ze *Streptomyces refuineus*.<sup>28</sup> Anthramycin je považován za přírodní protinádorové antibiotikum, ovšem jeho použití je limitováno značnými vedlejšími účinky.



**Obrázek 2.** Struktura Anthramycinu.

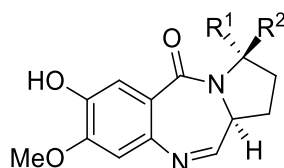
S postupným vývojem vědy bylo objeveno mnoho dalších derivátů PBD, jež byly produkovány jak streptomycety, tak i mikrokoky.

Tak například Tomaymycin ( $R^1 = \text{OMe}$ ,  $R^2 = \text{OH}$ ; **Obrázek 3**), izolován ze *Streptomyces achromogenes*, je protinádorové, antivirové antibiotikum. Antibiotikum Prothracarcin ( $R^1, R^2 = \text{H}$ ; **Obrázek 3**) bylo izolováno z kultivačního bujónu *Streptomyces umbrosus* subsp. a bylo aktivní proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím.<sup>29</sup>



**Obrázek 3.** Obecná struktura Tomaymycinu a Prothracarcinu.

Mezi další známá PBD antibiotika produkovaná bakteriemi *Streptomyces* je možné zahrnout Neothramycin A ( $R^1 = \text{OH}$ ,  $R^2 = \text{H}$ ; **Obrázek 4**) a Neothramycin B ( $R^1 = \text{H}$ ,  $R^2 = \text{OH}$ ; **Obrázek 4**). Neothramycin se vyznačuje slabou aktivitou proti některým bakteriím a houbám, ale má značnou protinádorovou aktivitu proti myším nádorům, konkrétně nádor Walker carcinosarcoma-256. Při dávkách 2 mg/kg/den 96,5% inhibice růstu nádoru byly získány 22. den po inokulaci.<sup>30</sup>



**Obrázek 4.** Optické isomery Neothramycinu.

Ze *Streptomyces sp.* byly také získány dva aktivní deriváty, jež jsou znázorněné na **Obrázku 5**, a to Chicamycin A a Chicamycin B. Postupem času bylo zjištěno, že původní derivát, produkovaný mikroorganizmy, je Chicamycin B. Druhý, jeho methoxylový analog byl získán nevhodným způsobem izolace. Nicméně obě sloučeniny vykazují nejen protinádorový účinek, ale i slabý antimikrobiální účinek proti některým gram pozitivním bakteriím.<sup>31</sup>

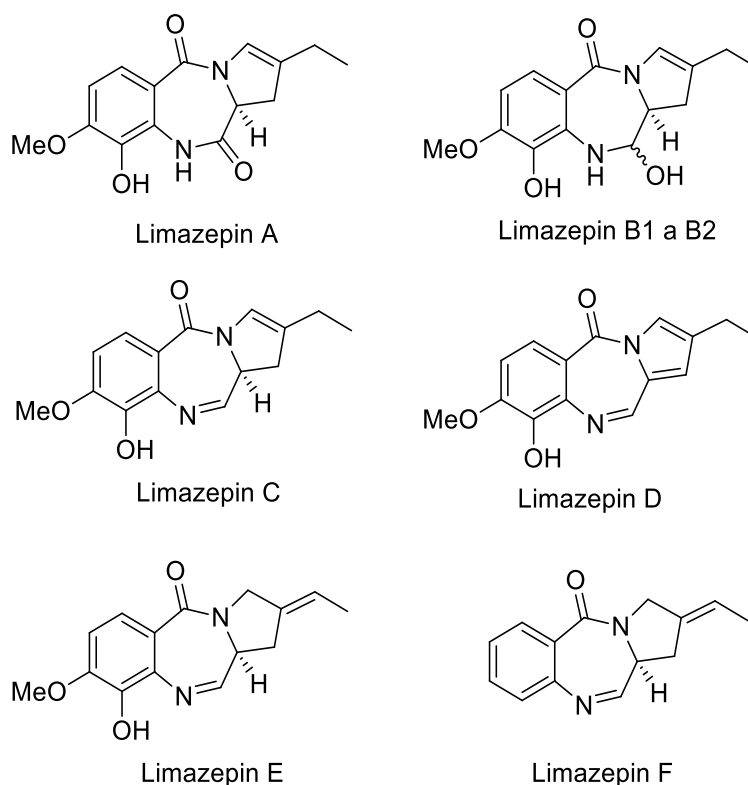


**Obrázek 5.** Chicamycin A (vlevo) a Chicamycin B (vpravo).

*Micrococcus* je další z mnoha rodů, které produkují známá antibiotika. Jedná se o sférické buňky, vyskytující se jak ve dvojicích, tak v nepravidelných shlucích. Jsou nepohyblivé, striktně aerobní a mírně halotolerantní (rostou v 5% NaCl). Mohou produkovat karotenoidní pigmenty (žluté, světle oranžové). Jelikož jsou mezofilní, pohybuje se jejich optimální růstová teplota v rozmezí od 25 do 37 °C. Primárně se vyskytují na kůži savců včetně

člověka. Dále se nacházejí v prostředí (půda, voda, vzduch) a v potravinách (maso). Nejsou považovány za patogení.<sup>27</sup>

Zahraniční autoři v roce 2009 publikovali, že z mikroorganismu *Micrococcus species* (ICBB 8177) izolovali skupinu PBD antibiotik nazvanou Limazepiny. Za krátký čas byla vydána korekce k diskutovanému článku, kde autoři uvedli, že na základě nedávné předlohy genomové sekvence kmene ICBB 8177, kterou provedla Dr. Lucie Najmanová na Ústavu mikrobiologie AV ČR v Praze, si uvědomili, že kmen ICBB 8177 není *Micrococcus sp.*, ale *Streptomyces sp.*. To ovšem na věci nic nemění, bylo objeveno sedm nových antibiotik, jež byly označeny jako Limazepiny A, B1 a B2 (izolované jako směs optických izomerů), C, D, E a F (**Obrázek 6**).<sup>32</sup>

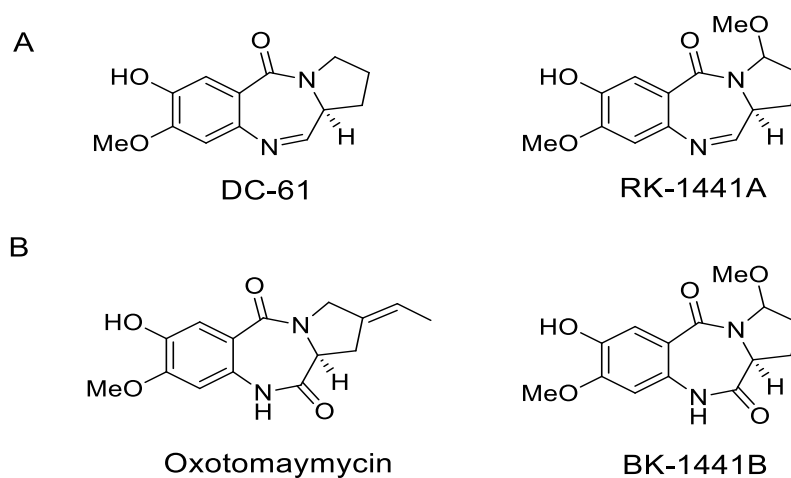


**Obrázek 6.** Struktury Limazepinů izolovaných z kmene ICBB 8177.

Zmíněné izolované Limazepiny byly testovány v různých koncentracích, při nichž byla u některých prokázána antibakteriální aktivita. Sloučeniny byly testovány metodou napuštěných disků položených na agaru s rozetřenou bakteriální suspenzí několika druhů bakterií. Limazepiny B1/B2, C a E byly testovány v koncentraci 40 µg/disk a Limazepin D

v koncentraci 30  $\mu\text{g}/\text{disk}$ . Pozitivní výsledky inhibice byly prokázány u bakterií *Staphylococcus aureus*, kdy Limazepin D vytvořil 7 mm, Limazepin E 12 mm a Limazepin B1/B2 a C dokonce 18 mm inhibiční zónu od místa aplikace disku. Vůči bakteriím *Escherichia coli* Limazepin D účinný nebyl. Ostatní, dříve uvedené, měly inhibiční aktivitu na *E.coli* srovnatelnou jako na *S. aureus* (Limazepin C a E - 10 mm inhibiční zóna, Limazepin B1/B2 - 15 mm inhibiční zóna). Mikroorganismus *Pseudomonas aeruginosa* inhibovaly pouze Limazepin D ve vzdálenosti - 9 mm a Limazepin B1/B2 ve vzdálenosti - 16 mm od disku.<sup>32</sup>

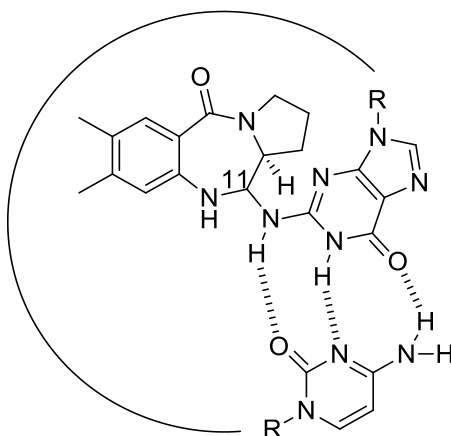
Samozřejmě je nutné podotknout, že výše uvedené deriváty PBD izolované z mikroorganismů nejsou vyčerpávajícím výčtem látek stejného typu, které je možné z živé přírody izolovat. Byli uvedeni pouze ti nejznámější zástupci velmi rozmanité skupiny PBD, u kterých byla více či méně známá biologická aktivita. Na **Obrázku 7** jsou uvedeny další příklady jiných struktur PBD, které uvedeny v rešeršní části nejsou.



**Obrázek 7.** Deriváty pyrrolobenzodiazepinů - (A) bioaktivní, (B) biologicky neaktivní.

U většiny derivátů PBD, které jsou zmíněny výše v textu a ve skupině A, uvedených na **Obrázku 7**, byly prokázány antibakteriální účinky. Zajímavé je, že deriváty PBD s oxoskupinou v poloze C-11, znázorněných ve skupině B, a Limazepinem A nevykazovaly biologickou aktivitu žádnou. Tyto oxosloučeniny jsou považovány za produkty rezistenčního mechanismu producentů RK1441A, Tomaymycinu a Limazepinu C.<sup>26</sup>

Cytotoxicita a protinádorová aktivita derivátů PBD je způsobena jejich inkluzí do DNA. Tento složitý proces je v dnešní době poměrně dobře prozkoumán. Je známo, že PBD aktivní substance se v první fázi reverzibilně poutají prostřednictvím nekovalentních interakcí, tj. vodíkovými vazbami, Van der Waalsovými silami a elektrostatickými kontakty, na různá místa buněčné DNA. Jestliže jsou tyto nekovalentní intramolekulární interakce slabé, pravděpodobně dochází k jejich přerušení, PBD se od DNA oddělí a opět se stejnými mechanizmy váže na jiných místech DNA. Tyto procesy se stále opakují do doby, kdy PBD najdou vazebné místo s nízkou energií. Preferována je sekvenční vazba na Pu-G-Pu (Pu = Purin, G = Guanin).<sup>25,28,33</sup> Dále ve druhé fázi se vytváří kovalentní vazba mezi C-11 PBD a aminoskupinou na C-2 guaninové báze, čímž jsou PBD pevně zakotveny do molekuly DNA.



**Obrázek 8.** Kovalentní spojení PBD s nukleovými bázemi.

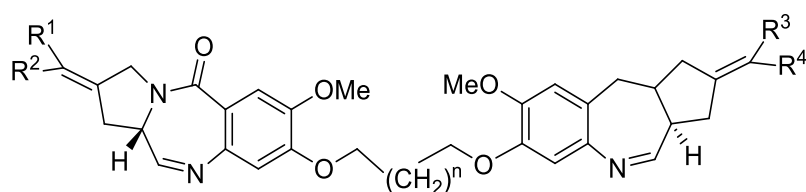
Zatímco počáteční nekovalentní interakce jsou rychlé procesy, časová náročnost pro tvorbu kovalentní vazby je variabilní v závislosti na struktuře PBD a sekvenci DNA. Tento proces může trvat 3 až 24 hodin.<sup>28</sup>

Po pochopení mechanismu účinku PBD, byla vyvíjena snaha o syntézu PBD, které budou velmi silně vázány k DNA. Za tímto účelem bylo připraveno několik tzv. PBD dimerů. Konstruovány byly tak, že obsahovaly dvě PBD jednotky propojené buď v polohách C-7 nebo C-8 alifatickým linkerem. Tyto struktury PBD dimerů poskytují dvě vazebná místa (dvakrát C-11), jež umožňují vytvářet navzájem propojené vlákna DNA. Toto zesíťování vede k větší stabilizaci DNA než u monomeru a prakticky nedochází k rozplétání dvouvláknové DNA, což znemožňuje její replikaci. Největší stabilita je uváděna u dimerů



propojených v poloze C-8. Tyto dimery mají značně velkou cytotoxicitu a antibakteriální aktivitu.<sup>33</sup> Jakmile jsou monomery nebo dimery kovalentně vázány na DNA, zprostředkují řadu biologických účinků v buňkách, včetně poškození DNA řetězce, inhibice enzymů pro zpracování DNA (např. endonukleáza, RNA polymeráza a ligáza), specifické transkripční faktory a modulace různých signalizačních cest.

Na **Obrázku 9** jsou uvedeni tři vybraní zástupci PBD derivátů, SJG-136 ( $n = 1$ ;  $R^1, R^2, R^3, R^4 = H$ ), DRG-16 ( $n = 3$ ;  $R^1, R^2, R^3, R^4 = H$ ) a ELB-21 ( $n = 3$ ;  $R^1, R^2 = CH_3$ ;  $R^3, R^4 = H$ ), u kterých byly popsány antibakteriální aktivity s různou účinností a selektivitou proti různým bakteriím. Všechny gramnegativní izoláty byly ke všem třem dimerům značně odolné ( $MIC_{90} > 16$  mg/ml), oproti tomu na všechny grampozitivní izoláty byly všechny tři dimery značně účinné ( $MIC_{90} < 1$  mg/ml). Všechny tři dimery prokázaly dobrou aktivitu proti mykobakteriím.<sup>34</sup>



**Obrázek 9.** Struktury vybraných PBD dimerů.

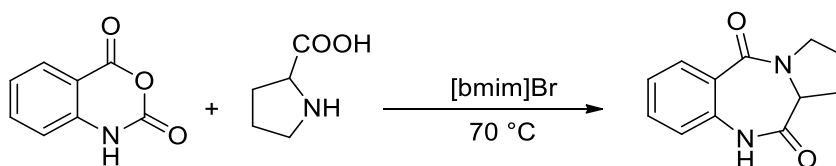
## 7 SYNTÉZA DERIVÁTŮ PYRROLOBENZODIAZEPINŮ

Pro přípravu pyrrolobenzodiazepinů byla vyvinuta řada metod, které jsou ovšem velmi složité a komplikované. Z tohoto důvodu byly vybrány jen tři syntézy, které jsou sice krátké, ale za to byl výsledný derivát pyrrolobenzodiazepinu získán s vysokým výtěžkem.

### 7.1 Ekologická syntéza v iontové kapalině

Byla vyvinuta jednoduchá chemická syntéza, ve které jsou ekologicky nepříznivá organická rozpouštědla nahrazeny více ekologicky šetrnými iontovými kapalinami (ILs). Tyto látky jsou schopny rozpouštět jak organické, tak anorganické látky a v reakci mimo jiné zastupují funkci katalyzátorů.

Jednoduchý experimentální postup je znázorněn ve **Schématu 2**, ve kterém dochází ke vzniku 2,3-dihydro-1*H*-benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-5,11(10*H*,11*aH*)-dionu kondenzací anhydridů kyseliny isatové a aminokyseliny za přítomnosti iontové kapaliny, 1-butyl-3-methylimidazolium bromidu ([bmim]Br). Syntéza probíhala při teplotě 70 °C, po dobu 45 minut. Po dokončení reakce byl získán derivát pyrrolobenzodiazepinu s výtěžkem 95 %. Směs byla promyta vodou, která byla v následujícím kroku odpařena a recyklovaný IL byl promyt diethyletherem a připraven pro nadcházející reakce. Dokonce po dalších čtyřech reakcích nedošlo k výraznému snížení aktivity iontové kapaliny a byly získány produkty s výtěžností převyšující 90 %.<sup>35</sup>

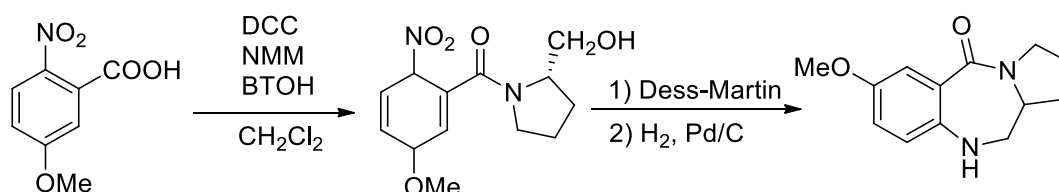


**Schéma 2.** Příprava vycházející z anhydridu kyseliny isatové a aminokyseliny.

### 7.2 Reakce kyseliny benzoové s prolinolem

V průběhu vývoje nových a přímých syntetických cest k pyrrolobenzodiazepinovému systému, byl popsán postup, ve kterém v prvním kroku reagovaly kyselina 5-methoxy-2-nitrobenzoová a pyrrolidin-2-ylmethanol za přítomnosti dicyklohexylkarbodiimidu (DCC), *N*-hydroxybenzotriazolu (BTOH) a *N*-methylmorpholinu (NMM). Reakce při laboratorní

teplotě po 12 hodinách poskytla za vzniku amid s výtěžkem 94 %. Následně byla primární hydroxylová skupina Dess-Martinovou oxidací převedena na skupinu karboxylovou, která cyklokondenzační reakcí s aminovou skupinou (vzniklou redukcí nitroskupiny) poskytuje substituovaný pyrrolobenzodiazepin (**Schéma 3**).<sup>36</sup>



**Schéma 3.** Příprava vycházející z 2-nitrobenzoové kyseliny.

### 7.3 Acylový radikálový postup

Byla nalezena zajímavá alternativa Friedel-Craftsovi reakce a to syntéza acylů a karboxamido hydrochinonů. Tato metoda představuje nový způsob tvorby acylových radikálů a má potenciál stát se jednou z nejúčinnějších. Reakce je ekonomicky výhodná, má jednoduchý postup a výsledkem syntézy jsou tricyklické sloučeniny pyrrolobenzodiazepinů.

Ve **schématu 4** je vyobrazen postup syntézy pyrrolobenzodiazepinu vycházející z derivátu pyrrolidinu a benzochinonu, které účinkem peroxodisíranu amonného a katalytického množství dusičnanu stříbrného poskytují keton, u kterého byl účinkem amoniaku na esterovou skupinu připraven amid. Ten byl následně působením anhydridu kyseliny trifluoroctové (TFAA) a triethylaminu (Et<sub>3</sub>N) zacyklen.<sup>37</sup>

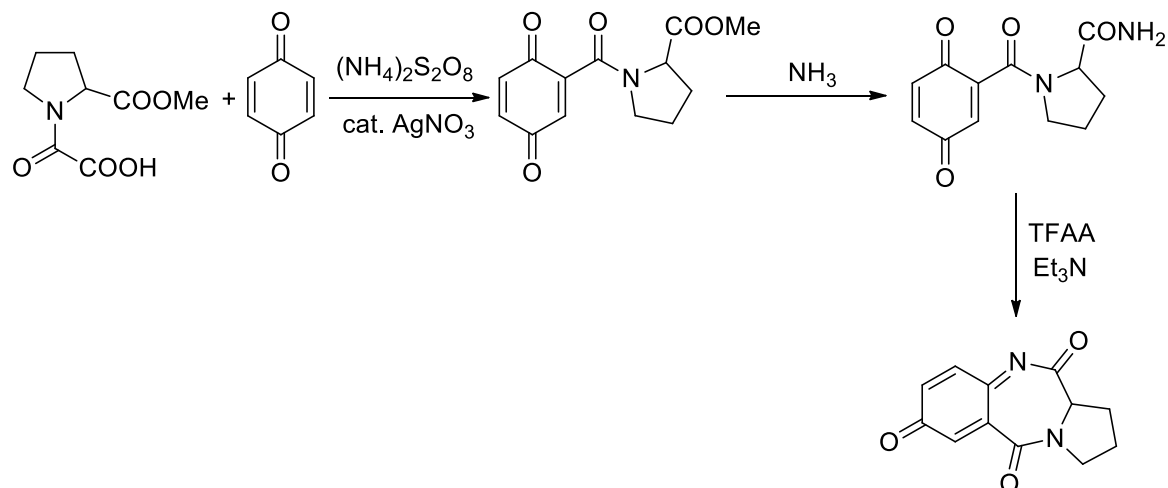


Schéma 4. Příprava vycházející z acylu a benzoquinonu.

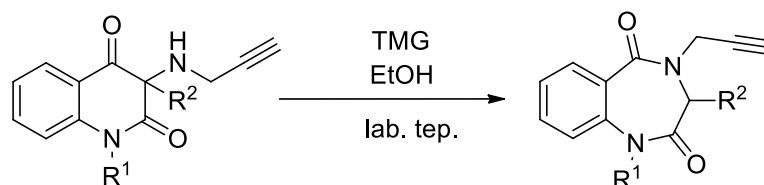
## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 8 DISKUZE A VÝSLEDKY

### 8.1 Shrnutí výsledků předchozích kolegů

Hlavním záměrem práce Ing. Mariany Molnárové bylo zavést druhý propargylový řetězec na sekundární aminovou skupinu připravených 3-(prop-2-yn-1-ylamino)chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionů. A právě v průběhu těchto experimentů došlo k prvotnímu objevu biologicky zajímavých tricyklických sloučenin, pyrrolobenzodiazepinů. Byla zpozorována tandemová reakce 3-(propargylamino)chinolindionu, která zahrnovala expanzi pyridinového kruhu doprovázenou spontánní cyklizací propargylové skupiny. Tato reakce probíhala za přítomnosti třímolárního nadbytku hydridu sodného v DMF při laboratorní teplotě. Taktéž bylo reakcí 4-propargylbenzodiazepindionu s hydridem ověřeno, že zmiňovaná tandemová reakce běží přes benzodiazepindionový meziprodukt.<sup>38</sup>

Primárním úkolem a cílem diplomové práce mé předchůdkyně Ing. Adély Lajdové bylo nalézt vhodnou metodu, kterou by bylo možné převést dříve připravené 3-(propargylamino)chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-diony na odpovídající 4-propargyl-3,4-dihydro-1*H*-benzo[*e*][1,4]diazepin-2,5-diony (**Schéma 5**).



**Schéma 5.** Přeměna 3-(propargylamino)chinolindionu.

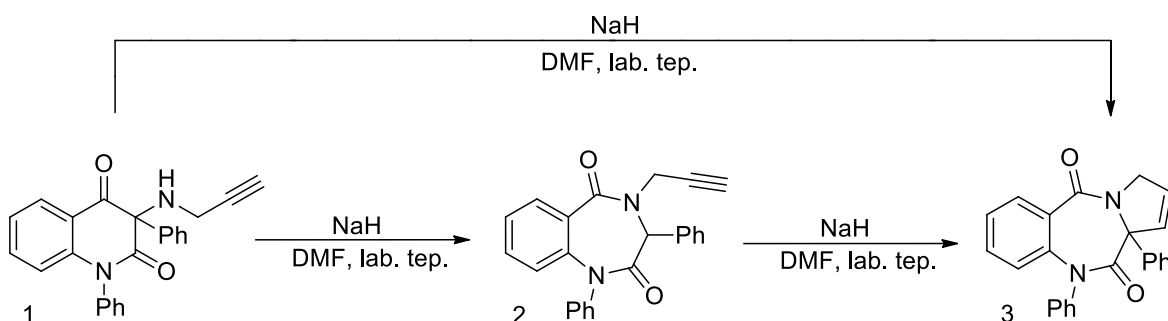
Byl proveden experiment, v němž bylo na výchozí sloučeninu za laboratorní teploty působeno dvoumolárním přebytkem TMG v prostředí ethanolu. Po 1 dnu míchání byla výchozí látka zcela spotřebována a byl získán žádaný benzodiazepindion s výbornou kvalitou a vysokým výtěžkem 85 %. Změna rozpouštědla (DMF) a teploty (90 °C) stačila ke změně průběhu reakce natolik, že v experimentu, ve kterém bylo pozorováno začlenění atomu dusíku aminové skupiny do šestičlenného heterocyklického kruhu chinolindionů, jež následně expandoval na sedmičlenný diazepinový kruh, byly neočekávaně izolovány pouze stopy benzodiazepinu (6 %) a téměř polovina teoretického množství pyrrolobenzodiazepinu (45 %). Právě tento neočekávaný vysoký výtěžek těchto biologicky zajímavých

tricyklických látek v nás evokoval myšlenku, nalézt co nejefektivnější přímou cestu k syntéze pyrrolobenzodiazepinů.<sup>39</sup>

## 8.2 Diskuse k řešení zadané problematiky

Mojí neúprosnou snahou bylo, pokusit se nalézt vhodné reakční podmínky pro přímou konverzi vybraných 3-(propargylamino)chinolin-2,4-dionů na žádané pyrrolobenzodiazepiny.

Jak je již zmiňováno výše, obdobným tématem se ve své diplomové práci zabývala i má předchůdkyně Ing. Adéla Lajdová. V jejím případě se ovšem nejednalo o přímou konverzi 3-(propargylamino)chinolin-2,4-dionů na odpovídající pyrrolobenzodiazepindiony, ale její úsilí bylo prvotně směřováno ke tvorbě benzodiazepinů a následně hledala vhodné podmínky pro jejich přeměnu na pyrrolobenzodiazepiny.<sup>39</sup> Jelikož znalost vhodných podmínek pro cyklizaci propargylové skupiny bylo i pro mne důležitou informací, pracovaly jsme na tomto tématu společně.



**Schéma 6.** Dříve pozorované přeměny 3-(propargylamino)chinolindionů.

Protože na obě prvně pozorované přeměny, uvedené ve **Schématu 6**, bylo použito stejné množství anorganické báze (NaH), bylo naší snahou učinit orientační průzkum reaktivnosti 4-propargylbenzodiazepinů, ze kterého mělo vyplynout, jaké je vhodné rozpouštědlo, potřebné množství a typ báze pro jejich přeměnu na pyrrolobenzodiazepiny.

Jednotlivé screeningové experimenty byly provedeny ve vialkách o objemu 2,5 ml, ve kterých byl sledován vliv charakterně odlišných a různě silných bází (NaH, DMAP, Et<sub>3</sub>N, MeO<sup>-</sup>Na<sup>+</sup>) na 0,01 mmol 1,3-difenyl-4-propargyl-3,4-dihydro-1*H*-benzo[*e*][1,4]diazepin-2,5-dion v prostředí pěti rozpouštědel (Be, DMF, MeOH, THF, MeCN). Průběh reakcí byl monitorován pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC).

**Tabulka 2.** Výsledky průzkumu reaktivnosti látek.

Řádek	Báze	Rozpouštědlo	R. doba	Konverze látek <sup>d</sup>
1	MeO <sup>-</sup> Na <sup>+</sup> <sup>a</sup>	MeOH	1 týden	0 %
2	DMAP <sup>a</sup>	MeOH	1 týden	0 %
3	Et <sub>3</sub> N <sup>a</sup>	MeOH	1 týden	0 %
4	Et <sub>3</sub> N <sup>b</sup>	DMF	2 týdny	0 %
5	NaH <sup>c</sup>	THF	3 dny	0 %
6	NaH <sup>c</sup>	MeCN	3 dny	75 %
7	NaH <sup>c</sup>	Be	1 týden	0 %
8	NaH <sup>c</sup>	Be/DMF (1/1)	2 h	100 %
9	NaH <sup>c</sup>	DMF	30 min	100 %

<sup>a</sup> Použito 20 ekvivalentů (vztaženo k vých. 1.); <sup>b</sup> Použity 3 ekvivalenty (vztaženo k vých. 1.); <sup>c</sup> Použit 1 ekvivalent (vztaženo k vých. 1.); <sup>d</sup> Visuální odhad dle intenzity skvrn vých. 1./produkt(y) na TLC.

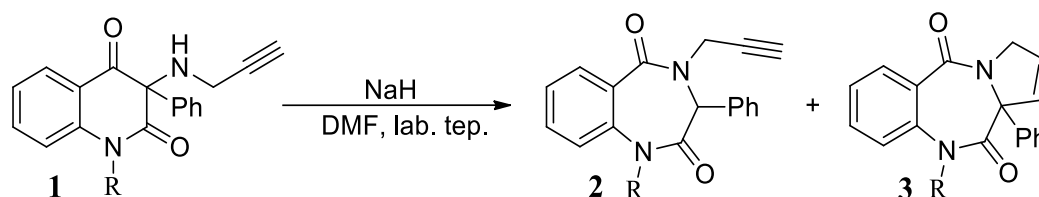
Jak je možné vypořádat z výsledků screeningových testů uvedených v **Tabulce 2**, ze sledovaných bází, je pouze účinek hydridu sodného schopný s molekulou výchozího derivátu **2** interagovat a taktéž ne vždy. V málo polárním prostředí benzenu (Be) ani během 1 týdne nenastaly v reakční směsi žádné změny (**Tabulka 2, Řádek 7**). Je-li ovšem tato reakční směs zředěna dimethylformamidem (DMF) na dvojnásobek původního objemu, reakce je po 2 h u konce a poskytuje pouze jeden, očekávaný produkt **3** (**Tabulka 2, Řádek 8**). Přídavkem ekvivalentního množství NaH do roztoku látky **2** v DMF byl pozorován stejný výsledek, ale za mnohem kratší dobu (**Tabulka 2, Řádek 9**). V polárním prostředí acetonitrilu sice NaH způsobuje značnou konverzi výchozí látky, nicméně dle TLC



v reakční směsi vzniká směs tří hlavních produktů, mezi kterými se žádaný pyrrolbenzodiazepin **2** nevyskytuje (Tabulka 2, Řádek 6).

Z uskutečněných nepreparativních experimentů, jež jsou stručně popsány výše, jasně vyplynulo, že pro cyklizaci propargylové skupiny vázané na diazepinovém kruhu je nejvíce výhodná kombinace účinku hydridu sodného v polárním prostředí neprotického DMF. Proto byly v těchto podmínkách prováděny i pokusy preparativní. Jako výchozí sloučeniny, které byly získány z laboratorních zásob, byly vybrány v poloze 1 jak substituované, tak i nesubstituované 3-fenyl-3-(propargylamino)chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-diony **1**. V poloze 3 chinolindionu byl fenylový substituent vybrán záměrně, protože již ve dřívějších studiích bylo prokázáno, že je-li v této pozici na benzodiazepindionu alkylový substituent, účinkem hydridu dochází ke vzniku značného množství degradačních produktů.

Počáteční pokusy pro přímou přeměnu 3-(propargylamino)chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionu **1a,b** na 3*H*-benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-5,11(10*H*,11*aH*)-diony **3a,b** byly provedeny účinkem ekvivalentního množství NaH při laboratorní teplotě v suchém DMF. V obou případech byla reakce dle TLC i EI-GC-MS po hodině u konce a v případě výchozí sloučeniny **1b** poskytla více než dobrý výtěžek (61 %). Kdežto v druhé reakční směsi po stejné době již taktéž nebyl přítomen původní fenylový derivát **1a**, ale po zpracování reakce a separaci dvou vzniklých produktů, byl v malém množství získán benzodiazepindion s nezacyklenou propargylovou skupinou **2a** a pyrrolbenzodiazepindion **3a** s výtěžkem 44 % (Schéma 7).



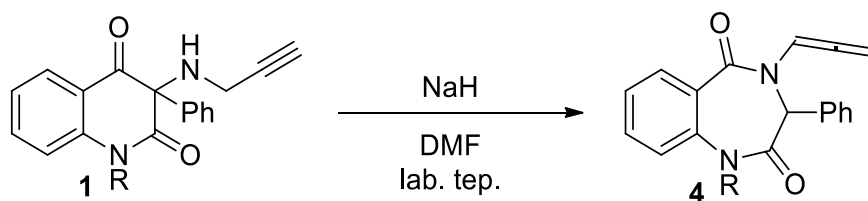
R	NaH	R. doba [h]	Produkt [%]	
			<b>2</b>	<b>3</b>
Ph	1	1	12	44
	1,5	3	6	23
Me	1	1	-	61

Schéma 7. Přeměna **1a** a **1b** na benzodiazepindion a pyrrolbenzodiazepindion.

Skutečnost, že z reakční směsi bylo izolováno 12 % benzodiazepinu **2a**, což je v našem případě meziprodukt, v nás evokovala myšlenku vyzkoušet větší množství NaH, které by působilo po delší dobu. Za tímto účelem, byla provedena analogická reakce derivátu **1a** s 1,5 násobkem látkového množství NaH, jejíž čas byl prodloužen na 3 h. Výsledky experimentu vyvolaly zklamání. Místo toho, aby větší množství NaH způsobilo úplnou konverzi 3-(propargylamino)chinolindionu **1a**, potažmo 4-propargylbenzodiazepindionu **2a**, mělo za následek vznik komplikovanější směsi, ze které byl požadovaný produkt **3a** oproti předchozímu experimentu získán v polovičním množství (Schéma 7).

Posledním derivátem, u kterého bylo zamýšleno studovat interakce jeho molekuly s hydridem sodným, byl 3-fenyl-3-(propargylamino)chinolin2,4(1*H*,3*H*)-dion (**1c**). Základní informace o chování benzodiazepindionu se stejnou substitucí s NaH poskytla opět diplomová práce Adély Lajdové,<sup>39</sup> kde bylo uvedeno jednak minimální množství (1,5 ekv.) potřebného hydridu pro isomerizaci těchto sloučenin s nesubstituovaným atomem dusíku v poloze 1 a jednak důvody k neochotě propargylové skupiny tvořit pětičlenný kruh.

V tomto kontextu byla vyzkoušena reakce sloučeniny **1c** s 1,5 násobkem látkového množství NaH v dimethylformamidu při laboratorní teplotě (Schéma 8). Překvapivě tento nadbytek hydridu po tak dlouhé době dle TLC nezpůsobil u výchozí látky žádné výraznější změny, proto bylo do reakční směsi přidáno další, stejně velké množství NaH, které mělo během následujících 3 h za následek absolutní přeměnu substrátu. Bylo tedy zřejmé, že 1,5 ekvivalentu NaH ve vztahu k látce **1c** nebylo dostačující, a proto byly provedeny ještě dva experimenty, v nichž původní množství hydridu bylo navýšeno na 2 a 3 ekvivalenty.



R	NaH	R. doba [h]	Produkt [%]
H	1,5+1,5	1,5 dne+3h	27
	3	2 h	20
	2	4 h	16

Schéma 8. Přímá konverze **1c** na allenylový derivát benzodiazepinu.

Z výsledků uvedených v tabulce **Schématu 8** je možné vidět, že se zvyšováním množství NaH dochází ke zkracování reakčního času, nicméně nemá výrazný vliv na výtěžek žádaného 4-allenylbenzodiazepindionu **4**. Možná je spíše výhodné celkové množství NaH přidávat postupně v menších dávkách. Tato úvaha, jež vyplynula z výsledků uvedených v prvním a druhém řádku tabulky, je ovšem pouze hypotetická, protože se nezakládá na experimentálně podložených datech.

## 9 CHARAKTERISTIKA PŘÍSTROJOVÉHO VYBAVENÍ A INSTRUMENTÁLNÍCH METOD

Použitá rozpouštědla a reagenty byly zakoupeny z komerčních zdrojů (Fisher Scientific, Sigma Aldrich, VWR).

Průběhy reakcí byly monitorovány za pomoci tenkovrstvé chromatografie (TLC), jež jsou tvořeny hliníkovými destičkami s nanesenou vrstvou silikagelu (Algrum® SIL G/UV<sub>254</sub>; 220–240 mesh; Marcherey-Nagel) s fluorescenčním indikátorem pro UV 254 nm.

Sloupcová chromatografie byla provedena za použití silikagelu Fluka Silica gel 60, 220–240 mesh s velikostí částic 35–75 μm, velikost pórů 60 Å. Teploty tání byly měřeny na Koflerově bloku a nejsou korigovány.

Infračervená spektra byla naměřena pomocí FIT-IR spektrometru Alpha (Brucker Optik GmbH Ettlingen) metodou KBr tablet.

## 10 DETAILNÍ POPIS SYNTETICKÝCH POSTUPŮ A STRUKTURNÍ CHARAKTERISTIKY PŘIPRAVENÝCH SLOUČENIN

### 10.1 Bazicky indukované přesmyky 3-(propargylamino)chinolin-2,4(1*H*,3*H*)-dionů

K roztoku výchozích 3-(propargylamino)chinolin-2,4-dionu **1** (1 mmol) v DMF (5 ml) byl za laboratorní teploty přisypán NaH (v případě **1a,b** 1 mmol, v případě **1c** 3 mmol.). Získaná suspenze byla míchána při laboratorní teplotě po dobu uvedenou v tabulce **Schématu 6 a 7**. Po ukončení reakce byla reakční směs zředěna 20 ml ledové vody. Získaný opalescenční roztok byl následně převeden do dělicí nálevky, ve které byl extrahován 5 × 15 ml EtOAc. Organické podíly byly následně spojeny, vysušeny Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, přefiltrovány a odpařeny do sucha na RVO. Takto získané surové produkty byly rozpuštěny v malém množství benzenu a poté byly s využitím vhodné mobilní směsi (PE/EtOAc; 5/1, 5/2, 5/3; v/v) chromatograficky čištěny na sloupci silikagelu. Následně byly chromatograficky čisté produkty **2**, **3** nebo **4** byly krystalizovány z vhodného rozpouštědla.

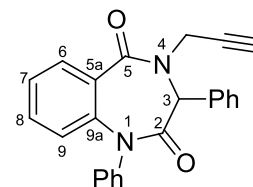
#### 1,3-Difenyl-4-(prop-2-yn-1-yl)-3,4-dihydro-1*H*-benzo[*e*][1,4]diazepin-2,5-dion (**2a**)

Bílá krystalická látka;  $t_f = 169\text{--}173\text{ }^\circ\text{C}$  (EtOAc);  $R_f = 0,25$  (38 % EtOAc v PE).

IČ spektrum (tableta KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 3231, 2117, 1679, 1639, 1602, 1465, 1425, 1345, 1256, 1240, 1152, 709, 562, 516.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): spektrum shodné s literaturou.<sup>39</sup>

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): spektrum shodné s literaturou.<sup>39</sup>



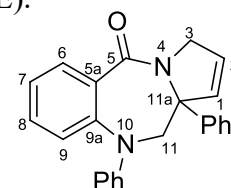
#### 10,11a-Difenyl-3*H*-benzo[*e*]pyrrolo[1,2-*a*][1,4]diazepin-5,11(10*H*,11a*H*)-dion (**3a**)

Bílá pevná látka,  $t_f = 224\text{--}227\text{ }^\circ\text{C}$  (EtOAc);  $R_f = 0,24$  (38 % EtOAc v PE).

IČ spektrum (tableta KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 1694, 1644, 1623, 1490, 1458, 1410, 1328, 1259, 1166, 1128, 1090, 1002, 976, 899, 752, 720, 696, 608, 516.

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): spektrum shodné s literaturou.<sup>39</sup>

<sup>13</sup>C NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): spektrum shodné s literaturou.<sup>39</sup>

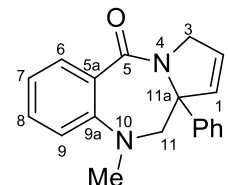


**11a-Fenyl-10-methyl-3H-benzo[e]pyrrolo[1,2-a][1,4]diazepin-5,11(10H,11aH)-dion  
(3b)**

Bílá pevná látka,  $t_f = 213\text{--}217\text{ }^\circ\text{C}$  (EtOAc);  $R_f = 0,25$  (6 % EtOAc v  $\text{CHCl}_3$ );  $R_f = 0,44$

(30 % EtOAc v PE)

IČ spektrum (tableta KBr),  $\text{cm}^{-1}$ : 1490, 1409, 1359, 1310, 1276,  
1262, 1224, 1124, 1084, 1050, 1002, 972, 895, 851, 761, 686, 610,  
532, 426.



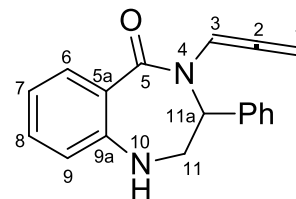
$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ): spektrum shodné s literaturou.<sup>39</sup>

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ): spektrum shodné s literaturou.<sup>39</sup>

**3-Fenyl-4-(propa-1,2-dien-1-yl)-3,4-dihydro-1H-benzo[e][1,4]diazepin-2,5-dion**

Bílá pevná látka,  $t_f = 178\text{--}183\text{ }^\circ\text{C}$  (EtOAc);  $R_f = 0,23$  (30 % EtOAc v PE)

IČ spektrum (Tableta KBr),  $[\text{cm}^{-1}]$ : 1685, 1645, 1606, 1583,  
1487, 1449, 1409, 1294, 1245, 1229, 1159, 1082, 1032, 894, 864,  
802, 755, 640, 541, 489.



$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ): spektrum shodné s literaturou.<sup>39</sup>

$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ ): spektrum shodné s literaturou.<sup>39</sup>

## ZÁVĚR

Hlavním úkolem a cílem mé bakalářské práce bylo nalézt vhodné reakční podmínky pro přímou syntézu 3-propargylaminochinolin-2,4-dionu na deriváty pyrrolobenzodiazepinu.

Před zahájením syntézy, byly provedeny nepreparativní pokusy zaměřené na ochotu cyklizace alkynylové skupiny 4-propargylbenzodiazepinů. Výsledky pokusů byly nápomocny při hledání vhodného rozpouštědla a dostatečně silné báze, která by reakci iniciovala. Průběhy jednotlivých reakcí byly monitorovány za pomoci tenkovrstvé chromatografie a plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Vyhodnocení výsledků vedlo k závěru, že pro přeměnu 4-propargyl-3,4-dihydro-1*H*-enzo[*e*][1,4]diazepin-2,5-dionů na deriváty pyrrolobenzodiazepinu je vhodná pouze kombinace dimethylformamidu a hydridu sodného.

Po nalezení vhodného rozpouštědla a báze byly provedeny experimenty na třech derivátech 3-(propargylamino)chinolin-2,4-dionu vzájemně lišících se substitucí na atomu dusíku v poloze 1. Dva z nich, fenylový a methylový derivát, poskytl nejlepší výtěžky žádaných pyrrolobenzodiazepindionů hodinovou interakcí s ekvimolárním množstvím hydridu sodného. Vyšší množství NaH a delší čas expozice měly za následek tvorbu značného množství vedlejších látek, což v konečném důsledku způsobilo daleko složitější izolaci produktu z reakční směsi a tudíž konečné výtěžky pyrrolobenzodiazepinů byly přibližně poloviční.

Následné pokusy s derivátem nemajícím na atomu dusíku žádný substituent v podstatě také dopadly podle očekávání. Při dvojnásobném molárním nadbytku NaH a vyšším docházelo během několika hodin k expanzi pyridinového kruhu chinolindionu a následně k isomerizaci propargylového řetězce na skupinu s kumulovaným systémem dvojných vazeb, skupinu allenylovou.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

O/V	Olej ve vodě
V/O	Voda v oleji
CFU	Jednotky tvořící kolonie
PBD	Pyrolobenzodiazepin
NaCl	Chlorid sodný
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
RNA	Ribonukleová kyselina
MIC <sub>90</sub>	Minimální koncentrace inhibující 90 % testovaných kmenů příslušného bakteriálního druhu
ILs	Iontová kapalina
DCC	Dicyklohexylkarbodiimid
BTOH	<i>N</i> -hydroxybenzotriazol
NMM	<i>N</i> -methylmorpholin
TFAA	Anhydrid kyseliny trifluoroctová
Et <sub>3</sub> N	Triethylamin
DMF	Dimethylformamid
TMG	N, N, N', N'-tetramethylguanidin
MeO <sup>-</sup> Na <sup>+</sup>	Methoxid sodný
Be	Benzen
DMAP	4-(dimethylamino)pyridin
MeOH	Methanol
MeCN	Acetonitril
THF	Tetrahydrofuran
TLC	Tenkovrstvá chromatografie



---

EI-GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostním detektorem
NaH	Hydrid sodný
EtOAc	Ethyl-acetát
CHCl <sub>3</sub>	Chloroform
NMR	Nukleární magnetická rezonance
PE	Petrolether
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Síran sodný
RVO	Rotační vakuová odparka
v/v	Volume/volume
R <sub>f</sub>	Retenční faktor
DMSO	Dimethylsulfoxid

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

<b>Obrázek 1.</b> Obecná struktura izolovaných PBD.....	25
<b>Obrázek 2.</b> Struktura Anthramycinu.....	27
<b>Obrázek 3.</b> Obecná struktura Tomaymycinu a Prothracarcinu. ....	27
<b>Obrázek 4.</b> Optické isomery Neothramycinu. ....	28
<b>Obrázek 5.</b> Chicamycin A (vlevo) a Chicamycin B (vpravo). ....	28
<b>Obrázek 6.</b> Struktury Limazepinů izolovaných z kmenu ICBB 8177.....	29
<b>Obrázek 7.</b> Deriváty pyrrolbenzodiazepinů - (A) bioaktivní, (B) biologicky neaktivní. ....	30
<b>Obrázek 8.</b> Kovalentní spojení PBD s nukleovými bázemi. ....	31
<b>Obrázek 9.</b> Struktury vybraných PBD dimerů. ....	32

**SEZNAM TABULEK****Tabulka 1.** Hodnoty vodní aktivity.....22**Tabulka 2.** Výsledky průzkumu reaktivnosti látek.....39

**SEZNAM SCHÉMÁT**

<b>Schéma 1.</b> Epimerizace C-11 v přítomnosti protického rozpouštědla. ....	26
<b>Schéma 2.</b> Příprava vycházející z anhydridu kyseliny isatové a aminokyseliny. ....	33
<b>Schéma 3.</b> Příprava vycházející z 2-nitrobenzoové kyseliny. ....	34
<b>Schéma 4.</b> Příprava vycházející z acylu a benzochinonu. ....	35
<b>Schéma 5.</b> Přeměna 3-(propargylamino)chinolindionu. ....	37
<b>Schéma 6.</b> Dříve pozorované přeměny 3-(propargylamino)chinolindionů. ....	38
<b>Schéma 7.</b> Přeměna <b>1a</b> a <b>1b</b> na benzodiazepindion a pyrrolbenzodiazepindion. ....	40
<b>Schéma 8.</b> Přímá konverze <b>1c</b> na allenylový derivát benzodiazepinu. ....	41

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

---

- <sup>1</sup> Barel, A. O. *Handbook of cosmetic science and technology* **2001**. ISBN 0-8247-0292-1
- <sup>2</sup> Geis, Philip A. *Cosmetic microbiology: a practical approach. 2nd ed.* **2006**. ISBN 978-0-8493-1453-7.
- <sup>3</sup> *Cosmetics Europe the personal care association. Cosmetics Europe the personal care association*[online]. [cit. 2019-04-20]. Dostupné z: <https://www.cosmeticseurope.eu/> **2019**.
- <sup>4</sup> EU.Nařízení Evropského parlamentu a rady (ES) č. 1223/2009 ze dne 30. listopadu 2009 o kosmetických přípravcích. In: Úřední věstník Evropské unie, OLJ 324, 22.12.2009, s.59-209. Dostupné z: <http://data.europa.eu/eli/reg/2009/1223/oj>
- <sup>5</sup> Langmaier, F. *Základy kosmetických výrob* **2001**. ISBN 80-731-8016-2.
- <sup>6</sup> Kirk-Othmer *Chemical technology of cosmetics* **2013**. ISBN 978-1-118-40692-2.
- <sup>7</sup> Němec, M.; Matoulková D. *Základy obecné mikrobiologie* **2015**. ISBN 978-80-210-7923-6.
- <sup>8</sup> Buňková, L. *Základy obecné mikrobiologie: pro studenty kombinovaného studia. Vyd. 1.* **2006**. ISBN 80-7318-487-7r.
- <sup>9</sup> Bednář, M. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie* **1996**. ISBN 80-238-0297-6.
- <sup>10</sup> Jankovský, L. *Viry, prokaryota, řasy, houby a lišejníky: přehled systému, fytoogeneze a ekologie* **1997**. ISBN 80-210-1555-1.
- <sup>11</sup> Hrstka, M. *Obecná biologie. Vyd. 2.* **2007**. ISBN 978-802-1434-646.
- <sup>12</sup> Rosypal, S. *Obecná bakteriologie* **1981**.
- <sup>13</sup> Šilhánková, L. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology* **2008**. ISBN 978-802-0017-031.
- <sup>14</sup> Romanowski, P.; Schueller, R., *Beginning cosmetic chemistry: practical knowledge for the cosmetic industry. 3rd* **2009**. ISBN 978-1-932633-53-5.
- <sup>15</sup> Buňková, L. *Mikrobiologie potravin a kosmetiky* **2012**.

- 
- <sup>16</sup> Dostálová, T. *Diplomová práce, Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně* **2015**.
- <sup>17</sup> Orth, Donald S. *Insights into cosmetic microbiology* **2010** ISBN 978-1932633627.
- <sup>18</sup> Neza, Ed. *Microbiologically Contaminated and Over-Preserved Cosmetic Products According Rapex* **2016**, 2008–2014.
- <sup>19</sup> Barel, A. O.; Paye, M.; Maibach, H. I. *Handbook of cosmetic science and technology* **2001**. ISBN 08-247-0292-1.
- <sup>20</sup> Hanek, R. *Materiály I pro studijní obor Kosmetička* **2011**. ISBN 978-80-7333-085-9.
- <sup>21</sup> Orth, Donald S. *Cosmetic and drug mikrobiology* **2006**. ISBN 08-493-7266-6.
- <sup>22</sup> Steinberg, D. C. *Preservatives for cosmetics* **2012**. ISBN 978-1-932633-94-8.
- <sup>23</sup> Kozłowski, A. *Formulating strategies in cosmetic science* **2009**. ISBN 978-1932633528.
- <sup>24</sup> Ambrožová, J. *Mikrobiologie v technologii vod* **2004**. ISBN 978-807-0805-343.
- <sup>25</sup> Wang, S.; Fang, K. *Journal of Medicinal Chemistry* **2015**, 58, 6678–6696.
- <sup>26</sup> Gerratana, B. *Medicinal Research Reviews* **2012**, 32, 254–293.
- <sup>27</sup> Sedláček, I. *Taxonomie prokaryot* **2007**. ISBN 978-80-210-4207-0.
- <sup>28</sup> Mantaj, J.; Jackson, P.J.M. *Angewandte Chemie International Edition* **2017**, 56, 462–488.
- <sup>29</sup> Mori, M.; Uozomi, Y. *Tetrahedron* **1986**, 42, 3793–3806.
- <sup>30</sup> Hisamats, T.; Uchida, S. *The Journal of Antibiotics* **1980**, 71, 308–12.
- <sup>31</sup> Kondo, S.; Ohno, M. *The Journal of antibiotics* **1997**, 30, 340–343.
- <sup>32</sup> Fotso, S.; Zabriskie, T.M. *Journal of Natural* 2009, 72, 690–695.
- <sup>33</sup> Wilson, S. C.; Howard, W.P. *Journal of Medicinal Chemistry* **1999**, 42, 4028–404.
- <sup>34</sup> Hadjivassileva, T.; Thurston, D. E. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **2005**, 56, 513–218.
- <sup>35</sup> Jadidi, K.; Ghahremanzadeh, R. *Chemical Monthly* **2008**, 139–1229.

---

<sup>36</sup> Kraus, G. A.; Melekhov, A. *Tetrahedron* **1998**, 11749–1754.

<sup>37</sup> Melekhov, A.G. *Retrospective Theses and Dissertations, Iowa State University* **1999**.

<sup>38</sup> Molnárová, M. *Diplomová práce, Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně* **2015**.

<sup>39</sup> Lajdová, A. *Diplomová práce, Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně* **2017**.