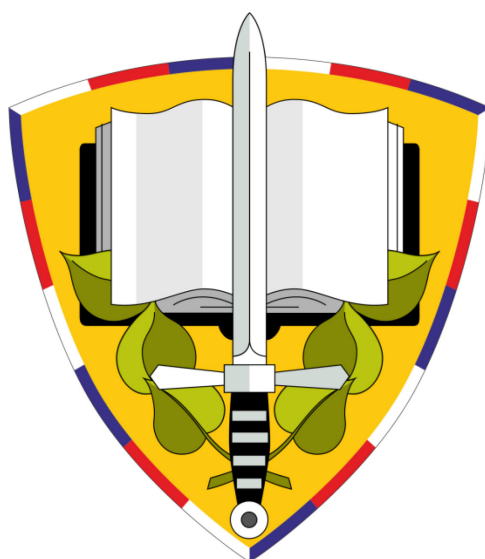


UNIVERZITA OBRANY V BRNĚ
FAKULTA VOJENSKÉHO ZDRAVOTNICTVÍ

Doktorský studijní program:

Preventivní medicína a ochrana veřejného zdraví



DISERTAČNÍ PRÁCE

Název: Sloučeniny s potenciálními antimikrobiálními účinky

Zpracoval: Mgr. Aneta Marková

Školitel: doc. PharmDr. Ondřej Soukup, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ 2022

Písemné zadání disertační práce

Aneta Marková

Stanovení tématu disertační práce

Student/ka: Mgr. Aneta Marková

Stanovené téma disertační práce: **Sloučeniny s potenciálními antimikrobními účinky.**

Klíčová slova v ČJ (5-10): Syntéza, kvarterní amoniové soli, dezinfekce, dekontaminace, antimikrobní působení, biofilmy

Klíčová slova v AJ (5-10): Synthesis, quaternary ammonium salts, disinfection, decontamination, antimicrobial effect, biofilms

Stručná anotace disertační práce v ČJ (v rozsahu 5 řádků):

Cílem disertační práce je příprava a testování nových sloučenin odvozených od dusíkatých heterocyklů. K přípravě a identifikaci sloučenin budou použity moderní přístupy chemické syntézy a analýzy. U připravených sloučenin budou ověřeny jejich fyzikálně-chemické vlastnosti. Sloučeniny budou následně testovány na schopnost mikrobiostatického či mikrobicidního působení proti širokému spektru mikroorganismů (nosokomiální kmeny či kmeny zneužitelné jako biologická agens). Dalším dílčím cílem bude hledání širšího uplatnění pro nově připravené sloučeniny (např. eradikace biofilmů, dekontaminační schopnosti).

Stručná anotace disertační práce v AJ (v rozsahu 5 řádků):

The aim of the dissertation thesis is preparation and evaluation of novel compounds derived from nitrogen bearing heterocycles. Modern approaches to chemical synthesis and analysis will be used to prepare and identify the compounds. The physicochemical properties of novel compounds will be determined. In addition, the compounds will be tested for the microbiostatic or microbicidal effect against a wide range of microorganisms (nosocomial strains or strains misused as a biological agents). The partial goal will consist in finding of a new application for the prepared compounds (e.g. biofilm eradication, decontamination properties).

Stanovisko oborové rady:

Souhlasím – nesouhlasím*/ se stanoveným tématem disertační práce.

24.11. 2017

.....
datum

.....
předseda oborové rady

Schvaluji.

1. XII. 2017

.....
datum

prof. MUDr.  Ph.D.

.....
děkan

* / nehodící se škrtněte

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli doc. PharmDr. Ondřeji Soukupovi, Ph.D. za vedení mé disertační práce.

Dále bych chtěla poděkovat kolegům z Centra biomedicínského výzkumu FNHK za cenné rady a pomoc v průběhu mého postgraduálního studia. Jmenovitě děkuji PharmDr. Janu Markovi, Ph.D. za vedení práce v laboratoři, Mgr. Michaele Hympánové za stanovení antibakteriálních vlastností připravených látek, Mgr. Radku Slehovi za stanovení virucidní účinnosti, Ing. Marku Matulovi za změření micelární katalýzy a PharmDr. Lukáši Prchalovi, Ph.D. za HRMS analýzu všech připravených látek a konzultace. Děkuji také doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, CSc. a Ing. Janě Svobodové, Ph.D. za změření NMR spekter.

Velké poděkování patří mé rodině, která mi studium umožnila a po celou dobu mě podporovala.

Poděkování grantové podpoře

SV/FVZ201808; NV18-09-00181; NV19-09-00198, TAČR-GAMA (CTBT-PoC č.4)

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně a s použitím uvedené literatury. Dále prohlašuji, že tato disertační práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové dne

Mgr. Aneta Marková

Abstrakt

Disertační práce se zabývá syntézou a hodnocením kvartérních amoniových solí. V teoretické části popisuje chemickou strukturu těchto látek, jejich fyzikálně-chemické vlastnosti a dekontaminační schopnosti.

Experimentální část se zabývá především syntézou nových kvartérních amoniových solí, ale i rozšířením spektra o látky na bázi běžně používaných látek (soli benzoxonia). V práci je zahrnuta příprava mono-kvartérních i bis-kvartérních derivátů.

Další část experimentální práce se zaměřuje na dekontaminační schopnosti KAS, stanovení kritické micelární koncentrace jako základní fyzikálně chemické vlastnosti těchto tenzidů a stanovení cytotoxicity jako jejich základní biologické vlastnosti. Jako charakteristiky potenciálně dekontaminačních vlastností biologického charakteru byly dále zařazeny metody pro stanovení minimální inhibiční a baktericidní koncentrace na vybraných planktonních formách bakterií a stanovení minimální biofilm eradikující koncentrace na dvou bakteriálních biofilmech. Okrajově se tato práce zabývá také hodnocením antivirové účinnosti na myším cytomegaloviru a novém typu koronaviru. Výše zmíněné stanovení kritické micelární koncentrace je nezbytné pro stanovení hydrolytické účinnosti vybraných KAS na modelové organofosforové látce fenitrothion a slouží tedy k charakterizaci dekontaminačních vlastností chemického charakteru.

Připravené látky mají určité strukturní rysy, které jsou nezbytné pro jejich antimikrobiální a hydrolytickou účinnost. Jedná se především o přítomnost kvartérního dusíku, hydroxyethylových skupin a dlouhého alkylového řetězce (v případě mono-kvartérních derivátů C₁₂-C₁₆, v případě bis-kvartérních derivátů C₈-C₁₂). Látky s nejvyšší účinností jsou nejvhodnějšími kandidáty pro přípravu dekontaminačních směsí proti biologickým i chemickým činitelům.

Klíčová slova

Syntéza; kvartérní amoniové soli; dezinfekce; dekontaminace; antimikrobiální působení; biofilmy; hydrolýza

Abstract

The thesis deals with the synthesis and evaluation of quaternary ammonium salts. The theoretical part describes the chemical structure of these substances, their physico-chemical properties and decontamination capabilities.

The experimental part deals mainly with the synthesis of new quaternary ammonium salts, but also with the extension of the spectrum of commonly used substances (benzoxonium salts). The research work includes the preparation of mono-quaternary and bis-quaternary derivatives.

The following part of the experimental work focuses on the decontamination capabilities of CAS, the determination of the critical micellar concentration as a fundamental characteristic of these surfactants and the determination of cytotoxicity as their fundamental biological characteristic. Methods for determining the minimum inhibitory and bactericidal concentration on selected planktonic forms of bacteria and determining the minimum biofilm eradicating concentration on two bacterial biofilms were also included as characteristics of potentially decontaminating properties of a biological nature. This work also deals with the evaluation of antiviral activity on murine cytomegalovirus and new type of coronavirus . The above-mentioned determination of the critical micellar concentration is necessary to determine the hydrolytic activity of selected CAS on the model organophosphorus substance fenitrothion.

The prepared substances have certain structural characteristics that are necessary for their antimicrobial and hydrolytic activity. This is mainly the presence of quaternary nitrogen, hydroxyethyl groups and a long alkyl chain (in the case of mono-quaternary derivatives C₁₂-C₁₆, in the case of bis-quaternary derivatives C₈-C₁₂). The most effective substances are the most suitable candidates for the preparation of decontamination mixtures against biological and chemical agents.

Keywords

Synthesis, quaternary ammonium salts, disinfection, decontamination, antimicrobial effect, biofilms

Obsah

1 ÚVOD	14
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	16
2.1 Kvartérní amoniové soli (KAS)	16
2.1.1 Chemická struktura	16
2.1.2 Fyzikálně-chemické vlastnosti KAS	18
2.1.3 Micely.....	19
2.1.4 Antimikrobiální vlastnosti.....	24
2.1.5 Antibiofilmová aktivita KAS	27
2.2 Dekontaminace biologických a chemických agens.....	31
2.2.1 Biologická agens	31
2.2.2 Chemická agens.....	33
3 CÍL PRÁCE.....	36
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	37
4.1 Syntéza	37
4.1.1 Použité chemikálie	37
4.1.2 Tenkovrstvá chromatografie	37
4.1.3 Metoda krystalizace.....	37
4.1.4 Přístrojové vybavení.....	37
4.1.5 Syntéza derivátů (1-benzyl-1 <i>H</i> -imidazol-5-yl)methanolu	38
4.1.6 Syntéza derivátů 4-methylmorfolinu.....	41
4.1.7 Syntéza derivátů diethanolaminu 1	43
4.1.8 Syntéza derivátů diethanolaminu 2	47
4.1.9 Syntéza derivátů 3-chloropyridinu	49
4.1.10 Syntéza derivátů (1-methylpiperidin-4-yl)methanolu.....	51
4.1.11 Syntéza derivátů 1-methylpyrrolidin-3-olu.....	53

4.1.12 Syntéza derivátů triethanolaminu.....	55
4.1.13 Syntéza derivátu 1-(2-hydroxyethyl)piperidin-4-olu	56
4.1.14 Syntéza derivátu 1-(2-methoxyethyl)piperidin-4-yl)methanolu	57
4.1.15 Syntéza derivátů (1-ethylpyrrolidin-3-yl)methanolu	58
4.1.16 Syntéza derivátů (1-(2-methoxyethyl) pyrrolidin-3-yl)methanolu	60
4.1.17 Syntéza bis-kvartérního derivátu (1-benzyl-1 <i>H</i> -imidazol-5-yl)methanolu	62
4.1.18 Syntéza bis-kvartérních derivátů 1-methylpyrrolidin-3-olu.....	63
4.1.19 Syntéza bis-kvartérních derivátů (1-methylpiperidin-4-yl)methanolu..	65
4.1.20 Syntéza bis-kvartérních derivátů <i>N</i> -methyldiethanolaminu	67
4.2 Stanovení kritické micelární koncentrace	69
4.2.1 Metodika stanovení CMC	69
4.3 Hodnocení antimikrobiální účinnosti	71
4.3.1 Metodika stanovení antimikrobiální účinnosti	71
4.4 Hodnocení antivirové účinnosti	73
4.5 Stanovení cytotoxicity	74
4.6 Stanovení hydrolytické účinnosti	75
5 VÝSLEDKY A DISKUZE	77
6 ZÁVĚR.....	87
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	89

Seznam použitých zkratek

ACN – acetonitril

ATB – antibiotikum

B-agens – biologické agens

CFU – jednotky tvořící kolonie (z angl. colony forming units)

CMC – kritická micelární koncentrace

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMF – dimethylformamid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EPS – extracelulární polymerní substance

ESBLs – beta-laktamázy s rozšířeným spektrem (z angl. extended spectrum beta-lactamases)

EtOH – ethanol

HRMS – hmotnostní spektrometrie (z angl. high resolution mass spektrometry)

CHO-K1 – ovariální buňky křečka čínského (z angl. Chinese hamster ovary-subtyp)

KAS – kvartérní amoniiová sůl

LVS – živý vakcinační kmen (z angl. live vaccine strain)

MBEC – minimální biofilm eradikující koncentrace

MCMV – myší cytomegalovirus

MeOH – methanol

MHB – Mueller Hinton bujon

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MK – micelární katalýza

NMR – nukleární magnetická resonance

OD – optická denzita

PAL – povrchově aktivní látka

PBS – fosfátový pufr (z angl. phosphate buffered saline)

SARS-CoV-2 – severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

TBABr – tetrabutylamonium-bromid

TBACl – tetrabutylamonium-chlorid

TCID50 – 50% infekční dávka pro tkáňové kultury (z angl. median tissue culture infectious dose)

TLC – tenkovrstvá chromatografie (z angl. thin layer chromatography)

VL – výchozí látka

Seznam obrázků a grafů

Obrázek č. 1: Typy kvartérních amoniových solí (str. 17)

Obrázek č. 2: Změny jednotlivých veličin při dosažení CMC (str. 20)

Obrázek č. 3: Tvary micel vznikající při zvyšující se koncentraci tenzidu ve vodném prostředí (str. 22)

Obrázek č. 4: Reverzní micela v nepolárním nebo velmi slabě polárním prostředí (str. 22)

Obrázek č. 5: Sternův model mikroprostředí micely (str. 24)

Obrázek č. 6: Rozdílná struktura membrány Grampozitivních a Gramnegativních bakterií (str. 25)

Obrázek č. 7: Mechanismus účinku KAS na bakteriální cytoplazmatickou membránu (str. 26)

Obrázek č. 8: Efluxní pumpa *qacA* poháněná protony znemožňuje prostup KAS bakteriální membránou (str. 27)

Obrázek č. 9: Proces formování biofilmu (str. 29)

Obrázek č. 10: Princip metody hydrolyzy fenitrothionu (O,O-dimethyl O-(3-methyl-4-nitrofenyl)fosforothioát) (str. 73)

Obrázek č. 11: Struktury připravených KAS se zvýrazněným hydroxylakylovým uskupením (tučně modře) a aromatickou částí molekuly (tučně červeně) (str. 77)

Obrázek č. 12: Nukleofilní substituce znázorněná na látce 3b (str. 78)

Graf č. 1: Závislost vodivosti roztoku na koncentraci tenzidu (str. 68)

Reakční schéma č. 1: (str. 37)

Reakční schéma č. 2: (str. 40)

Reakční schéma č. 3: (str. 42)

Reakční schéma č. 4: (str. 44)

Reakční schéma č. 5: (str. 46)

Reakční schéma č. 6: (str. 48)

Reakční schéma č. 7: (str. 50)

Reakční schéma č. 8: (str. 52)

Reakční schéma č. 9: (str. 54)

Reakční schéma č. 10: (str. 55)

Reakční schéma č. 11: (str. 56)

Reakční schéma č. 12: (str. 57)

Reakční schéma č. 13: (str. 59)

Reakční schéma č. 14: (str. 61)

Reakční schéma č. 15: (str. 62)

Reakční schéma č. 16: (str. 64)

Reakční schéma č. 17: (str. 66)

Seznam tabulek

- Tabulka č. 1: Deriváty 1-benzyl -1*H*-imidazol-5-yl)methanolu (str. 37)
- Tabulka č. 2: Deriváty 4-methylmorfolinu (str. 40)
- Tabulka č. 3, 4: Deriváty diethanolaminu 1 (str. 42, str. 44)
- Tabulka č. 5: Deriváty diethanolaminu 2 (str. 46)
- Tabulka č. 6: Deriváty 3-chloro-pyridinu (str. 48)
- Tabulka č. 7: Deriváty (1-methylpiperidin-4-yl)methanolu (str. 50)
- Tabulka č. 8: Deriváty 1-methylpyrrolidin-3-olu (str. 52)
- Tabulka č. 9: Deriváty triethanolaminu (str. 54)
- Tabulka č. 10: Deriváty 1-(2-hydroxyethyl)piperidin-4-olu (str. 55)
- Tabulka č. 11: Deriváty 1-(2-methoxyethyl)piperidin-4-yl)methanolu (str. 56)
- Tabulka č. 12: Deriváty (1-ethylpyrrolidin-3-yl)methanolu (str. 57)
- Tabulka č. 13: Deriváty (1-(2-methoxyethyl)pyrrolidin-3-yl)methanolu (str. 59)
- Tabulka č. 14: Bis-kvartérní deriváty (1-benzyl -1*H*-imidazol-5-yl)methanolu (str. 61)
- Tabulka č. 15: Bis-kvartérní deriváty 1-methylpyrrolidin-3-olu (str. 62)
- Tabulka č. 16: Bis-kvartérní deriváty (1-methylpiperidin-4-yl)methanolu (str. 64)
- Tabulka č. 17: Bis-kvartérní deriváty N-methyldiethanolamin (str. 66)

1 ÚVOD

Synteticky připravené antimikrobiální látky jsou známy z přelomu 19. a 20. století. Do té doby bylo k ošetření ran, dezinfekci a léčbě mikrobiálních onemocnění používáno především látek přírodního původu (kúra z chinovníku na léčbu malárie, vrbová kúra na léčbu horečky, stříbro na dezinfekci vody apod.)^{1,2}.

Mezi první chemické dezinfekce se řadí chlor v plynném stavu, používaný k vykuřování nemocnic, chlorový bělicí roztok a chlorové vápno. Významnou látkou tohoto období byl fenol, objeven F. F. Rungem, který ho získal z uhlého dehtu, avšak jeho dezinfekční účinky byly publikovány až roku 1867 J. Listerem v časopise Lancet. Dále bychom mohli zmínit tzv. Lugolův roztok, připravený roku 1829 J. Lugolem smísením jodu a jodidu draselného ve vodě. Později vzniká i ethanolový roztok jodu a jodidu draselného známý jako jodová tinktura. Mezi další významné látky tohoto období patří bezesporu alkohol, peroxid vodíků, ozon, formaldehyd aj.³⁻⁵. Zásadním objevem moderní mikrobiologie je bezesporu penicilin (objeven roku 1928 A. Flamingem, poprvé podán pacientovi roku 1940), z hlediska chemie je však první chemicky připravenou látkou Salvarsan (1910 P. Ehrlich) účinný na syfilis^{6,7}. Se vznikem nových antimikrobiálních látek souvisí i vznik mikrobiální rezistence, která byla poprvé zaznamenána roku 1941, což je pouhý rok od podání penicilinu prvnímu pacientovi. Od té doby bylo připraveno obrovské množství antimikrobiálních látek s rozdílnou strukturou i aktivitou⁸.

Problém mikrobiální rezistence však stále přetrvává. Souvisí především s nadužíváním antibiotik (ATB), zvyšujícím se použitím antibiotik v potravinářském průmyslu a předepisováním širokospektrých antibiotik tam, kde stačí ATB úzkospektrá. Pro zvýšení kvality používání antimikrobiálních látek již mnoho států zavedlo tzv. antibiotickou politiku. Ta si klade za cíl, aby byla léčba účinná, bezpečná a nákladově efektivní s minimálním vzestupem rezistence^{9,10}.

Mezi látky s vysokou antimikrobiální účinností a relativně nízkým rizikem vzniku rezistence spočívající v možnosti použití vysoce účinné struktury látek ve velmi nízkých koncentracích patří kvarterní amoniové soli (KAS), jejichž antimikrobiální účinek byl popsán už v roce 1935 německým lékařem G. Domagkem. Vzhledem k mechanismu účinku KAS, tedy působení na membránu patogenních mikroorganismů, mohou tyto látky zasáhnout nejen bakterie, ale i strukturu obalených virů a většiny hub, mají tedy účinnost antibakteriální, antivirovou a antifungální^{11,12}. V poslední době byla u těchto

látek zaznamenána také schopnost rozkládat některé toxické chemické látky. Díky své struktuře jsou schopny působit jako tzv. micelární katalyzátory a usnadňovat např. hydrolýzu organofosforových sloučenin ¹³⁻¹⁶. Látky tak představují potenciálně komplexní dekontaminační činidlo.

2 TEORETICKÁ ČÁST

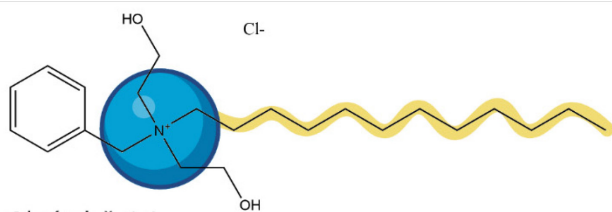
2.1 KVARTÉRNÍ AMONIOVÉ SOLI (KAS)

Kvartérní amoniové soli obsahující ve své molekule alespoň jeden lipofilní alkylový řetězec se řadí mezi kationické povrchově aktivní látky (PAL), neboli kationické tenzidy. Z anglického *surface active agents* se rovněž používá název surfaktanty. Pro své rozmanité vlastnosti nachází dlouhodobě uplatnění v různých průmyslových odvětvích (farmaceutický, chemický, potravinářský, textilní) ¹⁷⁻¹⁹.

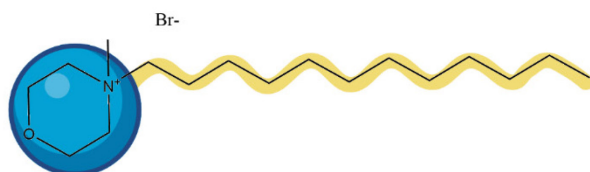
2.1.1 CHEMICKÁ STRUKTURA

KAS jsou látky amfifilní povahy, což znamená, že ve své struktuře obsahují hydrofilní i hydrofobní část a vykazují velký dipólový moment. Struktura KAS je charakterizována přítomností kladně nabitého hydrofilního dusíkového jádra. Kvartérní dusík může stát jako samostatný heteroatom se čtyřmi různými substituenty (obr. č. 1.1), nebo může být součástí heterocyklu a nést další dva různé substituenty (obr. č. 1.2). Hydrofobní část molekuly zastupuje vždy dlouhý alkylový řetězec. Výše popsaná struktura KAS je nezbytná pro jejich povrchovou aktivitu a antimikrobiální účinky (viz dále). Z praxe je známo, že nejvyšší antimikrobiální účinnost mají řetězce se sudým počtem uhlíků a délkou 10, 12, 14, 16 a 18. Ačkoliv toto platí i pro řetězce s lichým počtem uhlíků obdobné délky, jejich příprava je výrazně složitější a dražší a proto v praxi dominují řetězce se sudým počtem uhlíků. Dalšími substituenty na dusíku jsou nejčastěji methyl, hydroxymethyl, ethyl, hydroxyethyl apod ²⁰⁻²³.

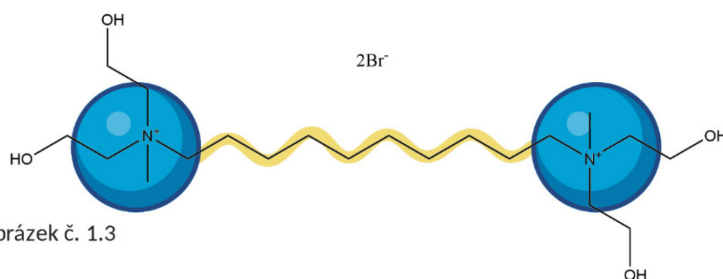
Existují však i sloučeniny se dvěma kvartérními dusíky spojenými jedním dlouhým alkylovým řetězcem (obr. č. 1.3), v této práci označené jako bis-kvartérní KAS, sloučeniny se dvěma dlouhými alkylovými řetězci na jednom dusíku (obr. č. 1.4), nebo se dvěma dlouhými alkylovými řetězci na každém dusíku spojeny krátkým či dlouhým linkerem (obr. č. 1.5). Poslední popsané látky jsou označovány jako tzv. *gemini surfactants* a často mají lepší smáčecí a povrchově aktivní vlastnosti a biologickou odbouratelnost než jejich mono-kvartérní ekvivalenty. Přípravou *gemini surfactants* a bis-kvartérních derivátů se významně sníží koncentrace potřebná pro snížení povrchového napětí a tím dochází i ke zvýšení jejich antimikrobiálních vlastností ^{24,25}.



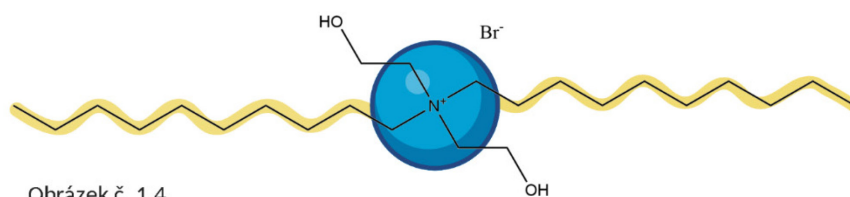
Obrázek č. 1.1



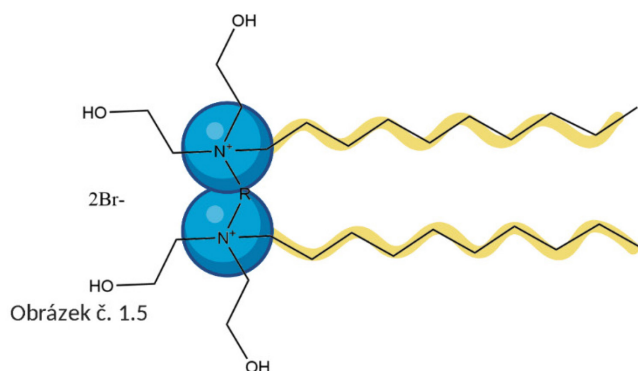
Obrázek č. 1.2



Obrázek č. 1.3



Obrázek č. 1.4



Obrázek č. 1.5

Obrázek č. 1: Typy kvartérních amoniových solí. Obrázky č. 1.1, 1.2, 1.3 a 1.4 zobrazují strukturní typy látek připravených v rámci této disertační práce, látka na obrázku č. 1.5 je pouze modelovou strukturou. U všech látek je vyznačena hydrofilní část molekuly tzv. „hlava“ (modrá) a hydrofobní část molekuly tzv. „ocas“ (žlutá). Vytvořeno pomocí BioRender.com

2.1.2 FYZIKÁLNĚ-CHEMICKÉ VLASTNOSTI KAS

Chemická struktura KAS zásadně ovlivňuje fyzikálně-chemické vlastnosti, a tedy následnou praktickou využitelnost těchto látek. Jedná se např. o povrchovou aktivitu, rozpustnost či hydrofilně-lipofilní rovnováhu závisující nejčastěji na délce uhlovodíkového řetězce. Tyto vlastnosti potom zásadně ovlivňují schopnost tvořit micely, které jsou základním předpokladem komplexní dekontaminační účinnosti KAS.

2.1.2.1 POVRCHOVÉ NAPĚTÍ

Jde o typ mezifázového napětí v systému kapalina/plyn, nejčastěji voda/vzduch. Povrchové napětí je definováno jako síla působící na jednotku plochy, označuje se symbolem γ s jednotkami $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$ dle SI. Důvodem vzniku povrchového napětí je snaha kapaliny zaujmout co nejmenší povrch a tím dosáhnout stavu s co nejnižší energií. Z vnějších faktorů má významný vliv na povrchové napětí pouze teplota. S rostoucí teplotou povrchové napětí klesá a při dosažení kritické teploty se rovná nule^{26–28}.

KAS jsou látky schopné povrchové napětí snižovat. Tento vztah je definován pomocí **Szyszkowského rovnice**, která popisuje závislost mezi koncentrací tenzidu a povrchovým napětím. Rovnice udává, že s rostoucí koncentrací tenzidu povrchové napětí klesá:

$$\frac{\gamma}{\gamma_0} = 1 - B \ln\left(\frac{c + A}{A}\right)$$

γ – povrchové napětí roztoku

γ_0 – povrchové napětí čistého rozpouštědla

c – koncentrace rozpuštěné látky

A – konstanta, stoupající s rostoucím počtem uhlíkových atomů v řetězci

B – konstanta, stejná hodnota pro danou homologickou řadu^{29,30}

Uspořádáním hydrofilních a hydrofobních částí molekuly na rozhraní fází dojde ke snížení povrchového napětí. Toto snížení je vysvětleno narušením struktury vody hydrofobní částí molekuly a vyloučení změnou orientace některých částí molekuly na rozhraní fází. V roztoku vznikne tzv. **monomolekulární vrstva**, kdy hydrofilní části drží molekulu ve vodném roztoku a hydrofobní části směřují ven^{20,31}.

Vztah mezi délkou uhlovodíkového řetězce a povrchovou aktivitou dané látky popisuje tzv. **Traubeho pravidlo**, které definoval v 80. letech 19. století německý chemik Isidor Traube³². Traubeho pravidlo říká, že s rostoucí délkou uhlovodíkového řetězce

dochází ke zvýšení povrchové aktivity. Traube dále zjistil, že molární koncentrace homologické řady PAL, která je potřebná ke snížení povrchového napětí vody, klesá zhruba třikrát s každou další přidanou CH₂ skupinou v dlouhém alkylovém řetězci. To znamená, že potřebujeme zhruba třikrát nižší koncentraci látky s delším alkylovým řetězcem, abychom snížili povrchové napětí na stejnou hodnotu jako látka ze stejné homologické řady, která je o jednu CH₂ skupinu kratší.^{33–35}

2.1.3 MICELY

Další významnou vlastností PAL je schopnost tvořit micely. Micely nachází široké uplatnění v oboru organické chemie, biochemie, biologie nebo farmaceutické technologie. Díky specifické struktuře působí jako katalyzátory některých organických reakcí, jsou schopné simulovat biologické membrány či globulární proteiny, nebo se využívají jako nosiče léčiv pro cílenou distribuci v organismu³⁶.

2.1.3.1 KRITICKÁ MICELÁRNÍ KONCENTRACE

Pro vznik micel je nezbytné dosáhnout tzv. kritické micelární koncentrace (CMC). Pod touto koncentrací jsou v roztoku molekuly PAL přítomny jako monomery. Při překročení CMC dochází ke shlukování jednotlivých monomerů a vznikají koloidní soustavy nazývané **micely**^{37,38}.

Počet monomerů tvořících jednu micelu je definován pomocí **agregačního čísla**. Agregací číslo závisí na struktuře micely, roste s rostoucí délkou uhlovodíkového řetězce a klesá se zvětšující se plochou polární části monomeru PAL tvořícího micelu. U neionických PAL se toto číslo pohybuje v řádu tisíců, zatímco micely z ionických PAL jsou tvořeny desítkami či stovkami monomerů^{38,39}.

Hodnotu CMC ovlivňuje struktura PAL, kdy s rostoucí hydrofobicitou látky dochází ke snížení CMC ve vodných roztocích. Tento vztah struktury a CMC popsal Klevens, který říká, že logaritmus CMC se lineárně snižuje s rostoucí hydrofobicitou uhlovodíkového řetězce:

$$\log(CMC) = A - Bn$$

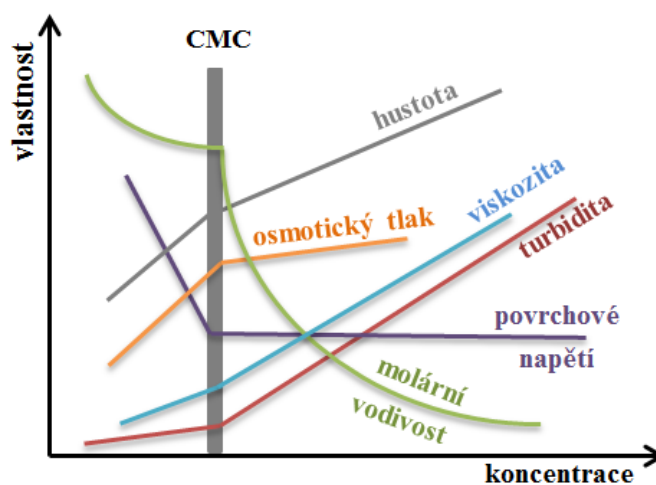
n – počet uhlíků v uhlovodíkovém řetězci

A, B – konstanty pro konkrétní homologickou řadu a teplotu^{40–42}

Hodnoty CMC se také liší u PAL s různou hydrofilní částí. Ionické PAL mají vyšší hodnoty CMC než neionické PAL se stejnou délkou uhlovodíkového řetězce⁴³.

CMC také zvyšuje rozvětvení řetězce, přítomnost dvojných vazeb nebo přítomnost polární skupiny v řetězci ⁴⁴.

Významný vliv na hodnotu CMC má také teplota. Nejnižší teplota, při které PAL tvoří micely, se nazývá **Krafftova teplota**. Pod hodnotou Krafftovy teploty jsou monomery látky nedostatečně rozpustné a vzniká nasycený roztok s koncentrací nižší, než je CMC. S rostoucí teplotou však rozpustnost látky roste a v okamžiku dosažení Krafftovy teploty dojde k překročení CMC a vzniku micel. Toto pravidlo platí pro PAL ionické, v případě neionických PAL se CMC s rostoucí teplotou snižuje ⁴⁵⁻⁴⁷.



Obrázek č. 2: Změny jednotlivých veličin při dosažení CMC. Hustota, osmotický tlak, viskozita a turbidita se po překročení CMC a vytvoření micel v roztoku zvýší. Naopak molární vodivost a povrchové napětí se sníží. Změna molární vodivosti nebo povrchového napětí se často využívá ke stanovení CMC. Převzato z Šojdrová ⁴⁸

2.1.3.2 VZNIK A STRUKTURA MICEL

Se zvyšující se koncentrací PAL ve vodném roztoku dochází k jejímu hromadění na rozhraní fází. Při nasycení povrchu kapaliny (překročení CMC) nastává spontánní agregace monomerů PAL a vytvoří se micely. Vznik micel je podmíněn přítomností hydrofobní části molekuly. Okolo dlouhého uhlovodíkového řetězce PAL dochází k uspořádání molekul vody, což má za následek snížení entropie. Při agregaci monomerů PAL do micely směřují dlouhé uhlovodíkové řetězce dovnitř micely a hydrofilní hlavy se orientují do vodného prostředí, tím dojde ke zpětnému snížení uspořádání molekul vody okolo hydrofobního řetězce, který pro ni již není přístupný, výsledkem je opětovný nárůst entropie. Ionické PAL v roztoku disociují na povrchově

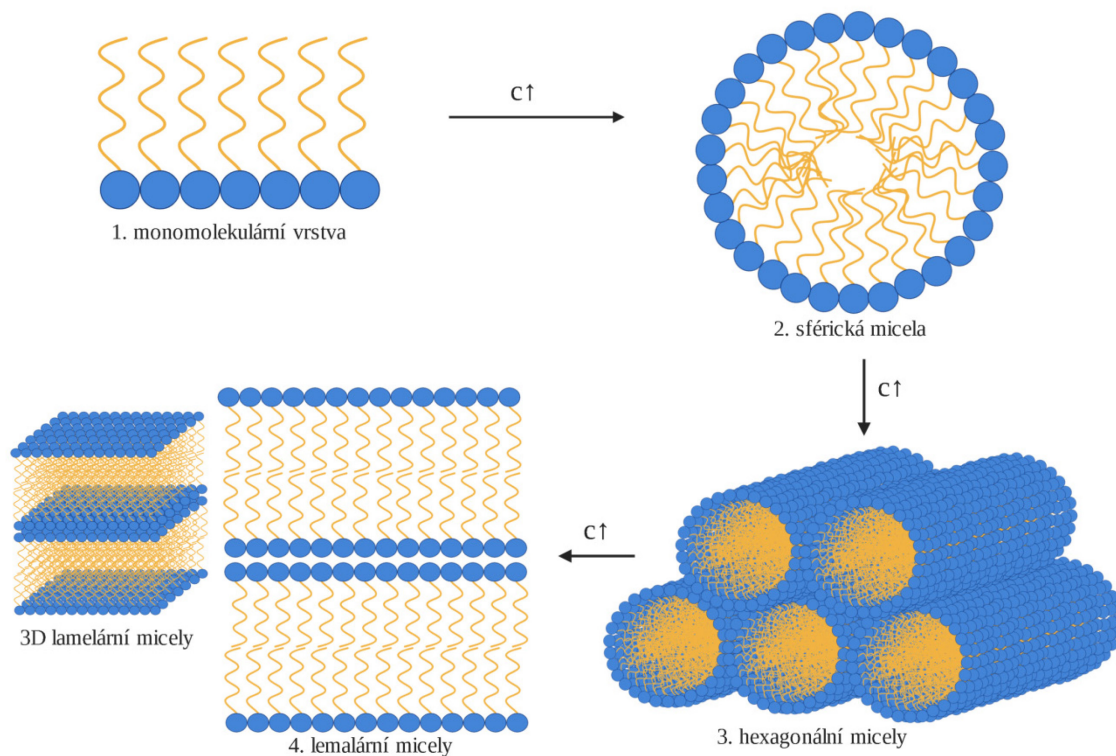
aktivní anionty nebo kationty, zatímco neionické PAL obsahují ve svých řetězcích polární neionogenní skupiny umožňující rozpustnost těchto sloučenin^{49,50}.

Micely jsou dynamické systémy, u nichž neustále dochází k výměně monomerů PAL mezi micelou a prostředím. Strukturu micely můžeme spíše odhadovat než přesně určit. Navíc výsledná velikost a tvar závisí na několika faktorech, těmi nejvýznamnějšími jsou struktura PAL, koncentrace, teplota a mezimolekulární síly^{44,51}.

Zjednodušeně můžeme říci, že s rostoucí koncentrací PAL v roztoku dochází nejprve ke vzniku **monomolekulární vrstvy** (obr. č. 3.1) na rozhraní fázi voda/vzduch, při překročení CMC dochází ke vzniku **sférických micel** (obr. č. 3.2), malých kulovitých agregátů. Tyto micely bývají označovány jako tzv. **Hartleyovy micely**, podle G. S. Hartley, který v roce 1936 navrhl jejich strukturu. Popsal je jako kulovité agregáty, jejichž poloměr je přibližně roven délce uhlovodíkového řetězce. Tento popis a schéma, ačkoli se dnes stále používá pro znázornění struktury micely, však není zcela přesný. Mnohem pravděpodobnější je, že se uhlovodíkové řetězce monomerů v micelě překrývají a polární části nejsou v tak pravidelném kruhovém uspořádání, tudíž určitá část vody částečně proniká do micely^{52,53}.

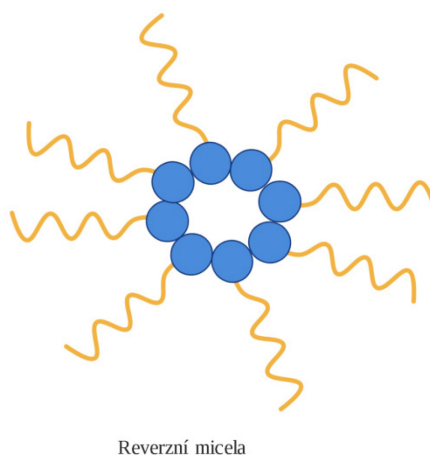
Při narůstající koncentraci PAL se polární části i uhlovodíkové řetězce začínají rovnat do vodorovné řady a vytváří tak **válcovité micely**, které se po dosažení ještě vyšší koncentrace mohou seskupovat do tzv. **hexagonálních micel** (obr. č. 3.3), jejichž struktura vychází z nematického kapalného krystalu, kdy jednotlivé válce micel jsou paralelně rovnoběžné, avšak nejsou uspořádány ve vrstvách^{54,55}.

Po přidání ještě většího množství PAL vzniknou **lamelární micely** (obr. č. 3.4), které vytváří dvě rovnoběžné vrstvy s hydrofobními uhlovodíkovými řetězci směřujícími dovnitř a hydrofilními částmi vytvářejícími svrchní plochu lamely. Tyto lamely s hydrofilní vnější vrstvou se na sebe mohou rovnoběžně skládat⁵⁶.



Obrázek č. 3: Tvary micel vznikající při zvyšující se koncentraci ($c \uparrow$) tenzidu ve vodném prostředí. Hydrofilní části PAL jsou znázorněny modře, uhlovodíkové řetězce oranžově. Vytvořeno pomocí BioRender.com

Pokud zvyšujeme koncentraci PAL v nepolárním prostředí, dochází ke vzniku tzv. **reverzních micel**, kdy hydrofilní části směřují dovnitř micely a uhlovodíkové řetězce ven do nepolárního prostředí ⁵⁷.



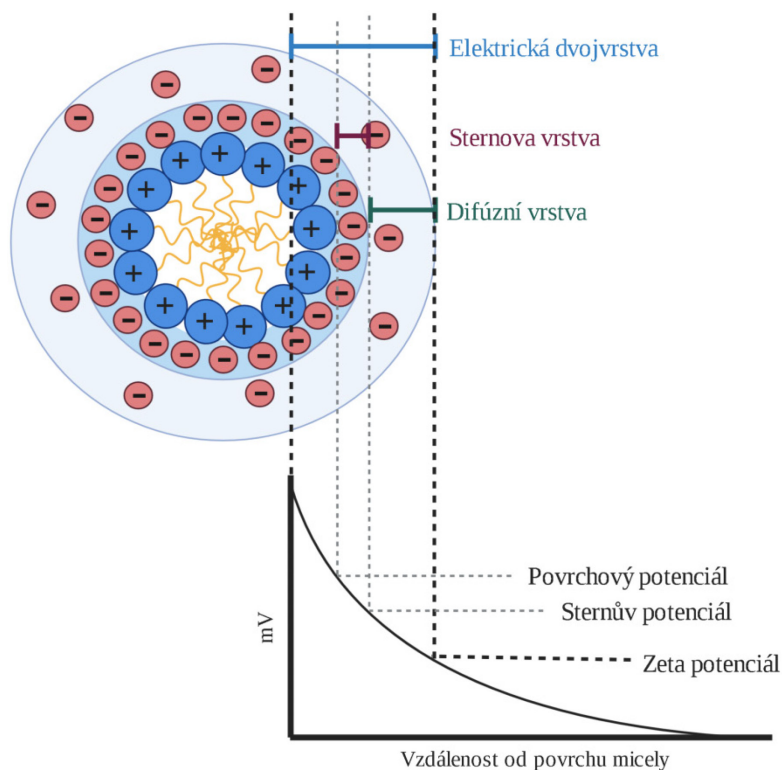
Reverzní micela

Obrázek č. 4: Reverzní micela v nepolárním nebo velmi slabě polárním prostředí. Hydrofilní skupiny jsou orientovány k sobě a vytváří tak polární prostředí, hydrofobní uhlovodíkové řetězce jsou orientovány do nepolárního prostředí. Vytvořeno pomocí BioRender.com

2.1.3.2.1 MIKROSTRUKTURA MICELY

Micely tvořené ionickými PAL vykazují určité elektrické vlastnosti koloidů. V roztoku dochází k tomu, že hydrofilní kladně nabitá jádra tvořící vnitřní vrstvu a záporně nabitě protiionty tvořící vnější vrstvu vytváří **elektrickou dvojvrstvu**. Tato kompenzace elektrických nábojů byla popsána modely podle Helmholtze, Gouye-Chapmana a Sterna, jehož model nejvíce odpovídá skutečnosti^{58,59}.

Podle Sternova modelu můžeme mikroprostředí micely rozdělit na dvě vrstvy. První se označuje jako **Sternova vrstva**, která je tvořena ionty těsně přiléhajícími k vnitřní vrstvě adsorpčními silami o plošné hustotě náboje. Tato hustota je nižší než plošný náboj vnitřní vrstvy. Druhá, **difúzní vrstva** nebo také Gouyova-Chapmanova vrstva, je tvořena ionty vázanými elektrostatickými silami k vnitřní vrstvě. Tato vrstva neutralizuje zbytek plošného náboje vnitřní vrstvy. Difúzní vrstva má dále dvě oblasti, při pohybu micely prostředím, ionty ve vnitřní oblasti putují spolu s micelou a ionty umístěné na zcela vnějším okraji difúzní vrstvy s micelou neputují. Potenciál vzniklý na této hranici pohybu se nazývá **zeta potenciál** ζ . Mimo ζ potenciálu je na hydrofilních částech micely přítomen i *povrchový potenciál* a na vnějším okraji Sternovy vrstvy *Sternův potenciál*⁶⁰⁻⁶³.



Obrázek č. 5: Sternův model mikroprostředí micely. Vytvořeno pomocí BioRender.com a upraveno podle⁶³

2.1.3.3 METODY STANOVENÍ KRITICKÉ MICELÁRNÍ KONCENTRACE

Stanovení CMC vychází ze změn vlastností daného prostředí, kde vznikají micely z monomerních jednotek PAL. Pro stanovení CMC tak existuje řada odlišných metod. Tyto metody můžeme rozdělit na přímé a nepřímé.

Přímé metody pozorují určitou změnu vlastností roztoku, ve kterém stoupá koncentrace PAL a vznikají micely. Změna závislosti dané vlastnosti na koncentraci (nejčastěji změna sklonu přímky) určuje hodnotu CMC. Mezi přímé metody stanovení CMC patří měření povrchového napětí, osmotického tlaku, refraktivního indexu, viskozity a velmi často používanou metodou stanovení CMC je měření konduktivity⁶⁴.

Nepřímé metody pozorují změnu vlastností jiné látky (sondy) přítomné v roztoku, ve kterém stoupá koncentrace PAL a vznikají micely. Mezi nepřímé metody se řadí spektroskopie. Vzhledem ke své vysoké citlivosti je pro stanovení CMC vhodná také metoda fluorescenční polarizace^{65,66}.

2.1.4 ANTIMIKROBIÁLNÍ VLASTNOSTI

Pro svou nízkou toxicitu a vysokou účinnost se dnes KAS běžně používají v domácnostech, v potravinářském a zdravotnickém odvětví k čištění a dezinfekci povrchů. Dostupná je i řada dezinfekčních směsí, kde se KAS vyskytují jako hlavní antimikrobiální složky⁶⁷⁻⁶⁹.

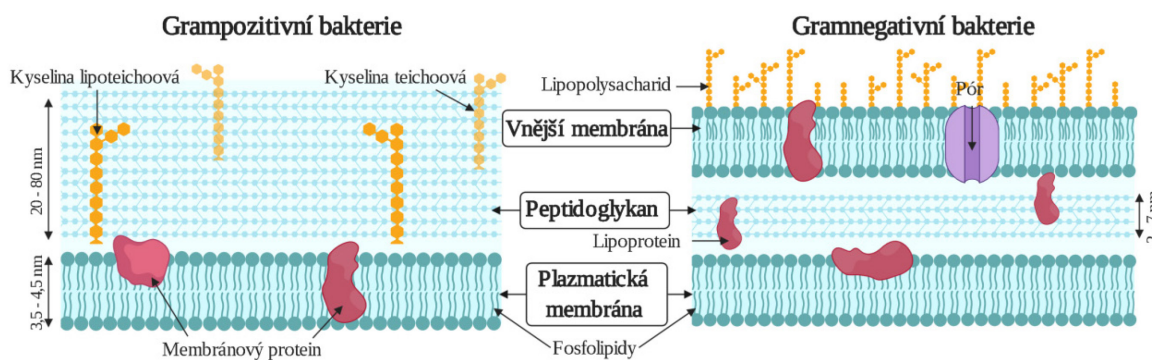
KAS mají široké antimikrobiální spektrum. Vykazují účinnost především na Grampozitivní bakterie (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*), Gramnegativní bakterie jsou díky své vnější membráně více odolné vůči KAS, mezi citlivé kmeny však patří *Escherichia coli* nebo *Pseudomonas aeruginosa*, KAS také vykazují antimikrobiální aktivitu vůči některým druhům *Mycobacterium*. Působí i na obalené viry, houby (*Candida*, *Aspergillus*) či prvoky (*Trypanosoma*, *Trichomonas*, *Plasmodium*)^{18,70,71}.

2.1.4.1 MECHANISMUS ÚČINKU

Od 50. let minulého století bylo popsáno několik teorií možného mechanismu účinku KAS. Dnes už víme, že mechanismus účinku spočívá především v interakci s bakteriální membránou. To je důvodem, proč vykazují vyšší aktivitu vůči Grampozitivním než Gramnegativním bakteriím. Gramnegativní bakterie mají totiž navíc vnější membránu, která je chrání před okolními vlivy. Důsledkem toho je, že KAS musí nejprve narušit

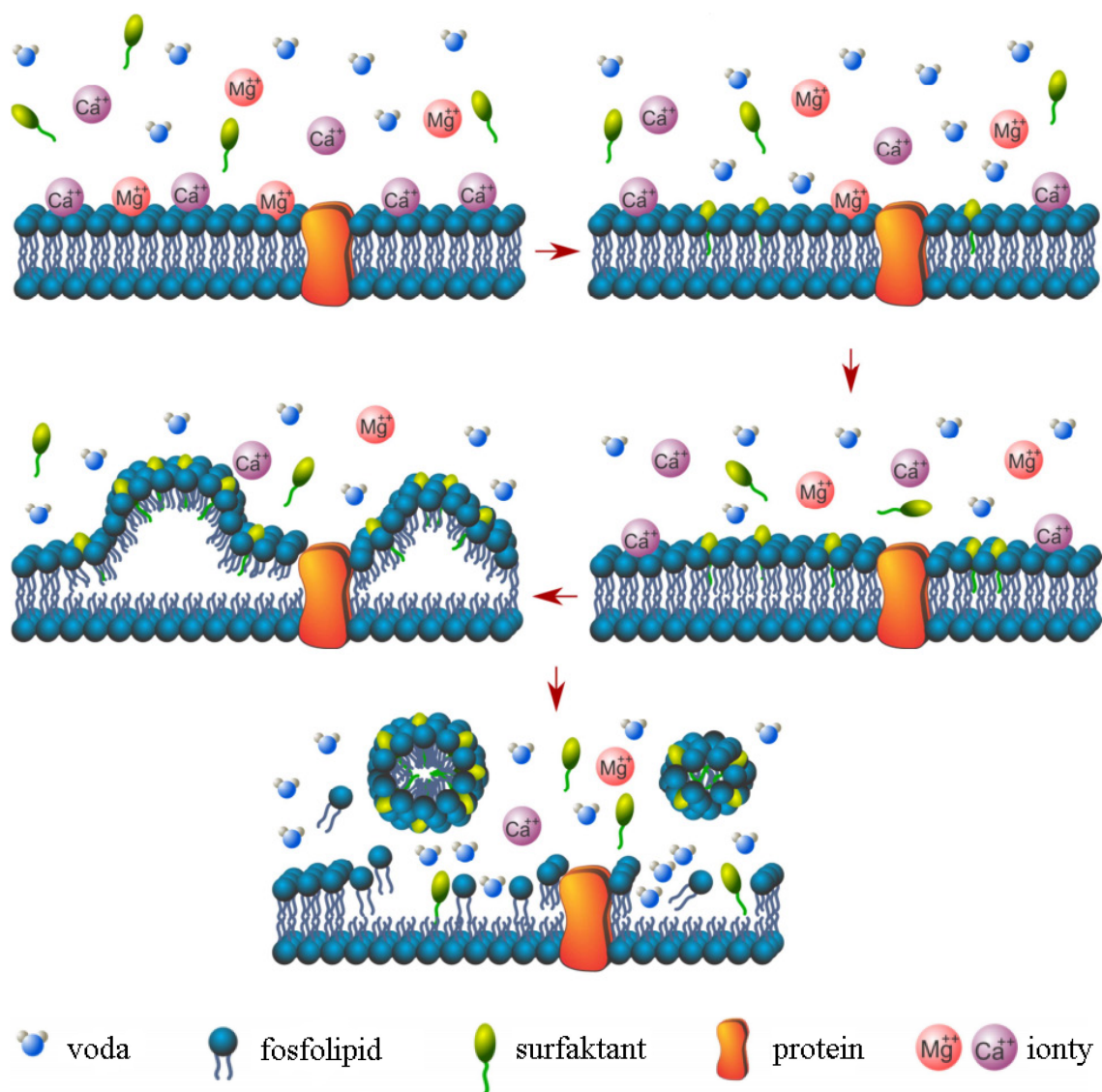
vnější membránu Gramnegativní bakterie, teprve poté se dostává k vnitřní membráně vedoucí k její destrukci^{18,72,73}.

Základní podmínkou pro navázání KAS na bakteriální membránu je přítomnost kvartérního dusíku. Nejvyšší účinnost vůči Grampozitivním bakteriím byla prokázána u jednořetězcových mono-kvartérních KAS s délkou uhlovodíkového řetězce C₁₂-C₁₄, zatímco na Gramnegativní bakterie působí lépe látky s délkou uhlovodíkového řetězce C₁₄-C₁₆. Mono-kvartérní KAS s délkou uhlovodíkového řetězce kratší než C₁₀ nemají dostatečnou délku pro tvorbu dimerů, které výrazně zvyšují interakci s bakteriální membránou a vedou k jejímu narušení, zatímco KAS s délkou alkylového řetězce větší než C₁₈ jsou natolik lipofilní, že jejich účinná koncentrace je až za hranicích jejich rozpustnosti⁷⁴⁻⁷⁶.



Obrázek č. 6: Rozdílná struktura membrány Grampozitivních a Gramnegativních bakterií. Vytvořeno pomocí BioRender.com

KAS obsahují ve své struktuře pozitivně nabitý kvartérní dusík N⁺. Bakteriální membrána je stabilizovaná dvoumocnými vápenatými Ca²⁺ a hořečnatými Mg²⁺ kationty. Při působení KAS tak dochází k výměně vápenatých a hořečnatých kationtů za amoniový kation, který umožňuje přístup celé molekuly k negativně nabitým složkám obsaženým v bakteriální stěně (tvořené *peptidoglykanem*), jako je *kyselina teichoová* a *kyselina lipoteichoová*, a k negativně nabitým složkám v bakteriální membráně, kterými jsou především *fosfolipidy*. Díky dlouhému alkylovému řetězci dochází k penetraci KAS do bakteriální membrány, vazbě na membránové lipidy a proteiny a následné destabilizaci bakteriální membrány (obr. č. 7). Výsledkem je lýza bakteriální buňky a její smrt^{74,77}.



Obrázek č. 7: Mechanismus účinku KAS na bakteriální cytoplazmatickou membránu. Upraveno podle Doležal a kol. ⁷⁴

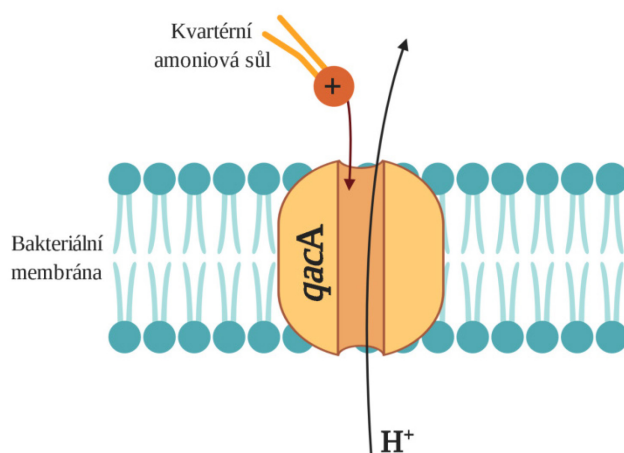
I když je za hlavní mechanismus účinku KAS považována disrupce bakteriální membrány, existuje řada studií potvrzujících působení KAS na intracelulární úrovni, kde by mohlo docházet k degradaci některých proteinů a nukleových kyselin ^{78,79}.

2.1.4.2 ANTIMIKROBIÁLNÍ REZISTENCE VŮČI KAS

Mikrobiální rezistenci, jak obecně, tak vůči KAS, můžeme rozdělit na vrozenou a získanou. Vrozená rezistence je přirozená vlastnost mikroorganismů, která vede ke snížení citlivosti vůči antimikrobiální látce. Může to být například již zmiňovaná vnější vrstva Gramnegativních bakterií, která značně zvyšuje minimální inhibiční koncentraci (MIC) KAS. Získaná rezistence vzniká nejčastěji při dlouhodobém působení podprahových dávek KAS na mikroorganismus. Dochází při ní k mutaci genů

mikroorganismu vlastních, přijetím cizích genů odpovědných za rezistenci (u bakterií nejčastěji pomocí *plazmidů* a *transpozonů*) nebo kombinací obou mechanismů ⁷⁷.

Rezistence bakterií vůči KAS je nejčastěji spojována s tzv. **efluxními pumpami**, které aktivně pumpují KAS z vnitřního prostředí membrány ven a snižují tak jeho působení na bakteriální membránu. Tyto pumpy mohou pracovat samostatně nebo v souladu se sníženou expresí snadno propustných porinů. V případě potřeby je bakterie schopná indukovat nadprodukcí těchto pump a stát se tak dostatečně rezistentní vůči působení vnějších vlivů ^{77,80}. Navíc se u bakterií objevují tzv. geny *qac* (*qacA-H/J/Z*), pro Grampozitivní bakterie je typická přítomnost *qacA/B*, zatímco u Gramnegativních bakterií se objevuje gen *qacE* a jeho homolog *qacEΔ1*. Tyto geny jsou zodpovědné za produkci protony poháněných efluxních pump specifických ke KAS, čímž selektivně zvyšují rezistence vůči těmto látkám ⁸¹.



Obrázek č. 8: Efluxní pumpa *qacA* poháněná protony znemožňuje vstup KAS bakteriální membránou. Vytvořeno pomocí BioRender.com

U obalených virů je rezistence nejpravděpodobněji způsobena znemožněním vstupu KAS s dlouhým hydrofobním řetězcem do hydrofilní kapsidy viru ⁸². Na neobalené viry nejsou KAS obecně účinné.

2.1.5 ANTIBIOFILMOVÁ AKTIVITA KAS

Doposud byly v této práci bakterie a další mikroorganismy chápány jako planktonní samostatně se vyskytující organismy. Byla vysvětlena obecná struktura bakteriální membrány a antimikrobiální působení KAS vůči planktonní formě. Nicméně většina mikroorganismů v našem prostředí existuje ve formě tzv. **biofilmů**.

Biofilmy jsou jednou z nejrozšířenějších forem života na Zemi vyskytující se ve vodě, v půdě i pod zemským povrchem. Všechny vyšší organismy jsou kolonizované mikroorganismy tvořícími biofilm. Biofilmy mají negativní dopad na člověka ve více ohledech. Například zdravotnické zařízení, implantáty, katetry nebo zubní náhrady bývají často infikovány biofilmem a způsobují obtížně léčitelné chronické infekce. Biofilm může vznikat přímo na lidském povrchu, často bývá napaden chrup zubním plakem, kůže nebo močový systém. Ve vysoké míře jsou biofilmy rovněž zodpovědné za biologické znečištění a kontaminaci vody^{83,84}.

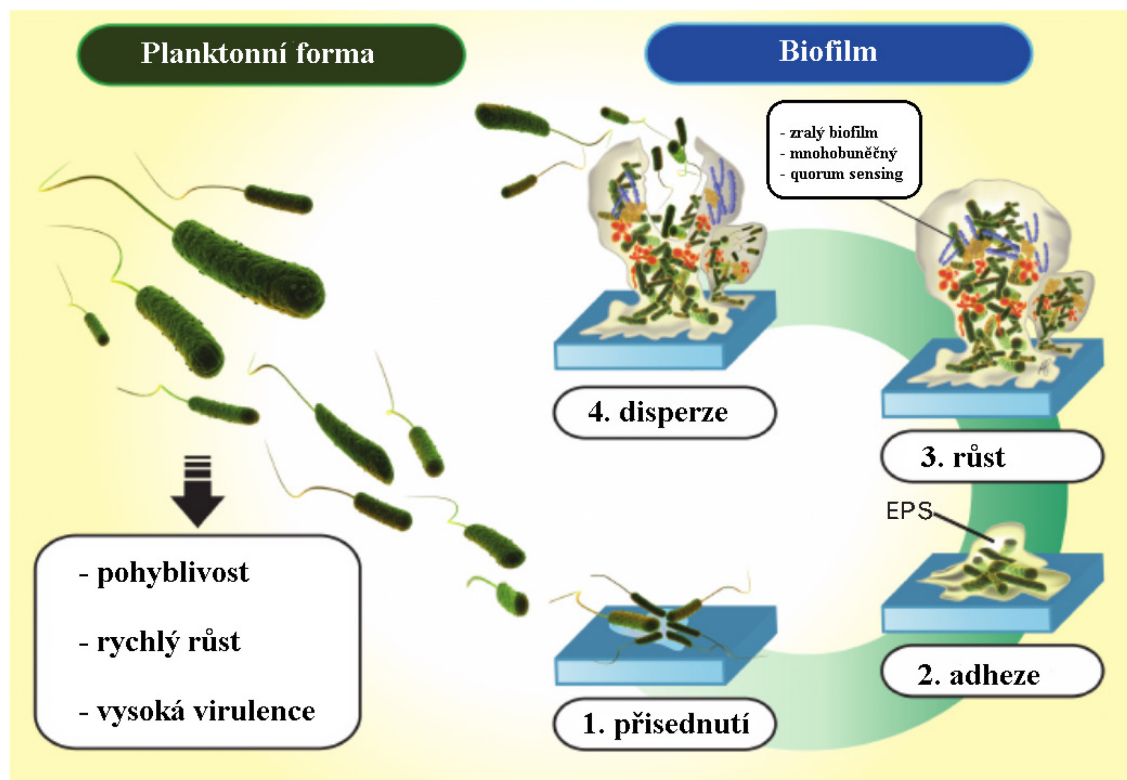
2.1.5.1 STRUKTURA A VZNIK BIOFILMU

Biofilmy jsou definovány jako společenství mikroorganismů produkující vlastní matrix nazývanou **extracelulární polymerní substance** (EPS), složenou z polysacharidů, proteinů, lipidů a extracelulární DNA (eDNA), která jim umožňuje přisedat k různým povrchům a udržovat biofilm pohromadě. Vznik biofilmu je dynamický, často energeticky náročný proces závislý na přísunu živin, syntéze extracelulární matrix a povaze mikroorganismů. Ty jsou v biofilmu schopné diferenciace, exprimují různé geny a produkují rozdílné proteiny, díky kterým vzniká heterogenní systém^{85–87}.

Formace biofilmu probíhá v několika krocích (obr. č. 9), jedná se o složitý proces zahrnující přisednutí, adhezi, fáze růstu, zrání a následně disperzi. Ve stručnosti můžeme celý proces popsat následovně:

1. Prvním krokem je vždy přisednutí mikroorganismu k povrchu, kdy je mikroorganismus nejdříve poután pouze reverzibilními van der Waalsovými silami, poté dochází k aktivaci genů a expresi povrchových struktur (bičíky, fimbrie) umožňujících ireverzibilní přisednutí.
2. Ve druhém kroku dochází k adhezi mikroorganismu k povrchu a vzniká tzv. mikrokolonie, přisedlé buňky produkují EPS, eDNA, rhamnolipidy a další látky potřebné k udržení biofilmu.
3. Po vytvoření dostatečné iniciální vrstvy dochází ke kumulaci živin a vzniku raného biofilmu.
4. Raný biofilm dále zraje a vytváří zralý biofilm, tvořený makrokoloniemi protkanými vodními kanály umožňujícími rozvod živin a signálních molekul.

5. Při nasycení systému dochází k uvolnění buněk nebo jejich shluků obalených v EPS do okolí a jejich dalšímu šíření⁸⁸⁻⁹².



Obrázek č. 9: Proces formování biofilmu. Upraveno podle Pirrone a kol.⁹³

Pro správnou funkčnost takto heterogenního systému je potřeba, aby spolu buňky navzájem komunikovaly. Tato komunikace se označuje jako *quorum sensing*. Buňky přítomné v biofilmu dokáží pomocí molekul zvaných **autoinduktory** vnímat přítomnost okolních buněk a na základě toho měnit genovou expresi. Pomocí *quorum sensing* dokáží buňky biofilmu například regulovat růst a udržovat optimální hustotu populace^{86,94}.

2.1.5.2 REZISTENCE BIOFILMU A AKTIVITA KAS

Aktivita antimikrobiálních látek vůči biofilmu se značně liší od jejich účinku na planktonní formy mikroorganismu. V první fázi vzniku biofilmu dochází k adhezi planktonních forem k určitému povrchu. Po přisednutí začnou mikroorganismy produkovat EPS, která vytváří velmi rezistentní štít chránící vznikající biofilm vůči působení vnějších vlivů. Navíc se uvnitř zralého biofilmu vyskytují mikroorganismy s nízkou metabolickou aktivitou, které jsou vysoce odolné vůči působení vnějších vlivů.

Mikroorganismy v biofilmu vykazují 10-1000x vyšší rezistenci vůči působení antimikrobiálních látek než planktonní formy^{68,95}.

Častým problémem je vznik biofilmu na zdravotnických prostředcích, jako jsou kloubní náhrady, implantáty nebo katetry. V současné době se jako nejlepší řešení jeví prevence přisednutí mikroorganismu k povrchu a znemožnění vzniku biofilmu. Jednou z možností je aplikace antimikrobiální látky na povrch, který může být potenciálně kontaminován. Nejčastěji se používá tzv. **coating**, což je obalení povrchu polymerem, na kterém je navázaná antimikrobiální látka. Často se jedná právě o KAS, které díky své struktuře dokáží pomocí uhlovodíkových řetězců vytvářet interakce s polymerem a zároveň exponovat hydrofilní amoniovou část napovrch. Mají tedy účinek antimikrobiální a zároveň vytváří fyzickou bariéru proti proniknutí mikroorganismu k povrchu a jeho dalšímu šíření⁹². Bylo prokázáno, že povrch obalený KAS na polymerovém nosiči, významně snižuje přisednutí některých druhů bakterií a hub. Příkladem mohou být *gemini surfactants* alaninu a glycinu na polystyrenu snižující přisednutí *S. epidermidis* a *C. albicans*, nebo kvaternizovaný chitosan snižující přisednutí především *S. epidermidis*, v menší míře pak *P. aeruginosa*^{17,96}.

2.2 DEKONTAMINACE BIOLOGICKÝCH A CHEMICKÝCH AGENS

Vzhledem k výše popsaným vlastnostem KAS, jako je povrchová aktivita umožňující vazbu na membránu patogenních mikroorganismů (bakterie, houby, obalené viry) nebo tvorba micel umožňující rozklad chemických látek, můžeme tyto látky využít i pro účely tzv. dekontaminace. Pojem dekontaminace může být chápán jako soubor postupů a prostředků vedoucí k odstranění kontaminantů z prostředí. Úplné odstranění kontaminantů (nejčastěji chemických či biologických) zpravidla nebývá možné, proto můžeme pojem dekontaminace definovat jako proces, při kterém se sníží škodlivý účinek kontaminace na bezpečnou úroveň. Podle metody odstranění kontaminanty rozlišujeme dekontaminaci **mechanickou** (vytřepání, vysátí, drhnutí), **fyzikální** (smývání, sorpce) a **chemickou** (rozložení kontaminantů pomocí vhodného dekontaminačního činidla)^{97,98}.

Nejčastěji je pojem dekontaminace spojován s tzv. CBRN(E) (*chemical, biological, radiological, nuclear, explosive*) terorismem, který je v současnosti jednou z nejnebezpečnějších hrozeb. Důvodem je absence schopnosti se na takovou událost připravit. Mimo biologická a chemická agens, která se zneužívají k teroristickým útokům a budou diskutována níže, zahrnuje CBRN terorismus navíc radiologické a jaderné výbušné zbraně⁹⁹.

2.2.1 BIOLOGICKÁ AGENS

Biologická agens (B-agens) zahrnují především viry, bakterie a houby v přírodním nebo modifikovaném stavu, ve formě izolované živé kultury nebo substrátu obsahujícího živý materiál, který byl záměrně naočkován nebo nakažen touto kulturou. Z hlediska zneužití, jsou B-agens více nebezpečná než chemická agens. Produkují heterogenní skupinu **toxinů**, chemických látek produkovaných metabolickými pochody organismů, nebo synteticky připravených analogů¹⁰⁰, jejichž letální dávky dosahují mnohem nižších hodnot než dávky chemických agens. Jejich hlavní nebezpečí spočívá v tom, že jsou často bez zápachu a chuti, dají se snadno a levně získat z nakažených zvířat, lidí nebo z půdy a pro zneužití často stačí velmi malé množství. B-agens dokáží kontaminovat dané místo na několik hodin, některá jsou však schopná přežít i několik týdnů. Inkubační doba mikrobiálních patogenů se pohybuje mezi 24 hodinami a 6 týdny do projevení nákazy a výskytu prvních příznaků, což může limitovat jejich použití. Avšak patogeny s dlouhou inkubační dobou mohou mít významný dopad mnoho týdnů po původním útoku. Biologický útok může být proveden tak, aniž by ho někdo zaznamenal a pozdní projevy mohou být spojovány s přirozeným vypuknutím choroby^{101–103}.

Přežití B-agens je podmíněno vnějším prostředím (teplota, vlhkost, podnebí), z hlediska útoku tak může dojít ke kontaminaci prostředí nevhodného pro B-agens. Kromě toho záleží na bráně vstupu nákazy, pro dostatečnou dávku vyvolávající onemocnění je potřeba B-agens vdechnout (inhalace) nebo pozřít (ingesce), dále je možný vstup narušenou kůží (inokulace) nebo vstřebáním přes neporušenou kůži (povrchová kontaminace). Až na výjimky (spory antraxu a některé toxiny), se B-agens poměrně rychle rozkládají a ztrácí svou patogenitu, proto jsou náročné na přepravu a uchování¹⁰⁴.

V České republice existuje *zákon č. 281/2002 Sb., o některých opatřeních souvisejících se zákazem bakteriologických (biologických) a toxinových zbraní a o změně živnostenského zákona* doplněný vyhláškou č. 474/2002 Sb., kterou se provádí zákon č. 281/2002 Sb.,. Tato vyhláška definuje tzv. seznam **VRAT** (seznam vysoce rizikových biologických agens a toxinů) a **RAT** (seznam rizikových biologických agens a toxinů) zahrnujících lidské a živočišné bakterie a viry, dále rostlinné viry a houby, toxiny a jejich podjednotky a také genetické elementy a geneticky modifikované organismy^{103,105–107}.

Dekontaminace B-agens se rozděluje podle stupně účinnosti na:

Sanitaci (mechanickou očistu), zahrnující odstranění nečistot a snížení počtu mikroorganismů¹⁰⁸.

Dezinfekci, která zneškodňuje vegetativní formy mikroorganismů tak, aby se přerušila cesta nákazy od zdroje k vnímavému jedinci. Dezinfekce zahrnuje postupy fyzikální, chemické nebo kombinované. Pro usmrcení bakterií, některých méně odolných bakteriálních spor, virů a makroskopických hub byl vyvinut tzv. **vyšší stupeň dezinfekce**. Jedná se prakticky o sterilizaci za studena, která je provedena chemickou cestou. Nejčastěji se používá pro endoskopy vstupující do sterilních systémů^{109,110}.

Nejúčinnějším způsobem dekontaminace je **sterilizace**, při níž dochází k usmrcení všech forem patogenních i nepatogenních mikroorganismů, včetně odolných bakteriálních spor, virů, protozoí, helmintů a jejich vajíček³.

Níže je vyjmenovaný stručný výčet nejčastěji zmiňovaných B-agens ze seznamu VRAT^{111,112}:

VIRY

- Viry hemoragických horeček (*Dengue, Ebola, Lassa, Marburg, Machupo*)
- Virus ptačí chřipky
- Virus moru (afrického, klasického, malých přežvýkavců, ...)
- Virus žluté zimnice
- Virus vztekliny
- Virus slintavky a kulhavky
- Virus pravých neštovic
- Koronavirus způsobující těžký akutní respirační syndrom (kor. podobný SARS)

BAKTERIE

- *Bacillus anthracis* (antrax)
- *Brucella* sp. (brucelóza)
- *Chlamydia psittaci* (psitakóza)
- *Clostridium botulinum* (botulismus)
- *Escherichia coli* - kmeny produkující shiga toxin
- *Francisella tularensis* (tularemie)
- *Rickettsia prowazekii* (skvrnitý tyfus)
- *Salmonella typhi* (gastroenteritidy)
- *Shigella dysenteriae* (gastroenteritidy)
- *Vibrio cholerae* (gastroenteritidy)
- *Yersinia pestis* (mor)

TOXINY

- Aflatoxiny
- Botulinové toxiny
- Choleratoxin
- Ricin
- Saxitoxin
- Shiga toxin
- Enterotoxiny
- Viscumin

2.2.2 CHEMICKÁ AGENS

Podle Organizace pro zákaz chemických zbraní (OPCW, *Organisation for the Prohibition of chemical weapons*) jsou za chemické zbraně považovány všechny toxické chemikálie a jejich prekurzory, s výjimkou těch, které jsou určeny pro účely povolené Úmluvou o chemických zbraních (CWC, *Chemical Weapons Convention*) v množství odpovídajícím tomuto účelu. Dále se za chemickou zbraň pokládá munice nebo zařízení speciálně určené na poškození nebo usmrcení pomocí toxické chemické látky, a veškeré vybavení určené k použití munice a zařízení označených jako chemické zbraně ¹¹³.

Podle bojového určení dělíme otravné látky (OL) na:

SMRTÍCÍ OL

- Nervově-paralytické látky (*sarin, soman, tabun, VX, IVA*)
- Zpuchýřující látky (*yperit dusíkatý a sulfidický, lewisit*)
- Všeobecně jedovaté látky (*kyanovodík, chlorkyan*)
- Dusivé látky (*fosgen, difosgen, chlorpikrin*)

ZNESCHOPŇUJÍCÍ OL

- Fyzicky zneschopňující látky (*aziridiny, tremorogenní látky*)
- Psychicky zneschopňující látky (*BZ látka, LSD-25, Psilocyn, Psilocybin*)
- Dráždivé látky (*lakrimátory – BBC látka, CS látka, CR látka, CN látka; sternity – DA látka, DC látka, DM látka*)^{98,114–116}.

2.2.2.1 MICELÁRNÍ KATALÝZA (MK)

Micely jsou schopné vytvářet specifické prostředí pro průběh některých chemických reakcí. Tato vlastnost je dána jejich mikrostrukturou, která je popsána výše. MK je obdobou enzymatické katalýzy s tím rozdílem, že MK probíhá v dynamickém systému, kde micely neustále vznikají a zanikají a zároveň není substrátově specifická. Ve vodném prostředí dochází ke vzniku „normálních“ micel s hydrofilními částmi PAL směřujícími do polárního prostředí vody a hydrofobními částmi PAL směřujícími dovnitř micely. Polární látky rozpuštěné v takovém prostředí jsou pomocí specifických interakcí poutány k povrchu micely, zatímco látky lipofilní, v závislosti na jejich lipofilitě, se hromadí na rozhraní fázi micela/voda nebo prostupují přímo do micely^{117,118}.

Např. podstatou detoxikace látek typu esterů je často hydrolyza jejich esterové vazby urychlená solubilizací této látky v prostředí micely a zároveň zvýšení koncentrace hydroxidových iontů (případně jiných nukleofilů) na povrchu kladně nabitě micely¹¹⁹.

Zrychlení rozkladu toxické látky pak ovlivňují tyto podmínky:

- Koncentrace reagujících látek v micelárním prostředí v důsledku solubilizace a elektrostatických interakcí.
- Sorpce na povrch micely v důsledku povrchového náboje a změna reakčních vlastností látek při přechodu z vodného prostředí do micely.
- Lipofilita hydrolyzované látky. Vysoce hydrofobní látky snadno přecházejí do micelárního prostředí¹²⁰.

Tvorba micel a schopnost urychlovat chemické reakce může být v případě KAS s povrchovou aktivitou využita k urychlení rozkladu chemických toxických látek. Byla popsána schopnost KAS rozkládat některé toxické organofosforové sloučeniny, přičemž bylo prokázáno, že s rostoucí délkou uhlovodíkového řetězce, rychlost rozkladu organofosfátu stoupá^{121,122}.

3 CÍL PRÁCE

1. V teoretické části popsat základní vlastnosti surfaktantů se zaměřením na kvartérní amoniové soli (KAS). Popis jejich chemické struktury, fyzikálně-chemických vlastností a schopnosti tvořit micely. Stručný přehled využití KAS se zaměřením na chemická a biologická agens.
2. Na základě získaných dat navrhnout a připravit přibližně 50 látek s definovanou strukturou. Příprava KAS s kvartérním dusíkem v cyklu (nasyčené i nenasycené heterocykly) i mimo něj, kde tyto základní struktury mohou zahrnovat jeden (mono-kvartérní deriváty) či dva kvartérní (bis-kvartérní deriváty) dusíky a dále jeden nebo dva dlouhé uhlovodíkové řetězce. Potvrzení totožnosti látek pomocí NMR a HRMS analýzy.
3. U vybraných látek stanovit kritické micelární koncentrace (CMC) pomocí konduktometrické metody.
4. Postoupení vybraných látek pro hodnocení dekontaminačních vlastností *in-vitro* metodami.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 SYNTÉZA

4.1.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE

Výchozí látky a rozpouštědla pro syntézu byly zakoupeny od firem Sigma-Aldrich, Fluka, a Merck (Darmstadt, Německo), VWR international (Radnor, Pensylvánie, USA) a Penta (Praha, Česká republika) v čistotě p.a.

4.1.2 TENKOVSTVÁ CHROMATOGRAFIE

Pro monitorování průběhu reakcí a ověření čistoty vzniklých produktů byla použita tenkovrstvá chromatografie (TLC). Chromatogramy byly vyvíjeny ve skleněných komorách na hliníkových foliích typu TLC Silica gel 60 F₂₅₄ zakoupených od firmy Sigma-Aldrich, Fluka, a Merck (Darmstadt, Německo). Jako mobilní fáze sloužila směs methanol/ethylacetát/vodný roztok amoniaku v poměru 3:1:0,1 a výsledné TLC bylo detekováno pomocí Dragendorffova činidla schopného zachytit kvartérní dusík.

4.1.3 METODA KRYSTALIZACE

Pro čištění látek byla použita metoda krystalizace. V závislosti na struktuře látky, byla tato nejprve rozpuštěna v malém množství methanolu a následně řízenou krystalizací vysrážena z roztoku pomocí ethylacetátu nebo etheru za snížené teploty.

4.1.4 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ

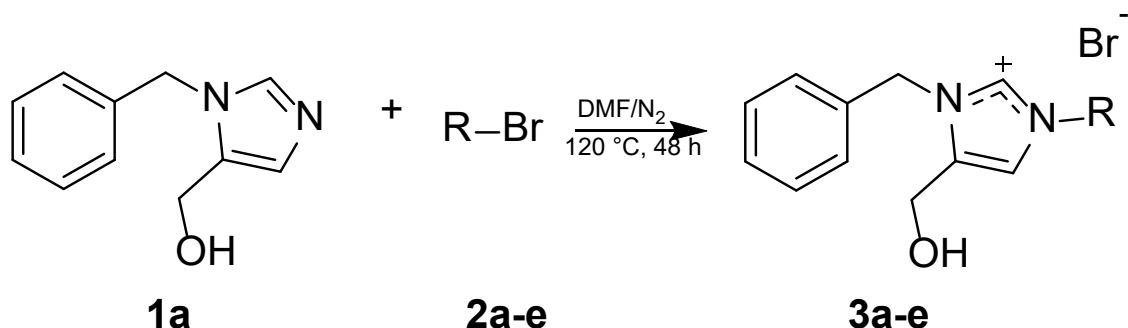
- Teplota tání byla měřena na bodotávku M-565 firmy BÜCHI Laboratechnik AG (Flawil, Švýcarsko).
- Totožnost připravených látek byla ověřena využitím analýzy ¹H NMR a ¹³C NMR (nukleární magnetická resonance) na přístrojích Varian Mercury Vx BB 300 a VNMR S 500 (Los Altos, Kalifornie, USA) změřené doc. PharmDr. Jiřím Kunešem CSc. na Katedře anorganické a organické chemie Farmaceutické fakulty Univerzity Karlovy a dále na přístroji Bruker Avance Neo 500MHz (Billerica, Massachusetts, USA) změřené Ing. Janou Svobodovou na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Spektra byla zpracována programem MestReNova 12.0.0.
- Pro hmotnostní spektrometrii byl použit vysokoúčinný kapalinový chromatograf Dionex Ultimate 3000 RS skládající se z nízkotlaké kvartérní

pumpy, kolonového termostatu, autosampleru a detektoru s diodovým polem, celé ovládané programem Chromeleon (verze 7.2.9 build 11323, Thermo Fisher Scientific, Germering, Německo) spojeného s hmotnostním spektrometrem typu Orbitrap Q Exactive Plus ovládaným programem Thermo Xcalibur (version 3.1.66.10., Thermo Fisher Scientific, Brémy, Německo). Spektra byla změřena v Centru biomedicínského výzkumu Fakultní nemocnice Hradec Králové PharmDr. Lukášem Prchalem, Ph.D.

4.1.5 SYNTÉZA DERIVÁTŮ (1-BENZYL-1H-IMIDAZOL-5-YL)METHANOLU

Výchozí látka (1-benzyl-1H-imidazol-5-yl)methanol (**1a**) v množství 1 mmol byla rozpuštěna v cca 30 ml DMF (dimethylformamid). K roztoku bylo přidáno 8 mmol příslušného alkylbromidu (**2a-e**). Reakce probíhala při teplotě 120 °C v inertní atmosféře (N₂) 48 hodin. Reakce byla monitorována pomocí TLC. Po ukončení reakce byla směs odpařena do konstantní hmotnosti a následně několikrát čištěna řízenou krystalizací.

Reakční schéma č. 1:



Tabulka produktů č. 1:

Označení	R	Struktura	Mr	výtěžek (%)
3a	C ₁₀ H ₂₁		409,40	90
3b	C ₁₂ H ₂₅		437,46	92
3c	C ₁₄ H ₂₉		465,51	94
3d	C ₁₆ H ₃₃		493,56	97
3e	C ₁₈ H ₃₇		521,62	94

Pozn: **2a**: 1-bromodekan, **2b**: 1-bromododekan, **2c**: 1-bromotetradekan, **2d**: 1-bromohexadekan, **2e**: 1-bromooktadekan

Analýza NMR a HRMS:

1-benzyl-3-decyl-5-hydroxymethyl-1H-imidazol-3-ium-bromid (3a). Bílá krystalická látka, t. t. 133,8-134,7 °C, (0,40 g, 90 %); ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 9.17 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.45 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.44 – 7.36 (m, 5H), 5.63 (s, 2H), 4.66 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H), 4.23 – 4.17 (m, 2H), 1.92 – 1.84 (m, 2H), 1.36 – 1.20 (m, 14H), 0.86 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 135.74, 135.42, 132.79, 129.55, 129.41, 128.51, 120.74, 53.13, 51.51, 50.33, 34.85, 31.90, 30.05, 29.60, 29.49, 28.95, 26.30, 22.67, 14.13; HRMS: *m/z* 329.2588 [M]⁺ (calc. for [C₂₁H₃₃N₂O]⁺ 329.2587)

1-benzyl-3-dodecyl-5-hydroxymethyl-1H-imidazol-3-ium-bromid (3b). Hnědá krystalická látka, t. t. 88,5-89,1 °C, (0,43 g, 92 %); ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 9.18 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.46 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.44 – 7.36 (m, 5H), 5.62 (s, 2H), 4.65 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H), 4.23 – 4.17 (m, 2H), 1.92 – 1.84 (m, 2H), 1.36 – 1.20 (m, 18H), 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 135.78, 135.43, 132.81, 129.54, 129.41, 128.57, 120.75, 53.13, 51.52, 50.34, 34.84, 31.90, 30.05, 29.60, 29.49, 29.38, 29.33, 28.95, 26.30, 22.68, 14.13; HRMS: *m/z* 357.2894 [M]⁺ (calc. for [C₂₃H₃₇N₂O]⁺ 357.2900).

1-benzyl-5-hydroxymethyl-3-tetradecyl-1H-imidazol-3-ium-bromid (3c). Bílá krystalická látka, t. t. 133,6-134,6 °C, (0,46 g, 94 %); ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 9.16 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.48 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H), 7.46 – 7.36 (m, 5H), 5.64 (s, 2H), 4.67 (m, 2H), 4.26 – 4.16 (m, 2H), 1.95 – 1.83 (m, 2H), 1.42 – 1.18 (m, 22H), 0.88 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 135.73, 135.44, 132.76, 129.55, 129.42, 128.57, 120.76, 53.14, 51.58, 50.36, 34.86, 31.91, 30.06, 29.67, 29.64, 29.59, 29.49, 29.38, 29.34, 28.95, 26.30, 22.68, 14.12; HRMS: *m/z* 385.3211 [M]⁺ (calc. for [C₂₅H₄₁N₂O]⁺ 385.3213).

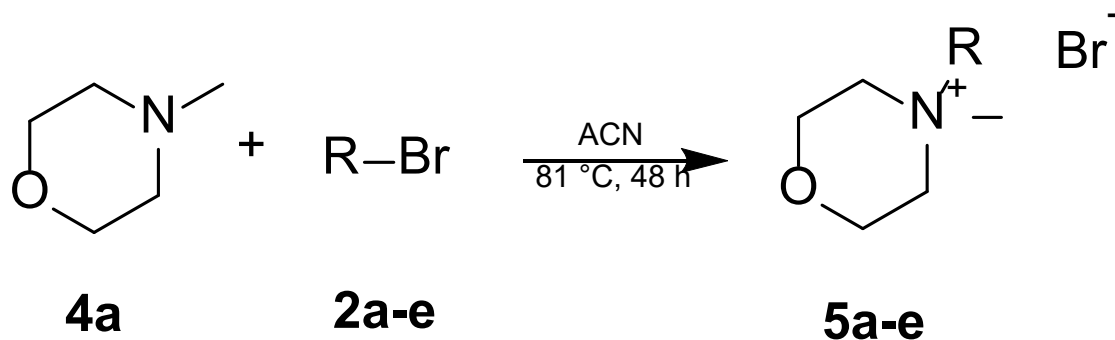
1-benzyl-3-hexadecyl-5-hydroxymethyl-1H-imidazol-3-ium-bromid (3d). Bílá krystalická látka, t. t. 98,1-99,0 °C, (0,50 g, 97 %); ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 9.46 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H), 7.47 – 7.34 (m, 6H), 5.60 (s, 2H), 4.61 (d, *J* = 5.5 Hz, 2H), 4.22 – 4.14 (m, 2H), 1.93 – 1.81 (m, 2H), 1.41 – 1.18 (m, 26H), 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 136.03, 135.48, 132.96, 129.47, 129.32, 128.56, 120.58, 52.94, 51.29, 50.24, 34.73, 31.93, 30.08, 29.70, 29.66, 29.62, 29.51, 29.40, 29.36, 28.97, 26.30, 22.69, 14.13; HRMS: *m/z* 413.3524 [M]⁺ (calc. for [C₂₇H₄₅N₂O]⁺ 413.3526).

1-benzyl-5-hydroxymethyl-3-oktadecyl-1H-imidazol-3-ium-bromid (**3e**). Hnědá krystalická látka, t. t. 96,2-97,5 °C, (0,52 g, 94 %); ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 9.70 (d, J = 1.8 Hz, 1H), 7.44 (dd, J = 7.6, 2.1 Hz, 2H), 7.41 – 7.30 (m, 4H), 5.57 (s, 2H), 4.58 (s, 2H), 4.14 (t, J = 7.6 Hz, 2H), 1.84 (m, 2H), 1.24 (m, 30H), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, 3H). ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 136.01, 135.50, 133.01, 129.45, 129.30, 128.45, 120.55, 52.91, 51.30, 50.15, 34.72, 31.94, 30.08, 29.71, 29.65, 29.62, 29.55, 29.50, 29.42, 29.33, 28.85, 26.31, 22.70, 14.12; HRMS: *m/z* 441.3839 [M]⁺ (calc. for [C₂₉H₄₉N₂O]⁺ 441.3839).

4.1.6 SYNTÉZA DERIVÁTŮ 4-METHYLMORFOLINU

Výchozí látka 4-methylmorfolin (**4a**) v množství 15 mmol byla rozpuštěna v cca 30 ml ACN (acetonitril). K roztoku bylo přidáno 21 mmol příslušného alkylbromidu (**2a-e**). Reakce probíhala za refluxu rozpouštědla (81 °C) 48 hodin a byla monitorována pomocí TLC. Po ukončení reakce byla směs odpařena do konstantní hmotnosti a následně čištěna krystalizací.

Reakční schéma č. 2:



Tabulka produktů č. 2:

Označení	R	Struktura	Mr	výtěžek (%)
5a	C ₁₀ H ₂₁		322,33	84
5b	C ₁₂ H ₂₅		349,20	71
5c	C ₁₄ H ₂₉		378,44	72
5d	C ₁₆ H ₃₃		406,49	76
5e	C ₁₈ H ₃₇		434,55	83

Analýza NMR a HRMS:

4-decyl-4-methylmorfolin-4-ium-bromid (5a). Bílá krystalická látka, t. t. 182,2-183,8 °C, (4,06 g, 84 %); ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.17 – 4.10 (m, 2H), 4.06 – 3.99 (m, 2H), 3.94 – 3.88 (m, 2H), 3.86 – 3.80 (m, 2H), 3.70 – 3.63 (m, 2H), 3.59 (s, 3H), 1.83 – 1.74 (m, 2H), 1.46 – 1.20 (m, 18H), 0.88 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 65.50, 60.77, 59.71, 47.33, 31.83, 29.43, 29.40, 29.28, 29.24, 26.31, 22.66, 21.97, 14.11; HRMS: *m/z* 242.2474 [M]⁺ (calc. for [C₁₅H₃₂NO]⁺ 242.2478).

4-dodecyl-4-methylmorfolin-4-ium-bromid (5b). Bílá krystalická látka, t. t. 198,2-199,0 °C, (3,7 g, 71 %); ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.17 – 4.09 (m, 2H), 4.06 – 3.99 (m, 2H), 3.94 – 3.87 (m, 2H), 3.87 – 3.80 (m, 2H), 3.70 – 3.63 (m, 2H), 3.59 (s, 3H), 1.83 – 1.74 (m, 2H), 1.46 – 1.20 (m, 18H), 0.88 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H); ¹³C NMR (126

MHz, Chloroform-*d*) δ 65.49, 60.76, 59.71, 47.36, 31.91, 29.60, 29.48, 29.41, 29.33, 29.29, 26.31, 22.69, 21.98, 14.13; HRMS: m/z 270.2786 [M]⁺ (calc. for [C₁₇H₃₆NO]⁺ 270.2791).

4-methyl-4-tetradecylmorpholin-4-ium-bromid (**5c**). Bílá krystalická látka, t. t. 198,1-199,8 °C, (4,10 g, 72 %); ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.17 – 4.09 (m, 2H), 4.06 – 4.00 (m, 2H), 3.94 – 3.87 (m, 2H), 3.86 – 3.80 (m, 2H), 3.70 – 3.62 (m, 2H), 3.59 (s, 3H), 1.83 – 1.73 (m, 2H), 1.47 – 1.19 (m, 22H), 0.91 – 0.86 (m, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 65.48, 60.76, 59.70, 47.35, 31.93, 29.69, 29.65, 29.61, 29.50, 29.42, 29.37, 29.29, 26.32, 22.70, 21.98, 14.14; HRMS: m/z 298.3100 [M]⁺ (calc. for [C₁₉H₄₀NO]⁺ 298.3104).

4-hexadecyl-4-methylmorpholin-4-ium-bromid (**5d**). Bílá krystalická látka, t. t. 207,2-208,5 °C, (4,63 g, 76 %); ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.18 – 4.09 (m, 2H), 4.06 – 3.99 (m, 2H), 3.94 – 3.87 (m, 2H), 3.87 – 3.81 (m, 2H), 3.69 – 3.62 (m, 2H), 3.59 (s, 3H), 1.82 – 1.74 (m, 2H), 1.46 – 1.19 (m, 26H), 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 65.46, 60.75, 59.70, 47.36, 31.93, 29.70, 29.69, 29.66, 29.65, 29.61, 29.49, 29.41, 29.36, 29.28, 26.30, 22.69, 21.97, 14.13; HRMS: m/z 326.3410 [M]⁺ (calc. for [C₂₁H₄₄NO]⁺ 326.3417).

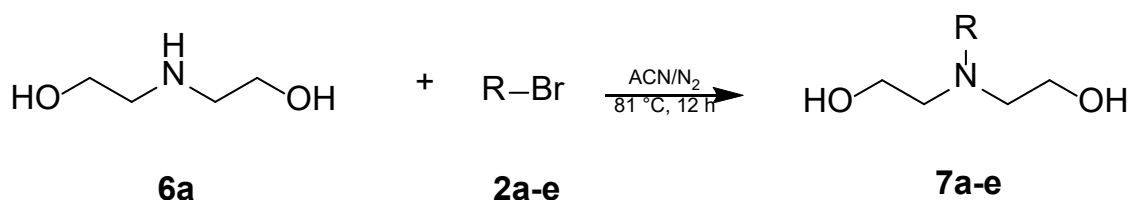
4-methyl-4-oktadecylmorpholin-4-ium-bromid (**5e**). Bílá krystalická látka, t. t. 200,0-201,8 °C, (5,41 g, 83 %); ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.17 – 4.10 (m, 2H), 4.06 – 4.00 (m, 2H), 3.94 – 3.88 (m, 2H), 3.86 – 3.80 (m, 2H), 3.70 – 3.62 (m, 2H), 3.59 (s, 3H), 1.82 – 1.75 (m, 2H), 1.46 – 1.19 (m, 30H), 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 65.47, 60.76, 59.70, 47.35, 31.94, 29.72, 29.70, 29.67, 29.62, 29.50, 29.42, 29.38, 29.30, 26.31, 22.70, 21.98, 14.14; HRMS: m/z 354.3724 [M]⁺ (calc. for [C₂₃H₄₈NO]⁺ 354.3730).

4.1.7 SYNTÉZA DERIVÁTŮ DIETHANOLAMINU 1

První krok reakce:

Výchozí látka diethanolamin (**6a**) v množství 22,5 mmol byla rozpuštěna v cca 40 ml ACN (acetonitril). Do roztoku bylo přidáno 15 mmol příslušného alkylbromidu (**2a-e**), 3 mmol jodidu draselného a 30 mmol uhličitanu draselného. Reakce probíhala za refluxu rozpouštědla (81 °C), v inertní atmosféře (N₂) po dobu 12 hodin a byla monitorována pomocí TLC. Po ukončení reakce byla směs odpařena a dvakrát vytřepána v 60 ml fáze voda/dichlormethan (1:1). Poté byla fáze dichlormethanu odpařena do konstantní hmotnosti.

Reakční schéma č. 3:



Tabulka produktů č. 3:

Označení	R	Struktura	Mr	výtěžek (%)
7a	C ₁₀ H ₂₁		245,41	65
7b	C ₁₂ H ₂₅		273,46	91
7c	C ₁₄ H ₂₉		301,52	67
7d	C ₁₆ H ₃₃		329,57	77
7e	C ₁₈ H ₃₇		357,62	96

Analýza NMR a HRMS:

N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-*N*-decylamin (**7a**). Žlutá olejovitá kapalina, (2,40 g, 65 %); ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 3.63 (t, *J* = 5.4 Hz, 4H), 2.68 (t, *J* = 5.4 Hz, 4H), 2.57 – 2.50 (m, 2H), 1.51 – 1.44 (m, 2H), 1.35 – 1.21 (m, 14H), 0.89 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 59.67, 56.05, 54.79, 31.88, 29.61, 29.55, 29.30, 27.36, 27.17, 22.67, 14.10; HRMS: *m/z* 246.2424 [M + H]⁺ (calc. for [C₁₄H₃₂NO₂] 246.2428).

N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-*N*-dodecylamin (**7b**). Žlutá olejovitá kapalina, (3,75 g, 91 %); ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 3.63 (t, *J* = 5.4 Hz, 4H), 2.68 (t, *J* = 5.4 Hz, 4H), 2.58 – 2.51 (m, 2H), 1.52 – 1.44 (m, 2H), 1.32 – 1.22 (m, 18H), 0.89 (t, *J* = 7.1, 1.7

Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 59.46, 56.08, 54.80, 31.87, 29.62, 29.59, 29.52, 29.30, 27.33, 26.80, 22.64, 14.07; HRMS: m/z 274.2736 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calc. for $[\text{C}_{16}\text{H}_{36}\text{NO}_2]$ 274.2741).

N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-*N*-tetradecylamin (**7c**). Žlutá olejovitá kapalina, (3,07 g, 67 %); ^1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 3.62 (t, $J = 5.4$ Hz, 4H), 2.66 (t, $J = 5.4$ Hz, 4H), 2.55 – 2.49 (m, 2H), 1.49 – 1.43 (m, 2H), 1.32 – 1.22 (m, 22H), 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 59.65, 56.05, 54.79, 31.90, 29.67, 29.65, 29.63, 29.62, 29.57, 29.56, 29.34, 27.37, 27.08, 22.67, 14.09; HRMS: m/z 302.3054 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calc. for $[\text{C}_{18}\text{H}_{39}\text{NO}_2]$ 302.3054).

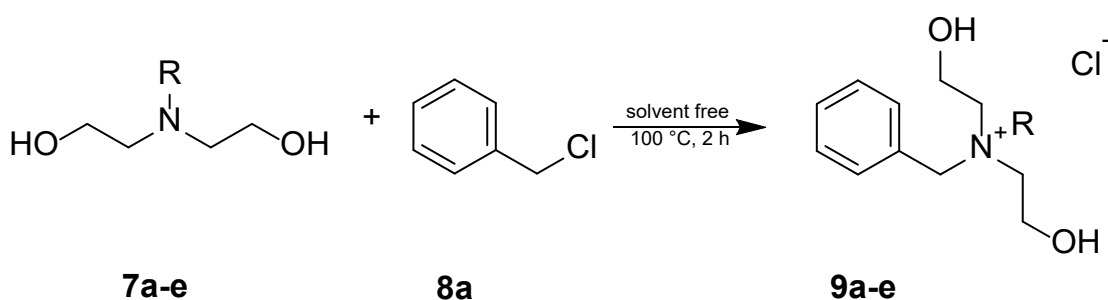
N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-*N*-hexadecylamin (**7d**). Žlutá olejovitá kapalina, (3,82 g, 77 %); ^1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 3.62 (t, $J = 5.4$ Hz, 4H), 2.66 (t, $J = 5.4$ Hz, 4H), 2.56 – 2.49 (m, 2H), 1.51 – 1.43 (m, 2H), 1.29 – 1.25 (m, 26H), 0.89 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 59.65, 56.05, 54.79, 31.91, 29.68, 29.66, 29.64, 29.62, 29.56, 29.34, 27.37, 27.09, 22.67, 14.09; HRMS: m/z 330.3361 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calc. for $[\text{C}_{20}\text{H}_{44}\text{NO}_2]$ 330.3367).

N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-*N*-oktadecylamin (**7e**). Žlutá krystalická látka, t. t. 48,1 – 49,7 °C (5,17 g, 96 %); ^1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 3.62 (t, $J = 5.4$ Hz, 4H), 2.66 (t, $J = 5.4$ Hz, 4H), 2.55 – 2.49 (m, 2H), 1.49 – 1.43 (m, 2H), 1.29 – 1.24 (m, 30H), 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 61.10, 59.62, 56.04, 54.78, 50.94, 31.90, 29.67, 29.64, 29.61, 29.56, 29.33, 27.37, 27.00, 22.66, 14.09; HRMS: m/z 358.3675 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calc. for $[\text{C}_{22}\text{H}_{48}\text{NO}_2]$ 358.3680).

Druhý krok reakce:

Výchozí látka N-alkyldiethanolamin (**7a-e**) v množství 14 mmol z prvního kroku reakce byla smísená s 28 mmol benzylchloridu (**8a**). Reakce probíhala při teplotě 100 °C po dobu 2 hodin a průběh byl monitorován pomocí TLC. Po 2 hodinách byla reakce odstavena na 3 dny, poté byla směs odpařena do konstantní hmotnosti a výsledný produkt byl čištěn opakovanou krystalizací.

Reakční schéma č. 4:



Tabulka produktů č. 4:

Označení	R	Struktura	Mr	výtěžek (%)
9a	C ₁₀ H ₂₁		371,98	78
9b	C ₁₂ H ₂₅		400,04	41
9c	C ₁₄ H ₂₉		428,09	65
9d	C ₁₆ H ₃₃		456,14	68
9e	C ₁₈ H ₃₇		484,20	52

Analýza NMR a HRMS:

N-benzyl-*N,N*-bis(2-hydroxyethyl)dekan-1-aminium-chlorid (**9a**). Bílá krystalická látka, t. t. 114,0 -114,6°C (4,09 g, 78 %); ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.63 – 7.57 (m, 2H), 7.47 – 7.39 (m, 3H), 5.73 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 4.86 (s, 2H), 4.26 – 4.14 (m, 4H), 3.68 – 3.54 (m, 4H), 3.39 – 3.32 (m, 2H), 1.89 – 1.80 (m, 2H), 1.36 – 1.19 (m, 14H), 0.87 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 133.18, 130.61, 129.25, 127.27, 64.39, 60.20, 59.60, 55.83, 31.78, 29.37, 29.36, 29.18, 29.13, 26.22, 22.69, 22.59, 14.05; HRMS: *m/z* 336.2888 [M]⁺ (calc. for [C₂₁H₃₈NO₂]⁺ 336.2897).

N-benzyl-*N,N*-bis(2-hydroxyethyl)dodekan-1-aminium-chlorid (**9b**). Bílá krystalická látka, t. t. 118,7 -119,0 °C (4,68 g, 41 %); ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.62 – 7.57 (m, 2H), 7.47 – 7.39 (m, 3H), 5.30 (t, *J* = 5.4 Hz, 2H), 4.86 (s, 2H), 4.27 – 4.14 (m,

4H), 3.69 – 3.54 (m, 4H), 3.38 – 3.31 (m, 2H), 1.89 – 1.80 (m, 2H), 1.31 – 1.22 (m, 18H), 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 133.17, 130.61, 129.26, 127.27, 64.39, 60.21, 59.61, 55.83, 31.84, 29.55, 29.42, 29.39, 29.27, 29.15, 26.23, 22.69, 22.62, 14.06; HRMS: m/z 364.3207 $[\text{M}]^+$ (calc. for $[\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{NO}_2]^+$ 364.3210).

N-benzyl-*N,N*-bis(2-hydroxyethyl)tetradekan-1-aminium-chlorid (**9c**). Bílá krystalická látka, t. t. 120,6 -120,9 °C (3,92 g, 65 %); ^1H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.68 – 7.62 (m, 2H), 7.56 – 7.52 (m, 3H), 4.79 (s, 2H), 4.09 (t, $J = 5.1$ Hz, 4H), 3.51 (t, $J = 7.4, 5.0$ Hz, 4H), 3.38 – 3.31 (m, 2H), 1.98 – 1.88 (m, 2H), 1.37 – 1.27 (m, 22H), 0.93 – 0.89 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz Methanol-*d*₄) δ 134.34, 131.79, 130.36, 129.11, 65.40, 61.34, 61.08, 56.71, 33.06, 30.79, 30.77, 30.75, 30.71, 30.61, 30.53, 30.46, 30.18, 27.34, 23.72, 23.49, 14.44; HRMS: m/z 392.3515 $[\text{M}]^+$ (calc. for $[\text{C}_{25}\text{H}_{46}\text{NO}_2]^+$ 392.3523).

N-benzyl-*N,N*-bis(2-hydroxyethyl)hexadekan-1-aminium-chlorid (**9d**). Bílá krystalická látka, t. t. 121,6 -121,9 °C (4,39 g, 68 %); ^1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.65 – 7.55 (m, 2H), 7.48 – 7.40 (m, 3H), 5.73 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H), 4.86 (s, 2H), 4.28 – 4.14 (m, 4H), 3.69 – 3.55 (m, 4H), 3.39 – 3.32 (m, 2H), 1.90 – 1.80 (m, 2H), 1.32 – 1.23 (m, 26H), 0.87 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 133.22, 130.67, 129.31, 127.31, 64.43, 60.25, 59.65, 55.89, 31.92, 29.70, 29.66, 29.61, 29.48, 29.45, 29.36, 29.21, 26.28, 22.75, 22.68, 14.11; HRMS: m/z 420.3828 $[\text{M}]^+$ (calc. for $[\text{C}_{27}\text{H}_{50}\text{NO}_2]^+$ 420.3836).

N-benzyl-*N,N*-bis(2-hydroxyethyl)octadekan-1-aminium-chlorid (**9e**). Bílá krystalická látka, t. t. 123,2-123,8 °C (3,59 g, 52 %); ^1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 7.62 – 7.57 (m, 2H), 7.49 – 7.39 (m, 3H), 5.72 (t, $J = 5.4$ Hz, 2H), 4.87 (s, 2H), 4.22 (t, $J = 10.8, 6.3, 5.6$ Hz, 4H), 3.62 (t, $J = 39.6, 14.4, 6.5, 3.3$ Hz, 4H), 3.38 – 3.31 (m, 2H), 1.90 – 1.81 (m, 2H), 1.38 – 1.15 (m, 30H), 0.88 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 133.19, 130.63, 129.28, 127.28, 64.40, 60.22, 59.61, 55.87, 31.88, 29.68, 29.64, 29.62, 29.59, 29.46, 29.42, 29.32, 29.18, 26.24, 22.71, 22.65, 14.08; HRMS: m/z 448.4153 $[\text{M}]^+$ (calc. for $[\text{C}_{29}\text{H}_{54}\text{NO}_2]^+$ 448.4149).

4.1.8 SYNTÉZA DERIVÁTŮ DIETHANOLAMINU 2

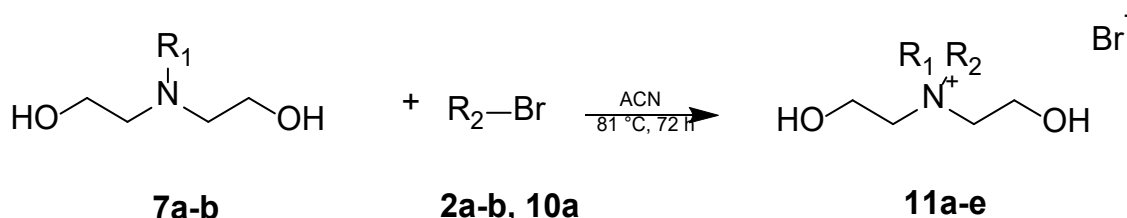
První krok reakce:

Viz kapitola 4.1.7 Syntéza derivátů diethanolaminu 1.

Druhý krok reakce:

Výchozí látka (**7a-e**) v množství 3,66 mmol byla rozpuštěna ve 30 ml acetonitrilu (ACN). K roztoku bylo přidáno 1,4 ekvivalentu příslušného alkylbromidu (5,124 mmol) a tetrabutylamonium-bromid (TBABr) nebo tetrabutylamonium-chlorid (TBACl) v 0,1 ekvivalentu (0,366 mmol) jako katalyzátoru. Reakce probíhala za refluxu rozpouštědla (81 °C) 72 hodin. Surový produkt byl promyt diethyletherem a následně separován ve směsi voda/chloroform (1:1). Výsledný produkt byl přečištěn krystalizací v ethylacetátu.

Reakční schéma č. 5:



Tabulka produktů č. 5:

Označení	R ₁ , R ₂	Struktura	Mr	výtěžek (%)
11a	C ₁₂ H ₂₅ , C ₈ H ₁₇		466,58	6
11b	C ₁₂ H ₂₅ , C ₁₀ H ₂₁		494,63	41
11c	C ₁₀ H ₂₁ , C ₈ H ₁₇		438,53	5
11d	C ₁₂ H ₂₅ , C ₁₂ H ₂₅		522,69	1
11e	C ₁₀ H ₂₁ , C ₁₀ H ₂₁		466,58	7

Pozn: **10a**: 1-bromooktan

Analýza NMR a HRMS:

N,N-bis(2-hydroxyethyl)-*N*-dodecyl-*N*-oktylammonium-bromid (**11a**). Bílá krystalická látka, t. t. 55,0-55,8 °C, (0,1 g, 6 %) ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.85 – 4.80 (m, 2H), 4.13 – 4.06 (m, 4H), 3.73 – 3.65 (m, 4H), 3.49 – 3.41 (m, 4H), 1.74 – 1.65 (m, 4H), 1.37 – 1.25 (m, 28H), 0.88 (t, *J* = 6.7 Hz, 6H); ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 61.18, 60.41, 55.67, 31.89, 31.63, 29.60, 29.48, 29.43, 29.32, 29.14,

29.07, 29.06, 26.32, 22.67, 22.58, 22.09, 14.10, 14.05; HRMS: m/z 386.3984 $[M]^+$ (calc. for $[C_{24}H_{52}NO_2]^+$ 386.3993).

N,N-bis(2-hydroxyethyl)-N-decyl-N-dodecylammonium-bromid (11). Bílá krystalická látka, t. t. 57,2-57,9 °C, (0,75 g, 41 %) 1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.84 – 4.80 (m, 2H), 4.14 – 4.07 (m, 4H), 3.73 – 3.65 (m, 4H), 3.48 – 3.41 (m, 4H), 1.74 – 1.64 (m, 4H), 1.39 – 1.22 (m, 32H), 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 61.16, 60.36, 55.65, 31.87, 31.81, 29.58, 29.57, 29.45, 29.40, 29.39, 29.29, 29.22, 29.12, 29.10, 26.29, 22.64, 22.61, 22.06, 14.07, 14.06; HRMS: m/z 414.4210 $[M]^+$ (calc. for $[C_{26}H_{56}NO_2]^+$ 414.4306).

N,N-bis(2-hydroxyethyl)-N-decyl-N-oktylammonium-bromid (11c). Žlutá olejovitá látka, (0,1 g, 6 %); 1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.83 (t, $J = 5.5$ Hz, 2H), 4.13 – 4.07 (m, 4H), 3.72 – 3.66 (m, 4H), 3.49 – 3.42 (m, 4H), 1.75 – 1.65 (m, 4H), 1.44 – 1.17 (m, 24H), 0.88 (t, $J = 6.8$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 61.18, 60.43, 55.68, 31.85, 31.65, 29.44, 29.27, 29.15, 29.09, 29.08, 26.33, 22.66, 22.60, 22.11, 14.11, 14.08; HRMS: m/z 358.3675 $[M]^+$ (calc. for $[C_{22}H_{48}NO_2]^+$ 358.3680).

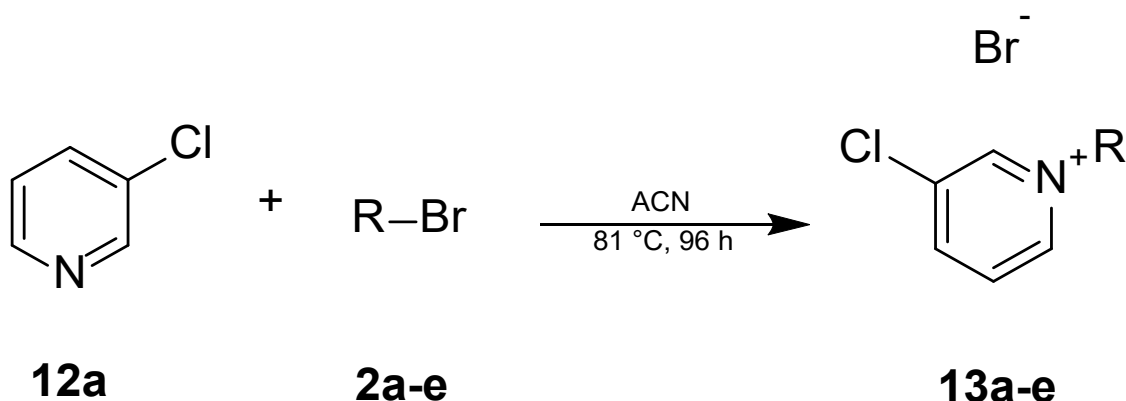
N,N-bis(dodecyl)-N,N-bis(2-hydroxyethyl)ammonium-bromid (11d). Bílá krystalická látka, t. t. 62,3-62,8 °C, (0,01 g, 1 %) 1H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.85 – 4.80 (m, 2H), 4.13 – 4.07 (m, 4H), 3.72 – 3.67 (m, 4H), 3.47 – 3.41 (m, 4H), 1.73 – 1.65 (m, 4H), 1.40 – 1.21 (m, 36H), 0.88 (t, $J = 6.9$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 61.16, 60.36, 55.64, 31.86, 29.58, 29.52, 29.45, 29.40, 29.29, 29.11, 26.29, 22.64, 22.06, 14.06; HRMS: m/z 442.4601 $[M]^+$ (calc. for $[C_{28}H_{60}NO_2]^+$ 442.4619).

N,N-bis(decyl)-N,N-bis(2-hydroxyethyl)ammonium-bromid (11e). Bílá krystalická látka, t. t. 59,2-60,1 °C, (0,130 g, 7 %) 1H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 4.84 (s, 2H), 3.95 (t, $J = 4.9$ Hz, 4H), 3.57 – 3.52 (m, 4H), 3.47 – 3.38 (m, 4H), 1.78 – 1.71 (m, 4H), 1.43 – 1.25 (m, 28H), 0.90 (t, $J = 6.9$ Hz, 6H); ^{13}C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 60.42, 60.02, 55.20, 31.65, 29.20, 29.14, 29.03, 28.76, 25.91, 22.33, 21.54, 13.04; HRMS: m/z 386.3972 $[M]^+$ (calc. for $[C_{24}H_{52}NO_2]^+$ 386.3993).

4.1.9 SYNTÉZA DERIVÁTŮ 3-CHLOROPYRIDINU

Výchozí látka 3-chloro-pyridin (**12a**) byla v množství 17,6 mmol rozpuštěna ve 30 ml ACN (acetonitril). K roztoku bylo přidáno 44 mmol alkylbromidu (**2a-e**). Reakce probíhala za refluxu rozpouštědla (81 °C) 96 hodin a byla monitorována pomocí TLC. Poté byla směs odpařena do konstantní hmotnosti a výsledný produkt byl získán opakovanou krystalizací.

Reakční schéma č. 6:



Tabulka produktů č. 6:

Označení	R	Struktura	Mr	výtěžek (%)
13a	C ₁₀ H ₂₁		334,72	70
13b	C ₁₂ H ₂₅		362,78	83
13c	C ₁₄ H ₂₉		380,93	71
13d	C ₁₆ H ₃₃		418,88	78
13e	C ₁₈ H ₃₇		446,94	46

Analýza NMR a HRMS:

3-chloro-1-decylpyridin-1-ium-bromid (13a). Hnědá olejovitá látka, (4,24 g, 70 %); ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 9.69 – 9.66 (m, 1H), 9.60 (t, *J* = 1.7 Hz, 1H), 8.50 – 8.47 (m, 1H), 8.27 – 8.22 (m, 1H), 5.10 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H), 2.10 – 2.00 (m, 2H), 1.43 – 1.17 (m, 14H), 0.86 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 144.97, 144.19, 143.65, 135.68, 129.17, 62.45, 31.96, 31.74, 29.38, 29.26, 29.16, 29.00, 25.98, 22.57, 14.03; HRMS: *m/z* 254.1666 [M]⁺ (calc. for [C₁₅H₂₅ClN]⁺ 254.1670).

3-chloro-1-dodecylpyridin-1-ium-bromid (13b). Hnědá krystalická látka, t. t. 50,1-51,3 °C, (5,41 g, 83 %); ¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 9.37 (t, *J* = 1.8 Hz, 1H),

9.06 (dt, $J = 6.0, 1.2$ Hz, 1H), 8.73 – 8.67 (m, 1H), 8.14 (dd, $J = 8.5, 6.1$ Hz, 1H), 4.71 – 4.64 (m, 2H), 2.10 – 2.01 (m, 2H), 1.48 – 1.24 (m, 18H), 0.90 (t, $J = 7.0$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, Methanol- d_4) δ 146.67, 145.53, 144.72, 137.01, 130.04, 63.61, 33.05, 32.42, 30.71, 30.61, 30.47, 30.44, 30.09, 27.16, 23.71, 14.43; HRMS: m/z 282.1982 [M] $^+$ (calc. for [C₁₇H₂₉ClN] $^+$ 282.1983).

3-chloro-1-tetradecyl-pyridin-1-ium-bromid (13c). Bílá krystalická látka, t. t. 80,5-82,4 °C, (4,87 g, 71 %); ^1H NMR (500 MHz, Chloroform- d) δ 9.70 – 9.65 (m, 2H), 8.48 (dd, $J = 7.8, 1.8$ Hz, 1H), 8.25 (dd, $J = 8.5, 6.0$ Hz, 1H), 5.10 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.09 – 1.99 (m, 2H), 1.45 – 1.14 (m, 22H), 0.86 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform- d) δ 144.97, 144.12, 143.75, 135.65, 129.16, 62.35, 31.98, 31.82, 29.58, 29.54, 29.51, 29.44, 29.27, 29.25, 29.01, 25.97, 22.59, 14.03; HRMS: m/z 310.2284 [M] $^+$ (calc. for [C₁₉H₃₃ClN] $^+$ 310.2296).

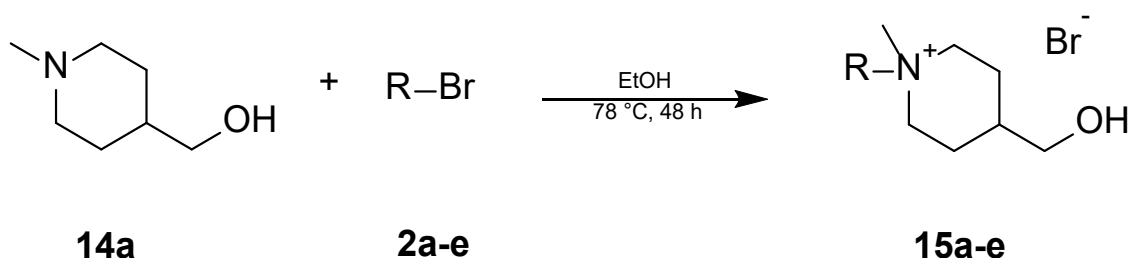
3-chloro-1-hexadecylpyridin-1-ium-bromid (13d). Bílá krystalická látka, t. t. 89,2-90,8 °C, (5,77 g, 78 %); ^1H NMR (500 MHz, Chloroform- d) δ 9.68 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 9.63 (t, $J = 1.7$ Hz, 1H), 8.48 (dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, 1H), 8.24 (dd, $J = 8.5, 6.0$ Hz, 1H), 5.11 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.09 – 1.99 (m, 2H), 1.46 – 1.11 (m, 26H), 0.86 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform- d) δ 144.98, 144.16, 143.70, 135.67, 129.15, 62.41, 31.98, 31.85, 29.63, 29.58, 29.54, 29.46, 29.29, 29.03, 25.99, 22.61, 14.05; HRMS: m/z 338.2596 [M] $^+$ (calc. for [C₂₁H₃₇ClN] $^+$ 338.2609).

3-chloro-1-okadecyl-pyridin-1-ium-bromid (13e). Bílá krystalická látka, t. t. 96,0-96,8 °C, (3,63 g, 46 %); ^1H NMR (500 MHz, Chloroform- d) δ 9.68 (d, $J = 6.0$ Hz, 1H), 9.64 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H), 8.51 – 8.45 (m, 1H), 8.26 – 8.20 (m, 1H), 5.11 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 2.04 (p, $J = 7.5$ Hz, 3H), 1.44 – 1.13 (m, 30H), 0.86 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform- d) δ 144.98, 144.16, 143.71, 135.66, 129.15, 62.40, 31.98, 31.84, 29.63, 29.61, 29.58, 29.54, 29.46, 29.29, 29.28, 29.02, 25.98, 22.61, 14.04; HRMS: m/z 366.2919 [M] $^+$ (calc. for [C₂₃H₄₁ClN] $^+$ 366.2922).

4.1.10 SYNTÉZA DERIVÁTŮ (1-METHYLPYPERIDIN-4-YL)METHANOLU

Výchozí látka (1-methylpiperidin-4-yl)methanol (**14a**) v množství 3,87 mmol byla rozpuštěna v 30 ml EtOH (ethanol). K roztoku bylo přidáno 7,74 mmol alkylbromidu (**2a-e**). Reakce probíhala za refluxu rozpouštědla (78 °C) 48 hodin. Reakce byla monitorována pomocí TLC. Po ukončení reakce byla směs odpařena do konstantní hmotnosti a čištěna řízenou krystalizací.

Reakční schéma č. 7:



Tabulka produktů č. 7:

Označení	R	Struktura	Mr	výtěžek (%)
15a	C ₁₀ H ₂₁		350,38	39
15b	C ₁₂ H ₂₅		378,43	92
15c	C ₁₄ H ₂₉		406,48	31
15d	C ₁₆ H ₃₃		434,54	37
15e	C ₁₈ H ₃₇		462,59	21

Analýza NMR a HRMS:

1-decyl-4-hydroxymethyl-1-methylpiperidin-1-ium-bromid (15a). Žlutá olejovitá látka, (0,53 g, 39 %); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.67 – 4.61 (m, 1H), 3.48 – 3.40 (m, 2H), 3.35 – 3.20 (m, 6H), 3.01 (s, 2H), 2.96 (s, 1H), 1.80 – 1.48 (m, 7H), 1.36 – 1.18 (m, 14H), 0.85 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 66.75, 64.43, 64.27, 59.54, 59.42, 56.80, 51.17, 43.64, 35.63, 35.10, 31.47, 29.10, 29.05, 29.00, 28.86, 28.79, 28.71, 26.13, 25.99, 22.61, 22.40, 22.29, 21.26, 21.22, 14.16; HRMS: *m/z* 270.2794 [M]⁺ (calc. for [C₁₇H₃₆NO]⁺ 270.2791).

1-dodecyl-4-hydroxymethyl-1-methylpiperidin-1-ium bromid (15b). Hnědá olejovitá látka, (1,34 g, 92 %); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.70 – 4.57 (m, 1H), 3.47 – 3.39 (m, 2H), 3.33 – 3.19 (m, 6H), 3.01 (s, 2H), 2.95 (s, 1H), 1.78 – 1.48 (m, 7H), 1.26 – 1.20

(m, 18H), 0.84 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 66.79, 64.45, 64.28, 59.57, 59.44, 56.82, 51.19, 43.65, 35.64, 35.11, 31.50, 29.23, 29.22, 29.15, 29.07, 29.01, 28.92, 28.81, 28.72, 26.14, 26.00, 22.63, 22.41, 22.31, 21.27, 21.23, 14.17; HRMS: m/z 298.3104 $[\text{M}]^+$ (calc. for $[\text{C}_{19}\text{H}_{40}\text{NO}]^+$ 298.3104).

4-hydroxymethyl-1-methyl-1-tetradecylpiperidin-1-ium-bromid (**15c**). Žlutá krystalická látka, t. t. 150,8-151,2 °C, (0,49 g, 31 %); ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 4.67 – 4.62 (m, 1H), 3.47 – 3.39 (m, 2H), 3.34 – 3.20 (m, 6H), 3.01 (s, 2H), 2.95 (s, 1H), 1.80 – 1.48 (m, 7H), 1.26 – 1.20 (m, 22H), 0.84 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 66.78, 64.45, 64.29, 59.57, 59.44, 56.81, 51.20, 43.65, 35.64, 35.11, 31.50, 29.27, 29.23, 29.16, 29.07, 29.02, 28.92, 28.81, 28.73, 26.14, 26.01, 22.63, 22.41, 22.30, 21.27, 21.23, 14.17; HRMS: m/z 326.3420 $[\text{M}]^+$ (calc. for $[\text{C}_{21}\text{H}_{44}\text{NO}]^+$ 326.3417).

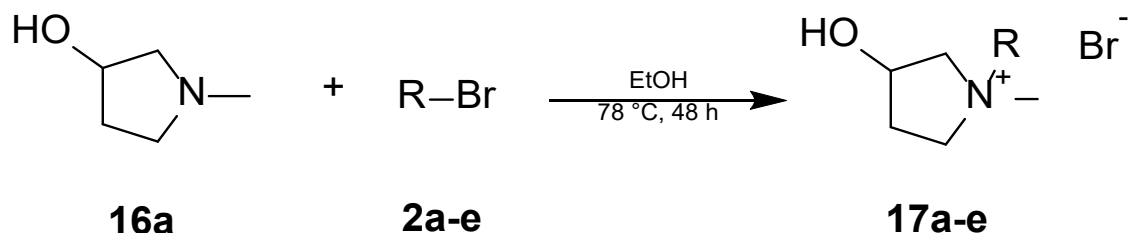
1-hexadecyl-4-hydroxymethyl-1-methylpiperidin-1-ium-bromid (**15d**). Bílá krystalická látka, t. t. 160,3-161,8 °C, (0,62 g, 37 %); ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 4.67 – 4.61 (m, 1H), 3.46 – 3.38 (m, 2H), 3.32 – 3.17 (m, 6H), 2.99 (s, 2H), 2.94 (s, 1H), 1.78 – 1.51 (m, 7H), 1.30 – 1.21 (m, 26H), 0.85 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 64.29, 59.48, 35.14, 31.49, 29.25, 29.21, 29.15, 29.05, 28.90, 28.80, 26.00, 22.61, 22.40, 22.29, 21.25, 14.17; HRMS: m/z 354.3723 $[\text{M}]^+$ (calc. for $[\text{C}_{23}\text{H}_{48}\text{NO}]^+$ 354.3730).

4-hydroxymethyl-1-methyl-1-oktadecylpiperidin-1-ium bromid (**15e**). Bílá krystalická látka, t. t. 168,0-169,8 °C, (0,38 g, 21 %); ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 4.66 – 4.61 (m, 1H), 3.47 – 3.39 (m, 2H), 3.32 – 3.22 (m, 6H), 3.00 (s, 2H), 2.95 (s, 1H), 1.81 – 1.48 (m, 7H), 1.40 – 1.07 (m, 30H), 0.84 (t, $J = 6.8$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 66.78, 64.44, 64.27, 59.56, 59.44, 56.81, 51.19, 43.63, 35.64, 35.11, 31.49, 29.25, 29.20, 29.16, 29.07, 29.01, 28.90, 28.81, 28.73, 26.14, 26.00, 22.61, 22.40, 22.29, 21.26, 21.22, 14.15; HRMS: m/z 328.4370 $[\text{M}]^+$ (calc. for $[\text{C}_{25}\text{H}_{52}\text{NO}]^+$ 328.4043).

4.1.11 SYNTÉZA DERIVÁTŮ 1-METHYLPYRROLIDIN-3-OLU

Výchozí látka 1-methylpyrrolidin-3-ol (**16a**) v množství 4,94 mmol byla rozpuštěna v 30 ml EtOH (ethanol). K roztoku bylo přidáno 9,89 mmol příslušného alkylbromidu (**2a-e**). Reakce probíhala za refluxu rozpouštědla (78 °C) 48 hodin a byla monitorována pomocí TLC. Po ukončení reakce byla směs odpařena do konstantní hmotnosti a následně čištěna krystalizací.

Reakční schéma č. 8:



Tabulka produktů č. 8:

Označení	R	Struktura	Mr	výtěžek (%)
17a	C ₁₀ H ₂₁		322,33	45
17b	C ₁₂ H ₂₅		350,38	22
17c	C ₁₄ H ₂₉		378,43	98
17d	C ₁₆ H ₃₃		406,48	57
17e	C ₁₈ H ₃₇		434,54	65

Analýza NMR a HRMS:

1-decyl-3-hydroxy-1-methyl-pyrrolidin-1-ium-bromid (17a). Hnědá olejovitá látka, (0,97 g, 45 %); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 5.54 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 4.50 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 3.78 – 3.21 (m, 9H), 2.48 – 2.30 (m, 1H), 2.04 – 1.90 (m, 1H), 1.74 – 1.61 (m, 2H), 1.32 – 1.23 (m, 17H), 0.84 (t, J = 6.8 Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 70.96, 68.32, 64.75, 63.09, 49.73, 32.33, 31.48, 29.10, 29.01, 28.86, 28.70, 26.06, 23.01, 22.30, 14.17; HRMS: *m/z* 242.2474 [M]⁺ (calc. for [C₁₅H₃₂NO]⁺ 242.2478).

1-dodecyl-3-hydroxy-1-methyl-pyrrolidin-1-ium-bromid (17b). Bílá krystalická látka, t. t. 182,3-183,6 °C, (0,38 g, 22 %); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 5.55 (d, J = 3.8 Hz, 1H), 4.51 (t, J = 5.0 Hz, 1H), 3.75 – 3.23 (m, 9H), 2.48 – 2.37 (m, 1H), 2.05 – 1.88 (m, 1H), 1.76 – 1.60 (m, 2H), 1.33 – 1.15 (m, 18H), 0.84 (t, J = 6.8 Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 70.96, 68.33, 64.75, 63.10, 49.74, 32.75, 32.34, 31.50,

29.22, 29.16, 29.02, 28.92, 28.71, 26.07, 23.03, 22.31, 14.17; HRMS: m/z 270.2783 [M]⁺ (calc. for [C₁₇H₃₆NO]⁺ 270.2791).

3-hydroxy-1-methyl-1-tetradecylpyrrolidin-1-ium-bromid (**17c**). Bílá krystalická látka, t. t. 194,6-195,2 °C, (1,83 g, 98 %); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 5.55 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 4.54 – 4.47 (m, 1H), 3.73 – 3.22 (m, 9H), 2.48 – 2.37 (m, 1H), 2.06 – 1.85 (m, 1H), 1.74 – 1.61 (m, 2H), 1.33 – 1.21 (m, 22H), 0.84 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 70.96, 68.33, 64.75, 63.10, 49.74, 32.75, 32.34, 31.50, 29.28, 29.26, 29.23, 29.16, 29.02, 28.92, 28.72, 26.07, 23.03, 22.30, 14.16; HRMS: m/z 298.3100 [M]⁺ (calc. for [C₁₉H₄₀NO]⁺ 298.3104).

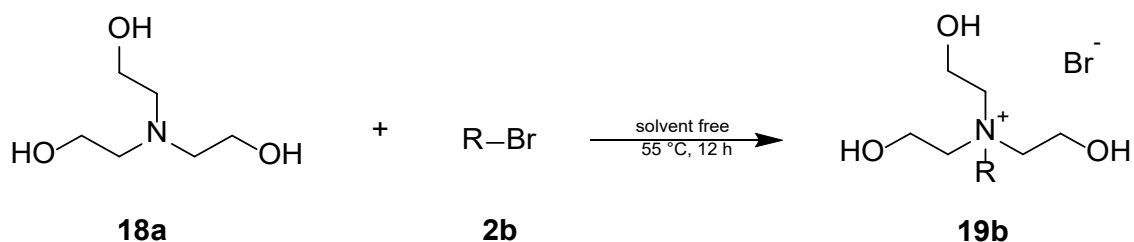
1-hexadecyl-3-hydroxy-1-methylpyrrolidin-1-ium-bromid (**17d**). Bílá krystalická látka, t. t. 197,8-198,9 °C, (1,94 g, 57 %); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 5.54 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 4.54 – 4.47 (m, 1H), 3.75 – 3.23 (m, 9H), 2.48 – 2.36 (m, 1H), 1.99 – 1.89 (m, 1H), 1.73 – 1.62 (m, 2H), 1.32 – 1.21 (m, 26H), 0.84 (t, *J* = 6.8 Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 70.95, 68.31, 64.74, 63.08, 49.72, 32.75, 32.33, 31.49, 29.25, 29.21, 29.15, 29.01, 28.91, 28.71, 26.06, 23.01, 22.29, 14.15; HRMS: m/z 326.3421 [M]⁺ (calc. for [C₂₁H₄₄NO]⁺ 326.3417).

3-hydroxy-1-methyl-1-oktadecylpyrrolidin-1-ium-bromid (**17e**). Bílá krystalická látka, t. t. 203,5-204,8 °C, (1,40 g, 65 %); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 5.54 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H), 4.54 – 4.47 (m, 1H), 3.72 – 3.22 (m, 9H), 2.48 – 2.37 (m, 1H), 1.99 – 1.89 (m, 1H), 1.73 – 1.62 (m, 2H), 1.30 – 1.21 (m, 30H), 0.84 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 70.95, 68.31, 64.73, 63.07, 49.71, 32.75, 32.33, 31.49, 29.25, 29.23, 29.20, 29.16, 29.03, 28.91, 28.72, 26.07, 23.02, 22.29, 14.15; HRMS: m/z 354.3734 [M]⁺ (calc. for [C₂₃H₄₈NO]⁺ 354.3730).

4.1.12 SYNTÉZA DERIVÁTŮ TRIETHANOLAMINU

Výchozí látka triethanolamin (**18a**) v množství 3,66 mmol byla přímo smíšena s 3,66 mmol alkylbromidu (**2b**) tzv. solvent-free reakce. Reakce probíhala při teplotě 55 °C 12 hodin a byla monitorována pomocí TLC. Po ukončení reakce byla směs odpařena do konstantní hmotnosti a následně čištěna krystalizací.

Reakční schéma č. 9:



Tabulka produktů č. 9:

Označení	R	Struktura	Mr	výtěžek (%)
19b	C ₁₂ H ₂₅		398,42	86

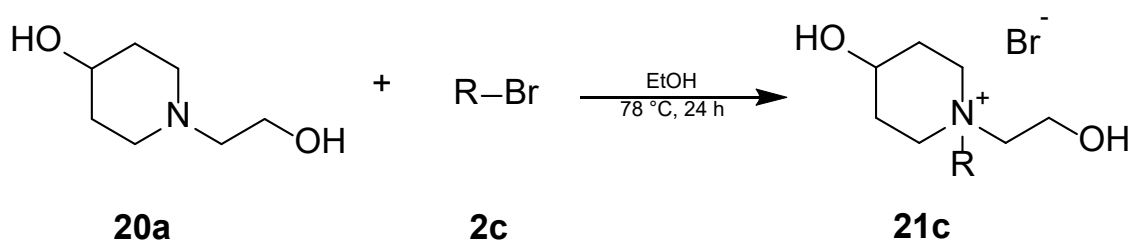
Analýza NMR a HRMS:

N-dodecyl-*N,N,N*-tris(hydroxyethyl)ammonium-bromid (**19b**). Bílá krystalická látka, t. t. 51,8-52,4 °C, (1,25 g, 86 %); ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 4.67 – 4.60 (m, 3H), 4.14 – 4.07 (m, 6H), 3.83 – 3.70 (m, 5H), 3.59 – 3.53 (m, 2H), 1.78 – 1.70 (m, 2H), 1.37 – 1.24 (m, 18H), 0.88 (t, *J* = 6.9 Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 61.83, 61.16, 55.68, 31.94, 29.72, 29.69, 29.62, 29.39, 29.32, 26.46, 22.71, 22.48, 14.14; HRMS: *m/z* 318.3008 [M]⁺ (calc. for [C₁₈H₄₀NO₃]⁺ 318.3003).

4.1.13 SYNTÉZA DERIVÁTU 1-(2-HYDROXYETHYL)PIPERIDIN-4-OLU

Výchozí látka 1-(2-hydroxyethyl)piperidin-4-ol (**20a**) v množství 3,44 mmol byla rozpuštěna v cca 30 ml EtOH (ethanol). K roztoku bylo přidáno 6,89 mmol alkylbromidu (**2c**). Reakce probíhala za refluxu rozpouštědla (78 °C) 24 hodin a byla monitorována pomocí TLC. Po ukončení reakce byla směs odpařena do konstantní hmotnosti a následně čištěna krystalizací.

Reakční schéma č. 10:



Tabulka produktů č. 10:

Označení	R	Struktura	Mr	výtěžek (%)
21c	C ₁₄ H ₂₉		422,48	2

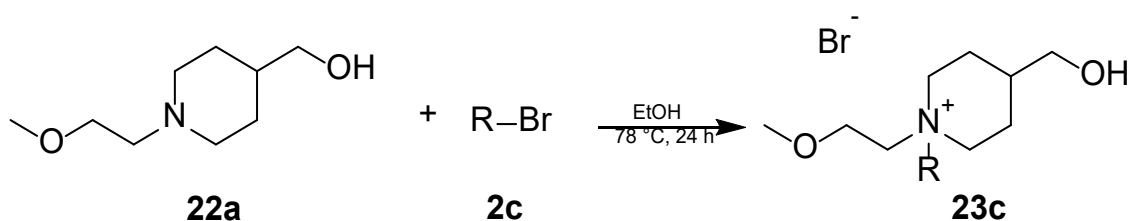
Analýza NMR a HRMS:

4-hydroxy-1-(2-hydroxyethyl)-1-tetradecylpiperidin-1-ium-bromid (**21c**). Hnědá olejovitá látka, (0,03 g, 2 %); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 5.28 – 5.22 (m, 1H), 5.06 (t, J = 3.5 Hz, 1H), 3.85 – 3.74 (m, 3H), 3.56 – 3.28 (m, 12H), 2.02 – 1.92 (m, 2H), 1.74 – 1.65 (m, 2H), 1.65 – 1.56 (m, 2H), 1.34 – 1.17 (m, 22H), 0.84 (t, J = 6.8 Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 55.75, 54.77, 54.66, 31.50, 29.27, 29.23, 29.15, 29.06, 28.92, 28.74, 28.73, 27.62, 27.55, 26.00, 22.30, 21.44, 21.13, 14.17. HRMS: *m/z* 342.3362 [M]⁺ (calc. for [C₂₁H₄₄NO₂]⁺ 342.3367).

4.1.14 SYNTÉZA DERIVÁTU 1-(2-METHOXYETHYL)PIPERIDIN-4-YL)METHANOLU

Výchozí látka (1-(2-methoxyethyl)piperidin-4-yl)methanol (**22a**) v množství 2,89 mmol byla rozpuštěna v 30 ml EtOH (ethanol). K roztoku bylo přidáno 5,77 mmol alkylbromidu (**2c**). Reakce probíhala za refluxu rozpouštědla (78 °C) 24 hodin a byla monitorována pomocí TLC. Po ukončení reakce byla směs odpařena do konstantní hmotnosti a surový produkt čištěn řízenou krystalizací.

Reakční schéma č. 11:



Tabulka produktů č. 11:

Označení	R	Struktura	Mr	výtěžek (%)
23c	C ₁₄ H ₂₉		450,54	22

Analýza NMR a HRMS:

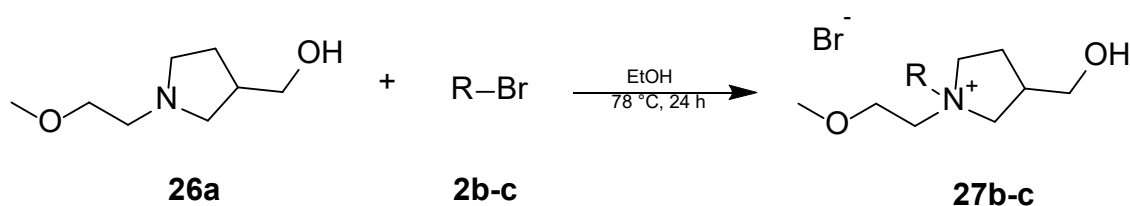
4-hydroxymethyl-1-(2-methoxyethyl)-1-tetradecylpiperidin-1-ium-bromid (**23c**). Žlutá krystalická látka, t. t. 63,2-64,0 °C, (0,25 g, 22 %); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.84 – 4.78 (m, 1H), 3.77 – 3.31 (m, 12H), 3.28 (s, 2H), 3.26 – 3.03 (m, 2H), 2.08 (s, 1H), 1.94 – 1.91 (m, 1H), 1.77 – 1.69 (m, 1H), 1.69 – 1.61 (m, 2H), 1.58 – 1.49 (m, 1H), 1.33 – 1.18 (m, 22H), 0.84 (t, J = 6.9 Hz, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 65.33, 64.48, 63.08, 61.28, 59.20, 58.53, 52.77, 32.86, 31.50, 29.26, 29.22, 29.14, 29.05, 28.99, 28.92, 28.74, 28.66, 25.87, 24.38, 22.30, 21.14, 19.01, 14.17; HRMS: *m/z* 370.3672 [M]⁺ (calc. for [C₂₃H₄₈NO₂]⁺ 370.3680).

1-ethyl-3-hydroxymethyl-1-tetradecylpyrrolidin-1-ium-bromid (25c). Bílá krystalická látka, t. t. 104,6-104,8 °C, (0,24 g, 16 %); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.98 – 4.92 (m, 1H), 3.69 – 3.60 (m, 1H), 3.59 – 3.50 (m, 1H), 3.50 – 3.11 (m, 8H), 2.67 – 2.57 (m, 1H), 2.18 – 2.05 (m, 1H), 1.87 – 1.76 (m, 1H), 1.63 – 1.53 (m, 2H), 1.34 – 1.14 (m, 25H), 0.88 – 0.81 (m, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 64.27, 61.70, 59.53, 57.83, 55.52, 38.06, 31.50, 29.26, 29.22, 29.16, 29.07, 28.92, 28.75, 28.71, 26.01, 24.89, 22.79, 22.30, 14.17, 8.87. HRMS: *m/z* 326.3421 [M]⁺ (calc. for [C₂₁H₄₄NO]⁺ 326.3417).

4.1.16 SYNTÉZA DERIVÁTŮ (1-(2-METHOXYETHYL)PYRROLIDIN-3-YL)METHANOLU

Výchozí látka (1-(2-methoxyethyl)pyrrolidin-3-yl)methanol (**26a**) v množství 3,14 mmol byla rozpuštěna v 30 ml EtOH. K roztoku bylo přidáno 6,28 mmol alkylbromidu (**2b-c**). Reakce probíhala za refluxu rozpouštědla (78 °C) 24 hodin a byla monitorována pomocí TLC. Po ukončení reakce byla směs odpařena do konstantní hmotnosti a následně čištěna krystalizací.

Reakční schéma č. 13:



Tabulka produktů č. 13:

Označení	R	Struktura	Mr	výtěžek (%)
27b	C ₁₂ H ₂₅		408,46	26
27c	C ₁₄ H ₂₉		436,51	55

Analýza NMR a HRMS:

1-dodecyl-3-hydroxymethyl-1-(2-methoxyethyl)pyrrolidin-1-ium-bromid (27b). Bílá krystalická látka, t. t. 78,3-78,6 °C, (0,33 g, 26 %); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) δ 4.95 (t, J = 5.1 Hz, 1H), 3.79 – 3.37 (m, 8H), 3.37 – 3.30 (m, 2H), 3.29 (s, 3H), 3.26 – 3.13 (m, 2H), 2.66 – 2.55 (m, 1H), 2.18 – 2.06 (m, 1H), 1.87 – 1.76 (m, 1H), 1.68 – 1.56 (m, 2H), 1.29 – 1.22 (m, 18H), 0.88 – 0.82 (m, 3H); ¹³C NMR (126 MHz, DMSO-*d*₆) δ 66.10, 65.36, 62.76, 61.79, 59.02, 58.43, 57.37, 37.87, 31.48, 29.20, 29.12, 29.00, 28.98, 28.90, 28.68, 28.63, 26.00, 24.68, 22.29, 14.16; HRMS: *m/z* 328.3198 [M]⁺ (calc. for [C₂₀H₄₂NO₂]⁺ 328.3210).

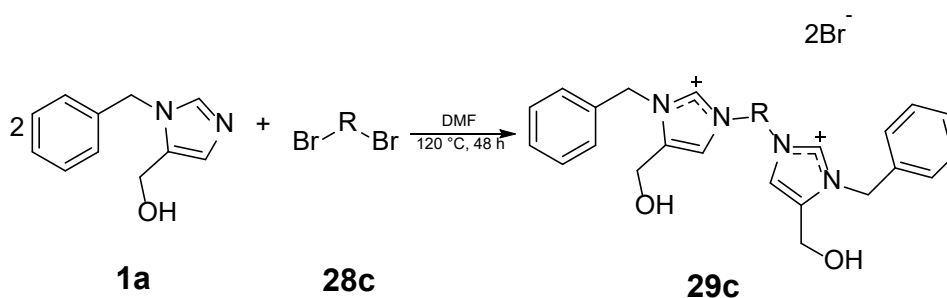
3-hydroxymethyl-1-(2-methoxyethyl)-1-tetradecylpyrrolidin-1-ium-bromid (27c). Bílá krystalická látka, t. t. 88,8-89,2 °C, (0,69 g, 55 %); ¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 4.96 (t, $J = 5.1$ Hz, 1H), 3.78 – 3.36 (m, 8H), 3.34 – 3.32 (m, 0H), 3.28 (s, 3H), 3.26 – 3.13 (m, 2H), 2.67 – 2.57 (m, 1H), 2.18 – 2.07 (m, 1H), 1.87 – 1.76 (m, 1H), 1.67 – 1.56 (m, 2H), 1.29 – 1.21 (m, 22H), 0.84 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 66.24, 65.37, 62.77, 61.80, 59.42, 58.44, 57.39, 37.85, 31.50, 29.26, 29.22, 29.14, 29.02, 28.92, 28.70, 28.65, 26.02, 25.95, 24.65, 22.30, 14.16; HRMS: m/z 356.3525 $[\text{M}]^+$ (calc. for $[\text{C}_{22}\text{H}_{46}\text{NO}_2]^+$ 356.3523).

4.1.17 SYNTÉZA BIS-KVARTÉRNÍHO DERIVÁTU (1-BENZYL-1H-IMIDAZOL-5-YL)METHANOLU

Výchozí látka (1-benzyl -1*H*-imidazol-5-yl)methanol (**1a**) v množství 1,06 mmol byla rozpuštěna v 30 ml DMF (dimethylformamid). K roztoku bylo přidáno 0,53 mmol alkylačního činidla (**28a-c**). Reakce probíhala při teplotě 120 °C 48 hodin a byla monitorována pomocí TLC. Po ukončení reakce byla směs odpařena do konstantní hmotnosti a následně čištěna krystalizací.

Reakční schéma č. 14:



Tabulka produktů č. 14:

Označení	R	Struktura	Mr	výtěžek (%)
29c	C ₁₂ H ₂₅	<p style="text-align: center;">29c</p>	704,57	13

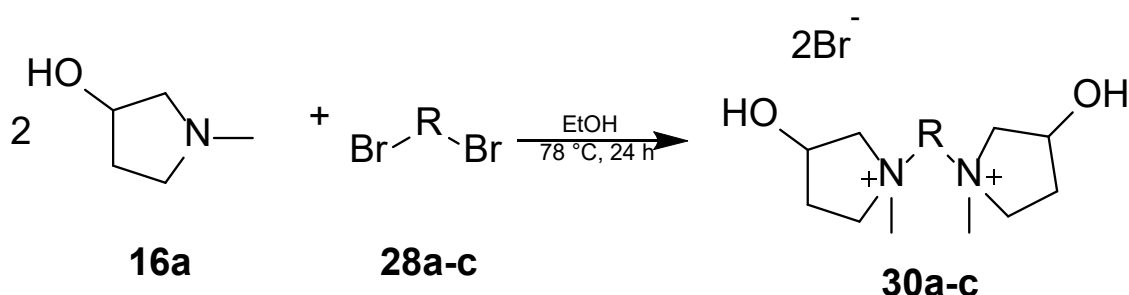
Analýza NMR a HRMS:

*3,3'-(dodekan-1,12-diyl)bis(1-benzyl-5-hydroxymethyl-1*H*-imidazol-3-ium)-dibromid (28b)*. Bílá krystalická látka, t. t. 127,6-127,9 °C, (0,05 g, 13 %); ¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 9.03 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H), 7.65 (d, *J* = 1.8 Hz, 2H), 7.47 – 7.35 (m, 10H), 5.49 (s, 4H), 4.57 (s, 4H), 4.20 (t, *J* = 7.3 Hz, 4H), 1.93 – 1.83 (m, 4H), 1.39 – 1.27 (m, 16H); ¹³C NMR (126 MHz, MeOD) δ 136.76, 135.13, 133.59, 129.04, 128.84, 127.90, 120.51, 52.64, 50.62, 50.60, 49.57, 49.55, 29.65, 29.21, 29.16, 28.68, 25.88; HRMS: *m/z* 272.1887 [M]²⁺ (calc. for [C₂₀H₄₆N₄O₂]²⁺ 272.1883).

4.1.18 SYNTÉZA BIS-KVARTÉRNÍCH DERIVÁTŮ 1-METHYLPYRROLIDIN-3-OLU

Výchozí látka 1-methylpyrrolidin-3-ol (**16a**) byla v množství 15 mmol rozpuštěna v 30 ml EtOH. K roztoku bylo přidáno 7,5 mmol příslušného dibromoalkanu (**28a-c**). Reakce probíhala za refluxu rozpouštědla (78 °C) 24 hodin a byla monitorována pomocí TLC. Po ukončení reakce byla směs odpařena do konstantní hmotnosti a následně čištěna krystalizací.

Reakční schéma č. 15:



Tabulka produktů č. 15:

Označení	R	Struktura	Mr	výtěžek (%)
30a	C ₈ H ₁₆		474,32	80
30b	C ₁₀ H ₂₀		502,39	12
30c	C ₁₂ H ₂₄		530,43	51

Analýza NMR a HRMS:

1,1'-(oktan-1,8-diyl)bis(3-hydroxy-1-methylpyrrolidin-1-ium)-dibromid (30a). Bílá krystalická látka, t. t. 102,4-102,6 °C, (3,03 g, 80 %); ¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 4.70 – 4.62 (m, 2H), 3.88 – 3.74 (m, 2H), 3.71 – 3.35 (m, 10H), 3.28 (s, 3H), 3.13 (s, 3H), 2.62 – 2.48 (m, 2H), 2.22 – 2.09 (m, 2H), 1.90 – 1.76 (m, 4H), 1.49 – 1.36 (m, 8H); ¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 71.46, 69.01, 65.77, 63.72, 49.87, 32.37, 28.40, 25.84, 23.21; HRMS: *m/z* 157.1461 [M]²⁺ (calc. for [C₁₈H₃₈N₂O₂]²⁺ 157.1383).

1,1'-(dekan-1,10-diyl)bis(3-hydroxy-1-methylpyrrolidin-1-ium)-dibromid (30b). Bílá krystalická látka, t. t. 216,8-217,3 °C, (0,45 g, 12 %); ¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 4.69 – 4.62 (m, 2H), 3.87 – 3.73 (m, 2H), 3.69 – 3.32 (m, 10H), 3.27 (s, 3H), 3.13 (s, 3H), 2.62 – 2.48 (m, 2H), 2.22 – 2.08 (m, 2H), 1.88 – 1.76 (m, 4H), 1.43 – 1.35 (m, 12H); ¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 71.45, 69.00, 65.81, 63.70, 49.84, 32.38,

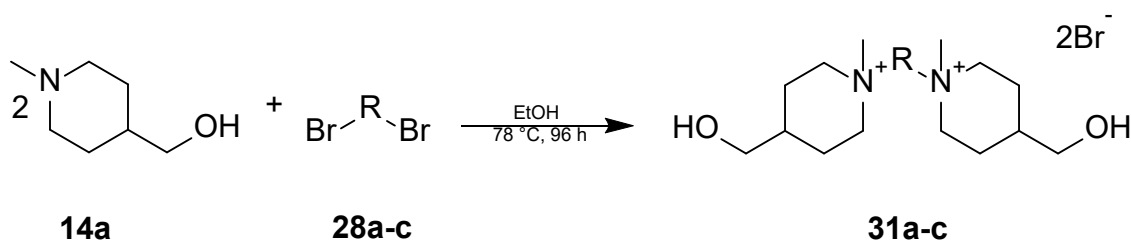
28.92, 28.69, 26.04, 23.29; HRMS: m/z 171.1616 $[M]^{2+}$ (calc. for $[C_{20}H_{42}N_2O_2]^{2+}$ 171.1618).

1,1'-(dodekan-1,12-diyl)bis(3-hydroxy-1-methylpyrrolidin-1-ium)-dibromid (**30c**).
Hnědá olejovitá látka, (2,02 g, 51 %); 1H NMR (500 MHz, Methanol- d_4) δ 4.69 – 4.62 (m, 2H), 3.86 – 3.73 (m, 2H), 3.69 – 3.33 (m, 10H), 3.27 (s, 3H), 3.12 (s, 3H), 2.62 – 2.48 (m, 2H), 2.22 – 2.09 (m, 2H), 1.87 – 1.75 (m, 4H), 1.42 – 1.32 (m, 16H); ^{13}C NMR (126 MHz, Methanol- d_4) δ 71.46, 69.00, 65.83, 63.69, 49.83, 32.38, 29.18, 29.12, 28.80, 26.09, 23.31; HRMS: m/z 185.1773 $[M]^{2+}$ (calc. for $[C_{22}H_{46}N_2O_2]^{2+}$ 185.1774).

4.1.19 SYNTÉZA BIS-KVARTÉRNÍCH DERIVÁTŮ (1-METHYLPYPERIDIN-4-YL)METHANOLU

Výchozí látka (1-methylpiperidin-4-yl)methanol (**14a**) byla v množství 7,74 mmol rozpuštěna v cca 30 ml EtOH. K roztoku bylo přidáno 3,87 mmol příslušného dibromoalkanu (**28a-c**). Reakce probíhala za refluxu rozpouštědla (78 °C) 96 hodin a byla monitorována pomocí TLC. Po ukončení reakce byla směs odpařena do konstantní hmotnosti a následně čištěna krystalizací.

Reakční schéma č. 16:



Tabulka produktů č. 16:

Označení	R	Struktura	Mr	výtěžek (%)
31a	C ₈ H ₁₆		531,12	35
31b	C ₁₀ H ₂₀		558,49	22
31c	C ₁₂ H ₂₄		586,53	47

Analýza NMR a HRMS:

1,1'-(oktan-1,8-diyl)bis(4-(hydroxymethyl)-1-methylpiperidin-1-ium)-dibromid (**31a**). Bílá krystalická látka, t. t. 231,6-232,4 °C, (0,69 g, 35 %); ¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 3.64 – 3.48 (m, 8H), 3.41 – 3.32 (m, 8H), 3.10 (s, 3H), 3.06 (s, 3H), 1.95 – 1.66 (m, 12H), 1.50 – 1.38 (m, 10H); ¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 64.50, 60.13, 57.45, 51.29, 35.06, 28.55, 25.81, 22.36, 21.43; HRMS: *m/z* 185.1773 [M]²⁺ (calc. for [C₂₂H₄₆N₂O₂]²⁺ 185.1774).

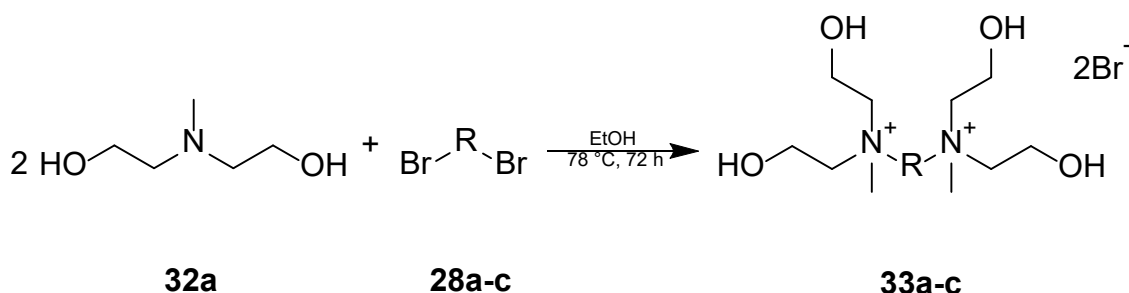
1,1'-(dekan-1,10-diyl)bis(4-(hydroxymethyl)-1-methylpiperidin-1-ium)-dibromid (**31b**). Žlutá krystalická látka, t. t. 137,3-137,9 °C, (0,48 g, 22 %); ¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 3.65 – 3.46 (m, 8H), 3.41 – 3.31 (m, 8H), 3.08 (d, J = 21.0 Hz, 6H), 1.96 – 1.63 (m, 12H), 1.45 – 1.36 (m, 14H); ¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 64.51, 60.12, 57.48, 51.27, 35.05, 29.00, 28.83, 26.01, 22.36, 21.50; HRMS: *m/z* 199.1929 [M]²⁺ (calc. for [C₂₄H₅₀N₂O₂]²⁺ 199.1931).

1,1'-(dodekan-1,12-diyl)bis(4-(hydroxymethyl)-1-methylpiperidin-1-ium)-dibromid
(**31c**). Bílá krystalická látka, t. t. 195,0-195,6 °C, (1,07 g, 47 %); ¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 3.63 – 3.50 (m, 8H), 3.39 – 3.30 (m, 8H), 3.07 (d, *J* = 20.4 Hz, 6H), 1.96 – 1.62 (m, 12H), 1.44 – 1.32 (m, 18H); ¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 64.51, 60.12, 57.48, 51.27, 43.29, 35.05, 29.00, 28.83, 28.74, 26.01, 22.36, 21.50.; HRMS: *m/z* 213.2085 [M]²⁺ (calc. for [C₂₆H₅₄N₂O₂]²⁺ 213.2087).

4.1.20 SYNTÉZA BIS-KVARTÉRNÍCH DERIVÁTŮ *N*-METHYLDIETHANOLAMINU

Výchozí látka *N*-methyl-diethanolamin (**32a**) v množství 16,78 mmol byla rozpuštěna v 30 ml EtOH. K roztoku bylo přidáno 8,39 mmol dibromoalkanu (**28a-c**). Reakce probíhala za refluxu rozpouštědla (78 °C) 72 hodin a byla monitorována pomocí TLC. Po ukončení reakce byla směs odpařena do konstantní hmotnosti a následně čištěna krystalizací.

Reakční schéma č. 17:



Tabulka produktů č. 17:

Označení	R	Struktura	Mr	výtěžek (%)
33a	C ₈ H ₁₆		510,34	80
33b	C ₁₀ H ₂₀		538,41	39
33c	C ₁₂ H ₂₄		566,45	61

Analýza NMR a HRMS:

*N*¹,*N*¹,*N*⁸,*N*⁸-tetrakis(2-hydroxyethyl)-*N*¹,*N*⁸-dimethyloktan-1,8-diaminium-dibromid (**33a**). Bílá krystalická látka, t. t. 120,5-121,8 °C, (4,07 g, 80 %); ¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 4.03 – 3.96 (m, 8H), 3.64 – 3.53 (m, 8H), 3.53 – 3.46 (m, 4H), 3.21 (s, 6H), 1.88 – 1.78 (m, 4H), 1.49 – 1.33 (m, 8H); ¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 63.80, 63.63, 55.39, 49.03, 28.38, 25.75, 21.94; HRMS: *m/z* 175.1569 [M]²⁺ (calc. for [C₁₈H₄₂N₂O₄]²⁺ 175.1567).

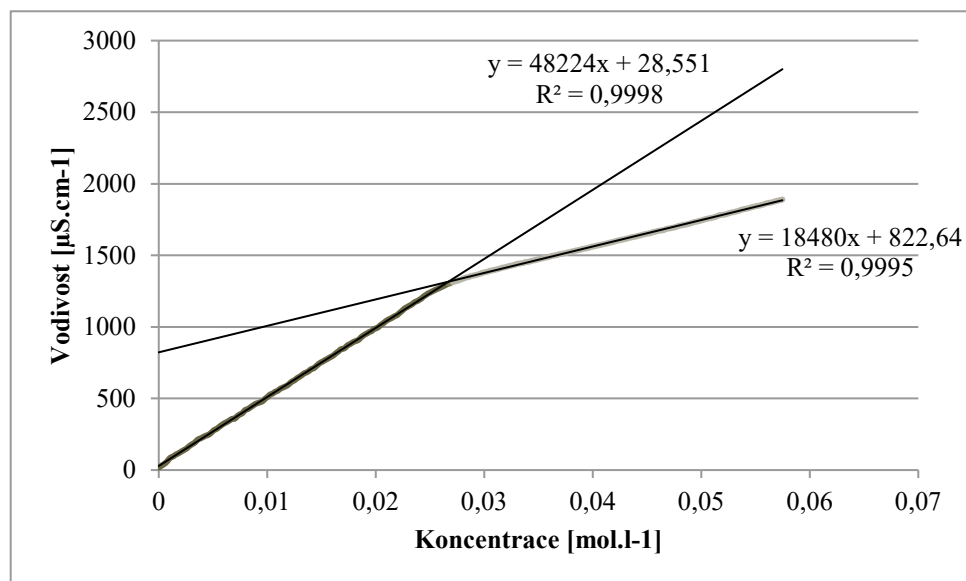
*N*¹,*N*¹,*N*¹⁰,*N*¹⁰-tetrakis(2-hydroxyethyl)-*N*¹,*N*¹⁰-dimethyldekan-1,10-diaminium-dibromid (**33b**). Bílá krystalická látka, t. t. 93,9-94,1 °C, (1,75 g, 39 %); ¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 4.02 – 3.96 (m, 8H), 3.64 – 3.52 (m, 8H), 3.52 – 3.45 (m, 4H), 3.20 (s, 6H), 1.86 – 1.76 (m, 4H), 1.45 – 1.35 (m, 12H); ¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 63.78, 63.66, 55.38, 49.02, 28.92, 28.69, 25.96, 22.03; HRMS: *m/z* 189.1722 [M]²⁺ (calc. for [C₂₀H₄₆N₂O₄]²⁺ 189.1724).

*N*¹,*N*¹,*N*¹²,*N*¹²-tetrakis(2-hydroxyethyl)-*N*¹,*N*¹²-dimethyldodekan-1,12-diaminium-dibromid (**33c**). Bílá krystalická látka, t. t. 56,2-56,4 °C, (3,48 g, 61 %); ¹H NMR (500 MHz, Methanol-*d*₄) δ 4.02 – 3.96 (m, 8H), 3.64 – 3.52 (m, 8H), 3.52 – 3.45 (m, 4H), 3.20 (s, 6H), 1.85 – 1.75 (m, 4H), 1.40 – 1.31 (m, 16H); ¹³C NMR (126 MHz, Methanol-*d*₄) δ 63.78, 63.67, 55.38, 49.05, 49.01, 29.16, 29.12, 28.80, 26.02, 22.06; HRMS: *m/z* 203.1880 [M]²⁺ (calc. for [C₂₂H₅₀N₂O₄]²⁺ 203.1880).

4.2 STANOVENÍ KRITICKÉ MICELÁRNÍ KONCENTRACE

Jednou z možností stanovení CMC povrchově aktivních látek je použití konduktometrické metody, při které měříme závislost vodivosti roztoku na koncentraci rozpuštěné PAL.

Při nízkých koncentracích rozpuštěné PAL je závislost vodivosti na koncentraci lineární. Pokud dojde k překročení CMC, dojde ke zlomu na přímce a vodivost roste s nižší strmostí.



Graf č. 1: Závislost vodivosti roztoku na koncentraci PAL: Graf stanovení CMC pro látku **17a** s délkou uhlovodíkového řetězce C12. CMC bylo stanoveno na $0,028 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

4.2.1 METODIKA STANOVENÍ CMC

Konduktivita připravených látek byla měřena na konduktometru Tristar Orion v konduktometrické cele 013005MD (Thermo Scientific, USA). Měření bylo kontrolováno softwarem Navigator 21 a naměřená data zaznamenávána v pravidelných intervalech 3 vteřin. Teplota měřeného roztoku byla vždy $49 \pm 0,1$ °C. Zásobní roztoky měřených látek byly připraveny v koncentracích 15-200 mM v závislosti na délce uhlovodíkového řetězce. Roztok byl přikapáván pomocí lineární pumpy Lineomat (VEB MLW Labortechnik Ilmenau, Německo) rychlostí $0,43 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ a konstantně míchán pomocí magnetické míchačky Arex (VELP Scientifica Srl, Itálie).

Výsledná data byla převedena do MS excel a následně vyhodnocena převedením osy času na osu koncentrace pomocí vzorce:

$$C_t = \frac{C_0}{1 + \frac{V_{start}}{v_{inj} * t}}$$

- C_t = koncentrace měřené látky v čase t
- C_0 = počáteční koncentrace měřené látky
- V_{start} = objem destilované vody na začátku měření
- v_{inj} = rychlost dávkování roztoku měřené látky
- t = čas zaznamenaný softwarem Navigator21

Výsledná křivka závislosti vodivosti na koncentraci byla rozdělena na dolní, přechodovou a horní část. Pro horní a dolní část byla vypočtena rovnice přímky a hodnota CMC byla stanovena z průsečíku těchto dvou přímek ¹²³.

4.3 HODNOCENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINNOSTI

4.3.1 METODIKA STANOVENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ ÚČINNOSTI

Pro stanovení antimikrobiální účinnosti byla použita mikrodiluční bojonová metoda podle standardu M07-A10¹²⁴, při které se MIC odečítá z jamek mikrotitrační destičky s koncentrační řadou KAS a živným médiem. Stanovení bylo provedeno v Centru biomedicínského výzkumu FNHK Mgr. Michaelou Hympánovou.

Jako testovací medium byl použit bujón Mueller-Hinton (MHB) (Sigma-Aldrich) upravený na pH 7,4 ($\pm 0,2$). Všechny měřené látky byly rozpuštěny v DMSO. Jeho celková koncentrace v mediu nepřekročila 1 %. Do jamek mikrotitrační destičky bylo pipetováno 200 μl MHB se sériovým ($\times 2$) ředěním testované látky ($500-0,49 \mu\text{mol.l}^{-1}$). Následně byly jamky inokulovány 10 μl bakteriální suspenze. Bakteriální suspenze byly denzitometricky kontrolovány, aby dosáhly $1,5 \cdot 10^8$ CFU na 1 ml. Hodnoty MIC (definovány jako 95% inhibice růstu bakterií) byly stanoveny po 24 a 48 hodinách při teplotě $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Hodnoty MBC byly stanoveny jako koncentrace látky způsobující snížení počtu bakteriálních kolonií $\geq 99,9 \%$, po vysazení 10 μl z každé jamky do nového media bez viditelného bakteriálního růstu^{23,125}.

Stanovení minimální biofilm eradikující koncentrace (MBEC) bylo provedeno Calgary metodou pomocí MBEC assay (Innovotech, Edmonton, Canada) upravené podle pokynů výrobce¹²⁶. Pro hodnocení byly vybrány bakteriální kmeny *Staphylococcus aureus* a *Streptococcus mutans*. Biofilm vytvořený na víčku mikrotitrační destičky upravené pro stanovení MBEC byl opláchnut solným roztokem a vložen na vyvíjecí destičku. Každá mikrotitrační vyvíjecí destička obsahovala testované sloučeniny sériově dvojnásobně zředěné v MHB, kontrolu sterility a růstu. Po inkubaci po dobu 24 hodin při $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ bylo víčko se zpracovaným biofilmem odstraněno, opláchnuto solným roztokem a biofilm byl rozrušen sonikací. Narušený biofilm byl přenesen na novou mikrotitrační destičku s MHB doplněným 0,5% Tween 80 jako antimikrobiálním neutralizátorem. MBEC byla stanovena po 24 hodinách inkubace při $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ odečtením OD600 (optická denzita při vlnové délce 600 nm). Vyvíjecí destička byla zakryta novým sterilním víčkem a po 24 hodinách inkubace při $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ byla použita pro stanovení MIC odečtením OD600.

Stanovení antimikrobiální aktivity vůči *F. tularensis* bylo provedeno pomocí průtokové cytometrie. Bakteriální suspenze *F. tularensis* LVS v PBS (fosfátový pufr)

byla připravena z nové subkultury přes noc, aby se dosáhlo OD₆₀₀ 1,0. 1 ml alikvoty byly centrifugovány po dobu 7 minut, 7000 x g při 4 °C a supernatant byl nahrazen 500 µl testované sloučeniny. Po 5 minutách expozice byla upravená bakteriální suspenze znovu centrifugována po dobu 7 minut, 7000 x g při 4 °C a roztok testované sloučeniny byl odstraněn. Buňky byly resuspendovány v 1 ml PBS a skladovány na ledu. Negativní kontrola byla připravena ze suspenze mrtvých bakterií resuspendovaných v PBS (OD 1,0), kde byly bakterie vystaveny přes noc 36% formaldehydu. Čerstvé bakterie kultivované přes noc na agarových plotnách McLeod byly resuspendovány v PBS (OD 1,0) a použity jako pozitivní kontrola. Všechny vzorky byly zředěny 100x v 1 ml PBS, obarveny 1 µl propidium jodidu, 1,5 µl Syto 9 a inkubovány ve tmě po dobu 15 minut. Bylo přidáno 10 µl vortexovaných mikrokuliček a vzorky byly před měřením řádně promíchány. Všechny vzorky byly analyzovány průtokovým cytometrem CyAn ADP (Beckman Coulter, Indianapolis, IN, USA). Data byla analyzována softwarem Summit v4.3 (Beckman Coulter). Byly provedeny alespoň tři nezávislé experimenty.

4.4 HODNOCENÍ ANTIVIROVÉ ÚČINNOSTI

Virucidní aktivita připravených látek byla hodnocena pomocí kvantitativního suspenzního testu. Stanovení bylo provedeno na katedře epidemiologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity Obrany Mgr. Radkem Slehou.

Jedna část virové suspenze byla smísená s jednou částí fetálního bovinního séra zředěného fosfátovým pufrům (finální koncentrace 2 %) a osmi částmi testované látky. Směs byla inkubována 5 minut (expoziční čas) při pokojové teplotě. Po této době byla směs sériově (x10) zředěna s ledovým DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) a 100 μ l každého zředění bylo přesazeno do 96-jamkové mikrotitrační destičky s příslušnou buněčnou kulturou inkubovanými při teplotě 37 °C v 5% atmosféře CO₂ až do doby, kdy byl pozorován cytopatický efekt (5-7 dní) viru na buňky, který je vizuálně patrný jako tzv. *bubble cells*. Po vyředění vzorku bylo sériově (x10) inokulováno dalších 6 jamek. Pro kontrolu byly dále pozorovány buňky neošetřené virem se stejnými koncentracemi proteinu ^{127,128}.

Titru viru byl vyhodnocen pomocí Spearman-Karber metody^{129,130} a vyjádřen jako log₁₀ TCID₅₀/ml. V souladu s EN 14476 pro virucidní aktivitu dezinfekcí by měla látka prokázat snížení titru viru alespoň o 4 řády, což odpovídá 99,99% inaktivaci. Pro rozlišení virem vyvolaných cytopatologických změn a toxického efektu způsobeného testovanými látkami, byly až do konce virucidního testování monitorovány morfologické změny samotné buněčné linie bez přítomnosti viru ^{127,128}.

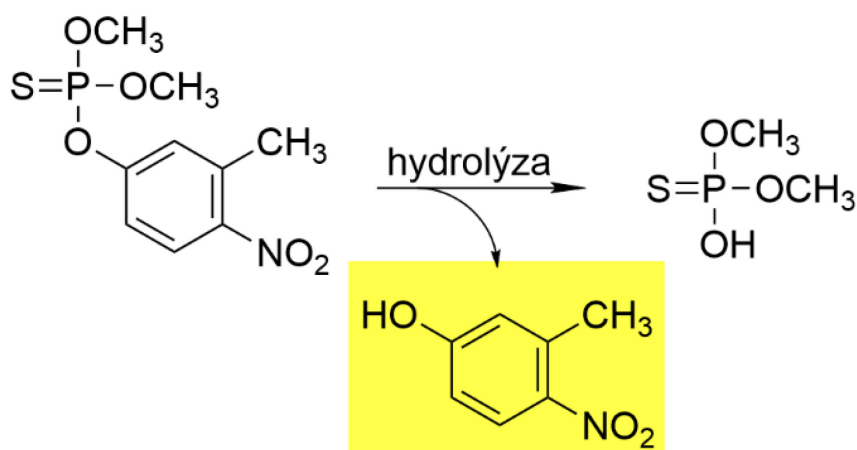
4.5 STANOVENÍ CYTOTOXICITY

Cytotoxicita byla stanovena pomocí MTT testu v Centru biomedicínského výzkumu RNDr. Lenkou Půlkrábkovou.

Do titrační destičky (96 jamek) byly za sterilních podmínek (HFsafe 1200LC, Heal Force, China) nasazeny buňky CHO-K1 (Chinese hamster ovary, ECACC, Salisbury, UK) resuspendované v kultivačním mediu. Kultivační médium obsahovalo Nutrient Mixture F-12 Ham, 10 % fetálního bovinního séra a 1 % směsi antibiotik penicilinu a streptomycinu (vše Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Buňky byly nasazeny v počtu 8000 buněk/jamku a následně byly inkubovány přes noc při 37 °C, 5 % CO₂ a při 85 – 90% relativní vlhkosti vzduchu (Forma Direct Heat CO Incubator, Thermo Scientific, USA). Následující den bylo odsáto kultivační médium a buňky byly vystaveny sériově (x2) naředěnému roztoku jednotlivých KAS v kultivačním mediu po dobu 24 hodin (opět při 37 °C, 5 % CO₂ a při 85 – 90% relativní vlhkosti vzduchu). Po uplynutí doby inkubace bylo médium odebráno a k buňkám bylo přidáno 100 µl roztoku, který obsahoval kultivační médium a MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma Aldrich, Prague, Czech Republic) (0,5mg.ml⁻¹) na 3 hod (inkubace při 37 °C, 5 % CO₂ a při 85 – 90 % relativní vlhkosti vzduchu). Po 3hod inkubaci bylo médium s MTT odsáto a krystaly vzniklého formazinu byly rozpuštěny pomocí DMSO (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Po promíchání obsahu jamek na třepačce (TopMix Infrared Vortex Mixer, Fisher Scientific, USA) proběhlo měření absorbance pomocí multidetekčního readeru Synergy HT (BioTek, VT, USA) při vlnových délkách 570 nm a 650 nm. Hodnoty IC₅₀ charakterizující redukcí počtu buněk na 50 % v dané koncentraci byly získány pomocí programu GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) ¹²⁷.

4.6 STANOVENÍ HYDROLYTICKÉ ÚČINNOSTI

Pro stanovení hydrolytické účinnosti byl jako modelová látka použit fenitrothion a vliv nově připravených látek na jeho rozklad. Stanovení bylo provedeno na katedře toxikologie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity Obrany Ing. Markem Matulou.



Obrázek č. 10: Princip metody hydrolyzy fenitrothionu (O,O-dimethyl O-(3-methyl-4-nitrofenyl)fosforothioát)

Princip metody spočívá v tom, že po vytvoření roztoku obsahujícího micely, dochází v prvním kroku k přiblížení molekul fenitrothionu do oblasti micely, solubilizaci fenitrothionu a koncentrace záporně nabitých iontů na povrchu kladně nabité micely (při použití vyššího pH dochází ke koncentraci OH^- iontů na povrchu micely). V dalším kroku dochází vlivem zvýšené koncentrace záporných iontů k urychlení hydrolyzy esterové vazby na fenitrothionu a vzniká netoxický produkt žluté barvy, který lze detekovat spektrofotometricky.

Zásobní roztok fenitrothionu byl připraven rozpuštěním v methanolu na koncentraci 10 mM. Zásobní roztok PAL byl připraven v koncentracích 500 mM, 100 mM nebo 10 mM v závislosti na hodnotě CMC a poté zředěn v rozmezí 100-0,01 mM. Dále bylo k roztoku přidáno 0,1 M hydrogenuhličitanového pufru, aby bylo dosaženo pH 10 a 11. Do kyvety o tloušťce 1 cm bylo přidáno 250 μl hydrogenuhličitanového pufru, 250 μl zásobního roztoku PAL a 10 μl fenitrothionu.

Měření změn absorbance bylo provedeno na přístroji Helios α (Thermo Fischer Scientific, USA) s nastavenou vlnovou délkou 394 nm. Měření probíhalo za teploty $37 \pm 0,1$ $^{\circ}\text{C}$ a ukončeno bylo tehdy, když rozdíl mezi přilehlými absorbancemi byl minimální. Výsledná data byla zpracována v programu ThermoScientific Vision (Thermo Fischer Scientific, USA) a následně převedena do MS Excel.

Rychlostní konstanta byla vypočítána podle Guggenheima¹³¹ s modifikací podle Zajíčka a Rádla¹³²:

$$A_{t+\Delta t} = A_t * \exp(k_{\text{obs}} * \Delta t) + A_n * (1 - \exp(-k_{\text{obs}} * \Delta t)),$$

- $A_{t+\Delta t}$ - absorbance v čase $t + \Delta t$
- A_t – absorbance v čase t
- \exp – základ přirozeného logaritmu
- k_{obs} – pozorovaná rychlostní konstanta
- Δt – rozdíl času mezi dvěma po sobě jdoucími měřeními
- A_n – absorbance v nekonečnu

Výsledkem je lineární rovnice se sklonem $\exp(k_{\text{obs}} * \Delta t)$ a průsečíkem $A_n * (1 - \exp(-k_{\text{obs}} * \Delta t))$. Takto připravená data byla zobrazena v rozptylovém grafu. Vzniklými body byla proložena spojnice trendu s vyobrazením rovnice regrese a hodnoty spolehlivosti. Získané směrnice byly použity pro výpočet rychlostní konstanty k_{obs} z $\exp(-k_{\text{obs}} * \Delta t)$. Rychlostní konstanta byla vždy přepočítána na poločas reakce¹⁴.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

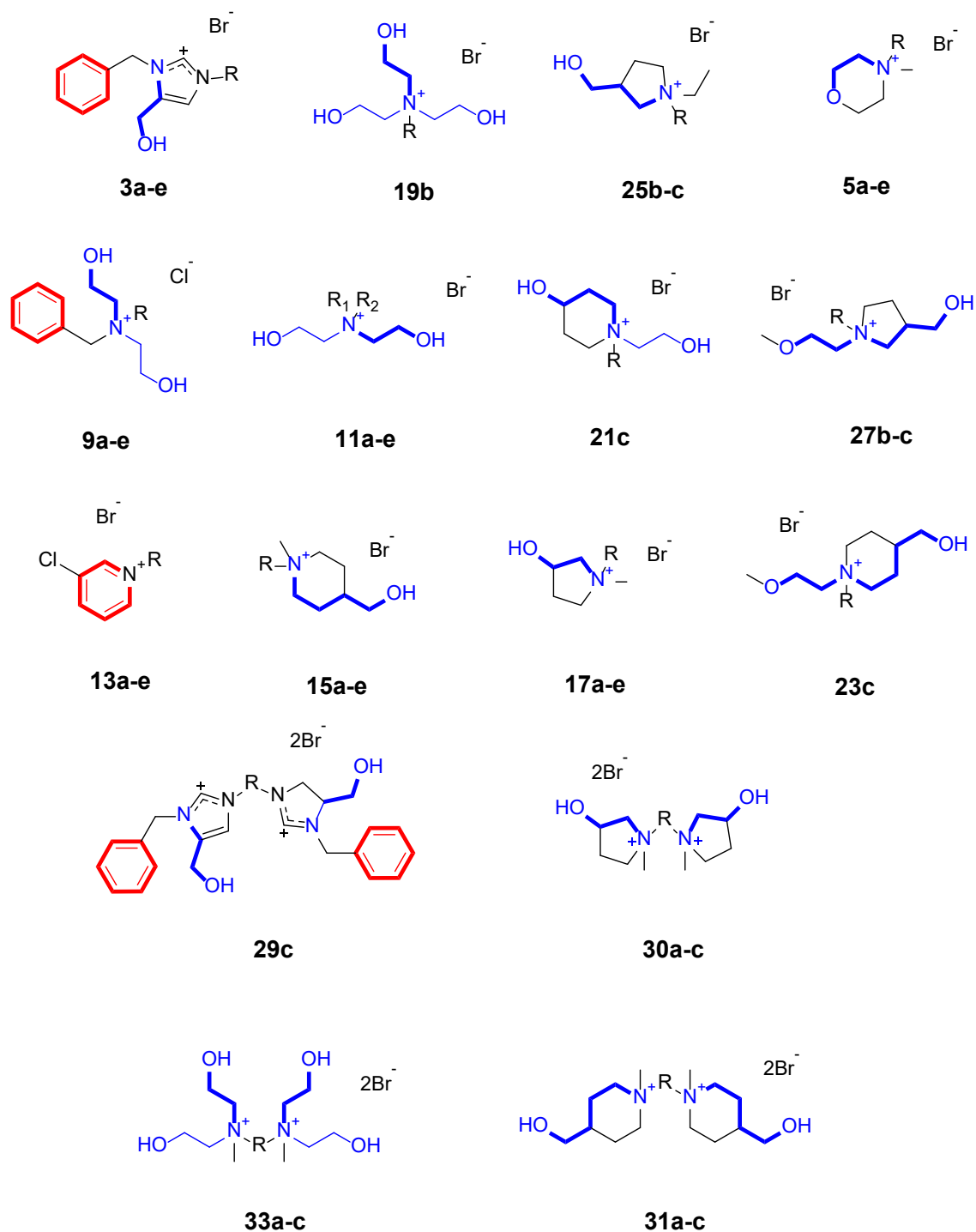
Látek typu KAS s povrchovou aktivitou bylo připraveno a publikováno velké množství jak v rámci naší pracovní skupiny, tak v rámci mnoha světových výzkumných pracovišť^{127,133–135}. Řada těchto látek byla hodnocena na antimikrobiální aktivitu různých patogenních mikroorganismů. O poznání méně látek však bylo hodnoceno jako akcelerátory rozkladu různých chemických látek pomocí tzv. micelární katalýzy^{13,14}. Látky připravené v rámci disertační práce byly navrženy s předpokládaným účinkem jak na biologické, tak na chemické látky, tzv. polyvalentní dekontaminační účinek. Z literatury je zřejmé, že zásadním předpokladem pro antimikrobiální účinek je přítomnost kvartérního dusíku a alespoň jednoho dlouhého řetězce s optimálním počtem uhlíků 12 až 16 v závislosti na skupině mikroorganismů, kterou chceme hodnotit. Zesílení antimikrobiální účinnosti lze dále dosáhnout přítomností dvou lipofilních řetězců s menším počtem uhlíků (8 až 12)^{123,127}. Zde však může nastat komplikace s rozpustností látek ve vodném roztoku, následným testováním a praktickým použitím v dekontaminační směsi.

Strukturním předpokladem látek pro rozklad toxických chemických látek organofosforového typu je navíc přítomnost alespoň jedné nukleofilní skupiny v molekule testované látky, která ve vodném prostředí tvoří např. oximátový nebo alkoholátový anion zodpovědný za urychlení rozkladné reakce¹⁴. V minulosti byly naší skupinou takovéto látky na bázi pyridinu s nukleofilní skupinou typu oximu připraveny a testovány. Bylo prokázáno, že přítomnost nukleofilní skupiny v molekule KAS je významným urychlovačem rozkladných reakcí v porovnání s KAS bez těchto skupin. Toto urychlení může být i více než 100-násobné^{13,14}.

Pokud tedy látky cílíme jak na chemickou, tak biologickou dekontaminaci je třeba v návrhu struktur dělat určité kompromisy. Každá molekula však musí zahrnovat kvartérní dusík, jednu nebo více lipofilních částí (např. dlouhé alkyly, aromatická uskupení apod.) a nukleofilní skupinu (oxim, hydroxyl, hydroxyalkyl apod.).

V rámci této disertační práce byly vytipovány jako vhodné nukleofilní skupiny různá hydroxyalkylová uskupení, kde se vzdálenost hydroxylové skupiny od kvartérního dusíku pohybovala od 2 do 4 atomů uhlíků, jak je znázorněno na obrázku č. 11 tučně modře. Některé struktury byly navrženy tak, že obsahovaly více skupin tohoto typu (další skupiny stejného typu znázorněny slabě modře). Dále byly navrženy látky s kyslíkem, který je alkylován z obou stran, ať už jako součást heterocyklu (morfolin), nebo jako

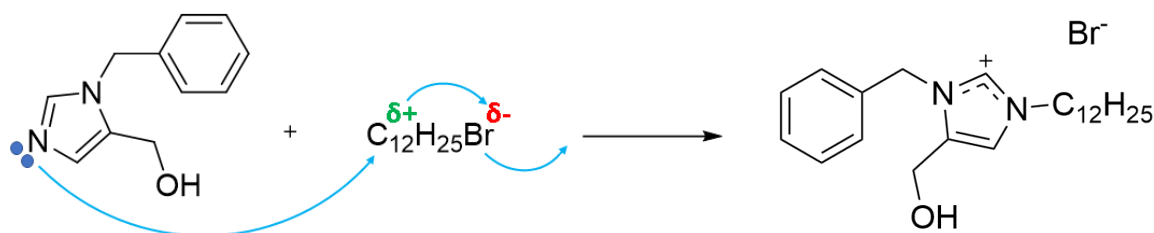
alkoxyskupina. Nukleofilní skupina hydroxyalkylového typu byla námi upřednostněna před oximovou na základě lepší rozpustnosti celé molekuly, a tedy i lepšího praktického uplatnění. Z důvodu vysoké účinnosti byl u některých navržených látek rovněž zachován strukturní základ běžně používaných komerčních látek typu benzalkonia, benzoxonia, pyridinia nebo didecyldimethylamonia (např. aromatická část molekuly – znázorněno tučně červeně). Obecně vzato, látky byly navrženy tak, aby měly aplikační potenciál, tzn., aby dosahovaly potenciálně vysoké účinnosti v kombinaci s vhodnými vlastnostmi, jako je rozpustnost ve vodném prostředí, a z pohledu základního výzkumu, aby mohla být sledována strukturně-aktivitní závislost, tedy vliv prodlužujícího se řetězce, přítomnost nukleofilních skupin, přítomnost více nábojů (zdvojení molekuly) a přítomnost více alkylových řetězců v rámci jedné molekuly na dekontaminační účinky látek.



Obrázek č. 11: Struktury připravených KAS se zvýrazněným hydroxyalkylovým uskupením (tučně modře) a aromatickou částí molekuly (tučně červeně)

Z pohledu organické syntézy, KAS vznikají **nukleofilní substitucí**, která se označuje jako Menshutkinova reakce¹³⁶. Výchozí látka obsahující dusík s volným elektronovým párem vystupuje v tomto typu reakce jako nukleofil. Při reakci s alkyhalogenidy, kde je polarizovaná vazba uhlík-halogen, dochází k odstoupení halogenu ve formě

halogenidového aniontu a k vazbě alkylového řetězce na dusík s volným elektronovým párem, tím dusík dostává čtvrtý substituent a stává se kladně nabitým.



Obrázek č. 12: Nukleofilní substituce znázorněná na látce **3b**

Většina reakcí na přípravu látek s jedním dlouhým alkylem probíhala jedнокrokově přímou nukleofilní substitucí alkylhalogenidu s délkou uhlíkového řetězce C_{10} - C_{18} na výchozí látku obsahující dusík s volným elektronovým párem. Jednokrokové reakce se zdají být jednoduché, nicméně často zde narážíme na optimalizaci purifikačního procesu pro získání dostatečného množství čisté látky. Takto byly připraveny monokvartérní deriváty 1-benzyl-1*H*-imidazol-5-yl)methanolu (**3a-e**), 1-methylmorfolinu (**5a-e**), 3-chloropyridinu (**13a-e**), (1-methylpiperidin-4-yl)methanolu (**15a-e**), 1-methylpyrrolidin-3-olu (**17a-e**), 1-(2-hydroxyethyl)piperidin-4-olu (**21c**), (1-(2-methoxy)ethyl)piperidin-3-yl)methanolu (**23c**), 1-ethylpyrrolidin-3-yl)methanolu (**25b-c**), (1-(2-methoxy)ethylpyrrolidin-3-yl)methanolu (**27b-c**), triethanolaminu (**19b**) a bis-kvartérní deriváty 1-benzyl-1*H*-imidazol-5-yl)methanolu (**29c**), 1-methylpyrrolidin-3-olu (**30a-c**), 1-methylpiperidin-3-yl)methanolu (**31a-c**) a *N*-methyldiethanolaminu (**33a-c**).

Syntéza derivátů diethanolaminu s jedním alkylovým řetězcem probíhala ve dvou krocích. V prvním kroku byl připraven derivát s dlouhým alkylovým řetězcem (**7a-e**), ve druhém kroku vznikl kvartérní derivát nukleofilní substitucí benzylchloridu (**9a-e**). Syntéza některých látek z této skupiny byla již v minulosti částečně popsána^{137,138}. V rámci disertační práce pak byla publikována syntéza celé skupiny látek a jejich dekontaminační hodnocení¹³⁹. Při přípravě derivátů diethanolaminu se dvěma alkylovými řetězci (**11a-e**) byl první krok shodný s přípravou látek **7a-e** a ve druhém kroku byl přidán další alkylový řetězec.

Z důvodu nízké reaktivity většiny výchozích látek bylo nutné použít vždy nadbytek alkylačního činidla. U většiny látek byly použity 1,4-2 ekvivalenty alkylhalogenidu vůči výchozí látce. Nadbytek alkylačního činidla byl zvolen z toho důvodu, že se při čištění snadněji odstraňuje než výchozí látka tvořící hydrofilní část KAS. Při přípravě derivátů

3a-e však muselo být použito 8 ekvivalentů alkylačního činidla a navíc DMF jako rozpouštědlo, které umožňovalo nastavení teploty reakce až na 120 °C. Naopak syntéza bis-kvartérních derivátů probíhala s polovičním ekvivalentem alkylačního činidla, aby se zamezilo vzniku halogenovaných mono-kvartérních derivátů. Vznik mono-kvartérních derivátů by komplikoval čištění vzniklých produktů.

Reakce probíhaly zpravidla 24-72 hodin, aby došlo ke zreagování maximálního množství výchozí látky. Průběh reakcí byl vždy monitorován pomocí TLC a reakce ukončeny ve chvíli, kdy se intenzita skvrn na chromatogramu nijak neměnila. Jako mobilní fáze pro TLC byla pro všechny reakce použita směs methanolu, ethylacetátu a vodného roztoku amoniaku v poměru 3:1:0,1 s detekcí v jodu nebo Dragendorffově činidle, které se spolu s amoniiovými solemi projeví oranžovou sraženinou.

Některé reakce však vyžadovaly použití odlišných podmínek. Při přípravě derivátů diethanolaminu s jedním alkylovým řetězcem (**7a-e**) byly pro zvýšení reaktivity použity jodid draselný (KI) a uhličitan draselný (K₂CO₃). V případě přípravy derivátů diethanolaminu se dvěma alkylovými řetězci (**11a-e**) byly jako katalyzátory použity tetrabutylamonium-chlorid (TBACl) nebo tetrabutylamonium-bromid (TBABr).

Čištění surového produktu probíhalo převážně opakovanou krystalizací z roztoku, při které byl odstraněn nadbytek alkylačního činidla a nereagovaný zbytek výchozí látky. Často docházelo ke značnému snížení výtěžku reakce. Pro připravené látky nebylo prakticky možné použít sloupcovou chromatografii, neboť při ní docházelo k zachycení produktu na stacionární fázi kolony a k vysokým nebo úplným ztrátám produktu.

Ačkoli primárním předmětem této práce byla příprava nových dosud nepopsaných KAS, v následujících pasážích budou popsány i jejich zejména biologické vlastnosti za účelem zhodnocení jak potenciálního užití, tak z pohledu charakterizace vztahu struktura-účinek. Kvantifikaci účinků lze nalézt v přílohách této práce.

U vybraných látek byla stanovena jejich kritická micelární koncentrace (CMC) jako základní vlastnost KAS. U látek s velmi nízkým výtěžkem nemohla být CMC změřena z důvodu jejich nedostatečného množství potřebného pro měření. Hodnoty CMC jsou shrnuty v příloze A. Při měření bylo potvrzeno, že s rostoucí délkou uhlovodíkového řetězce CMC klesá, což je v souladu s literaturou⁴². Hodnoty CMC získané z konduktometrického měření byly použity pro nastavení koncentrací roztoků použitých ke stanovení hydrolytické účinnosti vybraných látek.

U všech připravených látek byla stanovena jejich antimikrobiální účinnost (viz příloha B). Hodnoty minimální inhibiční koncentrace (MIC) a minimální baktericidní koncentrace (MBC) byly stanoveny pomocí mikrodiluční bujonové metody na 8 bakteriálních kmenech. Pro hodnocení byly použity Grampozitivní kmeny *Staphylococcus aureus* (C1947), Methicillin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (C1923), *Staphylococcus epidermidis* (C1936), Vancomycin-rezistentní *Enterococcus* a Gramnegativní kmeny *Escherichia coli* (A1235), *Klebsiella pneumoniae* neprodukující B-laktamázy se širokým spektrem účinku (ESBLs) (C1950), *Klebsiella pneumoniae* produkující B-laktamázy se širokým spektrem účinku (ESBLs) (C1914) a multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa* (A1245).

Látky **13b-d** testované v rámci spolupráce se slovinským pracovištěm, které ne zcela spadají do výše zmíněného konceptu navržených látek (neobsahují nukleofilní skupiny) byly navíc testovány proti Grampozitivnímu *Enterococcus faecalis*. Výsledky této spolupráce byly nedávno publikovány ¹⁴⁰.

Vyšší antimikrobiální účinnost vykazovaly látky vůči Grampozitivním bakteriím, které postrádají, na rozdíl od Gramnegativních bakterií, vnější membránu. Obecně lze říci, že nejvyšší aktivitu vykazovaly látky s délkou uhlovodíkového řetězce C₁₂-C₁₆, což potvrzuje i výše zmíněná literatura ^{74,75}.

Deriváty imidazolu (**3c-d**) vykazují poměrně specifický účinek vůči Grampozitivnímu *S. epidermidis*. Naopak deriváty morfolinu (**5b-c**) jsou vysoce účinné na většinu Grampozitivních kmenů a vykazují dokonce velmi vysokou účinnost vůči Gramnegativní *E. coli*.

Deriváty benzoxonia (**9c-d**) jsou silně účinné vůči Grampozitivním kmenům *S. aureus*, *MRSA*, *S. epidermidis* a *VRE*. Naopak nejvyšší antimikrobiální aktivitu vůči Gramnegativním kmenům *E. coli*, *K. pneumoniae* a multirezistentní *P. aeruginosa* vykazovala látka **9b**, která je také komerčně dostupná pod názvem *benzoxonium-chlorid*. Nejnižší účinnost vůči Grampozitivním i Gramnegativním kmenům vykazovala z této série derivátů benzoxonia látka **9a** s délkou uhlovodíkového řetězce C₁₀.

Mezi látky s nejvyšším potenciálem patří deriváty benzoxonia, kde byl benzylový nahrazen dalším alkylovým řetězcem (**11a-e**). Zástupci těchto látek byly vysoce účinné na většinu testovaných bakteriálních kmenů. Nejvyšší účinnost obecně měla látka **11e** se dvěma alkylovými řetězci C₁₀. Vůči *P. aeruginosa* byla neúčinnější látka **11c** s délkami

alkylových řetězců C₈ a C₁₀, která byla zároveň jediná ze všech testovaných látek schopná dostatečně inhibovat růst této Gramnegativní bakterie.

Deriváty pyridinu (**13b-d**), které mají ve své struktuře navíc chlor vázaný na pyridin, vykazovaly v porovnání s dříve připravenými deriváty pyridinu bez substituovaného chlóru¹⁴¹ vyšší účinnost vůči kmenu *S. aureus*. Dále byly vysoce účinné vůči kmenu *MRSA*.

Z dalších látek vykazovaly středně silnou antimikrobiální aktivitu látky **17c-e** a **15e**. Jednalo se o látky s dlouhým alkylovým řetězcem (C₁₄₋₁₈) a dobrou rozpustností.

Bis-kvartérní deriváty nevykazovaly ve srovnání s mono-kvartérními deriváty dostatečně vysokou antimikrobiální účinnost i přes to, že by podle literatury^{24,25} měly společně s *gemini surfactants* mít díky svým povrchovým vlastnostem účinnost vyšší. Obdobně, ani předpokládaná vyšší rozpustnost vlivem přítomnosti dvou nábojů v molekule nebyla zcela prokázána. Při hodnocení vztahu struktury a antimikrobiálního účinku bylo vyzorováno, že pokud jsou v molekule dva náboje, je třeba také přítomnost alespoň dvou delších alkylových řetězců, aby bylo dosaženo významnějšího antimikrobiálního účinku. Dvě hydrofilní nabitě části spojené pouze jedním dlouhým lipofilním řetězcem neprokázaly významný antimikrobiální účinek. Na druhou stranu máme-li dva náboje a dva delší řetězce, antimikrobiální efekt je výborný, nicméně rozpustnost se blíží úrovni kvartérních amoniových solí základního typu (tzn. látek s jedním nábojem a jedním dlouhým řetězcem). Rozpustnost je pak tedy lepší ovlivnit přítomností vhodných hydrofilních substituentů (v našem případě hydroxyalkylových skupin).

Hodnocení antimikrobiální účinnosti bylo u vysoce účinných látek v rámci projektu „Vývoj polyvalentního dekontaminačního činidla“ rozšířeno na stanovení antimikrobiální aktivity vůči Gramnegativní aerobní bakterii *Francisella tularensis* LVS, která je vnímána jako potenciální nástroj bioterorismu (viz příloha C). Z vybraných látek hodnocených vůči *F. tularensis* vykazovaly v 0,1% koncentraci a ve srovnání se zavedenými standardy, tedy koncentraci běžně použitelné pro praktické uplatnění, vysokou účinnost především látka **11e** a látky **9b-c**.

Na základě naměřených hodnot MIC byli vybráni nejvhodnější kandidáti pro stanovení minimální biofilm eradikující koncentrace (MBEC) (viz příloha D). Látky **9b-d** byly testovány na biofilmy bakterií *Staphylococcus aureus* a jejich účinnost porovnána

s benzalkonií. Lze konstatovat, že vůči biofilmu *S. aureus* byly naměřené hodnoty MBEC srovnatelné se zavedenými standardy. Dále byly tyto látky společně s látkami **11a-c** a **11e** hodnoceny vůči biofilmu *S. mutans* a opět porovnány s deriváty benzalkonia. Účinnost srovnatelnou se standardy vykazovaly látky **9c-d**, **11a-c** a **11e**. V poslední řadě, ve spolupráci se slovinským pracovištěm byla na biofilmu *E. faecalis* stanovena hodnota MBEC pro chlorované deriváty pyridinu **13b-d**. Zde nejvyšší účinnost vykazovala látka **13c** a potvrdila, že stejně jako při hodnocení MIC i v tomto případě byla látka se substituovaným chlorem účinnější než pyridinový derivát postrádající chlor¹⁴⁰.

Na základě vysoké účinnosti látek řady **9** a **11** proti planktonické i biofilmové formě bakterií byly tyto látky vybrány pro další antimikrobiální hodnocení, a sice stanovení antivirové účinnosti (viz příloha E). Pro stanovení antivirové aktivity byly vybrány myší cytomegalovirus (MCMV) a aktuální SARS-CoV-2 virus (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus). Velmi dobré výsledky vykazovala látka **9b**, která byla schopná již v 0,01% koncentraci snížit titr MCMV o 5 řádů. Látky **9b-c** byly také testovány na SARS-CoV-2, avšak vykazovaly pouze slabý účinek, neboť již při koncentraci 0,1 % docházelo k ovlivnění buněčné linie potřebné pro růst viru a tedy neobjektivního hodnocení pokusu. Zcela mimořádné virucidní účinky vůči SARS-CoV-2 však prokázaly některé látky ze skupiny **11**, především **11b-c**, které při 0,01% koncentraci snížily titr viru o 5 řádů, což je v souladu se směrnicí EN 14476. Příprava a virucidní účinek těchto látek jsou nyní předmětem patentového řízení a výsledky dosud nebyly publikovány (patentová přihláška č. 2).

Vzhledem k potenciálnímu využití v praxi je nutné změřit také selektivitu těchto látek, tzn. účinnost vůči mikrobům versus účinnost (bezpečnost) vůči savčím buňkám. K tomu sloužil test cytotoxicity vůči savčí CHO-K1 buněčné linii (viz příloha F). Z výsledků měření je patrné, že se vzrůstající lipofilitou stoupá i cytotoxicita dané látky. Nejméně cytotoxická se tedy jeví látka **15a** s délkou uhlovodíkového řetězce 10, navíc ve své molekule obsahuje hydroxyethylovou skupinu, která zřejmě také významně snižuje její cytotoxicitu. Látky s dvěma alkylovými řetězci (**11a-e**) sice vykazují poměrně vysokou cytotoxicitu (13 - 20 $\mu\text{mol.l}^{-1}$), avšak jejich antimikrobiální efekt (především vůči Gram pozitivním bakteriím) nastává při mnohem nižší koncentraci (0,5 - 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$), stále lze tedy hovořit o selektivním antimikrobiálním účinku. Ze vztahu struktury a cytotoxického účinku lze vyvodit, že se vzrůstající lipofilitou stoupá cytotoxicita, což je evidentní z přílohy F, kde jsou sumarizovány hodnoty IC_{50} . Je tedy zřejmé, že přítomnost

dvou alkylových řetězců rovněž zvyšuje cytotoxický efekt. Na druhou stranu lze konstatovat, že antimikrobiální efekt (MIC) u tohoto typu látek nastává daleko dříve, než dosáhne koncentrace cytotoxického účinku. Dále lze z výsledků vyčíst, že přítomnost a zvyšující se počet hydroxyethylových skupin znatelně snižuje cytotoxický efekt na testovaných savčích buňkách. Pokud bychom měli hodnotit vliv počtu nábojů, tak pro bis-kvartérní látky s jedním linkerem je sice cytotoxicita nižší, avšak dochází ke ztrátě antimikrobiálního efektu. Naopak bis-kvartérní látky se dvěma dlouhými řetězci jsou přibližně na úrovni mono-kvartérních látek s jedním dlouhým řetězcem. Je tedy možné odvodit, že převažuje spíše negativní efekt dlouhých řetězců ve srovnání s počtem nábojů. Závěrem lze poznamenat, že vzhledem k tomu, že tyto látky nejsou zamýšlené k vnitřnímu užití, nemusí být cytotoxicita nutně vyřazujícím faktorem při potenciálním praktickém využití těchto látek.

Stanovení hydrolytické účinnosti bylo měřeno u látek s nukleofilními skupinami, které se podařilo připravit v dostatečném množství (viz příloha G). Většina látek se nejevila jako zvláště nadějně akcelerátory rozkladu organofosforového pesticidu. Výjimkou byla skupina látek typu benzoxonií, kde nejvyšší hydrolytickou účinnost vůči modelové látce fenitrothion vykazovaly látky **9c-e**, které mají ve své molekule přítomny dvě hydroxyethylové skupiny a benzylový zbytek. Bylo potvrzeno, že s rostoucí délkou uhlovodíkového řetězce dochází ke zvýšení hydrolytické účinnosti. Nicméně, jak již bylo řečeno, délka uhlovodíkového řetězce významně ovlivňuje rozpustnost dané látky. Látka **9c** sice vykazuje nejlepší rozpustnost, avšak její hydrolytická účinnost je nižší. Naopak použití látky **9e** vykazující nejvyšší hydrolytickou účinnost je omezené její nízkou rozpustností. Z tohoto pohledu se jako nejvíce účinná jeví při koncentraci 0,005 mol.l⁻¹ a pH 11 látka **9d** s délkou alkylového řetězce C₁₆. Z výsledků je tedy zřejmé, že kombinace vhodného dlouhého řetězce, benzylového substituentu a dvou hydroxyethylových skupin je zásadní pro vysokou hydrolytickou účinnost. Tyto výsledky byly taktéž přihlášeny na patentový úřad a následně publikovány v časopise s impakt faktorem jako nejvýznamnější výsledek této disertační práce¹³⁹. Látky se tak staly předlohou pro návrh účinných dekontaminačních směsí s biologickým a chemickým účinkem k dalšímu hodnocení. Látky s nejvyšší hydrolytickou aktivitou jsou vhodnými kandidáty na rozklad nervově paralytických látek typu sarin, soman, tabun, VX apod.

Závěrem, z pohledu studia interakce struktura – účinek, můžeme shrnout následující pozorované závislosti. Nejvyšší antimikrobiální účinnost vykazovaly mono-kvartérní

látky s délkou uhlovodíkového řetězce C₁₂-C₁₆ viz výše. Dále bylo zjištěno, že z připravených látek měly nejvyšší účinnost ty, jejichž dusík byl umístěn mimo cyklus a obsahovaly navíc hydroxyethylové uspořádání. Jistý vliv na účinnost má v tomto případě i symetrie molekuly, kde látky **9b-d** a **11a-e** vykazují širokospektrý účinek na většinu Grampozitivních bakterií, ty neúčinnější (**11e**) pak dokáží zneškodnit i Gramnegativní *P. aeruginosa*, *F. tularensis* (**9b-c**, **11e**) či bakteriální monokulturní biofilmy tvořené *S. aureus*, *S. mutans* (**9c-d**, **11a-e**, **13c**). Látky jejichž dusík je součástí cyklu působí v naší studii více selektivně a to především na Grampozitivní bakterie *S. epidermidis*, *S. aureus* a *MRSA* (**3c-d**), na Gramnegativní bakterie, konkrétně *E. coli*, působí především deriváty morfolinu, jejichž heterocykl obsahuje navíc kyslík (**5b-c**). U bis-kvartérních derivátů jsou výsledky v rozporu s literaturou, tyto látky nevykazovaly vyšší účinnost než jejich mono-kvartérní analogy.

Virucidní účinnost byla hodnocena jen u neúčinnějších antibakteriálních látek za účelem zjištění širokospektrosti účinku napříč různými druhy mikrobů. Toto bylo potvrzeno a látky **5d**, **9b**, **11a-c** a **11d** lze považovat také za antivirotický účinné.

Cytotoxicita látek vůči savčím buňkám roste s jejich rostoucí lipofilitou a naopak klesá s přítomností hydroxylové skupiny v molekule. Stále však platí, že tyto látky působí antimikrobiálně dříve, než dosáhnou cytotoxické koncentrace, což je pozitivní zjištění pro potenciální aplikaci do praxe.

Konečně bylo zjištěno, že hydrolytická účinnost KAS je pozitivně ovlivněna přítomností hydroxyethylové skupiny a délkou uhlovodíkového řetězce. Přítomnost dlouhého alkyly však významně ovlivňuje rozpustnost, a proto látky s příliš dlouhým alkylovým řetězcem (C₁₈) jsou velmi omezeně použitelné. Jako univerzální činidlo s polyvalentními účinky se tak jeví látky typu benzoxonia (**9b-d**), na které byla podána patentová přihláška kvůli potenciálnímu budoucímu komerčnímu využití. Dalšími vhodnými kandidáty, navíc se silným virucidním účinkem, jsou pak dvou-alkylové analogy benzoxonia (**11a-e**).

6 ZÁVĚR

Celkem bylo připraveno 52 látek typu KAS. 14 látek obsahovalo dusík mimo cyklické uspořádání a 38 obsahovalo dusík jako součást heterocyklu. Bylo připraveno 42 mono-kvartérních a 10 bis-kvartérních derivátů KAS. 5 látek bylo připraveno se dvěma dlouhými alkylovými řetězci. Struktura látek byla potvrzena pomocí NMR a HRMS analýzy.

Antimikrobiální hodnocení simulující dekontaminační vlastnosti biologického charakteru probíhalo na vybraných kmenech bakterií a virů. U všech látek byla stanovena MIC. Látky s nejvyšší antimikrobiální aktivitou byly hodnoceny na bakteriálním kmeni *Francisella tularensis*. Na základě hodnoty MIC byli dále vybráni vhodní kandidáti na hodnocení proti biofilmové formě bakterií. U vybraných látek byla zhodnocena také jejich virucidní aktivita.

U vybraných 19 látek byla stanovena CMC jako základní vlastnost PAL. Na základě naměřené CMC bylo vybráno 5 látek s rozdílnou délkou uhlovodíkového řetězce, které byly testovány jako micelární katalyzátory urychlující rozklad paranitrofenolátových esterů a simulující dekontaminační vlastnosti chemického charakteru.

Na základě výše zmíněných výsledků antimikrobiálních aktivit a hydrolytických účinností byly vyzorovány nezbytné strukturní rysy navržených látek jako je přítomnost jedné nebo více hydroxyethylových skupin, přítomnost jednoho (C₁₂-C₁₆) nebo dvou (C₈-C₁₂) alkylových řetězců a samozřejmě přítomnost kladného náboje ve formě kvartérního dusíku. Látky s těmito vlastnostmi byly shledány nejvhodnějšími kandidáty jakožto aktivní složky pro dekontaminační směsi proti chemickým i biologickým činitelům. Za zmínku stojí také úspěšná příprava vysoce účinných virucidních sloučenin, které prokázaly účinnost i proti aktuálnímu SARS-CoV-2.

Z výsledků dále vyplývá, že KAS jsou stále ne zcela prozkoumanou oblastí z hlediska struktury a použití. Jejich mimořádné dezinfekční, dekontaminační a materiálové vlastnosti tak stále nabízejí prostor k dalšímu zkoumání.

SEZNAM AUTORSKÝCH A SPOLUAUTORSKÝCH PRACÍ

Publikace vzniklé v rámci disertační práce

(1) Soukup, O.; Benkova, M.; Dolezal, R.; Sleha, R.; Malinak, D.; SALAJKOVA, S.; **Markova, A.**; Hymapnova, M.; Prchal, L.; Ryskova, L.; Hobzova, L.; Sepcic, K.; Gunde-Cimerman, N.; Korabecny, J.; Jun, D.; Bostikova, V.; Bostik, P.; and Marek, J. The wide-spectrum antimicrobial effect of novel N-alkyl monoquaternary ammonium salts and their mixtures; the QSAR study against bacteria. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **2020**, 206, 112584. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112584> (IF = 6,514)

(2) Hympanova, M.; Terlep, S.; **Markova, A.**; Prchal, L.; Dogsa, I.; Pulkrabkova, L.; Benkova, M.; Marek, J.; Stopar, D. The Antibacterial Effects of New N-Alkylpyridinium Salts on Planktonic and Biofilm Bacteria. *Front. Microbiol.* **2020**, 11, 573951. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.573951>. (IF = 5,640)

(3) **Markova, A.**; Hympanova, M.; Matula, M.; Prchal, L.; Sleha, R.; Benkova, M.; Pulkrabkova, L.; Soukup, O.; Krocova, Z.; Jun, D. and Marek, J. Synthesis and Decontamination Effect on Chemical and Biological Agents of Benzoxonium-Like Salts. *Toxics* **2021**, 9, 222. <https://doi.org/10.3390/toxics9090222> (IF = 4,146)

Patentové přihlášky vzniklé v rámci disertační práce

(1) FAKULTNÍ NEMOCNICE HRADEC KRÁLOVÉ. Kvartérní amoniiová sůl, způsob její přípravy, dezinfekční kompozice a její použití. Původci: Ondřej Soukup, Aneta Marková, Jan Marek, Michaela Hympanová. Česká republika. Patentová přihláška PV 2021-139 z 20. 3. 2021 (v řízení Úřadu průmyslového vlastnictví)

(2) ČR-MINISTERSTVO OBRANY, UNIVERZITA OBRANY, FAKULTA VOJENSKÉHO ZDRAVOTNICTVÍ. Polyvalentní dekontaminační činidlo pro eliminaci účinků chemických a/nebo biologických bojových látek a jeho použití. Původci: Daniel Jun, Ondřej Soukup, Jan Marek, Marek Matula, Radek Sleha, Alžběta Dlabková, David Herman, Michaela Hympanová, Aneta Marková. Česká republika. Patentová přihláška 6053_V_2 (v řízení Úřadu průmyslového vlastnictví)

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- (1) Pierpoint, W. S. The Natural History of Salicylic Acid Plant Product and Mammalian Medicine. *Interdiscip. Sci. Rev.* **1997**, 22 (1), 45–52. <https://doi.org/10.1179/isr.1997.22.1.45>.
- (2) Alexander, J. W. History of the Medical Use of Silver. *Surg. Infect.* **2009**, 10 (3), 289–292. <https://doi.org/10.1089/sur.2008.9941>.
- (3) MELICHERČÍKOVÁ, Věra. *Sterilizace a Dezinfekce. Druhé, Doplněné a Přepřacované Vydání. Praha: Galén, 2015. ISBN 978-80-7492-139-1.*
- (4) Lugol's solution | antiseptic | Britannica <https://www.britannica.com/science/Lugols-solution> (accessed 2021 -12 -07).
- (5) Hollingham, R. *Blood and Guts: A History of Surgery*; 2016.
- (6) Gaynes, R. The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, 23 (5), 849–853. <https://doi.org/10.3201/eid2305.161556>.
- (7) Williams, K. The Introduction of ‘Chemotherapy’ Using Arsphenamine – the First Magic Bullet. *J. R. Soc. Med.* **2009**, 102 (8), 343–348. <https://doi.org/10.1258/jrsm.2009.09k036>.
- (8) Edwards, D. History of Antimicrobial Chemotherapy. In *Antimicrobial Drug Action*; Edwards, D., Ed.; Macmillan Education UK: London, 1980; pp 3–7. https://doi.org/10.1007/978-1-349-16360-1_1.
- (9) Antibiotická politika ČR, Státní ústav pro kontrolu léčiv <https://www.sukl.cz/antibioticka-politika-cr> (accessed 2021 -04 -08).
- (10) Antibiotická politika v České republice - Zdraví.Euro.cz <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/antibioticka-politika-v-ceske-republice-472463> (accessed 2021 -04 -08).
- (11) Marek, J. Příprava a Testování Látek Obsahujících Kvartérní Dusík. Disertační Práce, Hradec Králové, Fakulta Vojenského Zdravotnictví Univerzity Obrany, 2012, 115 s.
- (12) Thorsteinsson, T.; Másson, M.; Kristinsson, K. G.; Hjálmarsdóttir, M. A.; Hilmarsson, H.; Loftsson, T. Soft Antimicrobial Agents: Synthesis and Activity of Labile

Environmentally Friendly Long Chain Quaternary Ammonium Compounds. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (19), 4173–4181. <https://doi.org/10.1021/jm030829z>.

(13) Tiwari, S.; Ghosh, K.; Marek, J.; Kuca, K. Cationic Micellar-Catalyzed Hydrolysis of Pesticide Fenitrothion Using π -Nucleophiles. *Lett. Drug Des. Discov.* **2010**, *7* (3), 194–199. <https://doi.org/10.2174/157018010790596650>.

(14) Cabal, J., Kuča, K. & Míčová, J. Kinetics of Decomposition of Organophosphate Fenitrothion by Decontaminating Foam-Making Blends. *J. Appl. Biomed.* **5**, 167–170 (2007).

(15) Domagk, G. Eine neue Klasse von Desinfektionsmitteln. *DMW - Dtsch. Med. Wochenschr.* **1935**, *61* (21), 829–832. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1129654>.

(16) Fu, E.; McCue, K.; Boesenberg, D. Chemical Disinfection of Hard Surfaces – Household, Industrial and Institutional Settings. In *Handbook for Cleaning/Decontamination of Surfaces*; Elsevier, 2007; pp 573–592. <https://doi.org/10.1016/B978-044451664-0/50017-6>.

(17) Obląg, E.; Piecuch, A.; Rewak-Soroczyńska, J.; Paluch, E. Activity of Gemini Quaternary Ammonium Salts against Microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103* (2), 625–632. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9523-2>.

(18) Tischer, M.; Pradel, G.; Ohlsen, K.; Holzgrabe, U. Quaternary Ammonium Salts and Their Antimicrobial Potential: Targets or Nonspecific Interactions? *ChemMedChem* **2012**, *7* (1), 22–31. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201100404>.

(19) Bureš, F. Quaternary Ammonium Compounds: Simple in Structure, Complex in Application. *Top. Curr. Chem.* **2019**, *377* (3), 14. <https://doi.org/10.1007/s41061-019-0239-2>.

(20) Rosen, M. J.; Kunjappu, J. T. *Surfactants and Interfacial Phenomena*, 4. ed.; Wiley: Hoboken, NJ, 2012.

(21) Marek, J.; Josková, V.; Doležal, R.; Soukup, O.; Benkova, M.; Fucikova, A.; Malinak, D.; Bostikova, V.; Kuca, K. Synthesis, Antimicrobial Effect and Surface Properties of Hydroxymethylsubstituted Pyridinium Salts. *Lett. Drug Des. Discov.* **2018**, *15*, 828–842.

(22) Soukup, O.; Dolezal, R.; Malinak, D.; Marek, J.; Salajkova, S.; Pasdiorova, M.; Honegr, J.; Korabecny, J.; Nachtigal, P.; Nachon, F.; Jun, D.; Kuca, K.

Synthesis, Antimicrobial Evaluation and Molecular Modeling of 5-Hydroxyisoquinolinium Salt Series; the Effect of the Hydroxyl Moiety. *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24* (4), 841–848. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.01.006>.

(23) Malinak, D.; Dolezal, R.; Marek, J.; Salajkova, S.; Soukup, O.; Vejsova, M.; Korabecny, J.; Honegr, J.; Penhaker, M.; Musilek, K.; Kuca, K. 6-Hydroxyquinolinium Salts Differing in the Length of Alkyl Side-Chain: Synthesis and Antimicrobial Activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24* (22), 5238–5241. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.09.060>.

(24) Obłąk, E.; Piecuch, A.; Guz-Regner, K.; Dworniczek, E. Antibacterial Activity of Gemini Quaternary Ammonium Salts. *FEMS Microbiol. Lett.* **2014**, *350* (2), 190–198. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12331>.

(25) Pinazo, A.; Manresa, M. A.; Marques, A. M.; Bustelo, M.; Espuny, M. J.; Pérez, L. Amino Acid-Based Surfactants: New Antimicrobial Agents. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2016**, *228*, 17–39. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.11.007>.

(26) Adamson, A. W. *Physical Chemistry of Surfaces*; 1972.

(27) Aveyard, R.; Haydon, D. A. *An Introduction to the Principles of Surface Chemistry*; Cambridge chemistry texts; University Press: Cambridge, 1973.

(28) *Handbook of Surface and Colloid Chemistry*, 4. ed.; Birdi, K. S., Ed.; CRC Press: Boca Raton, Fla., 2015.

(29) Szyszkowski, B. von. Experimentelle Studien Über Kapillare Eigenschaften Der Wässerigen Lösungen von Fettsäuren. *Z. Für Phys. Chem.* **1908**, *64U* (1). <https://doi.org/10.1515/zpch-1908-6425>.

(30) Ross, S.; Morrison, I. D. On the Alleged Ideality of Szyszkowski-Langmuir Adsorption. *J. Colloid Interface Sci.* **1983**, *91* (1), 244–247. [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(83\)90328-4](https://doi.org/10.1016/0021-9797(83)90328-4).

(31) Myers, D. *Surfaces, Interfaces, and Colloids: Principles and Applications*, 2. ed.; Wiley-VCH: New York, NY, 1999.

(32) Isidor Traube | German chemist
<https://www.britannica.com/biography/Isidor-Traube> (accessed 2021 -04 -09).

- (33) Traube, Isidor. Über Die Kapillarität Konstanten Organischer Stoffe in Wässriger Lösung. *Annu. Chem. Liebings.* 1891, Vol. 265, p. 27-55.
- (34) Kipling, J. J. *Adsorption from Solutions of Non-Electrolytes*; 2017.
- (35) Rekvig, L.; Kranenburg, M.; Hafskjold, B.; Smit, B. Effect of Surfactant Structure on Interfacial Properties. *Europhys. Lett. EPL* **2003**, *63* (6), 902–907. <https://doi.org/10.1209/epl/i2003-00607-5>.
- (36) Marek, J.; Buchta, V.; Soukup, O.; Stodulka, P.; Cabal, J.; Ghosh, K. K.; Musilek, K.; Kuca, K. Preparation of Quinolinium Salts Differing in the Length of the Alkyl Side Chain. *Molecules* **2012**, *17* (6), 6386–6394. <https://doi.org/10.3390/molecules17066386>.
- (37) *Micelles Theoretical and Applied Aspects*; 1992.
- (38) Alargova, R. G.; Kochijashky, I. I.; Sierra, M. L.; Zana, R. Micelle Aggregation Numbers of Surfactants in Aqueous Solutions: A Comparison between the Results from Steady-State and Time-Resolved Fluorescence Quenching. *Langmuir* **1998**, *14* (19), 5412–5418. <https://doi.org/10.1021/la980565x>.
- (39) Baeurle, S. A.; Kroener, J. Modeling Effective Interactions of Micellar Aggregates of Ionic Surfactants with the Gauss-Core Potential. *J. Math. Chem.* **2004**, *36* (4), 409–421. <https://doi.org/10.1023/B:JOMC.0000044526.22457.bb>.
- (40) Hafiane, A.; Dhahbi, M.; Chasseray, X.; Lemordant, D. Surface Activity of n-Alkyltrimethylammonium Bromides in Concentrated Orthophosphoric Acid. *J. Colloid Interface Sci.* **1998**, *205* (1), 21–25. <https://doi.org/10.1006/jcis.1998.5586>.
- (41) Mozrzymas, A. Modelling of the Critical Micelle Concentration of Cationic Gemini Surfactants Using Molecular Connectivity Indices. *J. Solut. Chem.* **2013**, *42* (11), 2187–2199. <https://doi.org/10.1007/s10953-013-0095-6>.
- (42) Preiss, U.; Jungnickel, C.; Thöming, J.; Krossing, I.; Łuczak, J.; Diedenhofen, M.; Klamt, A. Predicting the Critical Micelle Concentrations of Aqueous Solutions of Ionic Liquids and Other Ionic Surfactants. *Chem. - Eur. J.* **2009**, *15* (35), 8880–8885. <https://doi.org/10.1002/chem.200900024>.
- (43) Stigter, D. Micelle Formation by Ionic Surfactants. II. Specificity of Head Groups, Micelle Structure. *J. Phys. Chem.* **1974**, *78* (24), 2480–2485. <https://doi.org/10.1021/j100617a013>.

- (44) Bartovská, L.; Šišková, M. *Fyzikální chemie povrchů a koloidních soustav*; Vysoká škola chemicko-technologická: Praha, 2005.
- (45) Miyake, M.; Yamashita, Y. Molecular Structure and Phase Behavior of Surfactants. In *Cosmetic Science and Technology*; Elsevier, 2017; pp 389–414. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802005-0.00024-0>.
- (46) Nakama, Y. Surfactants. In *Cosmetic Science and Technology*; Elsevier, 2017; pp 231–244. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802005-0.00015-X>.
- (47) Chang, Q. Surface of Solution. In *Colloid and Interface Chemistry for Water Quality Control*; Elsevier, 2016; pp 161–174. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809315-3.00009-8>.
- (48) Šojdrová, K. Prozkoumání Možných Povrchově Aktivních Vlastností Benzimidazoliových Solí s Adamantanovým Skeletem. Bakalářská Práce, Zlín, Fakulta Technologická, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2015, s. 14.
- (49) Jungnickel, C.; Łuczak, J.; Ranke, J.; Fernández, J. F.; Müller, A.; Thöming, J. Micelle Formation of Imidazolium Ionic Liquids in Aqueous Solution. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* **2008**, *316* (1–3), 278–284. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2007.09.020>.
- (50) hydrofobní interakce (vazba) http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/hesla/hydrofobni_interakce.html (accessed 2021 -04 -09).
- (51) Kellermann, M.; Bauer, W.; Hirsch, A.; Schade, B.; Ludwig, K.; Böttcher, C. The First Account of a Structurally Persistent Micelle. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43* (22), 2959–2962. <https://doi.org/10.1002/anie.200353510>.
- (52) *Micelles, Microemulsions, and Monolayers: Science and Technology*; Shah, D. O., International Symposium on Micelles, Microemulsions, and Monolayers: Quarter Century Progress and New Horizons, Eds.; Dekker: New York, 1998.
- (53) Bellare, J. R.; Kaneko, T.; Evans, D. F. Seeing Micelles. *Langmuir* **1988**, *4* (4), 1066–1067. <https://doi.org/10.1021/la00082a045>.
- (54) Campos, R. A. M.; Silva, V. A. da; Faez, R.; Rezende, M. C. Effect of Oxidants and Anionic Surfactants on the Morphology and Permittivity of Polypyrrole and Its Blends with Epoxy Resin. *Polímeros* **2016**, *26* (3), 197–206. <https://doi.org/10.1590/0104-1428.2169>.

- (55) Schoot, P. van der. The Hexagonal Phase of Wormlike Micelles. *J. Chem. Phys.* **1996**, *104* (3), 1130–1139. <https://doi.org/10.1063/1.470768>.
- (56) Sein, A.; Engberts, J. B. F. N. Micelle to Lamellar Aggregate Transition of an Anionic Surfactant in Dilute Aqueous Solution Induced by Alkali Metal Chloride and Tetraalkylammonium Chloride Salts. *Langmuir* **1995**, *11* (2), 455–465. <https://doi.org/10.1021/la00002a015>.
- (57) Flynn, P. F.; Wand, A. J. High-Resolution Nuclear Magnetic Resonance of Encapsulated Proteins Dissolved in Low Viscosity Fluids. In *Methods in Enzymology*; Elsevier, 2001; Vol. 339, pp 54–70. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(01\)39309-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(01)39309-6).
- (58) modely elektrické dvojrstvy http://147.33.74.135/knihy/uid_es-001/hesla/modely_elektricke_dvojrstvy.html (accessed 2021 -04 -09).
- (59) Kvítek, L.; Panáček, A.; Univerzita Palackého; Přírodovědecká fakulta. *Základy koloidní chemie*; Univerzita Palackého v Olomouci: Olomouc, 2007.
- (60) Chakraborty, T.; Chakraborty, I.; Ghosh, S. The Methods of Determination of Critical Micellar Concentrations of the Amphiphilic Systems in Aqueous Medium. *Arab. J. Chem.* **2011**, *4* (3), 265–270. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2010.06.045>.
- (61) Gongadze, E.; Rienen, U.; Iglič, A. Generalized Stern Models of the Electric Double Layer Considering the Spatial Variation of Permittivity and Finite Size of Ions in Saturation Regime. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2011**, *16* (4). <https://doi.org/10.2478/s11658-011-0024-x>.
- (62) Medinat, O. O.; Esan, O. S. Aggregational Attitude of Hexadecyltrimethylammonium Bromide in Aqueous Solutions of Sodium Salt at 298.15k. *Int. J. Chem. Mater. Res.* **2016**, *4* (4), 27–34. <https://doi.org/10.18488/journal.64/2016.4.4/64.4.27.34>.
- (63) Zeta potenciál zeta <https://www.xray.cz/kfkl-osa/eng/zetasizer/zeta.htm> (accessed 2021 -04 -09).
- (64) Nesměrák, K.; Němcová, I. Determination of Critical Micelle Concentration by Electrochemical Means. *Anal. Lett.* **2006**, *39* (6), 1023–1040. <https://doi.org/10.1080/00032710600620302>.
- (65) Zhang, X.; Jackson, J. K.; Burt, H. M. Determination of Surfactant Critical Micelle Concentration by a Novel Fluorescence Depolarization Technique. *J. Biochem.*

Biophys. Methods **1996**, *31* (3–4), 145–150. [https://doi.org/10.1016/0165-022X\(95\)00032-M](https://doi.org/10.1016/0165-022X(95)00032-M).

(66) Rapid Critical Micelle Concentration (CMC) Determination Using Fluorescence Polarization | September 18, 2014 <https://www.biotek.com/resources/application-notes/rapid-critical-micelle-concentration-cmc-determination-using-fluorescence-polarization/> (accessed 2021 -04 -09).

(67) Gerba, C. P. Quaternary Ammonium Biocides: Efficacy in Application. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81* (2), 464–469. <https://doi.org/10.1128/AEM.02633-14>.

(68) Kwaśniewska, D.; Chen, Y.-L.; Wiczorek, D. Biological Activity of Quaternary Ammonium Salts and Their Derivatives. *Pathogens* **2020**, *9* (6), 459. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060459>.

(69) Sütterlin, H.; Alexy, R.; Coker, A.; Kümmerer, K. Mixtures of Quaternary Ammonium Compounds and Anionic Organic Compounds in the Aquatic Environment: Elimination and Biodegradability in the Closed Bottle Test Monitored by LC–MS/MS. *Chemosphere* **2008**, *72* (3), 479–484. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.03.008>.

(70) Disinfectants and Antiseptics - Antibiotics in Laboratory Medicine, 6 Ed. <https://doctorlib.info/pharmacology/antibiotics-laboratory-medicine/13.html> (accessed 2021 -04 -09).

(71) McDonnell, G. E. *Antisepsis, Disinfection, and Sterilization*; 2017.

(72) Panawala, L. Difference Between Gram Positive and Gram Negative Bacteria. **2017**.

(73) Shtyrlin, N. V.; Sapozhnikov, S. V.; Galiullina, A. S.; Kayumov, A. R.; Bondar, O. V.; Mirchink, E. P.; Isakova, E. B.; Firsov, A. A.; Balakin, K. V.; Shtyrlin, Y. G. Synthesis and Antibacterial Activity of Quaternary Ammonium 4-Deoxypyridoxine Derivatives. *BioMed Res. Int.* **2016**, *2016*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2016/3864193>.

(74) Dolezal, R.; Soukup, O.; Malinak, D.; Savedra, R. M. L.; Marek, J.; Dolezalova, M.; Pasdiorova, M.; Salajkova, S.; Korabecny, J.; Honegr, J.; Ramalho, T. C.; Kuca, K. Towards Understanding the Mechanism of Action of Antibacterial N-Alkyl-

3-Hydroxypyridinium Salts: Biological Activities, Molecular Modeling and QSAR Studies. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *121*, 699–711. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.058>.

(75) Gilbert, P.; Moore, L. E. Cationic Antiseptics: Diversity of Action under a Common Epithet. *J. Appl. Microbiol.* **2005**, *99* (4), 703–715. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02664.x>.

(76) Li, B.; Moriarty, T. F.; Webster, T.; Xing, M. *Racing for the Surface: Antimicrobial and Interface Tissue Engineering*; Springer: Cham, 2020.

(77) Jennings, M. C.; Minbiole, K. P. C.; Wuest, W. M. Quaternary Ammonium Compounds: An Antimicrobial Mainstay and Platform for Innovation to Address Bacterial Resistance. *ACS Infect. Dis.* **2015**, *1* (7), 288–303. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00047>.

(78) Locher, H. H.; Ritz, D.; Pfaff, P.; Gaertner, M.; Knezevic, A.; Sabato, D.; Schroeder, S.; Barbaras, D.; Gademann, K. Dimers of Nostocarboline with Potent Antibacterial Activity. *Chemotherapy* **2010**, *56* (4), 318–324. <https://doi.org/10.1159/000320033>.

(79) Friedrich, C. L.; Moyles, D.; Beveridge, T. J.; Hancock, R. E. W. Antibacterial Action of Structurally Diverse Cationic Peptides on Gram-Positive Bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44* (8), 2086–2092. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.8.2086-2092.2000>.

(80) Bragg, R.; Jansen, A.; Coetzee, M.; van der Westhuizen, W.; Boucher, C. Bacterial Resistance to Quaternary Ammonium Compounds (QAC) Disinfectants. In *Infectious Diseases and Nanomedicine II*; Adhikari, R., Thapa, S., Eds.; Advances in Experimental Medicine and Biology; Springer India: New Delhi, 2014; Vol. 808, pp 1–13. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1774-9_1.

(81) Hernando-Amado, S.; Blanco, P.; Alcalde-Rico, M.; Corona, F.; Reales-Calderón, J. A.; Sánchez, M. B.; Martínez, J. L. Multidrug Efflux Pumps as Main Players in Intrinsic and Acquired Resistance to Antimicrobials. *Drug Resist. Updat.* **2016**, *28*, 13–27. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2016.06.007>.

(82) Hegstad, K.; Langsrud, S.; Lunestad, B. T.; Scheie, A. A.; Sunde, M.; Yazdankhah, S. P. Does the Wide Use of Quaternary Ammonium Compounds Enhance

the Selection and Spread of Antimicrobial Resistance and Thus Threaten Our Health? *Microb. Drug Resist.* **2010**, *16* (2), 91–104. <https://doi.org/10.1089/mdr.2009.0120>.

(83) *Biofilm Highlights*; Flemming, H.-C., Ed.; Springer series on biofilms; Springer: Heidelberg, 2011.

(84) Mattila-Sandholm, T.; Wirtanen, G. Biofilm Formation in the Industry: A Review. *Food Rev. Int.* **1992**, *8* (4), 573–603. <https://doi.org/10.1080/87559129209540953>.

(85) Flemming, H.-C.; Wingender, J.; Szewzyk, U.; Steinberg, P.; Rice, S. A.; Kjelleberg, S. Biofilms: An Emergent Form of Bacterial Life. *Nat. Rev. Microbiol.* **2016**, *14* (9), 563–575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>.

(86) Lopez, D.; Vlamakis, H.; Kolter, R. Biofilms. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2010**, *2* (7), a000398–a000398. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000398>.

(87) Suarez, C.; Piculell, M.; Modin, O.; Langenheder, S.; Persson, F.; Hermansson, M. Thickness Determines Microbial Community Structure and Function in Nitrifying Biofilms via Deterministic Assembly. *Sci. Rep.* **2019**, *9* (1), 5110. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41542-1>.

(88) Dufour, D.; Leung, V.; Lévesque, C. M. Bacterial Biofilm: Structure, Function, and Antimicrobial Resistance: Bacterial Biofilm. *Endod. Top.* **2010**, *22* (1), 2–16. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2012.00277.x>.

(89) Donlan, R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* **2002**, *8* (9), 881–890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>.

(90) Passos da Silva, D.; Schofield, M.; Parsek, M.; Tseng, B. An Update on the Sociomicrobiology of Quorum Sensing in Gram-Negative Biofilm Development. *Pathogens* **2017**, *6* (4), 51. <https://doi.org/10.3390/pathogens6040051>.

(91) Rulík, M.; Holá, V. Mikrobiální biofilmy 1. Všudypřítomný a přitom málo známý fenomén. 3.

(92) Jennings, M. C.; Ator, L. E.; Paniak, T. J.; Minbiole, K. P. C.; Wuest, W. M. Biofilm-Eradicating Properties of Quaternary Ammonium Amphiphiles: Simple Mimics of Antimicrobial Peptides. *ChemBioChem* **2014**, *15* (15), 2211–2215. <https://doi.org/10.1002/cbic.201402254>.

- (93) Pirrone, M.; Pincioli, R.; Berra, L. Microbiome, Biofilms, and Pneumonia in the ICU. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2016**, *29* (2), 160–166. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000255>.
- (94) Rutherford, S. T.; Bassler, B. L. Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2012**, *2* (11), a012427–a012427. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012427>.
- (95) Mah, T.-F. Biofilm-Specific Antibiotic Resistance. *Future Microbiol.* **2012**, *7* (9), 1061–1072. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.76>.
- (96) Piras, A. M.; Esin, S.; Benedetti, A.; Maisetta, G.; Fabiano, A.; Zambito, Y.; Batoni, G. Antibacterial, Antibiofilm, and Antiadhesive Properties of Different Quaternized Chitosan Derivatives. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (24), 6297. <https://doi.org/10.3390/ijms20246297>.
- (97) Dekontaminace | BOZPinfo.cz <https://www.bozpinfo.cz/dekontaminace> (accessed 2021 -04 -09).
- (98) Prymula, R. *Biologický a chemický terorismus: informace pro každého*; Grada: Praha, 2002.
- (99) https://www.natoaktual.cz/analyzy-a-komentare/cbrn-terorismus-vazna-hrozba-21-stoleti.A050510_094008_na_analyzy_m02
https://www.natoaktual.cz/analyzy-a-komentare/cbrn-terorismus-vazna-hrozba-21-stoleti.A050510_094008_na_analyzy_m02 (accessed 2021 -04 -09).
- (100) Patočka, J.; Fusek, J. TOXINS AND THEIR PRESENT MILITARY SIGNIFICANCE. *Vojen. Zdr. LISTY* **2000**, *9*.
- (101) Bellamy, R. J. Bioterrorism. *QJM* **2001**, *94* (4), 227–234. <https://doi.org/10.1093/qjmed/94.4.227>.
- (102) Janik, E.; Ceremuga, M.; Saluk-Bijak, J.; Bijak, M. Biological Toxins as the Potential Tools for Bioterrorism. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20* (5), 1181. <https://doi.org/10.3390/ijms20051181>.
- (103) *Zákon č. 281/2002 Sb., o Některých Opatřeních Souvisejících Se Zákazem Bakteriologických (Biologických) a Toxinových Zbraní a o Změně Živnostenského Zákona ve Znění Zákonů č. 186/2004 Sb., č. 413/2005 Sb., č. 296/2007 Sb., č. 124/2008*

Sb., č. 223/2009 Sb., č. 227/2009 Sb., č. 64/2014 Sb., č. 243/2016 Sb., č. 183/2017 Sb. a č. 253/2017 Sb.

(104) Rosenbloom, M.; Leikin, J. B.; Vogel, S. N.; Chaudry, Z. A. Biological and Chemical Agents: A Brief Synopsis: *Am. J. Ther.* **2002**, 9 (1), 5–14. <https://doi.org/10.1097/00045391-200201000-00003>.

(105) Matoušek, J.; Benedík, J.; Linhart, P. *CBRN: biologické zbraně; Sdružení požárního a bezpečnostního inženýrství: V Ostravě, 2007.*

(106) *Vyhláška č. 474/2002 Sb., Kterou Se Provádí Zákon č. 281/2002 Sb., o Některých Opatřeních Souvisejících Se Zákazem Bakteriologických (Biologických) a Toxinových Zbraní a o Změně Živnostenského Zákona, ve Znění Vyhlášky č. 74/2013 Sb. a Vyhlášky č. 379/2017 Sb.*

(107) CDC | Bioterrorism Agents/Diseases (by category) | Emergency Preparedness & Response <https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp> (accessed 2021 -04 -09).

(108) Tuček, M.; Slámová, A. *Hygiena a epidemiologie pro bakaláře; 2016.*

(109) uniweb.cz. VYŠŠÍ STUPEŇ DEZINFEKCE <https://www.szo.cz/cs/dezinfekce/vyssi-stupen-dezinfekce/> (accessed 2021 -04 -09).

(110) Melicherčíková, V. *Sterilizace a dezinfekce; 2015.*

(111) iTrivio https://www.ipvz.cz/e-kurzy/2015/virove_tropicke_infekce/24008.html (accessed 2021 -04 -09).

(112) *Příloha č. 1 k Vyhlášce č. 474/2002 Sb. Seznam Vysoce Rizikových Biologických Agens a Toxinů [K § 6 Odst. 4 Zákona] Dostupné z: https://www.sujb.cz/fileadmin/Sujb/Docs/Legislativa/Vyhlasiky/Vyhlasika_474_Priloha_1.Pdf.*

(113) What is a Chemical Weapon? <https://www.opcw.org/our-work/what-chemical-weapon> (accessed 2021 -04 -09).

(114) Kumar, V.; Goel, R.; Chawla, R.; Silambarasan, M.; Sharma, R. Chemical, Biological, Radiological, and Nuclear Decontamination: Recent Trends and Future Perspective. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **2010**, 2 (3), 220. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.68505>.

- (115) Yang, Y. C.; Baker, J. A.; Ward, J. R. Decontamination of Chemical Warfare Agents. *Chem. Rev.* **1992**, *92* (8), 1729–1743. <https://doi.org/10.1021/cr00016a003>.
- (116) Patočka, J. *Vojenská toxikologie*; Grada: Praha, 2004.
- (117) Rathman, J. F. Micellar Catalysis. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **1996**, *1* (4), 514–518. [https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(96\)80120-8](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(96)80120-8).
- (118) Khan, M. N. *Micellar Catalysis*; Surfactant science series; Taylor & Francis: Boca Raton, Fla., 2007.
- (119) Cibulka, R.; Dvořák, D.; Hampl, F.; Liška, F. Metallomicellar Hydrolytic Catalysts Containing Ligand Surfactants Derived from Alkyl Pyridin-2-Yl Ketoxime. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* **1997**, *62* (8), 1342–1354. <https://doi.org/10.1135/cccc19971342>.
- (120) Ptacek, A.; Kulic, J.; Oplustil, F. Chemical-Kinetics of Reactions in the Micellar Environment. *Chemicke Listy* 1993, *87* (4), 252-261.
- (121) Cronce, D. T. Chemical Warfare Agent Decontaminant Solution Using Quaternary Ammonium Complexes. US5760089A, June 2, 1998.
- (122) Singha, N.; Ghosh, K.; Marek, J.; Kuca, K. Effect of Some Pyridinium Based Compounds on the Hydrolysis of Carboxylate Ester. *Indian J. Chem. - Sect. B Org. Med. Chem.* **2012**, *51*, 611–616.
- (123) Benkova, M.; Soukup, O.; Prchal, L.; Sleha, R.; Eleršek, T.; Novak, M.; Sepčić, K.; Gunde-Cimerman, N.; Dolezal, R.; Bostik, V.; Bostik, P.; Marek, J. Synthesis, Antimicrobial Effect and Lipophilicity-Activity Dependence of Three Series of Dichained *N*-Alkylammonium Salts. *ChemistrySelect* **2019**, *4* (41), 12076–12084. <https://doi.org/10.1002/slct.201902357>.
- (124) Cockerill, F.; Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically: Approved Standard*; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, Pa., 2015.
- (125) Marek, J.; Malinak, D.; Dolezal, R.; Soukup, O.; Pasdiorova, M.; Dolezal, M.; Kuca, K. Synthesis and Disinfection Effect of the Pyridine-4-Aldoxime Based Salts. *Molecules* **2015**, *20* (3), 3681–3696. <https://doi.org/10.3390/molecules20033681>.

(126) The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms | Journal of Clinical Microbiology <https://jcm.asm.org/content/37/6/1771/figures-only> (accessed 2021 -04 -08).

(127) Soukup, O.; Benkova, M.; Dolezal, R.; Sleha, R.; Malinak, D.; Salajkova, S.; Markova, A.; Hympanova, M.; Prchal, L.; Ryskova, L.; Hobzova, L.; Sepčić, K.; Gunde-Cimerman, N.; Korabecny, J.; Jun, D.; Bostikova, V.; Bostik, P.; Marek, J. The Wide-Spectrum Antimicrobial Effect of Novel N-Alkyl Monoquaternary Ammonium Salts and Their Mixtures; the QSAR Study against Bacteria. *Eur. J. Med. Chem.* **2020**, *206*, 112584. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112584>.

(128) BS EN 14476:2013+A2:2019 - Chemical disinfectants and antiseptics. Quantitative suspension test for the evaluation of virucidal activity in the medical area. Test method and requirements (Phase 2/Step 1) <https://shop.bsigroup.com/ProductDetail?pid=00000000030401479> (accessed 2021 -04 -08).

(129) Spearman, C. THE METHOD OF 'RIGHT AND WRONG CASES' ('CONSTANT STIMULI') WITHOUT GAUSS'S FORMULAE. *Br. J. Psychol.* **1904-1920** *1908*, *2* (3), 227–242. <https://doi.org/10.1111/j.2044-8295.1908.tb00176.x>.

(130) Kärber, G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Für Exp. Pathol. Pharmacol.* **1931**, *162* (4), 480–483. <https://doi.org/10.1007/BF01863914>.

(131) Guggenheim, E. A. XLVI. On the Determination of the Velocity Constant of a Unimolecular Reaction. *Lond. Edinb. Dublin Philos. Mag. J. Sci.* **1926**, *2* (9), 538–543. <https://doi.org/10.1080/14786442608564083>.

(132) Zajicek M, Radl Z: Katalytický Vliv Kationaktivního Tenzidu Na Hydrolyzu Fosfonátu. In Sborník Vyzkumneho Ustavu 070, Brno 1979, Pp. 115-129 (In Czech).

(133) Morrison, K. R.; Allen, R. A.; Minbiole, K. P. C.; Wuest, W. M. More QACs, More Questions: Recent Advances in Structure Activity Relationships and Hurdles in Understanding Resistance Mechanisms. *Tetrahedron Lett.* **2019**, *60* (37), 150935. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2019.07.026>.

- (134) Ng, C. K. L.; Singhal, V.; Widmer, F.; Wright, L. C.; Sorrell, T. C.; Jolliffe, K. A. Synthesis, Antifungal and Haemolytic Activity of a Series of Bis(Pyridinium)Alkanes. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15* (10), 3422–3429. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.03.018>.
- (135) Zabielska-Matejuk, J.; Urbanik, E.; Pernak, J. New Bis-Quaternary Ammonium and Bis-Imidazolium Chloride Wood Preservatives. **2004**, *58* (3), 292–299. <https://doi.org/10.1515/HF.2004.045>.
- (136) Smith, M.; March, J. *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 5th ed.; J. Wiley & sons: New York, 2001.
- (137) Limanov, V. E.; Épshtein, A. E.; Skvortsova, E. K.; Aref'eva, L. I.; Gleiberman, S. E.; Volkova, A. P. Synthesis and Antibacterial Action of Surface-Active Quaternary Ammonium Salts Containing Hydroxyethyl Radicals. *Pharm. Chem. J.* **1976**, *10* (1), 55–58. <https://doi.org/10.1007/BF00764289>.
- (138) Chernyavskaya, M. A.; Stefanovich, V. V.; Sergeeva, I. A.; Belova, A. S. Antimicrobial and Surface-Active Properties of Cationic Surfactants Based on Chloroalkanes and Alkylbenzenes. *Pharm. Chem. J.* **1984**, *18* (11), 784–787. <https://doi.org/10.1007/BF00779905>.
- (139) Markova, A.; Hympanova, M.; Matula, M.; Prchal, L.; Sleha, R.; Benkova, M.; Pulkrabkova, L.; Soukup, O.; Krocova, Z.; Jun, D.; Marek, J. Synthesis and Decontamination Effect on Chemical and Biological Agents of Benzoxonium-Like Salts. *Toxics* **2021**, *9* (9), 222. <https://doi.org/10.3390/toxics9090222>.
- (140) Hympanova, M.; Terlep, S.; Markova, A.; Prchal, L.; Dogsa, I.; Pulkrabkova, L.; Benkova, M.; Marek, J.; Stopar, D. The Antibacterial Effects of New N-Alkylpyridinium Salts on Planktonic and Biofilm Bacteria. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 573951. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.573951>.
- (141) Marek, J.; Stodulka, P.; Cabal, J.; Soukup, O.; Pohanka, M.; Korabecny, J.; Musilek, K.; Kuca, K. Preparation of the Pyridinium Salts Differing in the Length of the N-Alkyl Substituent. *Molecules* **2010**, *15* (3), 1967–1972. <https://doi.org/10.3390/molecules15031967>.

Seznam příloh

Příloha A: Stanovení kritické micelární koncentrace (str. 2)

Příloha B: Stanovení minimální inhibiční (MIC) a baktericidní (MBC) koncentrace ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) po 24 a 48 hodinách (str. 3)

Příloha C: Stanovení antimikrobiální aktivity vůči *F. tularensis* (str. 10)

Příloha D: Stanovení minimální biofilm eradikující koncentrace ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) (str. 11)

Příloha E: Stanovení antivirové účinnosti (str. 12)

Příloha F: Stanovení cytotoxicity (str. 14)

Příloha G: Stanovení hydrolytické účinnosti (str. 15)

Příloha A

Stanovení kritické micelární koncentrace:

Látka	CMC (mol.l ⁻¹)	log CMC
9a	4,84E-02	-1,316
9b/BOX Cl	8,71E-03	-2,060
9c	3,00E-03	-2,522
9d	1,16E-03	-2,936
9e	4,71E-04	-3,332
15c	6,37E-03	-2,196
15d	1,80E-03	-2,745
15e	5,82E-04	-3,239
17a	6,37E-02	-1,209
17b	2,76E-02	-1,559
17c	6,26E-03	-2,203
17d	1,75E-03	-2,757
17e	5,03E-04	-3,298
21c	6,22E-03	-2,206
25c	5,86E-03	-2,232
11a	7,78E-04	-3,109
11b	5,66E-04	-3,249
11c	7,32E-04	-3,135
11e	6,37E-04	-3,200

CMC – kritická micelární koncentrace; BOX Cl – benzoxonium-chlorid

Příloha B

Stanovení minimální inhibiční (MIC) a baktericidní (MBC) koncentrace ($\mu\text{mol.l}^{-1}$) po 24 a 48 hodinách:

medium	Mueller-Hinton									BHI
Látka		STAU	MRSA	STEP	VRE	ESCO	KLPN ES-	KLPN ES+	PSAE MR	S. mutans
BAC CI C12	MIC 24	2,93	15,63	15,63	31,25	31,25	46,88	31,25	156,25	
	MIC 48	2,93	15,63	15,63	31,25	31,25	46,88	31,25	156,25	
	MBC 48	4,88	15,63	31,25	62,5	31,25	46,88	31,25	156,25	
BAC CI C14	MIC 24	0,98	5,86	2,93	15,63	31,25	31,25	23,44	156,25	
	MIC 48	0,98	5,86	2,93	15,63	31,25	31,25	23,44	156,25	
	MBC 48	1,47	5,86	3,91	23,44	31,25	31,25	23,44	156,25	
BAC CI C16	MIC 24	0,98	7,81	2,93	15,63	62,5	93,75	93,75	187,5	
	MIC 48	1,47	7,81	3,91	15,63	62,5	93,75	93,75	187,5	
	MBC 48	2,93	11,72	7,81	23,44	62,5	93,75	93,75	187,5	
3a	MIC 24	125	500	500	500	> 500	> 500	> 500	> 500	
	MIC 48	125	500	500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	
	MBC 48	500	500	500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	
3b	MIC 24	1,47	7,81	7,81	15,63	31,25	62,5	62,5	≥ 500	
	MIC 48	1,95	7,81	23,44	31,25	31,25	62,5	62,5	500	
	MBC 48	11,72	93,75	23,44	46,88	250	93,75	62,5	500	
3c	MIC 24	15,63	31,25	5,86	93,75	250	93,75	375	> 500	
	MIC 48	15,63	31,25	15,63	93,75	250	93,75	375	> 500	
	MBC 48	15,63	62,5	15,63	104,17	250	93,75	375	> 500	
3d	MIC 24	2,93	5,86	2,93	23,44	187,5	> 250	250	> 250	
	MIC 48	2,93	5,86	5,86	23,44	187,5	> 250	250	> 250	
	MBC 48	2,93	7,81	11,72	23,44	187,5	> 250	250	> 250	

3e	MIC 24	5,86	7,81	7,81	11,72	> 125	> 125	> 125	> 125
	MIC 48	9,77	70,32	11,72	23,44	> 125	> 125	> 125	> 125
	MBC 48	46,88	93,75	11,72	31,25	> 125	> 125	> 125	> 125
5a	MIC 24	250	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	MIC 48	375	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
	MBC 48	500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500
5b	MIC 24	2,45	62,5	9,79	250	1,22	> 500	125	> 500
	MIC 48	2,45	125	31,25	250	1,22	> 500	125	> 500
	MBC 48	2,45	187,5	31,25	500	1,22	> 500	500	> 500
5c	MIC 24	1,95	11,72	1,47	39,07	1,47	93,75	23,44	500
	MIC 48	2,93	15,63	2,93	39,07	1,47	93,75	23,44	500
	MBC 48	3,91	31,25	7,81	140,63	1,95	93,75	23,44	500
5d	MIC 24	0,98	2,93	0,49	62,5	15,63	23,44	31,25	> 500
	MIC 48	0,98	2,93	0,98	62,5	15,63	23,44	93,75	> 500
	MBC 48	1,47	7,81	2,45	125	23,44	23,44	93,75	> 500
5e	MIC 24	3,91	62,5	33,21	93,75	> 125	> 125	> 125	> 125
	MIC 48	5,86	62,5	66,41	125	> 125	> 125	> 125	> 125
	MBC 48	62,5	125	78,13	125	> 125	> 125	> 125	> 125
13a	MIC 24	15,63	31,25	250	500	500	500	500	500
	MIC 48	15,63	46,88	250	500	500	500	500	> 500
	MBC 48	23,44	93,75	250	500	500	500	500	> 500
13b	MIC 24	2,93	11,72	31,25	62,5	125	187,5	250	250
	MIC 48	3,91	19,53	46,88	93,75	125	187,5	375	250
	MBC 48	7,81	23,44	46,88	93,75	125	187,5	375	250
13c	MIC 24	0,49	3,91	5,86	15,63	62,5	125	125	> 125
	MIC 48	1,47	3,91	7,81	31,25	62,5	125	125	> 125
	MBC 48	1,47	11,72	11,72	31,25	62,5	125	125	> 125

13d	MIC 24	0,49	2,93	3,91	31,25	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	
	MIC 48	1,47	3,91	7,81	31,25	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	
	MBC 48	1,47	11,72	7,81	46,88	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	
13e	MIC 24	0,49	2,45	5,86	31,25	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	
	MIC 48	0,74	2,93	5,86	46,88	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	
	MBC 48	1,47	5,86	7,81	62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	
9a	MIC 24	5,86	11,72	46,88	125	250	375	500	> 500	
	MIC 48	5,86	11,72	46,88	125	250	375	500	> 500	
	MBC 48	5,86	23,44	62,5	125	250	375	500	> 500	
9b/BOX CI	MIC 24	1,95	15,63	11,72	15,63	7,81	31,25	31,25	125	5,86
	MIC 48	1,95	15,63	15,63	23,44	7,81	31,25	31,25	125	7,81
	MBC 48	1,95	15,63	15,63	23,44	7,81	31,25	31,25	125	15,63
9c	MIC 24	0,49	4,88	2,93	7,81	23,44	31,25	31,25	> 62,5	3,91
	MIC 48	0,98	5,86	5,86	15,63	23,44	31,25	31,25	> 62,5	7,81
	MBC 48	1,47	11,72	5,86	15,63	23,44	31,25	31,25	> 62,5	7,81
9d	MIC 24	0,98	4,88	2,93	11,72	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	3,91
	MIC 48	1,47	5,86	5,86	11,72	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	5,86
	MBC 48	1,95	11,72	5,86	11,72	> 62,5	> 62,5	> 62,5	> 62,5	5,86
9e	MIC 24	2,2	15,63	9,77	15,63	23,44	>31,25	>31,25	>31,25	
	MIC 48	2,45	15,63	11,72	15,63	23,44	>31,25	>31,25	>31,25	
	MBC 48	2,45	15,63	>31,25	23,44	23,44	>31,25	>31,25	>31,25	
11a	MIC 24	0,74	3,91	3,91	3,91	1,95	15,63	15,63	> 125	2,95
	MIC 48	0,74	3,91	3,91	3,91	1,95	15,63	15,63	> 125	7,81
	MBC 48	0,74	3,91	3,91	7,81	1,95	15,63	23,44	> 125	7,81
11b	MIC 24	0,74	1,95	7,81	3,91	4,88	31,25	46,88	> 125	3,91
	MIC 48	0,74	1,95	7,81	3,91	4,88	31,25	46,88	> 125	7,81
	MBC 48	0,74	1,95	7,81	3,91	4,88	31,25	46,88	> 125	7,81

11c	MIC 24	1,47	5,86	2,93	7,81	5,86	15,63	31,25	93,75	5,86
	MIC 48	1,95	5,86	2,93	11,72	5,86	15,63	31,25	93,75	7,81
	MBC 48	1,95	7,81	2,93	11,72	7,81	31,25	31,25	187,5	7,81
11d	MIC 24	0,49	1,95	2,93	2,93	62,5	23,44	11,72	> 62,5	
	MIC 48	0,49	1,95	2,93	2,93	62,5	46,88	15,63	> 62,5	
	MBC 48	0,49	1,95	2,93	4,88	62,5	46,88	15,63	> 62,5	
11e	MIC 24	0,65	1,95	1,95	3,26	7,81	5,21	10,42	31,25	3,91
	MIC 48	0,65	1,95	2,6	3,91	7,81	5,21	15,62	>250	5,86
	MBC 48	0,65	3,9	4,56	7,82	10,42	7,81	15,62	>250	5,86
15a	MIC 24	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	
	MIC 48	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	
	MBC 48	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	
15b	MIC 24	93,75	125	93,75	156,25	500	> 500	> 500	> 500	
	MIC 48	93,75	125	93,75	156,25	500	> 500	> 500	> 500	
	MBC 48	93,75	187,5	125	281,25	500	> 500	> 500	> 500	
15c	MIC 24	5,21	31,25	46,88	125	250	333,33	416,67	500	
	MIC 48	6,51	62,5	125	125	250	333,33	416,67	> 500	
	MBC 48	10,42	250	125	250	375	333,33	416,67	> 500	
15d	MIC 24	4,56	32,55	31,9	95,05	177,08	187,5	250	> 250	
	MIC 48	13,67	42,97	31,9	105,47	177,08	187,5	250	> 250	
	MBC 48	16,28	192,71	83,98	127,6	177,08	187,5	250	> 250	
15e	MIC 24	1,95	1,95	2,93	11,72	31,25	125	62,5	> 250	
	MIC 48	2,93	2,93	2,93	11,72	31,25	125	62,5	> 250	
	MBC 48	2,93	4,88	3,91	11,72	31,25	125	187,5	> 250	
17a	MIC 24	250	> 500	500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	
	MIC 48	250	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	
	MBC 48	500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	> 500	

17b	MIC 24	15,63	93,75	46,88	125,49	500	> 500	> 500	> 500
	MIC 48	46,88	93,75	62,5	187,5	500	> 500	> 500	> 500
	MBC 48	46,88	187,5	125	187,5	500	> 500	> 500	> 500
17c	MIC 24	3,26	18,23	13,02	31,5	31,25	72,92	46,88	> 250
	MIC 48	3,91	18,23	13,02	46,88	31,25	72,92	62,5	> 250
	MBC 48	26,04	31,25	31,25	46,88	46,88	145,83	62,5	> 250
17d	MIC 24	4,88	1,47	1,22		7,81	19,53	15,63	250
	MIC 48	4,88	1,95	2,93	2,93	7,81	19,53	31,25	250
	MBC 48	31,25	23,44	15,63	16,6	15,63	31,25	46,88	250
17e	MIC 24	1,63	5,86	2,95		20,84	46,88	> 125	> 125
	MIC 48	1,63	5,86	2,95		26,04	46,88	> 125	> 125
	MBC 48	6,51	20,84	10,42		41,67	52,08	> 125	> 125
19b	MIC 24	46,88	125	125	187,5	250	375	500	500
	MIC 48	46,88	125	125	187,5	250	375	500	> 500
	MBC 48	93,75	187,5	125	250	250	500	500	> 500
21c	MIC 24	15,62	46,88	31,25	187,5	125	375	375	500
	MIC 48	18,23	62,5	46,88	187,5	250	375	500	500
	MBC 48	23,44	93,75	125	375	250	375	500	500
23c	MIC 24	4,88	23,44	23,44	46,88	125	250	375	500
	MIC 48	5,86	23,44	31,25	62,5	125	250	375	500
	MBC 48	5,86	31,25	31,25	156,25	187,5	250	375	500
25b	MIC 24	15,63	125	125	375	500	500	> 500	> 500
	MIC 48	23,44	125	125	375	500	> 500	> 500	> 500
	MBC 48	46,88	187,5	187,5	375	500	> 500	> 500	> 500
25c	MIC 24	15,63	23,44	15,63	78,13	187,5	250	500	500
	MIC 48	23,44	31,25	23,44	78,13	187,5	250	500	500
	MBC 48	23,44	93,75	23,44	125	375	375	500	500

27b	MIC 24	7,81	93,75	125	187,5	375	500	500	> 500	
	MIC 48	7,81	125	125	187,5	375	500	500	> 500	
	MBC 48	46,88	375	125	250	375	500	500	> 500	
27c	MIC 24	3,91	15,63	15,63	46,88	93,75	125	375	500	
	MIC 48	3,91	15,63	15,63	46,88	93,75	125	375	500	
	MBC 48	3,91	93,75	62,5	93,75	125	125	375	500	
29c	MIC 24	4,88	15,63		7,81	78,13		375	500	31,25
	MIC 48	9,77	15,63		19,53	78,13		375	500	36,46
	MBC 48	23,44	23,44		66,41	93,75		500	> 500	36,46
30a	MIC 24	> 500	> 500		> 500	> 500		> 500	> 500	500
	MIC 48	> 500	> 500		> 500	> 500		> 500	> 500	500
	MBC 48	> 500	> 500		> 500	> 500		> 500	> 500	> 500
30b	MIC 24	> 500	> 500		> 500	> 500		> 500	> 500	> 500
	MIC 48	> 500	> 500		> 500	> 500		> 500	> 500	> 500
	MBC 48	> 500	> 500		> 500	> 500		> 500	> 500	> 500
30c	MIC 24	500	500		> 500	> 500		> 500	> 500	> 500
	MIC 48	500	500		> 500	> 500		> 500	> 500	> 500
	MBC 48	> 500	> 500		> 500	> 500		> 500	> 500	> 500
31a	MIC 24	> 500	> 500		> 500	> 500		> 500	> 500	> 500
	MIC 48	> 500	> 500		> 500	> 500		> 500	> 500	> 500
	MBC 48	> 500	> 500		> 500	> 500		> 500	> 500	> 500
31b	MIC 24	> 500	> 500		> 500	> 500		> 500	> 500	> 500
	MIC 48	> 500	> 500		> 500	> 500		> 500	> 500	> 500
	MBC 48	> 500	> 500		> 500	> 500		> 500	> 500	> 500
31c	MIC 24	125	187,5		62,5	> 500		> 500	> 500	500
	MIC 48	187,5	187,5		250	> 500		> 500	> 500	500
	MBC 48	500	> 500		> 500	> 500		> 500	> 500	> 500

33a	MIC 24	> 500	> 500		> 500	> 500		> 500	> 500	> 500
	MIC 48	> 500	> 500		> 500	> 500		> 500	> 500	> 500
	MBC 48	> 500	> 500		> 500	> 500		> 500	> 500	> 500
33b	MIC 24	> 500	> 500		> 500	> 500		> 500	> 500	> 500
	MIC 48	> 500	> 500		> 500	> 500		> 500	> 500	> 500
	MBC 48	> 500	> 500		> 500	> 500		> 500	> 500	> 500
33c	MIC 24	250	250		> 500	> 500		> 500	> 500	> 500
	MIC 48	375	500		> 500	> 500		> 500	> 500	> 500
	MBC 48	> 500	> 500		> 500	> 500		> 500	> 500	> 500

BAC Cl – benzalkonium-chlorid; BOX Cl – benoxonium-chlorid

STAU – *Staphylococcus aureus*

MRSA – *meticilin-rezistentní Staphylococcus aureus*

STEP – *Streptococcus epidermidis*

VRE – *vancomycin-rezistentní Enterococcus*

ESCO – *Escherichia coli*

KLPN ES- – *Klebsiella pneumoniae* neprodukující betalaktamázy

KLPN ES+ – *Klebsiella pneumoniae* produkující betalaktamázy

PSAE – *Pseudomonad aeruginosa*

S. mutans – *Streptococcus mutans*

Příloha C

Stanovení antimikrobiální aktivity vůči *F. tularensis*:

	Celkem (%)	Přeživší (%)	SD (%)	Mrtvé (%)	SD (%)
Pozitivní kontrola	100,0	96,1	1,11	3,9	1,11
Negativní kontrola	83,9	0,3	0,07	83,6	7,78
Ethanol 70%	67,4	18,2	11,74	49,1	22,02
Benzethonium-chlorid 0,1%	0,7	0,2	0,39	0,5	0,43
Ajatin 0,1%	9,5	3,8	4,12	5,7	6,67
Sanytol 0,1%	3,0	0,2	0,29	2,9	2,13
9b/BOX Cl 0,1%	8,4	4,7	7,35	3,7	2,71
9c 0,1%	39,5	19,3	17,76	20,3	18,70
9d 0,1%	68,1	60,0	48,61	8,1	8,74
11e 0,1%	81,6	0,1	0,05	81,5	17,87

SD – standard deviation (směrodatná odchylka)

BOX Cl – benzoxonium-chlorid

Příloha D

Stanovení minimální biofilm eradikující koncentrace ($\mu\text{mol.l}^{-1}$):

Látka		STAU - PS	STAU - HA	ESCO - PS	ESCO - HA	S. mutans - HA
BAC Cl C12	MBEC	1,95	145,83	44,27	NAD 500	52,08
BAC Cl C14	MBEC	0,65	291,67	36,46	NAD 250	33,85
BAC Cl C16	MBEC	2,60	NAD 125	23,44	NAD 125	36,46
9b/BOX Cl	MBEC	2,44	125,00	35,72	NAD 250	39,06
9c	MBEC	3,58	nad 125	21,49	NAD 125	15,63
9d	MBEC	2,62	NAD 125	23,44	NAD 125	36,46
11e	MBEC	1,95	NAD 125	15,83	NAD 125	48,61
11a	MBEC	2,60	NAD 125	18,23	NAD 125	42,97
11b	MBEC	3,91	NAD 125	52,08	NAD 125	36,46
11c	MBEC	1,71	NAD 125	19,79	NAD 125	18,23
29c	MBEC	0,00	0,00	0,00	0,00	72,92
13a	MBEC	35,16	250,00	437,50	nad 500	125,00
13c	MBEC	0,65	166,67	27,35	nad 250	46,88
13d	MBEC	1,95	104,17	15,63	NAD 125	18,23
13b	MBEC	2,60	93,75	41,67	291,67	46,88

PS – polystyren; HA – hydroxyapatit

BAC Cl – benzalkonium-chlorid; BOX Cl – benzoxonium-chlorid

STAU – *Staphylococcus aureus*

ESCO – *Escherichia coli*

S. mutans – *Streptococcus mutans*

MBEC – minimální biofilm eradikující koncentrace

Příloha E

Stanovení antivirové účinnosti:

MCMV – murine cytomegalovirus

Látka	$\Delta\log\text{TCID}_{50}$	Koncentrace (%)
Sanytol	>1,34	0,10
11a	>3,34	0,10
11b	>3,34	0,10
11c	>3	0,10
11d	>3,34	0,10
11e	4,17	0,10
9b/BOX CI	>3,34	0,10
9c	>2,34	0,10
9d	>3,34	0,10
9e	1,5	0,10
Sanytol	>3,34	0,01
11a	>4,67	0,01
11b	3,34	0,01
11c	3,34	0,01
11d	>3,67	0,01
9b	5,33	0,01
9c	3,34	0,01
9d	-0,5	0,01
9e	0	0,01
5d	5,51	0,01

$\Delta\log\text{TCID}_{50}$ – median tissue culture infectious dose

SARS-CoV-2 – severe acute respiratory syndrome coronavirus 2

Látka	$\Delta\log\text{TCID}_{50}$	Koncentrace (%)
Sanytol	>2,51	0,10
11a	>3,51	0,10
11b	>3,51	0,10
11c	>3,51	0,10
11d	>3,51	0,10
11e	3,67	0,10
9b/BOX CI	>3,51	0,10
9c	>3,51	0,10
9d	1	0,10
9e	0,34	0,10
11b	5	0,01
11c	5	0,01
11d	2,84	0,01
11e	>3,51	0,01
9b	0,47	0,01
9c	0,64	0,01
9d	0,84	0,01
5d	0,81	0,01

BOX C1 – benzoxonium-chlorid

Symbol >: koncentrace testované látky, mimo snížení titru viru, způsobovala i cytopatický efekt buněk buněčné linie. Nelze tedy určit přesnou hodnotu $\Delta\log\text{TCID}_{50}$, ale lze říct, že je vyšší než úbytek titru v jamce, kde cytopatický efekt pozorován nebyl.

Příloha F

Stanovení cytotoxicity:

Látka	IC ₅₀ (μmol.l ⁻¹)	± SEM (μmol.l ⁻¹)
Benzethonium	26,18	3,3
Chlorhexidine	19,33	1,4
Sanytol	7,83	0,4
3a	> 6 mM	-
3b	58,7	1,4
3c	132,80	5,6
3d	28,36	0,0
13b	25,50	2,5
13c	17,17	1,3
13d	12,54	1,1
9a	128,40	12,7
9b/BOX Cl	36,09	0,5
9c	27,34	1,1
9d	19,58	0,5
9e	19,14	1,3
11a	17,10	2,7
11b	13,92	0,8
11c	21,25	3,4
11d	19,11	1,5
11e	13,35	2,0
15a	1677,00	63,4
15b	267,13	17,2
15c	86,57	9,4
15d	45,85	1,4
15e	32,56	0,2
17a	625,67	63,0
17b	93,50	8,1
17c	32,99	0,7
17d	22,72	1,6
17e	18,50	0,5
19b	163,27	10,1
25b	147,65	9,5
25c	49,52	2,9
27b	134,30	1,5
27c	40,86	0,0

IC₅₀ – střední inhibiční koncentrace

SEM – střední chyba průměru

BOX Cl – benzoxonium-chlorid

Příloha G

Stanovení hydrolytické účinnosti:

Látka	c (mM)	pH 11, t= 37°C		pH 10, t= 37°C	
		10 ⁴ k (s ⁻¹)	T _{1/2} (min)	10 ⁴ k (s ⁻¹)	T _{1/2} (min)
9a	500	6,2	18,6	2,3	50,3
	100	12,82	9	3,97	29,2
	50	12,68	9,1	3,77	30,7
	10	0,5	230,8	0,18	606,3
	5	0,35	323,2	-	-
9b/BOX Cl	100	8,17	14,1	1,67	69,1
	50	9,35	12,4	2,35	49,3
	10	8,23	14	2,65	43,5
	5	5,93	19,5	1,15	100,8
	1	1,8	64,5	-	-
9c	10	24,62	4,7	6,77	17,1
	5	23,62	4,9	5,82	19,9
	1	11,28	10,2	2,02	57,5
	0,5	3,8	30,5	1,12	103
	0,1	1,17	98,8	0,5	230,8
9d	10	50,73	2,3	11,56	10
	5	49,06	2,4	11,14	10,4
	1	12,32	9,4	3,97	29,2
	0,5	6,47	17,9	2,3	50,3
	0,1	1,77	65,3	1,1	105,2
9e	5	23,3	5	6,98	16,5
	1	13,95	8,3	4,37	26,4
	0,5	7,82	14,8	2,97	38,9
	0,1	1,87	62	0,82	142,5
	0,05	0,83	138,4	0,28	404,1
Spontánní hydrolyza		0,14	808,4	-	-

BOX Cl – benzoxonium-chlorid