

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Ústav organické chemie a technologie

**Molekulárně otištěné polymery pro selektivní adsorpci  
Ibuprofenu**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Bc. Adam Jelínek

VEDOUCÍ PRÁCE: Ing. Jan Bartáček, Ph.D.

2024

**University of Pardubice**  
**Faculty of Chemical Technology**  
Institute of Organic Chemistry and Technology

Molecularly imprinted polymers for selective adsorption of  
Ibuprofen

DIPLOMA THESIS

AUTHOR: Bc. Adam Jelínek

SUPERVISOR: Ing. Jan Bartáček, Ph.D.

2024

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Adam Jelínek**  
Osobní číslo: **C21501**  
Studijní program: **N0531A130047 Organická chemie a technologie**  
Specializace: **Organická chemie**  
Téma práce: **Molekulárně otištěné polymery pro selektivní adsorpci ibuprofenu**  
Téma práce anglicky: **Molecularly imprinted polymers for selective adsorption of ibuprofen**  
Zadávající katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

## Zásady pro vypracování

1. Provedte literární rešerši týkající se přípravy a využití molekulárně otištěných polymerů pro selektivní záchyt ibuprofenu.
2. Připravte derivát ibuprofenu nesoucí fragment styrenu přes hydrolyzovatelnou spojku, ten podrobte polymeraci a odštěpení fragmentu ibuprofenu.
3. Všechny cílové látky a meziprodukty charakterizujte dostupnými metodami, proveďte vyhodnocení sorpční schopnosti připraveného materiálu.
4. Jednotlivé metody porovnejte, výsledky vyhodnotte.
5. Výsledky zpracujte formou závěrečné práce v souladu se Směrnicí UPCE č. 7/2019 "Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací" v platném znění.

Rozsah pracovní zprávy: **doporučený rozsah 50 stran**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:  
veškerá dostupná odborná literatura

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Jan Bartáček, Ph.D.**  
Ústav organické chemie a technologie

Datum zadání diplomové práce: **28. února 2023**  
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

**prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.** v.r.  
děkan

L.S.

**prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc.** v.r.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Adam Jelínek

## **Poděkování**

V první řadě bych rád poděkovat Ing. Janu Bartáčkovi, Ph.D. za vedení mé diplomové práce a za cenné rady při řešení problémů, které během výzkumu nastaly. V další řadě patří mé poděkování Ing. Janu Svobodovi, Ph.D. za jeho pomoc s průtokovými experimenty a konzultacích při vyhodnocování získaných dat. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat mé snoubence za pevné nervy a trpělivost, kterou se mnou měla při získávání dat a tvorbě této diplomové práce.

## **ANOTACE**

V této diplomové práci shrnuty možné strategie přípravy molekulárně otištěných polymerů pro selektivní zachycení léčiva Ibuprofenu z roztoku. Praktická část této diplomové práce shrnula přípravu takto otištěných polymerů kovalentním přístupem a následné vsádkové a průtočné experimenty pro zachycení Ibuprofenu, dále se tato práce zabývá selektivním zachycení Ibuprofenu ze směsi s Paracetamolem. Nakonec se také prostudovala možná recyklace a znovupoužití těchto materiálů.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

molekulárně otištěné polymery, Ibuprofen, syntéza, absorpční kapacita

## **Annotation**

This diploma thesis summarizes possible strategies for the preparation of molecularly imprinted polymers for the selective capture of the drug Ibuprofen from solution. The practical part summarized the preparation of such imprinted polymers by covalent approach and the subsequent batch and flow experiments for the capture of Ibuprofen, this work also deals with the selective capture of Ibuprofen from a mixture with Paracetamol. Finally, the possible recycling and reuse of these materials was also studied.

## **Keywords**

molecularly imprinted polymers, Ibuprofen, synthesis, absorption capacity

# Obsah

Seznam zkratk a značek .....	9
1. Úvod.....	10
2. Teoretická část.....	13
2.1. Použití nekovalentní přístupu .....	13
2.2. Použití nekovalentního přístupu společně s nanotechnologií.....	19
2.3. Použití nekovalentního přístupu společně s hybridní chitosan hydrogelovou technologií 21	
2.4. Použití nekovalentního přístupu společně s core@shell materiálem.....	25
2.5. Použití kovalentního přístupu.....	28
3. Experimentální část.....	36
3.1. Obecná část.....	36
3.2. 4-vinylbenzyl–2-(4-isobutylfenyl)propanoát .....	37
3.3. Příprava separační fáze pro kopolymeraci .....	37
3.4. Příprava polymeru (P35 a P50) .....	37
3.5. Hydrolyza polymerů .....	38
3.6. Sorpční experimenty v sádkovém uspořádání.....	39
3.7. Sorpční experimenty v průtočném uspořádání.....	39
4. Výsledky a diskuse .....	40
4.1. Návrh molekulárně otištěných polymerů pro sorpci ibuprofenu.....	40
4.2. Příprava a charakterizace MIPs .....	41
4.3. Sorbční experimenty ověřující aktivitu připravených MIPs .....	43
4.3.1. Volba rozpouštědla pro adsorpční experimenty .....	45
4.3.2. Sorbční experimenty ve vsádkovém uspořádání .....	45
4.3.3. Sorpční experimenty v průtočném uspořádání .....	46
4.3.3.1. Kalibrace průtočného systému.....	46
4.3.3.2. Regenerace adsorpční kolony KOLP35 .....	47
4.3.3.3. Selektivita adsorpční kolony KOLP50.....	47
4.3.3.4. Regenerace adsorpční kolony KOLP50 .....	48
5. Závěr .....	51
Použitá literatura .....	52
Přílohy.....	54



## Seznam zkratek a značek

ABCN – 1,1'-azobis(cyclohexankarbonitril)

ACN – acetonitril

AIBN – azobisisobutyronitril

BAPOs – fenylobis(2,4,6-trimethylbenzoyl)fosfin oxide

DCM – dichlormethan

DMF – *N,N*-dimethylformamid

DVB – divinylbenzen

EGDMA – ethylene glykol–dimetakrylát

HEMA – (2-hydroxyethyl)–metakrylát

**Ibu** – ibuprofen

MMA – methyl–methakrylát

MeOH – methanol

MMIP – magnetický molekulárně otištěný polymer

PCM – paracetamol

PVA – polyvinyl alkohol

THF – tetrahydrofuran

VBC – 4-vinylbenzyl chlorid

# 1. Úvod

Ibuprofen ((*2RS*)-2-[4-(2-methylpropyl)fenyl]propanová kyselina) je léčivo patřící do skupiny nesteroidních antiflogistik (léčí zánět) s antipyretickými (snižující horečku) a analgetickými (tlumení bolesti) vlastnostmi. V praxi se užívá při bolesti kloubů, zubů, svalů, hlavy a při menstruačních bolestech. Nejčastěji se užívá ve formě tablet, sirupů a také ve formě mastí a gelů pro lokální podání. Na trhu je dostupný pod komerčními názvy jako Brufen<sup>®</sup>, Ibalgin<sup>®</sup>, Ibumax<sup>®</sup>, Nurofen<sup>®</sup> aj.<sup>1,2</sup>

**Ibu** působí v lidském těle jako inhibitor enzymu cyklooxygenázy (COX), který je zodpovědný za tvorbu prostaglandinů. Prostaglandiny hrají zásadní roli při zvýšení citlivosti neuronů bolesti a také zvyšují tělesnou teplotu. Jako antiflogistikum působí na buňky imunitního systému a snižuje uvolňování mediátorů zánětu. **Ibu** je používán v racemické směsi, *R*-enantiomer podléhá složité interkonverzi na *S*-enantiomer *in vivo* a tento *S*-enantiomer se považuje za farmakologický aktivnější než jeho epimer, tímto se dá docílit delšího působení podané dávky.<sup>2-5</sup>

Jelikož je **Ibu** považován za třetí nejprodávanější a nejpředepisovanější léčivo na světě<sup>6</sup> je i značným kontaminantem v životním prostředí (společně s jeho metabolity). Jako hlavní zdroje **Ibu** jsou odpadní vody z výroby **Ibu**, odpadní vody z medicíny hospodářských zvířat, exkrece lidí resp. zvířat a z čistíren odpadních vod. Při odstraňování **Ibu** z odpadních vod můžeme použít 3 strategie<sup>7-9</sup>:

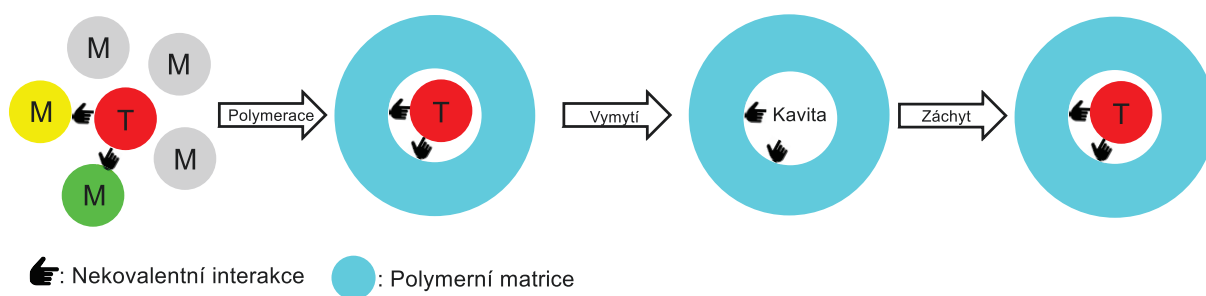
- První závisí na biologických metodách, kdy se využívají mikroorganismy k biotransformaci **Ibu** na méně škodlivé látky jako jsou 3-isobutylfenol, Ibuprofen acetát, dihydroxyIbuprofen aj.
- Druhá využívá chemických reakcí k odstranění **Ibu** z odpadních vod, mezi ně patří ozonizace, Gamma radiolýza, Fenton a Fenton-like procesy aj.
- Poslední strategie využívá fyzikálních metod, nejčastěji se jedná o různé filtrace přes aktivní uhlí<sup>8</sup> nebo využití molekulárně otištěných polymerů (MIP z anglického **M**olecularly **I**mprinted **P**olymers), kdy dochází k zachycení polutantu (templátu) v tomto případě **Ibu** do kavit vytvořených různými strategiemi ve vlastní polymerní matici.

Molekulárně otištěné polymery (MIPs) jsou inovativní třída materiálů s širokým spektrem použití, od separačních technik po biomedicínu. Jsou navrženy tak, aby specificky interagovaly s cílovou molekulou (templátem), což umožňuje selektivní zachycení resp. detekci. Podstatou

této techniky je vytvoření kavity ve tvaru cílové molekuly (templátu), do které se následně může selektivně zachytit pouze molekula, podle které je kavita vytvořena. Obecně můžeme při přípravě MIPs použít dvě odlišné strategie. Tyto strategie se liší jakým způsobem je cílová molekula (templát) vázána na funkční monomer<sup>10–13</sup>:

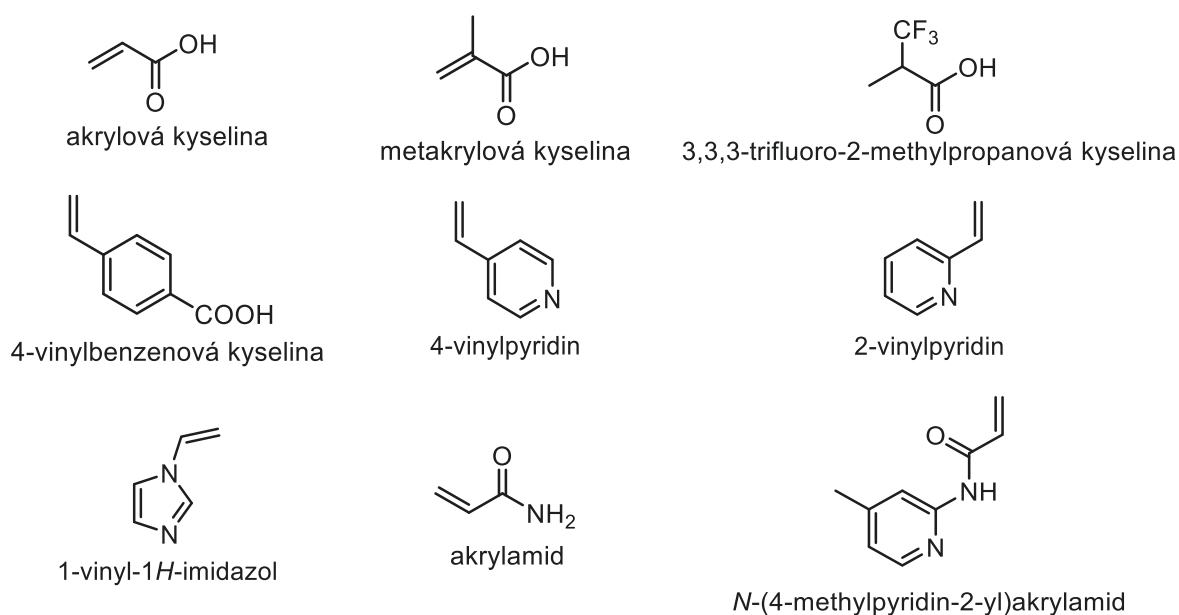
### Nekovalentní přístup

Tento přístup je kvůli jeho jednoduchosti a široké škále možných funkčních monomerů nejvíce používán ve výzkumných laboratořích. Dále má rychlejší vazebnou kinetiku oproti kovalentnímu přístupu.<sup>14</sup> Jak už název napovídá, templát je vázaný na funkční monomer pomocí nekovalentní interakce jako je vodíková vazba, iontová interakce nebo van der Waalsovy síly (**Schéma 1**). Dále je nutné podotknout, že takto připravené MIPs nevykazují jednoduchý vztah mezi zesítním a účinností, tento vztah je vždy nutné získat empirickou optimalizací. Příklady používaných funkčních monomerů jsou v **Tabulce 1**



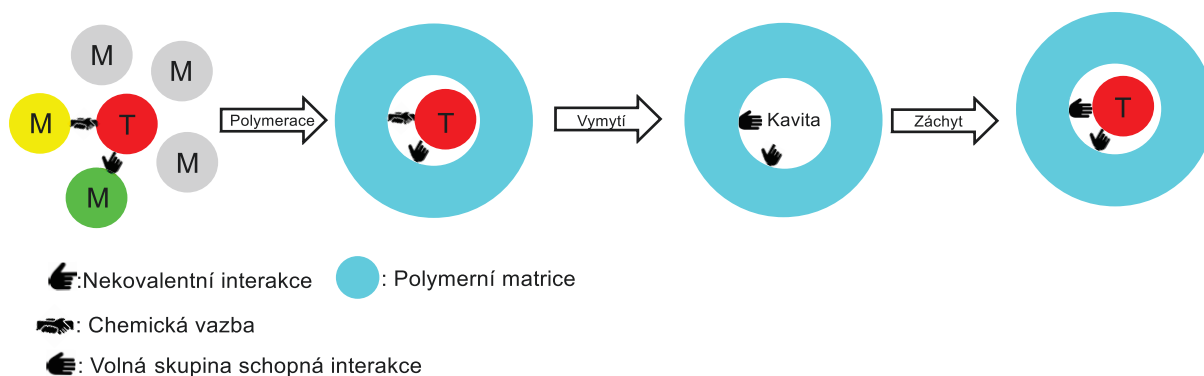
**Schéma 1** – Znárodnění nekovalentního přístupu pro přípravu MIPs

**Tabulka 1** – Příklady funkčních monomerů pro nekovalentní přístup přípravy MIPs



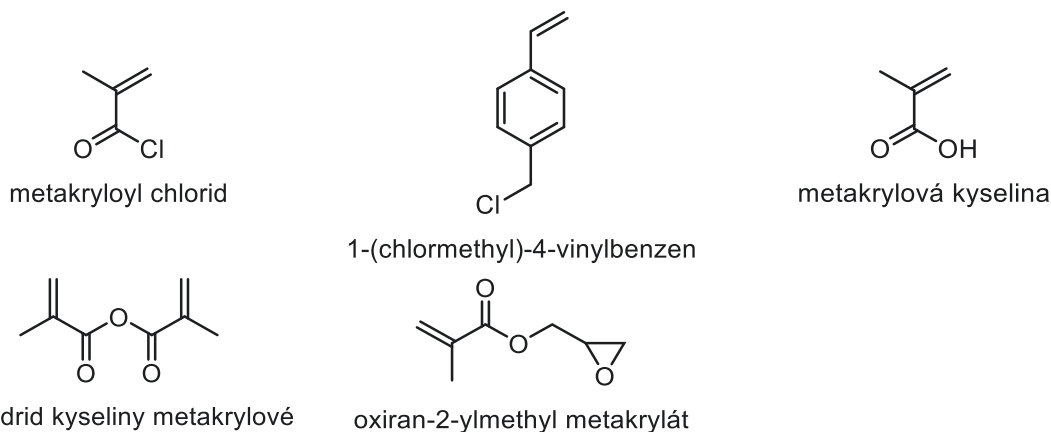
## (Semi)kovalentní přístup

Zde je templát vázaný na funkční monomer pomocí kovalentní vazby, která je zásadně silnější než slabé vazebné interakce u nekovalentního přístupu, tato skutečnost v praxi zpomaluje adsorpční kinetiku. Kovalentní vazba mezi monomerem a templátem je avšak přítomná pouze v polymeračním kroku, po vymytí vzniká kavita ve tvaru templátu obsahující zbytkovou funkční skupinou schopné interakce. Následně se do této kavity může vázat templát, pro který byla kavita navržena, ale zde pouze přes slabé vazebné interakce (nejčastěji vodíkové vazby), proto se tento přístup občas označuje jako semi-kovalentní (**Schéma 2**).<sup>14</sup> Druhou, méně častou používanou možností zpětného vázání templátu je prostřednictvím kovalentní vazby (typicky polyoly se váží jako boronestery na zbytkovou boronovou funkční skupinu)<sup>15,16</sup>. U kovalentního přístupu také obecně platí, že více zesítěné MIPs připravené tímto přístupem vykazují vyšší účinnost.<sup>17</sup> Používané funkční monomery jsou zobrazeny v **tabulce 2**.



**Schéma 2** – Znárodnění kovalentního přístupu pro přípravu MIPs

**Tabulka 2** – Příklady funkčních monomerů pro kovalentní přístup přípravy MIPs



## 2. Teoretická část

### 2.1. Použití nekovalentní přístupu

Výzkumný tým K. Farringtona připravil MIPs pro selektivní zachytávání **Ibu** nekovalentním přístupem. Jako funkční monomery zvažili allylamin, 4-vinylpyridin a metakrylovou kyselinu. Jako porogen použili DMF pro jeho aprotické vlastnosti a síťovadlo EGDMA. Jako iniciátor polymerace použili AIBN a templát z polymerní matrice odstranili horkým roztokem kyseliny octové v methanolu (**Schéma 3**).

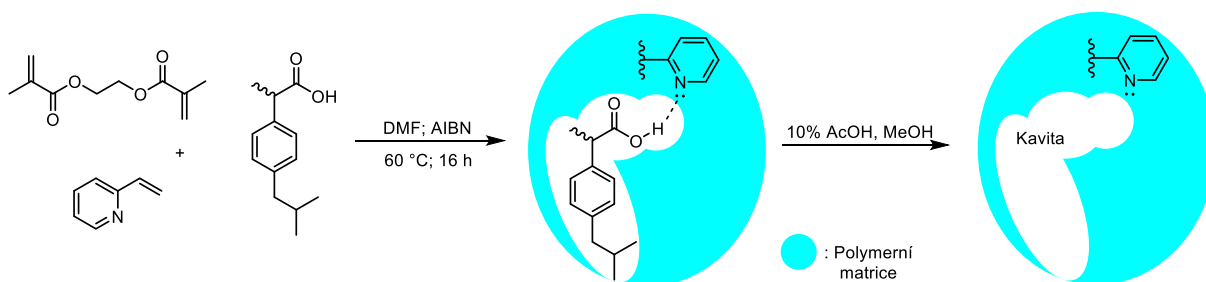
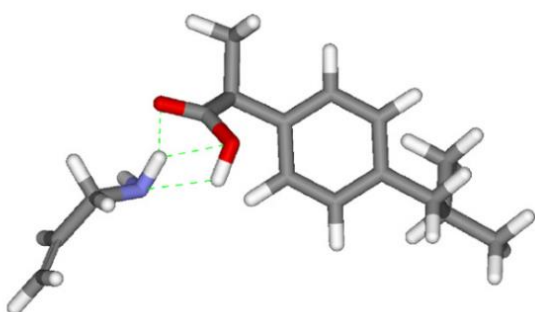
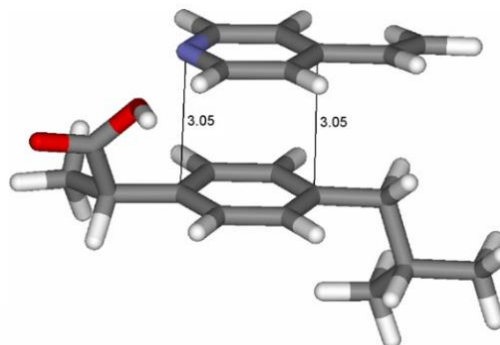


Schéma 3 – Příprava MIPs dle <sup>18</sup>

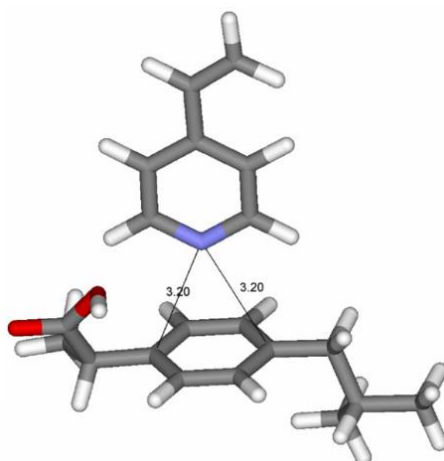
Dále autoři zdůvodňují velikost vazebné energie mezi **Ibu** a allylamidem (- 87.94 kJ/mol), kdy dochází k tvorbě tří vodíkových vazeb mezi karboxylovou skupinou **Ibu** a amino skupinou allylaminu (**Obrázek 1**). Dále konstatovali skutečnost, že interakce mezi 4-vinylpyridinem a **Ibu** neprobíhá pouze mezi dusíkem pyridinu a vodíkem karboxylové skupiny **Ibu**, jak se obecně uvádí. Tuto interakci označili za zanedbatelnou a jako hlavní interakci uvedli  $\pi$ -  $\pi$  stacking mezi aromatickým jádrem **Ibu** a pyridinu. Modelovací experiment navrhl dvě možné pozice aromatických systémů, první tzv. face to face (**Obrázek 2**) a druhá edge on (**Obrázek 3**) konformace.



Obrázek 1 – Interakce mezi **Ibu** a allylamidem



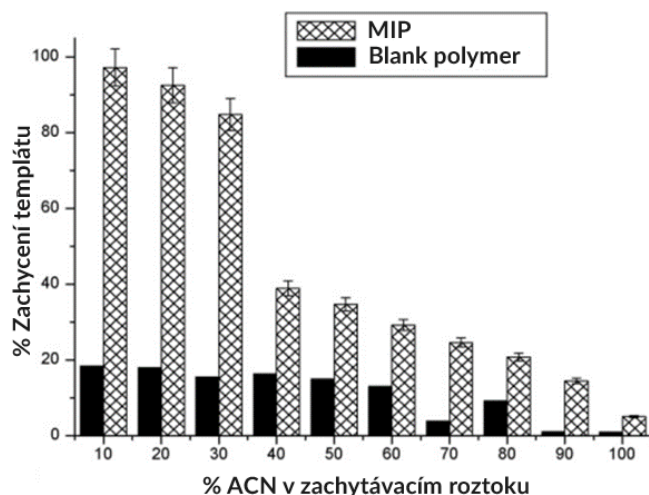
Obrázek 2 – Face to face interakce mezi **Ibu** a 4-vinylpyridinem



**Obrázek 3** – Edge on interakce mezi Ibu a 4-vinylpyridinem

Z velikostí vazebné energie mezi **Ibu** a allylaminem lze usuzovat vcelku stabilní komplex, tuto skutečnost potvrzuje i velice náročné vymývání **Ibu** z polymeru, které se nepovedlo ani při použití 10% roztoku kyseliny octové v methanolu nebo ACN, **Ibu** se uvolňoval vždy pouze v malém množství. Dále když jako porogen místo DMF použil ACN, došlo k vysrážení **Ibu** z reakční směsi. Díky těmto fyzikálně-chemickým faktorů se autoři rozhodli nepoužít allylamin jako možný funkční monomer. Vyřadili také metakrylovou kyselinu kvůli její malé vypočtené vazebné energii (-11,8 kJ/mol) a dále pracovali pouze s 4-vinylpyridinem (vazebná energie -54,62 kJ/mol).

Jako kvantitativní měřítko aktivity polymeru použili autoři procentuální zachycení **Ibu** pomocí MIPs. To prováděli přidáním roztoku **Ibu** o koncentraci 10, 20 a 50  $\mu\text{g/ml}$  do známého množství MIPs. Z důvodu špatné rozpustnosti **Ibu** ve vodě se autoři rozhodli použít ACN jako rozpouštědlo při zachytávajících experimentech, kde přišli k závěru, že ideální množství ACN je 10 %, kdy dojde k 98% zachycení, ovšem zvyšující se podíl ACN značně snižuje procentuální zachycení **Ibu** (**Obrázek 4**). Z toho usuzují, že zachytávání je zásadně ovlivňováno rozpouštědlem. Dále se autoři zabývali jak pH ovlivňuje zachytávání a přišli na skutečnost, že experiment nejlépe probíhá při  $\text{pH}=7$ , kdy materiál dosahoval, jak už bylo dříve zmíněno, 98% zachycení. Při  $\text{pH}=5$  dochází ke snížení zachycení o 20 p.b.<sup>18</sup>



**Obrázek 4** – Sloupcový graf ukazující závislost zachycení Ibu na koncentraci ACN

Tým L. M. Madikizela se rozhodl připravit MIPs s více jak jedním druhem templátu. Jejich volbou bylo použít tři často využívaná léčiva: naproxen, **Ibu** a diklofenak, které se hojně objevují v odpadních vodách a v dnešní době je veliký zájem o jejich selektivní odstranění.

Autoři připravovali MIPs dvoustupňovou polymerací (**Schéma 4**). V prvním kroku rozpustili 1,1'-Azobis(cyklohexankarbonitril) (ABCN) v toluenu, jako síťovadlo použili ethylen glykol-dimetakrylát a následně provedli částečnou polymeraci. Ve druhém kroku smíchali templáty naproxen, **Ibu** a diklofenak a přidali 2-vinylpyridin, ethylen glykol–dimetakrylát s ABCN. Směsi z obou kroků byly spojeny a byla provedena vlastní polymerace. Po dokončení byly templáty vymyty 10% roztokem kyseliny octové v acetonitrilu.

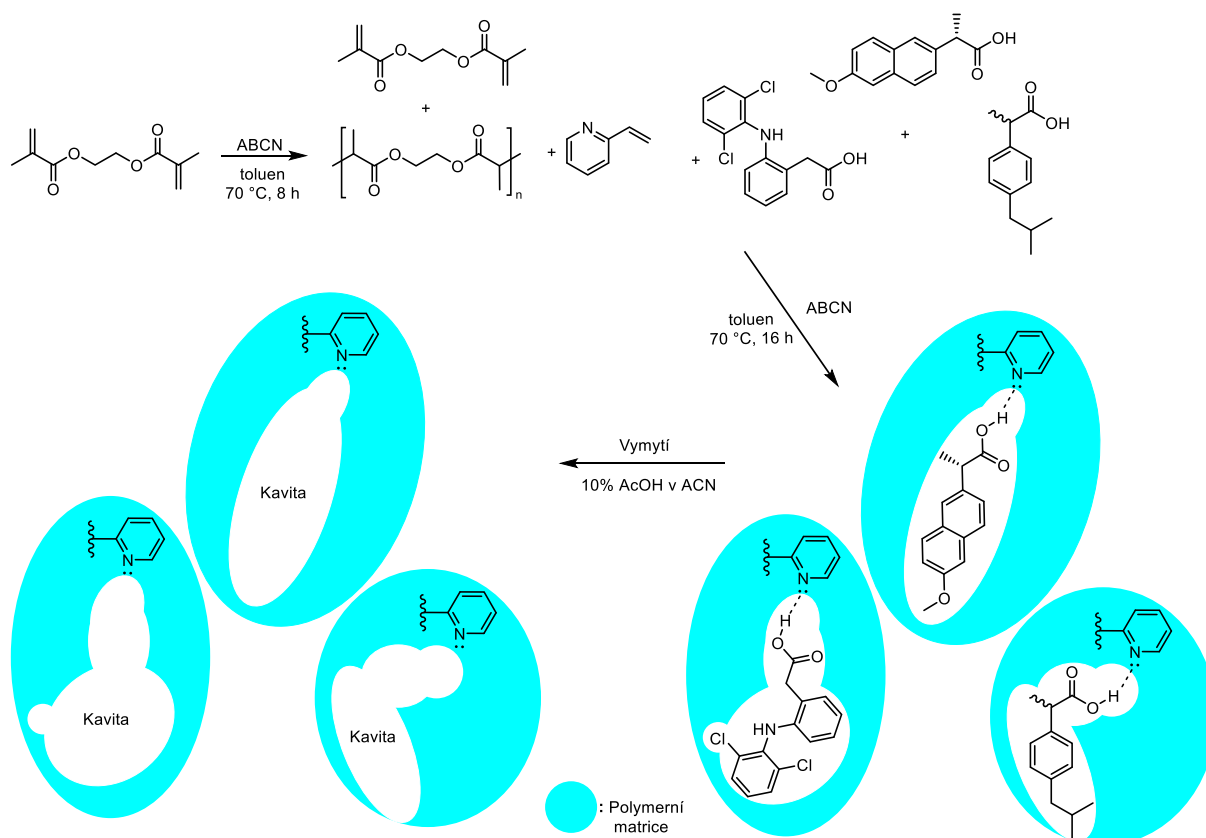
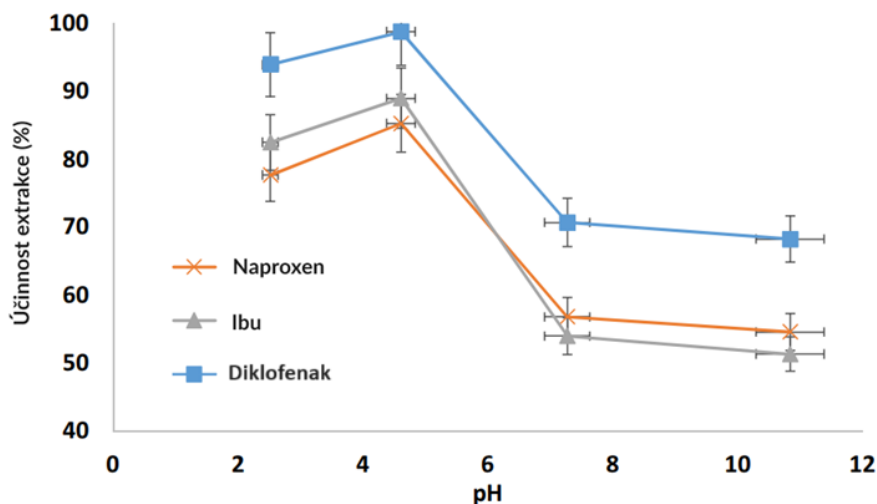


Schéma 4 – Příprava MIPs dle<sup>19</sup>

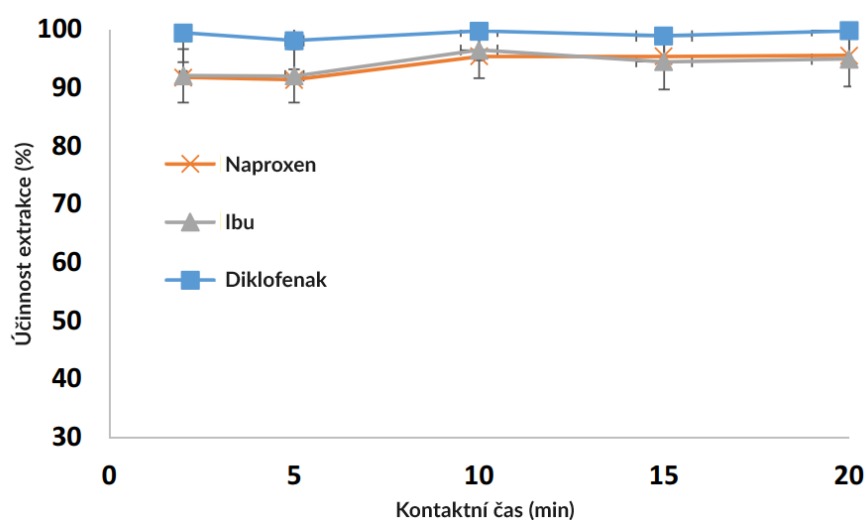
Zachytávací experiment autoři prováděli z odebrané odpadní vody z čističky odpadních vod kterou spikovali 50 µg/l každého templátu (naproxen, **Ibu** a diklofenak) a upravili pH na hodnotu 2,5. Do 10 ml této upravené odpadní vody přidali 50 mg MIPs a nechali směs 10 minut míchat. Naadsorbovaný MIPs byl promyt 10% methanolem, desorpce byla provedena pomocí 20% kyseliny octové v ACN a koncentrace léčiv byla zjištěna pomocí HPLC.

Autoři nejdříve prozkoumali vliv pH na zachytávání, jako optimální určili pH=4,6 kdy jsou přítomné karboxylové skupiny ve protonované formě a dokážou tvořit vodíkové vazby mezi molekulou templátu a funkční částí kavity (**Obrázek 5**). Dále autoři zkoumali čas, za jaký dojde k maximální absorpční kapacitě. Z **Obrázku 6** vyplývá, že téměř maximální absorpce byla dosažena už za 2 minuty. Z hlediska dosažení nejlepšího výsledku a konzistence autoři prováděli každý zachytávací experiment po dobu 10 minut.<sup>19</sup>





Obrázek 5 – Graf ukazující závislost účinnosti extrakce na pH

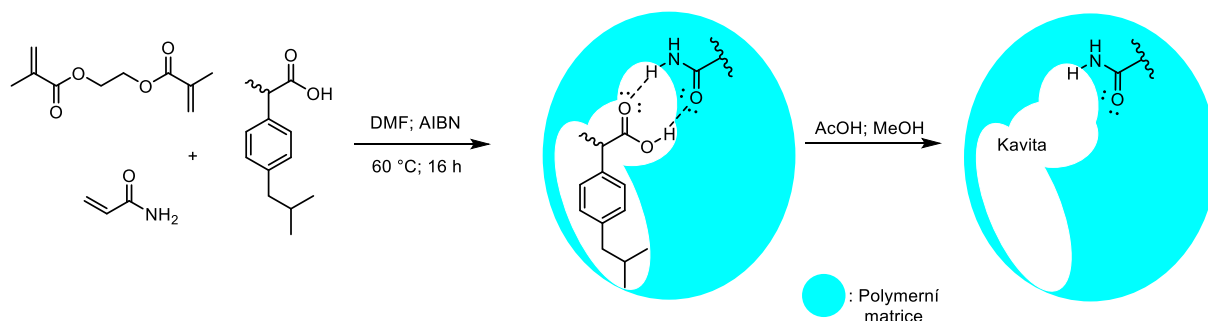


Obrázek 6 – Graf ukazující závislost účinnosti extrakce na kontaktním čase

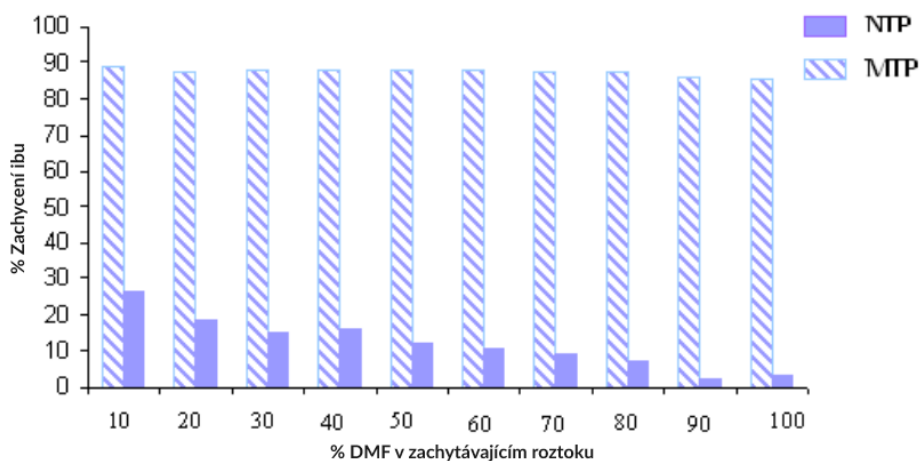
Výzkumný tým L. Monsera připravil MIPs pro selektivní zachytávání **Ibu** nekovalentním přístupem a jako funkční monomer zvolili akrylamid a následně tento MIPs použili na selektivní zachycení **Ibu** z lidské moči.

MIPs připravili následovně (**Schéma 5**): **Ibu** a akrylamid (funkční monomer) rozpustili v DMF, přidali ethylen glykol–dimetakrylát, termický iniciátor azobisisobutyronitril (AIBN) a provedli polymeraci. Templát byl vymyt pomocí kyseliny octové v methanolu. Blank NIP byl připraven stejným způsobem bez přítomnosti templátů. Pro zachytávací experiment byla zvolena dvě

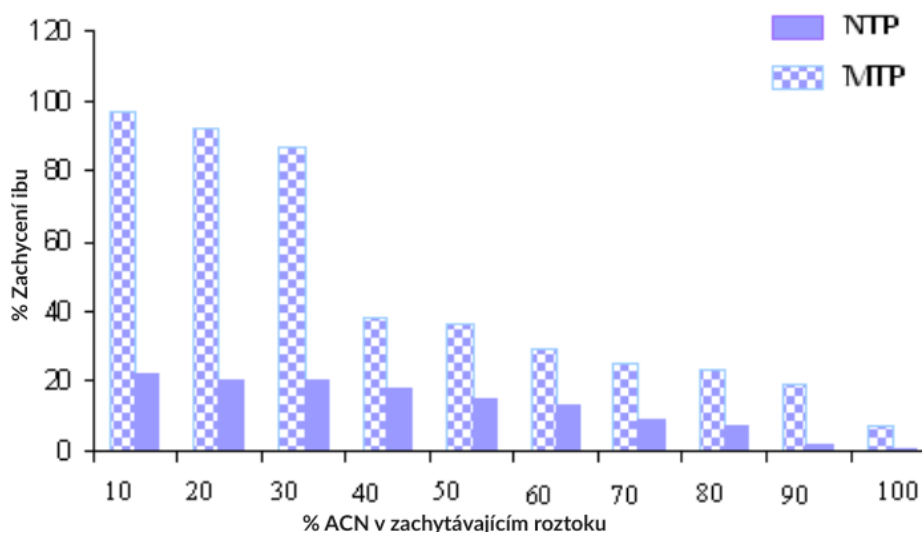
rozpuštědla: ACN ve vodě a DMF ve vodě. Jak již bylo dříve zmíněno, přítomnost organického rozpouštědla je kritická kvůli malé rozpustnosti **Ibu** ve vodě a koncentrace **Ibu** v těchto roztocích byla zvolena  $9,7 \cdot 10^{-5}$  mol/l. Porovnání zvolených rozpouštědel a jak jejich koncentrace ovlivňuje zachytávání jsou na **Obrázku 7 a 8**



**Schéma 5** – Příprava MIPs dle<sup>20</sup>



**Obrázek 7** – Graf ukazující závislost zachycení **Ibu** na % DMF



**Obrázek 8** – Graf ukazující závislost zachycení **Ibu** na % ACN

Autoři provedli selektivní experiment zachytávání **Ibu** z roztoku vedle ketoprofenu a naproxenu jakožto farmakologicky velice blízkých léčiv. Koncentrace všech látek byla 20 mg/l v 10% roztoku ACN ve vodě. Znovuzískání těchto dvou léčiv je značně nižší než u **Ibu**, pro který byl MIPs připraven. Pro ketoprofen je tato hodnota 11 % a pro naproxen 28 %, tato skutečnost se dá vysvětlit následovně: obě léčiva ketoprofen a naproxen obsahují dva aromatické systémy oproti **Ibu** a dále mají tyto molekuly jinou velikost a tvar (**Ibu** 149,8 Å; ketoprofen 178,4 Å; naproxen 151 Å). Tento rozdíl je nejvíc zřejmý u ketoprofenu, kdy se velikost oproti **Ibu** liší více jak u naproxenu. Autoři provedli zachytávající experiment i s neotištěným polymerem a u něj byla hodnota zpětného získání všech léčiv konzistentní okolo 6 %.

Nakonec autoři prostudovali možnost zachytávat **Ibu** z lidské moči. Vzorek moči bez přítomnosti **Ibu** byl upraven ACN (způsobuje koagulaci bílkovin) a následně byla uměle nastavená koncentrace **Ibu** na 20 µg/ml. Po provedení experimentu bylo z MIPs získáno zpět 85 % **Ibu** a u blank polymeru pouze 12 %. Toto potvrzuje možné použití MIPs v lékařském odvětví na stanovení **Ibu** v moči případně i v krvi.<sup>20</sup>

## 2.2. Použití nekovalentního přístupu společně s nanotechnologií

Výzkumný tým H. Fahriho se zabýval přípravou MIPs a jako nosič zvolili nanočástice Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> pro selektivní zachycení **Ibu**. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanočástice autoři připravili Koprecipitační metodou. FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O a FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O byl rozpuštěn v demineralizované vodě, následně byl po kapkách přidán NH<sub>4</sub>OH za intenzivního míchání a při pH=9 vznikla černá sraženina, ke které byla přidána kyselina olejová (stabilizuje povrch částic). Takto připravené Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanočástice byli promyty a vysušeny.

Přípravu magnetických MIPs autoři provedli následovně: Jako monomery použili **Ibu**, metakrylovou kyselinu a jako síťovadlo použili DVB. Tuto prepolymerační směs smíchali s výše připravenými magnetickými částicemi Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> a provedli termickou radikálovou polymeraci, iniciovanou dibenzoyl peroxidem. Templát byl odstraněn promytím ACN. neotištěný magnetický polymer (MNIP) byl připraven bez použití templátu. Celou reakční kaskádu popisuje **Schéma 6**.

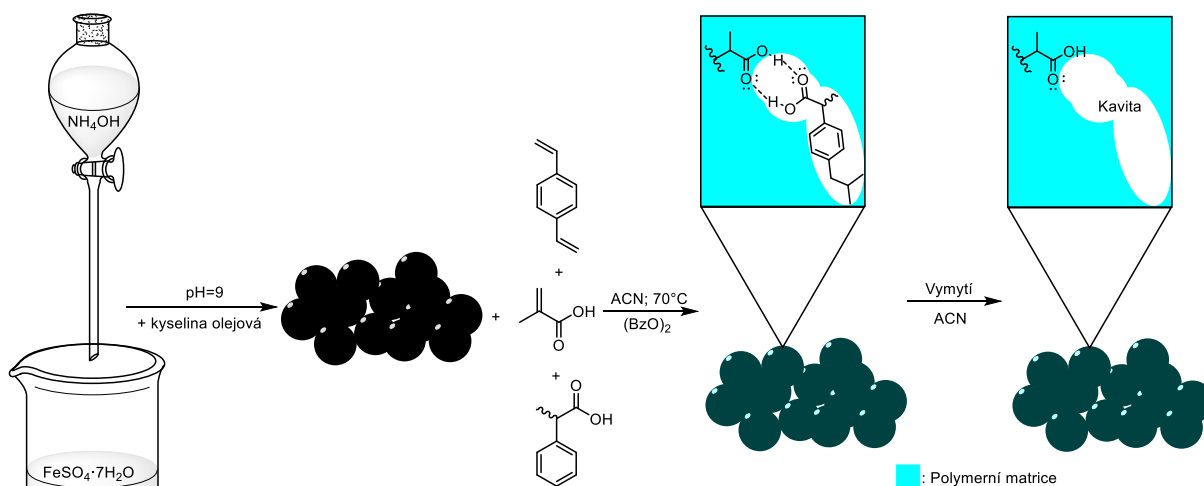
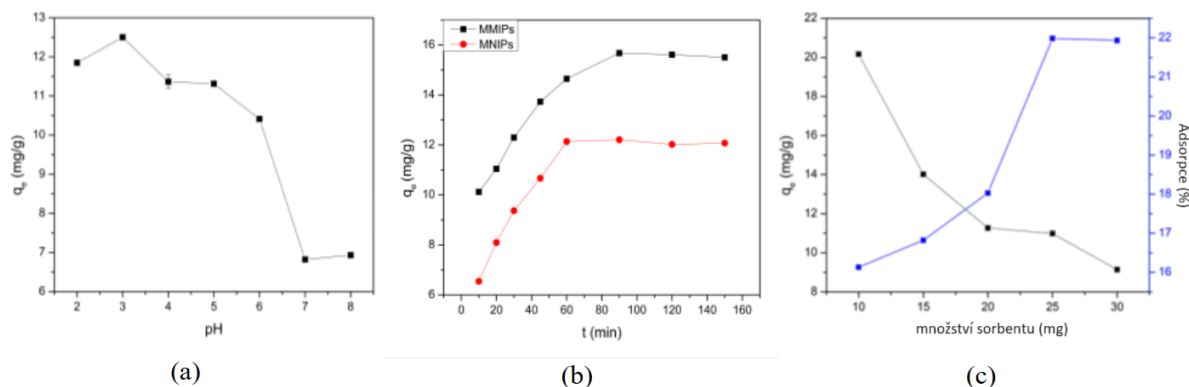


Schéma 6 – Příprava MIPs na bázi nanočástic dle<sup>21</sup>

Autoři s takto připraveným MMIP provedli vsádkové experimenty, kdy zkoumali závislost účinnosti zachytávání na pH, délce experimentu a množství polymeru. Jako rozpouštědlo při zachytávacích experimentech autoři použili 50% methanol ve vodě. Při zkoumání závislosti na adsorpční izotermě a termodynamických studiích bylo použito 25 mg MMIP a 25 ml roztoku **Ibu** o koncentraci 40 až 300 mg/ml a teplotu během experimentu udržovali při 25, 40 a 60 °C. Při studii adsorpční kinetiky autoři použili 25 ml roztoku **Ibu** s koncentrací 50 mg/l a 25 mg MMIP a délku experimentu zvolili na 10–150 min.

Při studiu závislosti pH na zachytávání autoři prozkoumali interval od pH=2–8 a výsledky jsou na **Obrázku 9(a)**. Optimální adsorpční kapacita je získána při pH=3, se zvyšujícím se pH kapacita strmě klesá kvůli deprotonaci samotného **Ibu** a OH skupina v kavitě polymeru nemůže výhodně interagovat. Dále autoři studovali závislost délky experimentu na adsorpční kapacitě. Naadsorbované množství **Ibu** na polymer se lineárně zvyšovalo až k dosažení rovnováhy za 90 min. U blank MNIP došlo k nastolení rovnováhy za 60 min. Všechny hodnoty jsou na **Obrázku 9(b)**. Množství MMIP je taky velice důležitá proměnná, autoři se rozhodli prozkoumat interval od 10 mg do 30 mg. Koncentraci roztoku **Ibu** zvolili na 50 mg/l, pH=3 a čas experimentu byl 90 min. Z **Obrázku 9(c)** je zřejmé, že se zvyšujícím se množstvím polymeru se zvyšuje adsorbční efektivita a snižuje adsorbční kapacita. Tento efekt se dá vysvětlit, že s větším množstvím MMIP se zvyšuje množství aktivních kavit a tímto i adsorbční efektivita, ale tyto kavity jsou vůči sobě navzájem kompetitivní, tudíž dochází ke snížení adsorbční kapacity. Z **Obrázku 9(c)** je zřejmé, že optimální množství MMIP pro zachytávací experiment je 25 mg.<sup>21</sup>



Obrázek 9 – Graf ukazující závislost záchytu na pH (a), kontaktním čase (b) a množství sorbentu (c)

### 2.3. Použití nekovalentního přístupu společně s hybridní chitosan hydrogelovou technologií

Výzkumný tým J. Kurczewské se rozhodl připravit hybridní chitosan/molekulárně otištěné polymerní hydrogelové částice s obsahem železa pro selektivní zachycení **Ibu**. Následně prostudovali jak proměnné jako pH, množství, koncentrace **Ibu**, čas a teplota ovlivňuje zachytávání templátu. Autoři připravili polymery suspenzní metodou následujícím způsobem (**Schéma 7**):

Jako monomery použili **Ibu**, MMA a síťovadlo EGDMA. Jako rozpouštědlo použili chloroform a vlastní polymeraci provedli pomocí AIBN jako termický katalyzátor. Templát byl vymyt pomocí roztoku vody, ethanolu a kyseliny octové a následně roztokem ethanolu a vody.

Autoři dále připravili mikročástice molekulárně otištěného polymeru ( $MIP^{mp}$ ) obdobnou metodou jako předchozí polymer (**Schéma 7**). Jako monomery použili **Ibu**, MMA a HEMA, jako síťovadlo použili opět EGDMA a jako rozpouštědlo používali ACN. Templát byl vymyt identicky jako v předchozí polymeraci. Blanky NIP a  $NIP^{mp}$  byly připraveny identicky, pouze bez použití templátu.

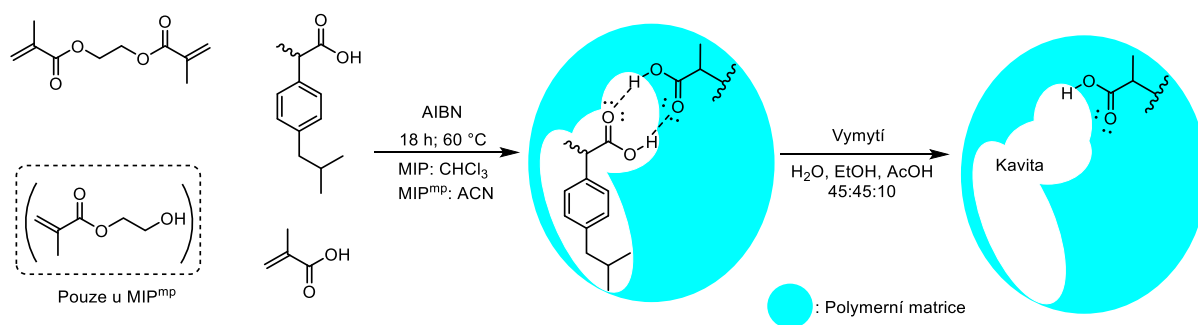


Schéma 7 – Příprava MIPs dle<sup>22</sup>

Chitosan hydrogelové částice autoři připravili následovně (**Schéma 8**): Chitosan společně s  $\text{FeCl}_3$  byl rozpuštěn v kyselině octové a následně byl do tohoto roztoku přidán polymer (MIP, MIP<sup>mp</sup>, NIP nebo NIP<sup>mp</sup>). Posléze byla tato disperze nakapána do roztoku NaOH a získané hydrogelové částice (CS\_Fe\_MIP, CS\_Fe\_NIP, CS\_Fe\_MIP<sup>mp</sup> a CS\_Fe\_NIP<sup>mp</sup>) byly promyty a vysušeny. Chitosanové hydrogelové částice bez polymerové matrice byly připraveny obdobně, pouze bez přidání polymeru.

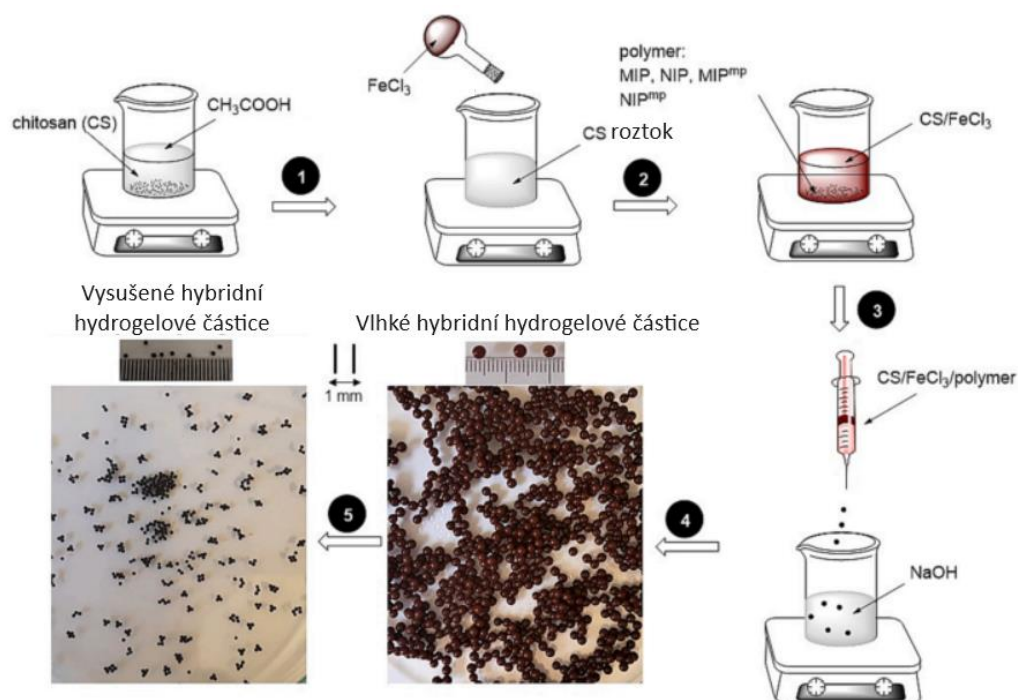
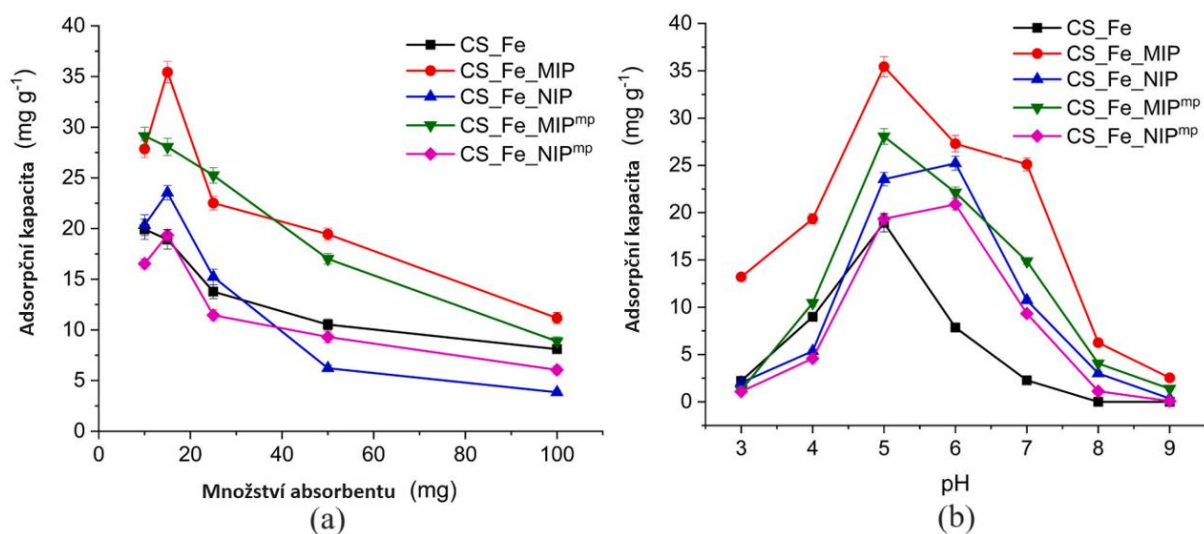


Schéma 8 – Příprava hybridních chitosan/MIPs hydrogelových částic dle<sup>22</sup>

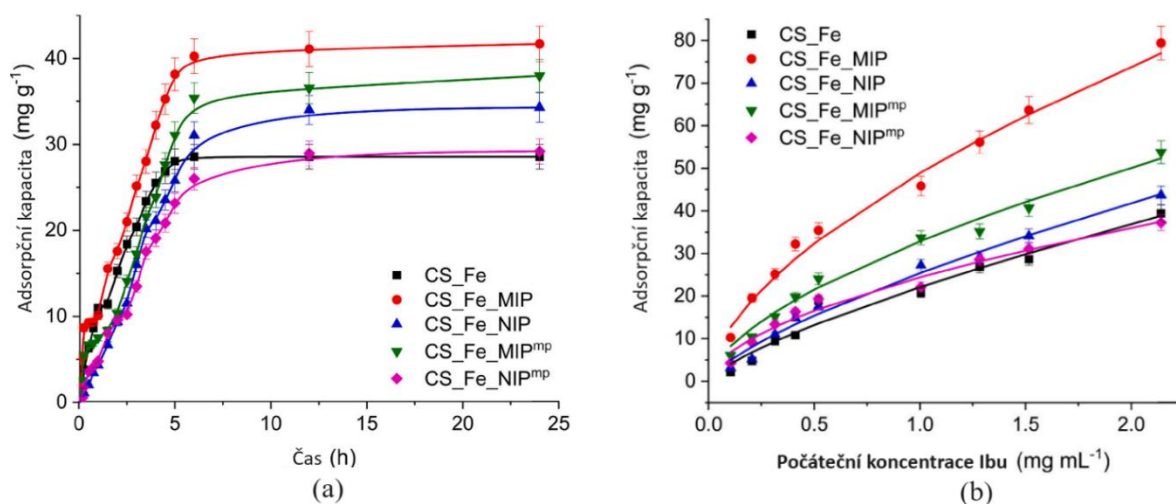
Dále se autoři zabývali jak množství absorbentu a pH ovlivňuje zachytávání **Ibu**. Pro množství zvolili interval od 10 mg po 100 mg. Z **Obrázku 10(a)** patrné, že zvětšující se množství absorbentu negativně ovlivňuje absorpční kapacitu. Toto autoři vysvětlují tím, že větší množství absorbentu ztěžuje **Ibu** překonat přenos hmoty z kapalně do pevné fáze. Studováním

pH autoři objasnili typy interakcí mezi templátem a aktivní částí absorbentu. Jak je z **Obrázku 10(b)** zřejmé, silně kyselé prostředí vykazuje relativně malou adsorpční kapacitu pro všechny připravené absorbenty. Adsorpční kapacita dosáhla maxima pro CS\_Fe a CS\_Fe\_MIP<sup>mp</sup> při pH=5 a pro CS\_Fe\_NIP<sup>mp</sup> při pH=6. Autoři tuto skutečnost vysvětlují tím, že při pH=5 se začíná **Ibu** vyskytovat ve větším množství jako odpovídající aniont ( $pK_{a_{Ibu}}=4,9$ ) a začíná docházet k adsorpci řízenou jen elektrostatickou interakcí (protonovaný chitosan je kationt a **Ibu** aniont). Ovšem se zvyšujícím se pH zaniká u chitosanu kladně nabitý náboj a elektrostatické interakce už nejsou možné.



**Obrázek 10** – Graf ukazující závislost adsorpční kapacity na množství sorbentu (a) a pH (b)

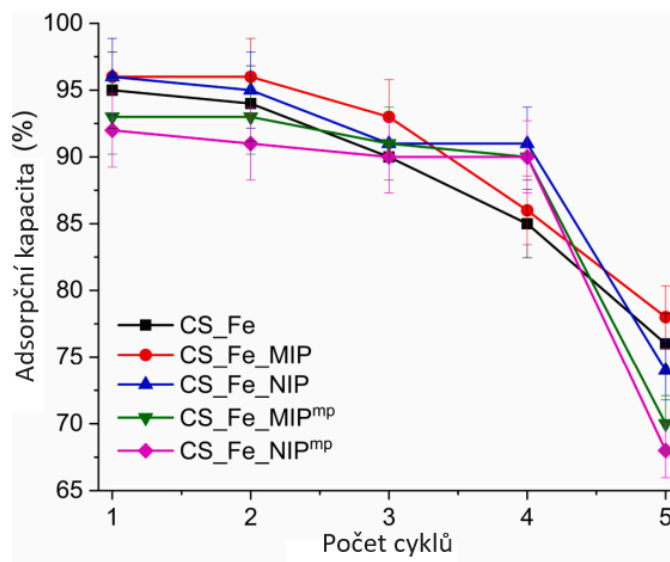
Počáteční koncentrace byla také vzata autory v úvahu a vyšlo najevo, že má zásadní vliv na adsorpční kapacitu všech připravených adsorbentů (**Obrázek 11b**). Autoři prostudovali škálu koncentrací od 0,1 mg/ml až po 2 mg/ml a zjistili, že zvyšující se koncentrace **Ibu** zvětšuje síly potřebné k překonání bariéry mezi kapalnou a pevnou fází potřebné k interakci mezi templátem a aktivní částí kavity. Dále se v tomto experimentu ukázal rozdíl mezi molekulárně otištěnými látkami (MIPs) a mikromolekulárně otištěnými látkami (MIP<sup>mp</sup>). Nejlepší připravený materiál pro tento experiment byl na bázi klasického MIP kvůli jeho velkému povrchu a velikosti pórů. Jako proměnná pro tyto experimenty je i samotný čas experimentu za který systém dosáhne rovnováhy. U absorbentu bez polymeru (CS\_Fe) došlo k dosažení rovnováhy za nejkratší čas (okolo 6 h), u ostatních připravených materiálů došlo k dosažení rovnováhy za 12 h. Všechny data jsou na **Obrázku 11**.



**Obrázek 11** – Graf ukazující závislost adsorpční kapacity na čase (a) a počáteční koncentraci (b)

Pro tyto připravené materiály je důležitá ekonomická stránka resp. znovupoužití těchto materiálů. Ta se dá provést desorpcí zachyceného templátu a následné znovupoužití. Jak je z **Obrázku 12** vidět, tyto materiály si udržovaly adsorpční kapacitu kolem 90 % do 4. cyklu. Bohužel, 5. cyklus ukazuje razantní pokles adsorpční kapacity, což autoři vysvětlují nedokonalým vymýváním templátu a obecně degradací aktivních center v polymerní matici.

22



**Obrázek 12** – Graf ukazující znovupoužití připravených molekulově otištěných hydrogelových částic



## 2.4. Použití nekovalentního přístupu společně s core@shell materiálem

Výzkumný tým Y. Yana se rozhodl připravit molekulárně otištěné nanokompozitní membrány modifikované Au@polyanilinem pro selektivní zachycení **Ibu**. Následně provedli zachytávající a selektivní experimenty společně s možným znovupoužitím.

Celou syntetickou kaskádu autoři začali přípravou samotného Au@polyanilinu pomocí reakce roztoků obsahujících anilin s HCl a HAuCl<sub>4</sub> s H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Schéma 9). Jako rozpouštědlo u obou těchto roztoků použili ethylen glykol. Po ukončení reakce byl produkt promyt a vysušen.

Takto připravený Au@polyanilin autoři rozpustili v bezvodém THF společně s TEA a následovala reakce s bromisobutyryl bromidem. Po ukončení této reakce byl produkt (Br-Au@polyanilin) promyt a opět vysušen.

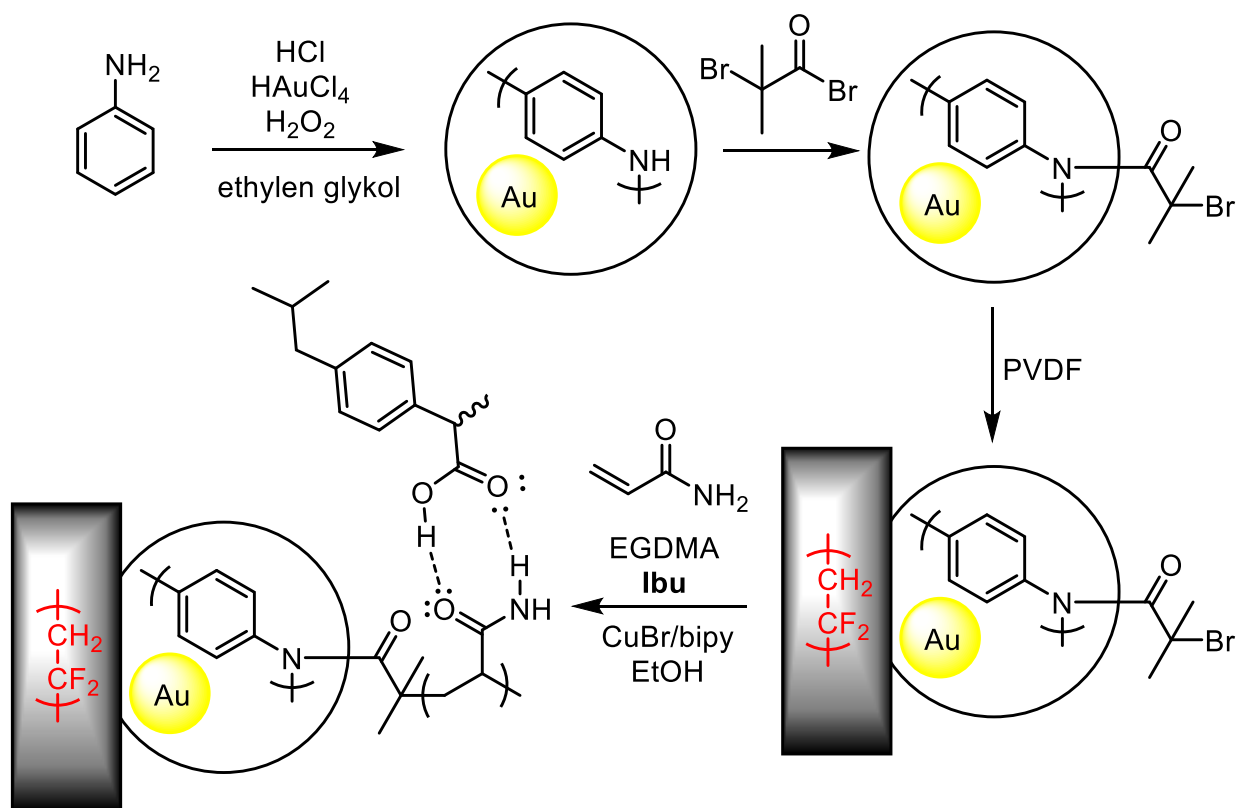


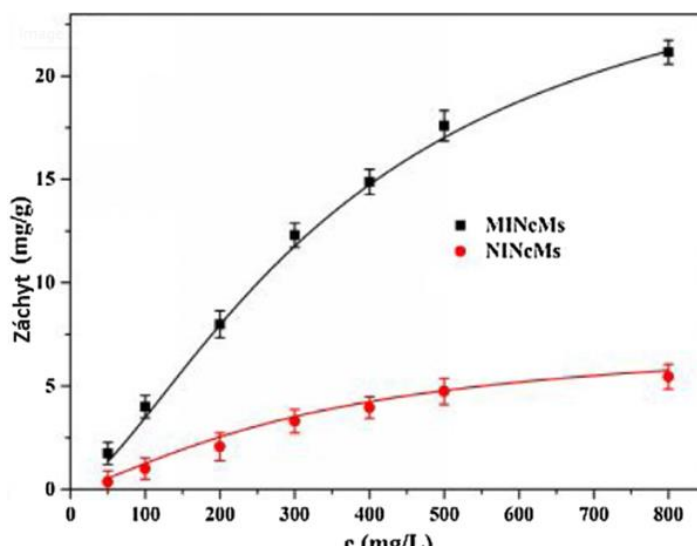
Schéma 9 – Příprava MIPs na bázi Au@polyanilinu dle<sup>23</sup>

Takto získaný core-shell polymer s imobilizovaným iniciátorem pro radikálovou polymeraci s přenosem atomu (ATRP) byl převeden na molekulově otištěnou nanokompozitní membránu (MINcMs) na bázi **Ibu** pomocí reakce výše připraveného Br-Au@polyanilinu s polyvinyliden fluoridem (PVDF; zde slouží jako porézní nosič připravených core-shell polymerů a tvoří strukturu samotné membrány). Takto byl získán, jak autoři referují, odlévající roztok. Samotná nanokompozitní membrána byla připravena nalitím tohoto odlévacího roztoku na skleněnou

desku a následným konstantním ponořováním do destilované vody, kde proběhl proces inverze fází a koagulace. Po ukončení výše popsaného procesu byla připravená nanokompozitní membrána (NP-NcMs) rozřezána skalpelem na malé kousky.

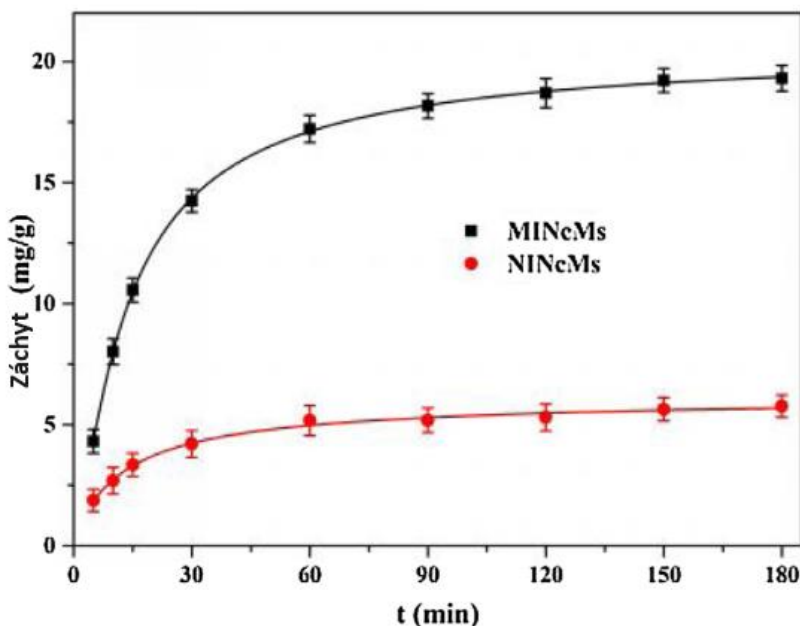
Poslední krokem přípravy MINcMs na bázi **Ibu** je reakce **Ibu**, akrylamidu a EDGMA v ethanolu a do takto připraveného roztoku byla přidána část dříve připravené membrány. Před vlastní polymerací byl do roztoku přidán CuBr s 2,2-bipyridinem a byla provedena vlastní radikálová polymerace. Templát byl vymyt pomocí roztoku kyseliny octové v methanolu (95:5). Celá syntetická kaskáda je na **Schématu 9**. Neotištěná kompozitní membrána (NINcMs) byla připravena obdobnou metodou pouze bez přidání templátu (**Ibu**).

Autoři provedli s výše připravenou membránou zachytávající experimenty kdy jeden kousek MINcMs membrány byl přidána do roztoku **Ibu** o koncentraci (50, 100, 200, 300, 400, 500 a 800 mg/l) v 0,4% NaOH a tato směs byla míchána po dobu 2 hodin za laboratorní teploty. Z **Obrázku 13** je patrné, že při zvyšující se koncentraci roztoku **Ibu** dochází k účinnějšímu zachytu **Ibu** na membráně. Dále autoři pozorovali, že neotištěná nanokompozitní membrána (NINcMs) má 4× nižší absorpční vlastnosti než membrána přímo designovaná přímo pro zachyt **Ibu**.



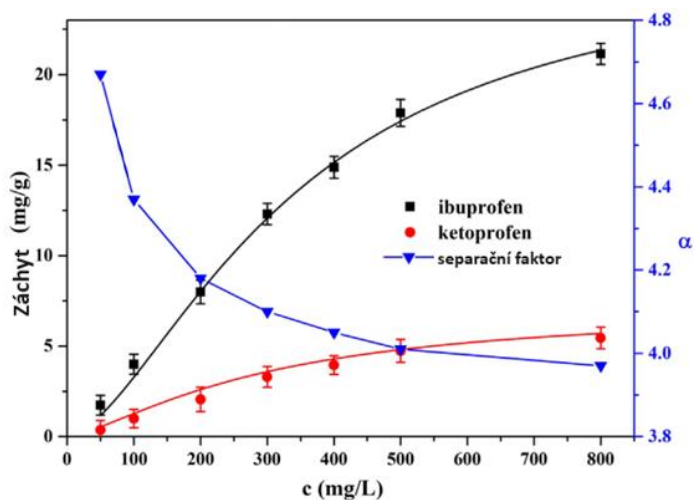
**Obrázek 13** – Graf ukazující závislost zachytu na počáteční koncentraci

Autoři také provedli měření závislosti zachycení na čase, pro tento experiment zvolili koncentraci **Ibu** 500 mg/l opět v 0,4% NaOH. Hodnoty jsou na **Obrázku 14** a z dat lze vyčíst, že u neotištěného materiálu dochází saturaci mnohem dříve, než u otištěného materiálu což naznačuje, že otištěný materiál obsahuje na i pod povrchem rovnoměrně rozmístěné velké množství aktivní kavit. Oproti tomu u neotištěného materiálu dochází k adsorpci **Ibu** na povrch bez interakce s jakoukoli kavitou a to pouze v malém množství, tímto je saturace dosažena téměř v poloviční čas.



**Obrázek 14** – Graf ukazující závislost záchytu na délce experimentu

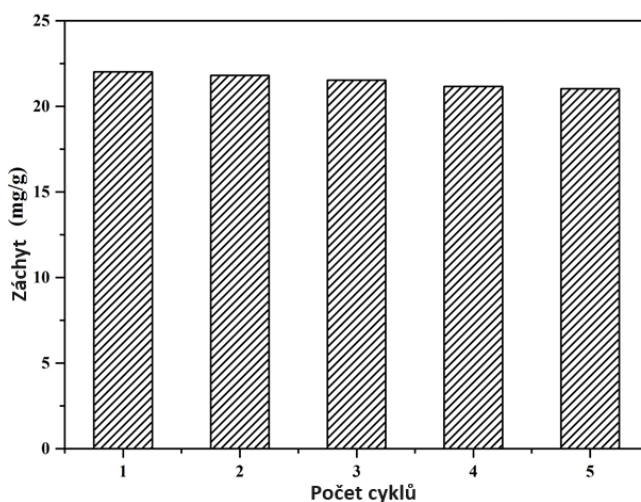
U takto připravených materiálů je důležitá také selektivita samotného zachytávání. To se autoři pokusili ověřit s dalším léčivem stejné farmakologické skupiny ketoprofenem. Jak je z **Obrázku 15** vidět, v širokém rozmezí koncentrací je MINcMs membrána výrazně selektivnější k **Ibu**.



**Obrázek 15** – Graf ukazující závislost selektivity Ibu vedle Ketoprofenu

Při porovnání hodnot zachycení **Ibu** na neotištěný materiál a adsorpce ketoprofenu na otištěný materiál (navržený pro **Ibu**) z **Obrázků 14 a 15** lze pozorovat podobné hodnoty, což naznačuje podobný proces adsorpce **Ibu** resp. ketoprofenu na povrch materiálů.

Důležitý parametr pro průmyslové použití takto připravených membrán je i možnost jejich regenerace a znovupoužití. Jak je vidět z **Obrázku 16** po 5. recyklačním cyklu dochází jen k malému snížení kapacity materiálu, toto snížení kapacity autoři vysvětlují částečnou degradací kavit z důvodu opětovného vymývání roztokem kyseliny octové v methanolu (95:5).<sup>23</sup>



**Obrázek 16** – Sloupcový graf ukazující záchyt **Ibu** po každém regeneračním cyklu

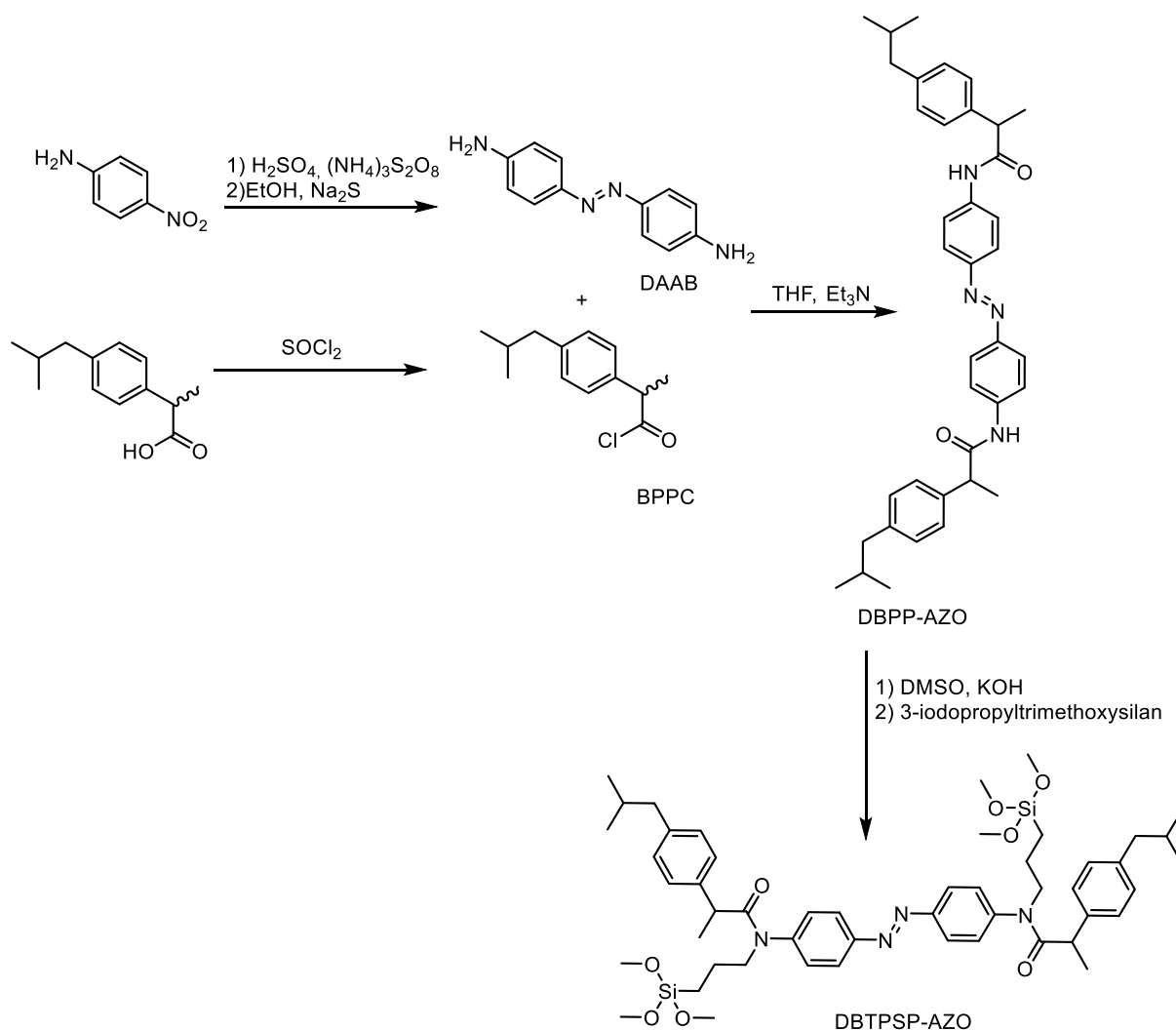
## 2.5. Použití kovalentního přístupu

Výzkumný tým L. Zhouna se zabýval přípravou MIPs semi-kovalentním přístupem na bázi organicko-anorganických sol-gelů pro selektivní zachycení **Ibu**. Následně prostudovali jak teplota a čas ovlivňuje zachytávání **Ibu** a následně se pokusili selektivně zachytit **Ibu** vedle ketoprofenu, naproxenu a aspirinu. Molekulárně otištěný polymer na bázi sol-gelu autoři připravili několika stupňovou syntézou (**Schéma 10**):

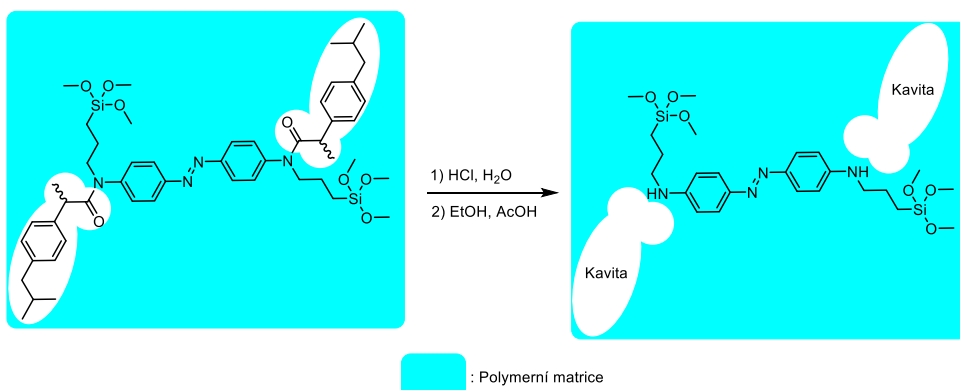
První reakční stupeň je syntéza 4,4'-dinitroazobenzenu, kde 4-nitroanilin reagoval s  $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$  v prostředí kyseliny sírové. Následuje redukce tohoto dinitro derivátu na 4,4'-diaminazobenzenu (DAAP) pomocí  $\text{Na}_2\text{S}$  v ethanolu. Dalším krokem je příprava 4-isobutylfenyl-2-propionyl chloridu (BPPC) reakcí **Ibu** s thionylchloridem. Tento intermediát je poté použit k vytvoření 4,4'-di[2-(4-isobutylfenyl)-propanamid]azobenzenu (DBPP-AZO)

reakcí s 4,4'-diaminazobenzenem v tetrahydrofuranu a triethylaminu. Následuje modifikace DBPP-AZO reakcí s 3-iodopropyltrimethoxysilanem v dimethylsulfoxidu a hydroxidu draselném pro zavedení triisopropoxysilyletherových skupin, čímž vzniká 4,4'-di[2-(4-isobutylfenyl)-N-(Triisopropoxysilyl)propanamid]azobenzen (DBTPSP-AZO).

Pro přípravu samotného sol-gel materiálu se využívá tetraethyl orthosilikátu, který reagoval s kyselinou chlorovodíkovou v ethanolu. Konečný MIP materiál je připraven reakcí předchozího DBTPSP-AZO produktu s tímto sol-gel prekurzorem v dichlormethanu. Templát se ze připraveného polymeru vymývá hydroxidem draselným v ethanolu. Sorpce a desorpce je znázorněná na **Schématu 11**. Paralelně byl připraven neotištěný sol-gel polymer (NIP) identickým postupem, avšak bez přídavku **Ibu**.

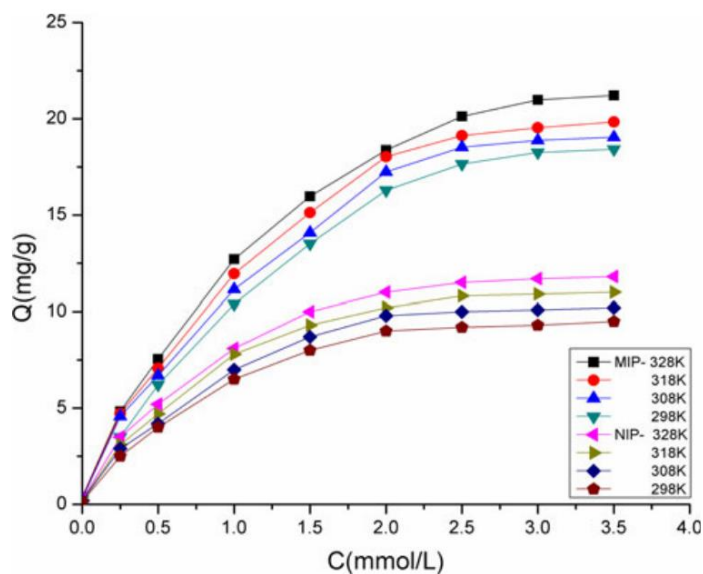


**Schéma 10** – Příprava MIPs na bázi sol-gelů dle<sup>24</sup>



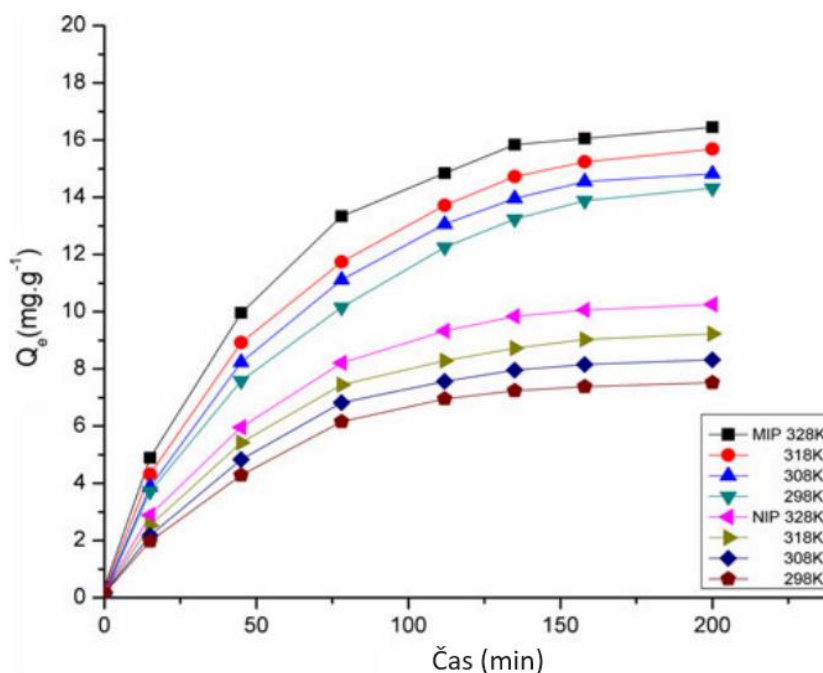
**Schéma 11** – Znázornění sorpce a desorpce na připravený MIP

Autoři s takto připraveným MIP na bázi sol-gel materiálů provedli adsorpční experimenty, kde studovali adsorpční kapacitu pro **Ibu** při zvyšující se koncentraci, teplotě a času. Z **Obrázku 17** je zřejmé, optimální teplota pro zachytávání je 56 °C a se snižující se teplotou se efektivita adsorpce snižuje. Stejný trend lze pozorovat i u závislosti zachycení na koncentraci, při vyšší koncentraci roztoku **Ibu** dochází k většímu zachytu. Autoři provedli identický experiment s NIP a výsledky jsou opět na **Obrázku 17**, ze kterého lze vidět, že neotištěný materiál má pouze poloviční kapacitu oproti otištěnému. Tato skutečnost je způsobená absencí kavit velikostí a tvaru **Ibu**, tudíž dochází pouze k povrchové adsorpci **Ibu**.



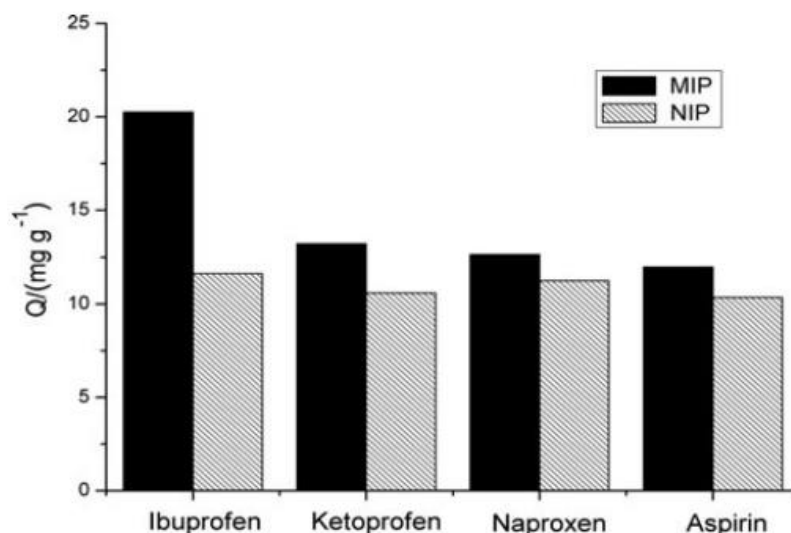
**Obrázek 17** – Graf ukazující závislost zachytu na počáteční koncentraci zachytávajícího roztoku při 56, 45, 35 a 25°C

Dále autoři studovali závislost zachycení na kontaktním čase opět při různých teplotách. Z **Obrázku 18** je vidět, že adsorpce strmě stoupala přibližně 80 minut a následně už docházelo pouze k pomalému růstu. Po 3 hodinách systém dosáhl rovnováhy, jinými slovy z těchto dat vyplývá, že při začátku experimentu jsou všechny kavity dostupné k adsorpci **Ibu** a postupně dochází k obsazení. Po určitém čase dojde k obsazení nejdostupnějších kavit a **Ibu** musí proniknout pod povrch materiálu což vlastní adsorpci znesnadňuje. Opět je také zřejmé, že neotištěný materiál (NIP) má poloviční kapacitu oproti otištěnému.



**Obrázek 18** – Graf zobrazující závislost zachytu na kontaktním čase

Autoři také ověřili selektivitu připraveného materiálu, kdy prováděli zachytávání **Ibu** vedle ketoprofenu, naproxenu a aspirinu. Autoři zvolili tyto léčiva kvůli jejich molekulárních podobnosti a/nebo kvůli jejich podobným farmakologickým účinkům. Z **Obrázku 19** lze vyčíst, že **Ibu** má nejúčinnější adsorpci, u zbytku léčiv je adsorpce velice blízká, což naznačuje podobný mechanismus adsorpce na povrch materiálu který je nezávislý na tvaru molekuly. Pro NIP je adsorpce stejná pro všechny použité léčiva, což naznačuje neselektivitu adsorpce.<sup>24</sup>

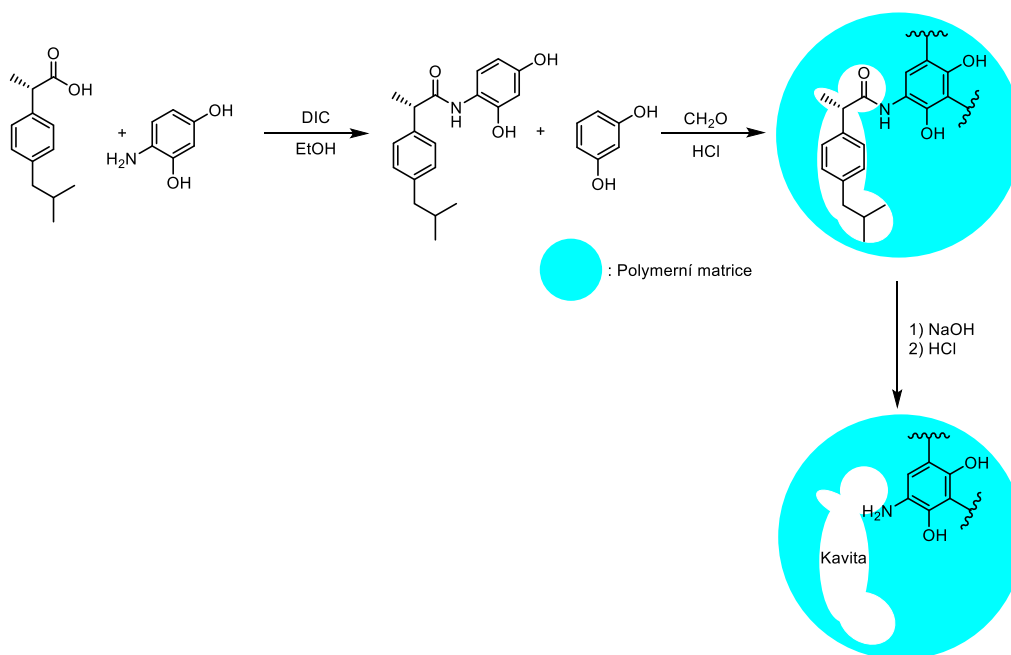


**Obrázek 19** – Sloupcový graf zobrazující selektivitu připraveného materiálu k **Ibu**

Výzkumný tým H. S. Alsalema připravil molekulově otištěnou resorcinol-formaldehydovou pryskyřici pro enantioselektivní separaci racemické směsi ( $\pm$ )-**Ibu**. Následně prostudovali jak pH a počáteční koncentrace ovlivňuje selektivní zachycení a separaci enantiomerů **Ibu** z jejich racemického roztoku.

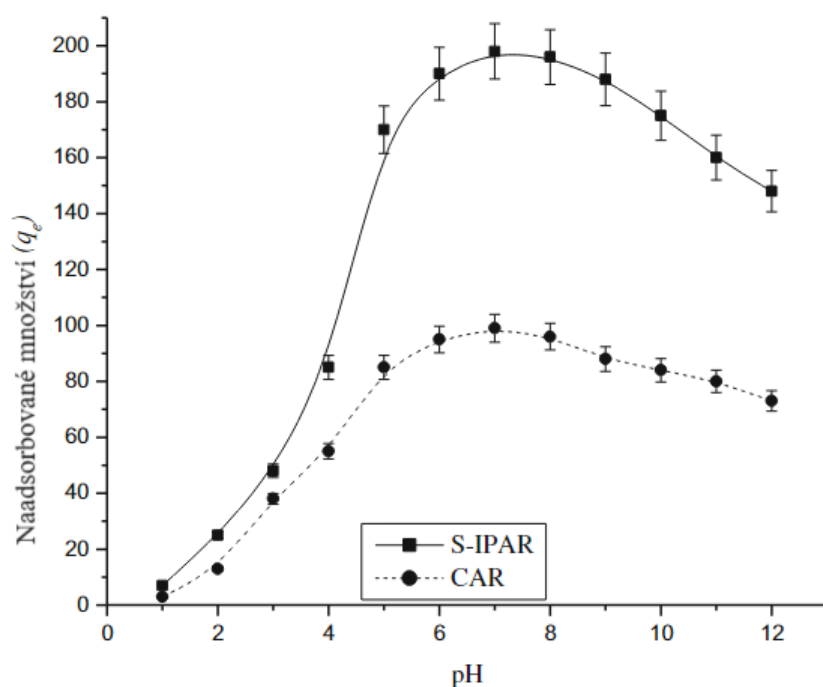
Recinol-formaldehydovou pryskyřici připravili autoři pomocí reakce čistého (*S*)-**Ibu** s 4-aminoresorcinolem (S-IBU-ARS). Následně byla provedena příprava vlastní recinol-formaldehydové pryskyřice reakcí monomeru nesoucí templát (S-IBU-ARS) s resorcinolem v DMF a následným přidáním HCl. Poté byla pryskyřice vytvrzena a templát byl vymyt pomocí roztoku NaOH a HCl. Neotřištěná pryskyřice byla připravena obdobně, pouze místo S-IBU-ARS autoři použili pouze 4-aminoresorcinol. Celá reakční sekvence je na **Schématu 12**.





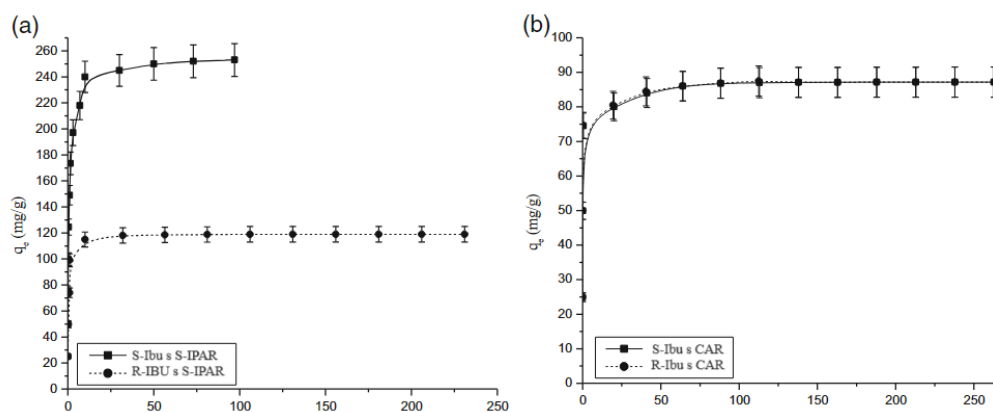
**Schéma 12** – Příprava MIPs na bázi recinol-formaldehydové pryskyřice dle<sup>23</sup>

Pro všechny zachytávající experimenty autoři pracovali s 50% EtOH jako rozpouštědlem. Při zkoumání závislosti zachytávání na pH autoři pracovali s 50 ml roztoku **(S)-Ibu** o koncentraci  $9,7 \cdot 10^{-4}$  mol/l a s 50 mg otištěné resinol-formaldehydové pryskyřice resp. neotištěné resorcinol-formaldehydové pryskyřice, experiment prováděli 4 h při 30 °C. Maximální kapacitu zachytávání autoři pozorovali v rozmezí pH 5–7 a kapacita se postupně snižovala při přechodu do alkalické nebo bazické oblasti viz. **Obrázek 20**. Autoři to vysvětlují tím, že při nižších hodnotách pH dochází k protonaci aminových skupin v aktivní kavitě a také možné protonace karbonylové a hydroxylové skupiny **Ibu**, což upravuje vlastnosti kavity resp. templátu a snižuje účinnost adsorpce. Naopak při přechodu do bazické oblasti je v roztoku přítomen **(S)-Ibu** převážně ve formě aniontu což také snižuje adsorpční kapacitu, snížení není ovšem tak drastické jako v kyselé oblasti, protože může docházet k aniont-kationt interkaci mezi **(S)-Ibu** a aminovou skupinou kavity.



Obrázek 20 – Graf zobrazující závislost zachycení na pH

Při experimentech studující rozdílnou počáteční koncentraci autoři použili 50 mg otištěného materiálu a pracovali s 50 ml roztoku obou enantiomerů **Ibu**, koncentraci zvolili v rozmezí od  $1,2 \times 10^{-4}$  do  $1,9 \times 10^{-3}$  mol/l a pH upravili na hodnotu 7. Experiment opět prováděli 4 h při 30 °C. Data pro otištěný i neotištěný polymer jsou na **Obrázku 21**. Z dat je zřejmé, že (**S**)-**Ibu** pro který byl materiál navržen vykazuje nejvyšší účinnost adsorpce, naopak pro (**R**)-**Ibu** je adsorpce méně než poloviční. Naopak u neotištěného materiálu mají oba enantiomery totožnou adsorpční kapacitu což naznačuje odlišný mechanismu interakce polymer/templát než je adsorpce do předem vytvořených kavit.



Obrázek 21 – Graf ukazující závislost zachytu na počáteční koncentraci zachytávajícího roztoku pro S,R-Ibu se otištěným sorbentem S-IPAR (a) a neotištěným CAR (b)

Nakonec autoři použili připravený materiál pro chirální separaci enantiomerů **Ibu**. Na průtokový experiment použili kolonu nasypanou z 5 g otištěné pryskyřice a tu promývali 50 ml téměř racemického roztoku **Ibu** o koncentraci 0,24 mol/l, výslednou optickou čistotu měřili polarimetricky. Zachytávající roztok (**S**)-**Ibu** měl 58% ee a po průchodu kolonou se optická čistota zvedla na 78 % ee. Při použití neotištěné pryskyřice nedocházelo k preferenci sorpce jednotlivých enantiomerů a optická čistota se neměnila.<sup>25</sup>

### 3. Experimentální část

#### 3.1. Obecná část

Spektra v infračervené oblasti byla měřena na přístroji FT-IR Nicolet iS50, technikou zeslabené úplné reflektance (ATR) na jednodrazovém diamantovém krystalu, ve střední infračervené oblasti, v rozsahu vlnočtů  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$  se spektrálním rozlišením  $4 \text{ cm}^{-1}$ . Oblast absorpce diamantového krystalu ( $1900 - 2400 \text{ cm}^{-1}$ ) byla, v případě absence charakteristických pásů v této oblasti, ze spekter odstraněna.

NMR spektra byla měřena při  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  na přístroji *Bruker Ascend<sup>TM</sup>*, vybaveným 5 mm širokopásmovou gradientní kryosondou (*CryoProbe<sup>TM</sup> Prodigy*) s inverzní detekcí, při frekvencích 500,13 MHz ( $^1\text{H}$ ), 125,79 MHz ( $^{13}\text{C}$ ), a *Bruker AVANCE III* při frekvencích 400,13 MHz ( $^1\text{H}$ ) a 100,62 MHz ( $^{13}\text{C}$ ). Veškeré pulzní programy byly převzaty z knihovny programů dodávaných firmou *Bruker*.

$^1\text{H}$  NMR spektra byla kalibrována v deuteriochloroformu ( $\text{CDCl}_3$ ) na interní tetramethylsilan (TMS) ( $\delta = 0,00 \text{ ppm}$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR spektra byla kalibrována na středový signál  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta = 77,0 \text{ ppm}$ ). Uhlíková NMR spektra byla měřena s širokopásmovým dekaplinkem protonů standardním způsobem nebo s pomocí pulzní sekvence APT.

UV-VIS spektra byla měřena na přístroji HP 8453 s použitím křemenné kyvety se sníženým objemem (0,7 ml) a optickou dráhou 1 cm. Spektra byla zpracována v programu Spectragryph.

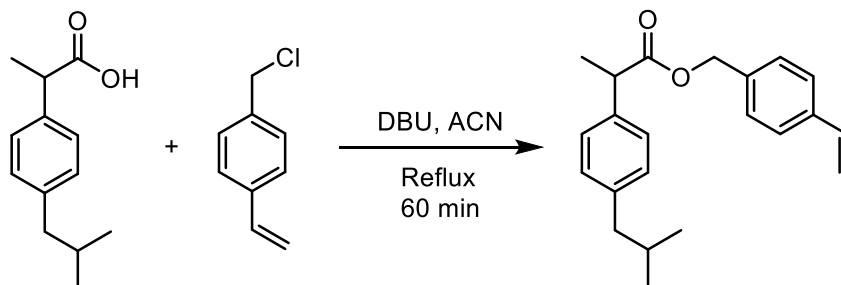
Pro průtočné experimenty byla navržena a sestavena home-made náplňová polyethylenová náplňová kolona. Jako plášť kolony byl použit ochranný obal na jehlu pro kolenní punkci. Trubice byla na obou koncích ukončena fitinkami pro HPLC nerezové kolony získané od fy Merck. Jako ucpávka byla použita teflonová kapilára a jako fritra smotek buničité vaty. Pro sledování koncentrace eluátu byl použit ECOM LCD2084 detektor nebo a pro experimenty sledující selektivitu byl použit SYKAM S3210 diode array UV-Vis detektor. Pro dávkování směsi do kolony byla použita vysokotlaká lineární dávkovací pumpa NE-8000.

Hmotová spektra byla měřena na GC/EIMS konfiguraci sestávající z plynového chromatografu Agilent Technologies 6890N (HP-5MS délka kolony 30 m, I.D. 0.25 mm, film 0.25  $\mu\text{m}$ ) opatřeného hmotovým detektorem Network MS detector 5973 (EI 70 eV, rozsah 33-550 Da).

Chemikálie byly pořízeny od společností Sigma-Aldrich, Acros Organics, TCI, Alfa Aesar, Fluorochem nebo Penta a používány bez dalšího čištění. Flash chromatografie byla prováděna na přístroji Reveleris<sup>®</sup> X2 na kolonách naplněných silikagelem. Tenkovrstvá chromatografie

byla prováděna na aluminiových destičkách potažených silikagemem SiO<sub>2</sub> s vizualizací pomocí UV lampy (254 nebo 366 nm).

### 3.2. 4-vinylbenzyl-2-(4-isobutylfenyl)propanoát



Do 100 ml baňky byl předložen **Ibu** (2 g; 9,7 mmol), který byl rozpuštěn v 25 ml ACN (HPLC čistota) a následně byl do této reakční směsi předložen DBU (2,2 ml; 2,24 g; 14, mmol) a VBC (1,2 ml; 1,3 g; 8,5 mmol). Reakční směs byla zahřívána k varu. Po 1 h byla provedena GC-MS analýza kde byl identifikovaný majoritní pík produktu. Reakční směs byla následně odpařena na vakuové rotační odparce a surová směs byla podrobena flash chromatografii (hexan→EtOAc). Produkt byl získán ve formě bezbarvého oleje (2,02 g; 6,26 mmol; 73 %)

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, Chloroform-d) δ 7.36 – 7.31 (m, 2H), 7.21 – 7.15 (m, 4H), 7.12 – 7.06 (m, 2H), 6.69 (dd, J = 17.6, 10.8 Hz, 1H), 5.73 (d, J = 17.5 Hz, 1H), 5.24 (d, J = 10.8 Hz, 1H), 5.12 – 5.03 (m, 2H), 3.74 (q, J = 7.2 Hz, 1H), 2.45 (d, J = 7.2 Hz, 2H), 1.89 – 1.79 (m, 1H), 1.50 (d, J = 7.1 Hz, 3H), 0.90 (d, J = 6.6 Hz, 7H).

<sup>13</sup>C NMR (126 MHz, Chloroform-d) δ 174.55, 140.63, 137.69, 137.41, 136.45, 135.69, 129.41, 128.11, 127.32, 126.33, 114.22, 66.10, 45.22, 45.11, 30.29, 22.47, 18.49.

### 3.3. Příprava separační fáze pro kopolymeraci

Do kádinky se 400 ml demineralizované vody byl předložen NaCl (15 g) a PVA (1,34 g). Směs byla přivedena za stálého míchání k varu a následně byla přefiltrována do tříhrdlé hruškové baňky kde byla směs degasována Ar po dobu 20 minut.

### 3.4. Příprava polymeru (P35 a P50)

Do tříhrdlé hruškové baňky se separační fází byl injekční stříkačkou přes injekční jehlu nadávkován roztok 4-vinylbenzyl 2-(4-isobutylfenyl)propanoátu (1,5 g; 4,6 mmol), DVB (0,75 g; 50% nebo 80% roztok v ethylstyrenech), PEG-VBE (114,75 mg; M<sub>w</sub> = 5000 g/mol) a BAPOs (66 mg) v Bn<sub>2</sub>O (2,4 ml). Otáčky na magnetické míchačce byly nastaveny na 450 rpm

a polymerace byla prováděna pod inertní atmosférou Ar. Směs byla osvětlována bílým světlem o barevné teplotě 6000 K, světelném toku 756 lm a výkonu 17 W ze vzdálenosti polymerační baňky od světelného zdroje 2 cm po dobu 24 h. Po ukončení polymerace byla směs převedena do kádinky s demineralizovanou vodou (400 ml) a surový polymer byl dekantován a následně promyt DEMI vodou (3 × 300 ml), MeOH (3 × 100 ml) a THF (3 × 100 ml). Surový polymer se dále nezpracovával a byl hned nasazen do dalšího reakčního kroku.

**T35:** FT-IR (ATR;  $\text{cm}^{-1}$ ): 3019, 2924, 2868, 1723, 1605, 1512, 1450, 1378, 1199, 1154, 846, 796, 708

**T50:** FT-IR (ATR;  $\text{cm}^{-1}$ ): 3020, 2922, 2667, 1732, 1603, 1511, 1449, 1378, 1329, 1199, 1153, 1070, 796, 708

### 3.5. Hydrolýza polymerů

Surový polymer (**P35** nebo **P50**) byl předložen do Erlenmeyerovy baňky společně s THF (75 ml) a MeOH (75 ml) a následně byl přidán po malých částech sodík (2-4 g), vzniklá směs byla ponechána míchat po dobu 16 h. Polymer prostý templátu byl následně promýván pomocí Soxletova extraktoru směsí THF/H<sub>2</sub>O (4:1) po dobu 24 h. Poslední promytí bylo provedeno DCM (3 × 100 ml) a získaný produkt byl namlet v třecí misce na jemný prášek. Takto bylo připraveno 1 g otištěného polymeru se zesítním 35 % (**P35**) a 1,05 g otištěného polymeru se zesítním 50 % (**P50**), což představuje 84% výtěžek **P35** a 74% výtěžek **P50**. Praktický výtěžek pro otištěné polymery byl počítán podle **Obrázek 22**.

**Obrázek 22 – Rovnice pro výpočet praktického výtěžku otištěných polymerů**

$$\% \text{ Výtěžek}_{MIPs} \cong \frac{PV}{\sum m_{monomer} - \left( \frac{M_{FM}}{M_{FMT}} \times m_{FMT} \right)} \times 100$$

Kde:

$m_{monomer}$  = navážka všech monomerů [g]

$m_{FMT}$  = navážka funkčního monomeru [g]

$M_{FM}$  = molekulová hmotnost funkčního monomeru [g/mol]

$M_{FMT}$  = molekulová hmotnost funkčního monomeru s navázaným templátem [g/mol]

PV = praktický výtěžek otištěného polymeru po odstranění templátu [g]

**P35:** FT-IR (ATR;  $\text{cm}^{-1}$ ): 3563, 3377, 3016, 2919, 2869, 1603, 1510, 1420, 1372, 1013, 893, 798, 706, 536

**P50:** FT-IR (ATR;  $\text{cm}^{-1}$ ): 3563, 3377, 3016, 2919, 2869, 1603, 1510, 1420, 1372, 1013, 798, 706, 536

### **3.6. Sorpční experimenty v sádkovém uspořádání**

Kinetické studie byly prováděny ve vialkách naplněných 100 mg otištěného polymeru a 1 ml roztoku **Ibu** o koncentraci  $10^{-3}$  mol/l okyseleného na  $\text{pH}=3$ . Vialky byly umístěny do ultrazvukové lázně naplněné malým množstvím ledu po dobu 30 min. Po ukončení pokusu byl roztok **Ibu** přefiltrován a koncentrace stanovena pomocí UV-VIS spektrofotometru při 223 nm.

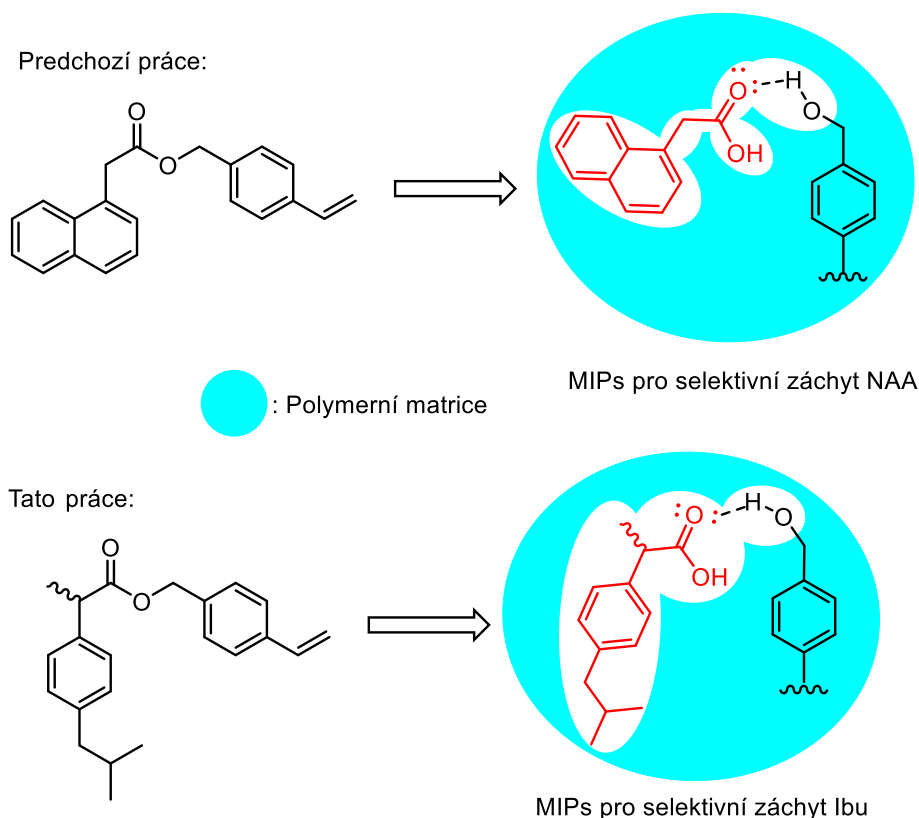
### **3.7. Sorpční experimenty v průtočném uspořádání**

Home-made kolona pro sorpce v průtoku byla sestavena následujícím postupem. Polyethylenová trubička (plášť kolony) byla na jedné straně zakončena teflonovou trubičkou a komerčně dostupnou fitinkou pro nerezové náplňové kolony pro HPLC dodávané firmou Merck. Na tuto fitinku lze připojit standardní PEEK HPLC trubičky. Do kolony byl dále vložen smotek buničité vaty, který nahradil porézní fritu zamezující úniku pevné polymerní náplně. Kolona byla následně plněna přes druhý konec bez analogické fitinky. Polymerní adsorpční náplň byla nejprve suspendována ve vialce v cca 5 ml 50% vodného MeOH. Vialka byla dále na 5 min ponořena do ultrazvukové vodní lázně. Tato operace zajistila nabotnění polymeru na takový objem, jaký byl dále používán při sorpčních pokusech. Takto nabotnaný polymer byl do kolony nadávkován upravenou dvoumilitrovou injekční stříkačkou bez jehly. Kolona byla na stříkačku pevně nasazena, aby bylo možné polymer dávkovat za mírného přetlaku a kontinuálního průtoku. Poté byl do kolony vložen další smotek buničité vaty nahrazující fritu a kolona byla opatřena shodnou fitinkou jako na jejím výstupu. Náplň kolony byla dále průtokem mobilní fáze (50% vodným MeOH) pomocí HPLC čerpadla slisována na požadovanou hodnotu cílové tlakové ztráty 0,5 MPa. Poté byla fitinka na vstupu do kolony demontována. Kolona byla zkrácena o mrtvý objem a fitinka znovu připevněna. Takto připravená kolona byla umístěna mezi pumpu a detektor.

## 4. Výsledky a diskuse

### 4.1. Návrh molekulárně otištěných polymerů pro sorpci ibuprofenu

V rámci naší výzkumné skupiny jsme vyvinuli molekulárně otištěné polymery (MIPs) pro záchyt 1-naftyloctové kyseliny (NAA) s využitím 4-vinylbenzyl esteru jako funkčního monomeru.<sup>26</sup> Tento postup nyní aplikujeme na **Ibu**, známý polutant odpadních vod, kde podobné MIPs na bázi styrenových pryskyřic dosud neexistují (**Schéma 13**). Navrhujeme syntézu 4-vinylbenzyl-2-(4-isobutylfenyl)propanoátu, který bude kopolymerován se styrenem a methoxypolyethylen glykol 4-vinylbenzyléterem ( $M_w = 5000 \text{ g/mol}$ ) pro zlepšení hydrofilicity polymerního materiálu. Tento kopolymerní systém bude polymerován metodou suspenzní fotopolymerace. Po polymeraci bude kopolymer alkoholyzován pomocí MeONa. Výsledné MIPs budou testovány na schopnost záchytu ibuprofenu v pryskyřicích se dvěma úrovněmi zesíťení: 35 % a 50 %, což odpovídá použití komerčních roztoků DVB 50 % a 80 %.



**Schéma 13** – Obecná myšlenka přípravy MIPs

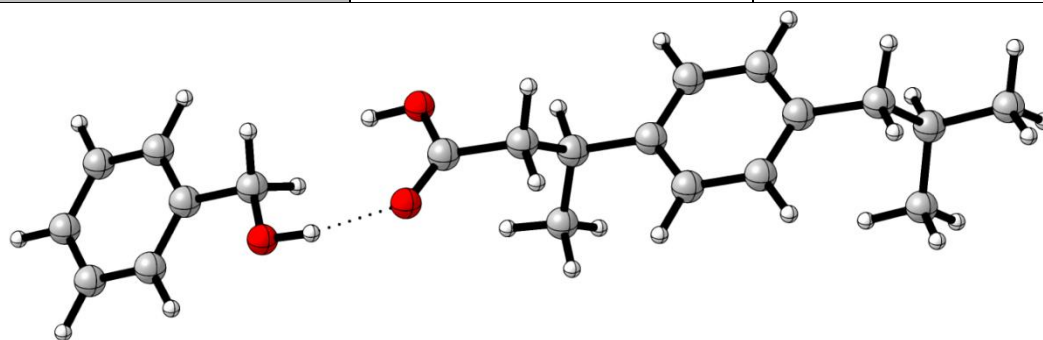
Schopnost vazby **Ibu** na zbytkový benzylalkoholový fragment byla podpořena DFT výpočtem (B3LYP funkcionál, báze def2-SVP). Vazebná energie byla vypočtena následujícím způsobem:



Byly optimalizovány geometrie **Ibu**, benzylalkoholu (model zbytkové skupiny v kavitě) a komplexu **Ibu**–benzylalkohol. Následně byl porovnán rozdíl v energiích komplexu **Ibu**–BnOH vůči součtu energií **Ibu** a BnOH. Tato energie vyšla  $-39$  kJ/mol a je ztotožnitelná s energií vznikající vodíkové vazby (**Tabulka 3**; **Obrázek 23**). Výsledek DFT výpočtu tedy po teoretické stránce podporuje návrh této strategie přípravy MIPs.

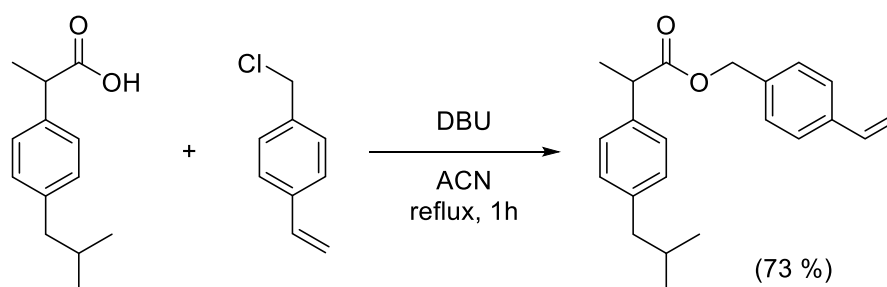
**Tabulka 3** – Hodnoty vazebné energie získané DFT výpočtem

Látka	Energie (kJ/mol)	
<b>Ibu</b>	-1 825 101	
Benzylalkohol	-909 306	Rozdíl (kJ/mol)
Součet <b>Ibu</b> + BnOH	-2 734 407	-39
<b>Ibu</b> –BnOH komplex	-2 734 446	



**Obrázek 23** – Nejpravděpodobnější interakce templát/monomer navržená DFT výpočtem

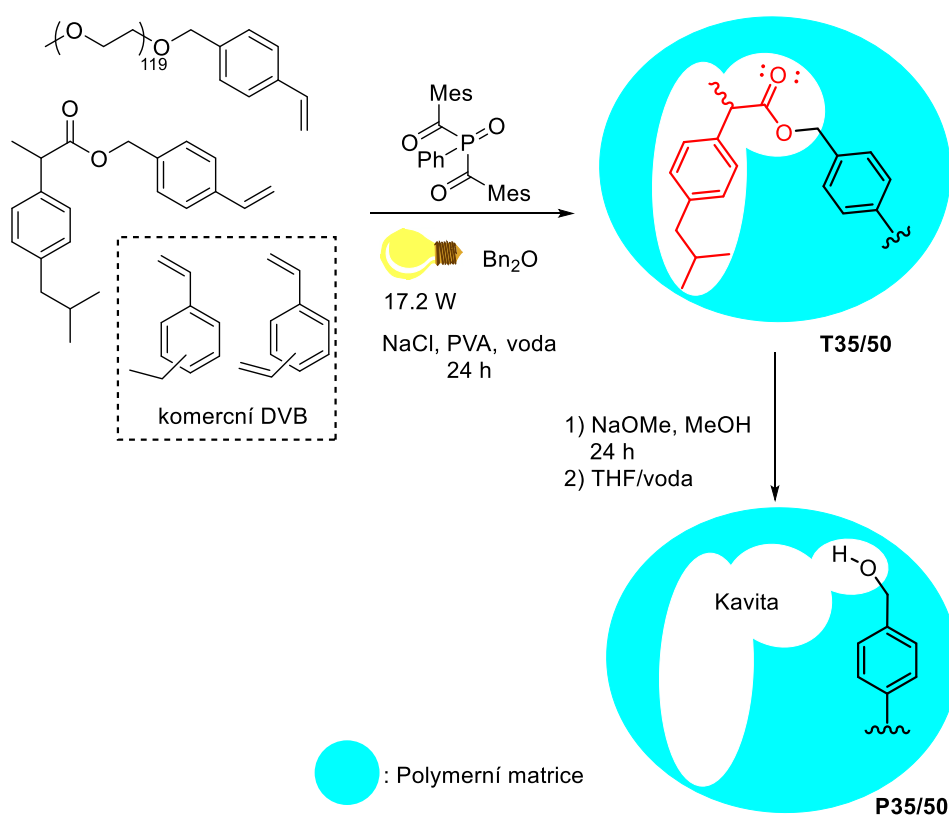
#### 4.2. Příprava a charakterizace MIPs



**Obrázek 24** – Schéma přípravy funkčního monomeru

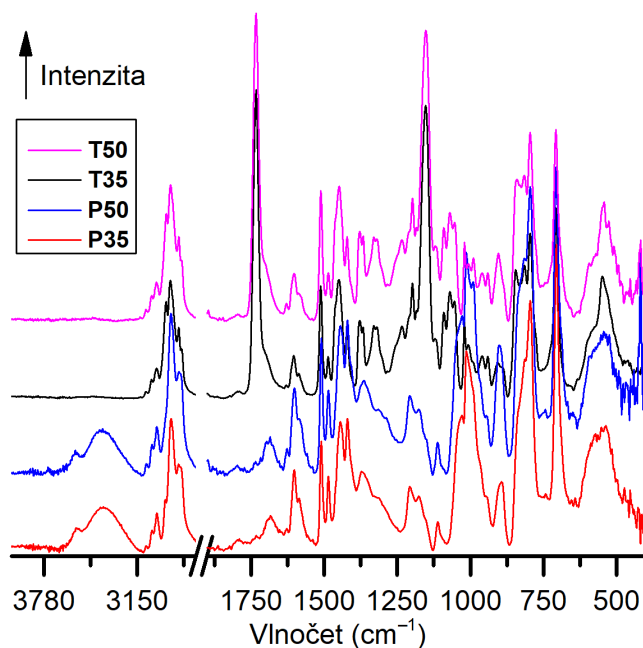
Nejprve byl připraven funkční monomer 4-vinylbenzyl-2-(4-isobutylfenyl)propanoát a to reakcí **Ibu** s 4-vinylbenzyl chloridem s využitím DBU jako báze v acetonitrilu. Po chromatografické separaci byl získán monomer ve výtěžku 73 % (**Obrázek 24**).

Syntéza vlastních MIPs byla poté provedena prostřednictvím suspenzní fotopolymerace kdy jako separační fáze byl použit vodný roztok NaCl, polyvinylalkoholu (87–89% hydrolyzát polyvinyl–acetátu). Obsahem organické fáze byl 4-vinylbenzyl–2-(4-isobutylfenyl)propanoát, komerční roztok divinylbenzenu (50% nebo 80% v ethylstyrenech), methoxypolyethylen glykol 4-vinylbenzyléter (Mw=5000 g/mol) a fotoiniciátor BAPOs v dibenzyléteru. Získané polymery nesoucí templát (**T35/50**) byly následně alkoholizovány *in situ* připraveným methanolátem sodným a získané surové MIPs byly promyty v Soxhletově ekstraktoru pomocí směsi THF/voda. Získané kopolymery (**P35/50**) mají výsledné zesílení 35 % (při použití 50% DVB) a 50% (při využití 80% DVB) (**Obrázek 25**)



**Obrázek 25** – Souhrnné reakční schéma navržených MIPs

Připravené kopolymery byly analyzovány pomocí infračervené spektroskopie. Kdy polymery nesoucí templát (**T35/50**) vykazují intenzivní vibrace při  $1734\text{ cm}^{-1}$  odpovídající valenčním vibracím esterových C=O skupin a C–O při  $1152\text{ cm}^{-1}$ . Po alkoholýze je patrný zánik těchto signálů a objevují se signály odpovídající valenční O–H vibraci při  $3381\text{ cm}^{-1}$  (**Obrázek 26**).



Obrázek 26 – Výřez IČ spekter připravených polymerů

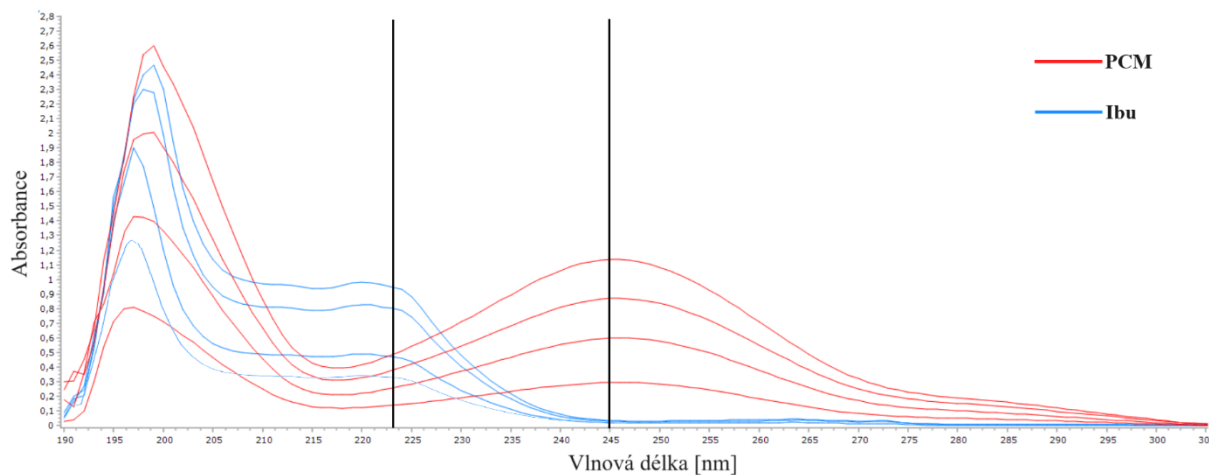
### 4.3. Sorbční experimenty ověřující aktivitu připravených MIPs

V souladu se zadáním diplomové práce byly připraveny dva molekulárně otištěné polymery **P35** a **P50**. Pro ověření jejich schopnosti selektivně adsorbovat **Ibu** byla navržena série experimentů jak ve vsádkovém, tak v průtočném uspořádání. Sorpční experimenty byly prováděny jednak se samotným **Ibu**, kdy bylo cílem zjistit, jakou afinitu má tato molekula ke kavitám „svého otisku“ v polymeru. Dále byly provedeny experimenty se směsí **Ibu-Paracetamol**.

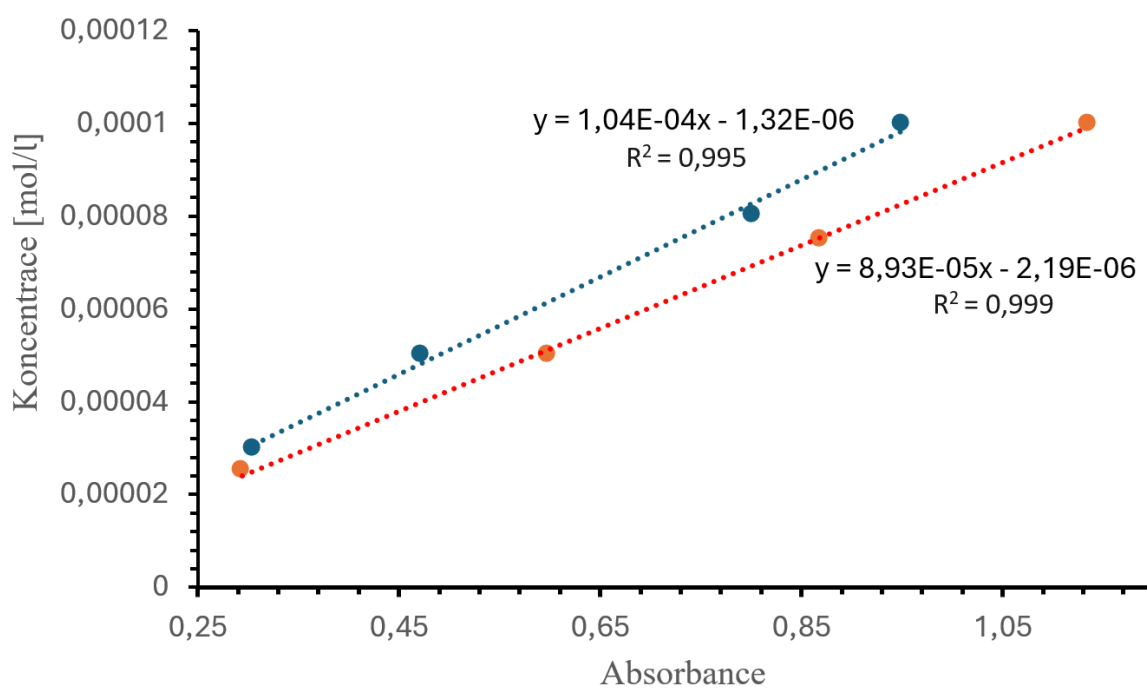
Směs **Ibu** s Paracetamolem byla vybrána jako analogie ke komerčně dostupným léčivým přípravkům obsahujícím směs těchto aktivních farmaceutických substancí. Jedná se o volně dostupné léčivé přípravky, které se však nedoporučují užívat současně. Jako příklad lze uvést: Combogesic, směs v hmotnostním poměru 1:3,3 **Ibu**:paracetamol. Ibutal-S, směs v hmotnostním poměru 400:325. V roce 2017 Evropská lékařská agentura rozhodla, že potahové tablety v hmotnostním poměru **Ibu**:paracetamol 150:500 mohou být použity v některých zemích unie, neboť jejich výhody převažují nad riziky.<sup>27</sup> Na trhu lze koupit řadu léčivých přípravků s různým poměrem zastoupení těchto dvou aktivních farmaceutických substancí.

Druhým důvodem pro vybrání paracetamolu jako příměsi ověřující selektivitu adsorpce byla možnost separace absorpčních pásů v UV-Vis spektrech. Tato skutečnost umožnila zjišťovat poměr zachycení jednotlivých složek směsi. Adsorpční pásy **Ibu** a Paracetamolu jsou uvedeny

na **Obrázek 27**. Pro sledování koncentrace Ibuprofenu byla na základě těchto spekter vybrána vlnová délka 223 nm a pro sledování koncentrace Paracetamolu vlnová délka 245 nm (**Obrázek 28**).



**Obrázek 27** – UV-Vis spektra Ibu a PCM



**Obrázek 28** – Vypočtené lineární regrese pro Ibu a PCM

#### 4.3.1. Volba rozpouštědla pro adsorpční experimenty

V Českém lékopise<sup>28</sup> 1997 je uvedeno, že Ibuprofen je prakticky nerozpustný ve vodě, snadno rozpustný v acetonu, diethyléteru, MeOH a dichlormethanu. Dále se rozpouští ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů a uhličitanů.

První sorpční experimenty se proto dělaly ve 30% vodném roztoku MeOH. Tento roztok byl použit jako analogie s prací [Kocúrik a kol]<sup>26</sup>. Vodné roztoky nižších alkoholů jsou totiž ze zkušenosti vhodné pro tento typ zesíťovaných styrenových kopolymerů, kde míra zesíťování souvisí s botnavostí. Vlastní adsorpce probíhá částečně v gelu, a to tím více, čím vyšší je míra zesíťování. Ukázalo se však, že i při této poměrně nízké koncentraci má **Ibu** v tendenci k precipitaci. Koncentrace MeOH v roztoku byla proto zvýšena na 50 %.

#### 4.3.2. Sorbční experimenty ve vsádkovém uspořádání

Množství adsorbovaného **Ibu** bylo vyhodnoceno diferenčně. Výchozí koncentrace **Ibu** byla  $10^{-3}$  mol/l a bylo použito 1 ml tohoto roztoku. Dále se pracovalo s 100 mg otištěného polymeru a koncentrace v roztoku po adsorpci byla zjištěna spektrofotometricky. Do 1 cm úzké křemenné kyvety byl přímo zfiltrován roztok po adsorpci. Zachycené množství bylo vypočítáno z kalibrační přímky získané lineární regresí podle **Rovnice 1**.

**Rovnice 1** – Kalibrační přímka pro výpočet koncentrace **Ibu**

$$c = 1,04 \cdot 10^{-4} \times A - 1,32 \cdot 10^{-6}$$

kde:

A = absorbance

c = molární koncentrace [mol/l]

Z experimentálních dat bylo zjištěno, že více zesíťovaný polymer má výrazně lepší sorpční vlastnosti oproti méně zesíťovanému. Toto zjištění souhlasí s obecným trendem pro kovalentní přístup přípravy MIPs (**Tabulka 4**).

**Tabulka 4** – Výsledky experimentů v sádkovém uspořádání

MIP	Zachycení <b>Ibu</b> [%]
<b>P35</b>	86
<b>P50</b>	98,7

### 4.3.3. Sorpční experimenty v průtočném uspořádání

Experimentální průtočná kolona byla sestavena podle kapitoly 3.7 v Experimentální části. Z důvodu paralely mezi průtočnými adsorpčními experimenty a kapalinovou kolonovou chromatografií budeme dále hovořit o dávkovaném roztoku do kolony jako o mobilní fázi. O vlastní náplni kolony pak jako o fázi stacionární.

Celkem byly použity tyto mobilní fáze:

$10^{-3}$  mol/l roztok **Ibu** v 50% vodném MeOH; směs **Ibu** ( $10^{-3}$  mol/l) a Paracetamolu ( $10^{-4}$  mol/l) roztok v 50% vodném MeOH; 50% vodný MeOH;  $10^{-1}$  mol/l roztok NaOH v 50% vodném MeOH; 100% MeOH a  $10^{-2}$  mol/l roztok **Ibu** v 100% MeOH. Mobilní fáze obsahující léčiva měli upravené pH na hodnotu 3 pomocí konc. HCl.<sup>26</sup> Počáteční průtok mobilní fáze byl nastaven na 0,5 ml/min. Tato hodnota průtoku byla nastavena na tlakové ztrátě 0,5 MPa, na který byla kolona lisována. V případě použití čistého MeOH jako mobilní fáze bylo nutno snížit průtok kolonou na desetinu. Polymer totiž v tomto roztoku více nabobtná a tím naroste tlaková ztráta. Hodnota tlakové ztráty 0,5 MPa je zhruba hraniční, při které ještě nedochází k úniku mobilní fáze přes píst dávkovací injekční stříkačky. Lineární injekční stříkačková pumpa byla jako dávkovací zařízení zvolena z několika důvodů, jednak umožňuje přesné dávkování poměrně malým průtokem, dále je možné používat roztoky chemikálií, kterými nechceme kontaminovat písky HPLC čerpadla, a nakonec také proto, že lineární pumpa nezpůsobuje rázy a poskytuje menší posun na detektoru způsobený kolísáním tlaku. Injekční stříkačka byla použita o objemu 12 ml, dávkovaný objem v jednom experimentu byl 10 ml a trval 20 minut. Tento experiment byl vyhodnocen jako optimální při sledování záznamů celých spekter při testování selektivity, neboť delší experiment by vedl ke komplikacím se zpracováním vytvořeného datového souboru neúměrné velikosti.

Byly připraveny dvě experimentální kolony. Podle obsahu stacionární fáze v koloně šlo o **KOLP35** (650 mg polymeru **P35**) a **KOLP50** (790 mg polymeru **P50**).

#### 4.3.3.1. Kalibrace průtočného systému

Nejprve byl prováděn experiment s kolonou **KOLP35**. Mobilní fázi byl roztok **Ibu**  $10^{-3}$  mol/l v 50% vodném MeOH. Z dávkovací stříkačky byl rychlostí 0,5 ml/min dávkován roztok 50% vodného MeOH přes kolonu do UV-Vis detektoru ECOM LCD 2084 nastaveného na vlnovou délku 223 nm. Po ustálení pozorované hodnoty napětí byla nastavena absorbance na nulu (čistá

mobilní fáze). Poté byla do kolony dávkována mobilní fáze s **Ibu**. Po mrtvém objemu kolony 2,5 ml začala postupně narůstat absorbance a to zhruba lineárně až k hodnotě zahlcení detektoru ( $A = 2$  tj.  $2,07 \cdot 10^{-4}$  mol/l z kalibrace, kdy již přestává platit Lambert-Beerův zákon). To znamená, že do této hodnoty v koloně adsorbovalo více než 80 % **Ibu**. K zahlcení detektoru došlo v čase 70 minut což odpovídá 35 ml roztoku a to je 35  $\mu$ mol **Ibu**. Odhadneme-li na tomto základě předpokládanou sorpční kapacitu polymeru **KOLP35** vyjde menší než **11 mg Ibu/g**.

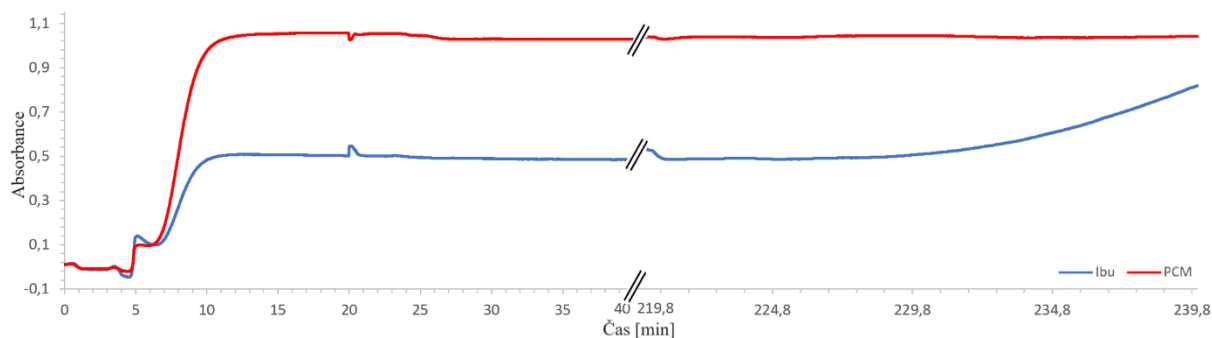
#### 4.3.3.2. Regenerace adsorpční kolony KOLP35

Po procesu zahlcení byl z kolony sorbovaný **Ibu** vymýván 50% vodným MeOH. Pozorovaná absorbance postupně klesala, až na hodnotu zhruba rovnu jedné, kdy se změnila rychlost vymývání. Další pokles absorbance byl výrazně pomalejší a naznačuje tedy různou míru sorpce **Ibu** v koloně. Kolona byla dále promývána mobilní fází s NaOH  $10^{-1}$  mol/l a poté znova 50% vodným MeOH. Po poklesu pozorované absorbance na hodnotu 0 bylo promývání ukončeno. Adsorpční pokus byl znovu zopakován s podobným výsledkem. Tímto byla ověřena reprodukovatelnost.

#### 4.3.3.3. Selektivita adsorpční kolony KOLP50

Na základě výsledků ze vsádkových pokusů byla předpokládána vyšší sorpční účinnost pro **Ibu** na polymeru **P50**. **KOLP50** byl proto využit k otestování možnosti selektivní adsorpce molekulárně otištěného **Ibu**. Měření bylo prováděno za použití diode array detektoru SYKAM S3210, který umožňuje časové záznamy celých UV-Vis spekter.

Přes kolonu byla nejprve čerpána čistá mobilní fáze 50% vodného MeOH analogicky s předchozím experimentem. Po ustálení hodnoty absorbance byla její hodnota nastavena na nulu. Poté byl do dávkovací stříkačky dán roztok mobilní fáze obsahující směs **Ibu** ( $10^{-3}$  mol/l) a Paracetamolu ( $10^{-4}$  mol/l) v 50% vodném MeOH. Časový záznam absorbancí při 223 a 245 nm je uveden na **Obrázek 29**. Na obrázku je vidět, že po mrtvém objemu kolony se začne ihned eluovat Paracetamol, zatímco praktický veškerý Ibuprofen je kolonou zachycen i když je jeho koncentrace ve vstupující mobilní fázi o řád vyšší. K eluci **Ibu** dochází až po poměrně dlouhém čase a to s poměrně rychlým nárůstem eluovaného množství končícím zahlcením kolony (oblast grafu od 219,8 do 239,8 minuty na **Obrázek 29**). Množství zachyceného **Ibu** v tomto případě odpovídá adsorpční kapacitě **26 mg/l**. Tedy výrazně více než u **KOLP35** i se skutečností, že v roztoku byla přítomna další látka.



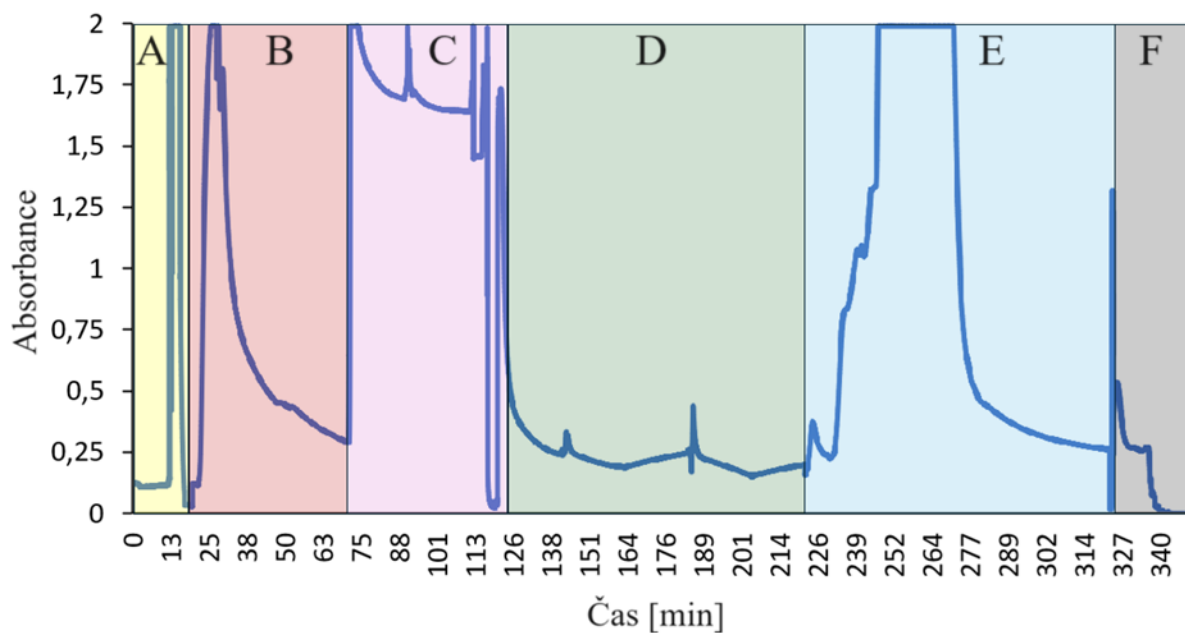
**Obrázek 29** – Časová závislost eluovaných léčiv z adsorpční kolony na Absorbanci. Měřeno při 223 nm pro **Ibu** a 245 nm pro PCM. Průtok 0,5 ml/min.

Koncentrace léčiv v mobilní fázi byla zvolena záměrně tak, aby vylučovaný Paracetamol nerušil stanovení Ibuprofenu. Při vlnové délce 223 nm musí ještě platit Lambert-Beerův zákon a zároveň musí být nastavená absorbance na takovou hodnotu, aby bylo možné sledovat její nárůst v závislosti na zvyšující se koncentraci **Ibu**.

#### 4.3.3.4. Regenerace adsorpční kolony KOLP50

Po tomto zahlcení byl z kolony sorbovaný **Ibu** vymýván 50% vodným MeOH. Pozorovaná absorbance postupně klesala, až na hodnotu zhruba rovnu 0.

Dále byl připraven experiment, který měl potvrdit znovupoužití **KOLP50**. Průběhy absorbancí v čase jsou zobrazeny na **Obrázek 30** a dále diskutovány v textu.



**Obrázek 30** – Časová závislost eluovaného **Ibu** z adsorpční kolony na Absorbanci. Průtok eluované mobilní fáze v oblasti **A–D**: 0,5 ml/min; **E**: 0,05ml/min; **F**: 0,05–0,5 ml/min. Mobilní fáze v oblasti **A**:  $10^{-3}$  mol/min **Ibu** v 50% vodném MeOH; **B**: 50% vodný MeOH; **C**: 0,1 mol/min roztok NaOH v 50% vodném MeOH; **D**: 50% vodný MeOH; **E**: čistý MeOH; **F**: 50% vodný MeOH. Sledováno při 223 nm.



**Oblast A:** Při průtoku dalšího roztoku  $10^{-3}$  mol/l **Ibu** v 50% vodném MeOH docházelo nejprve k totálnímu záchytu veškerého **Ibu** až v čase 13 min došlo k prudkému nárůstu absorbance a zahlčení detektoru. Toto množství zachyceného **Ibu** odpovídá zhruba kapacitě 1mg/g. Toto množství je výrazně menší než původní a po regeneraci je předpokládaná kapacita 26 mg/g.

**Oblast B:** Pokus o desorpci adsorbovaného **Ibu**. Prosté vymývání 50% vodným MeOH nevedlo k požadovanému cíli, neboť se zde ustaluje rovnováha a eluát z plně saturované kolony na jejím výstupu obsahoval méně než 10 % z původní koncentrace. Pro plné vymytí bychom tedy potřebovali mnohem více než desetinásobek použitého rozpouštědla pro adsorpci neboť koncentrace **Ibu** v eluátu s časem klesá.

**Oblast C:** Původní záměr použít pro regeneraci kolony 0,1 mol/l roztok NaOH v 50% vodném MeOH nevedl k cíli. Množství desorbovaného **Ibu** v čase bylo totiž podobné jako v případě čistého 50% MeOH. Přidaný hydroxid k tomuto roztoku však znemožnil přesné sledování desorbovaného množství **Ibu**, neboť odpovídající nárůst absorbance posunul sledovanou hodnotu mimo platnost Lambert-Beerova zákona.

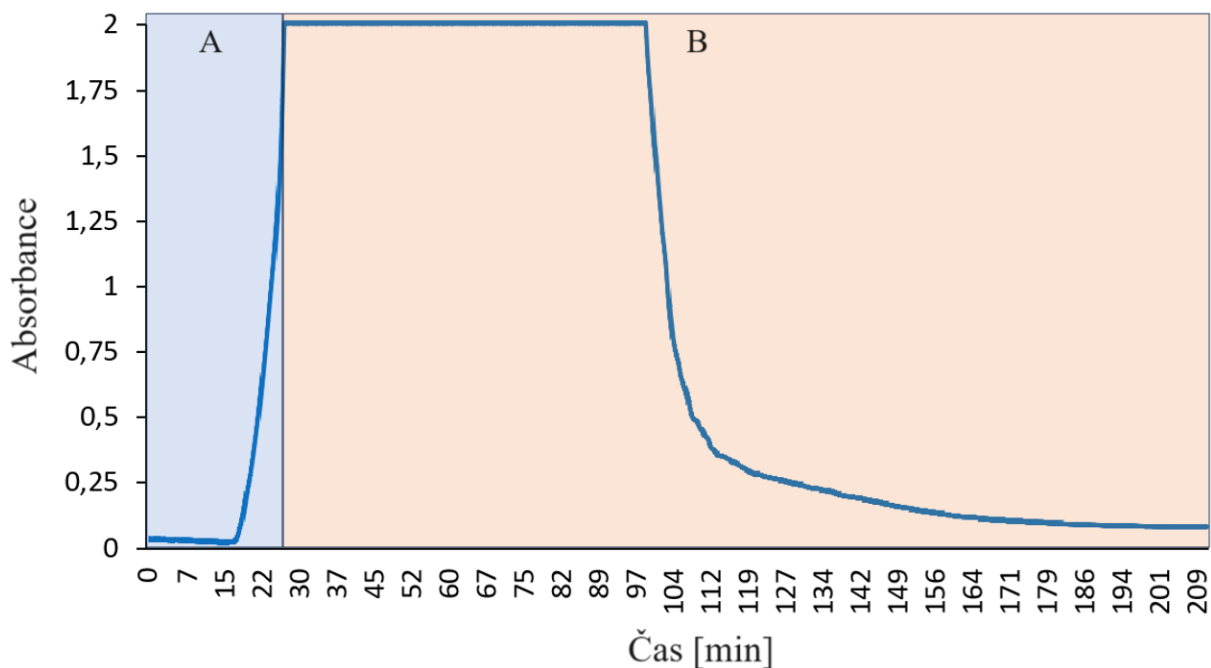
**Oblast D:** Důkladné promytí zbytku NaOH z **KOLP50** pomocí 50 ml ( $5 \times 10$  ml) 50% vodného MeOH.

**Oblast E:** Experiment s čistým MeOH jako s mobilní fází. Bylo zjištěno, že polymer poměrně nabobtná, což vede pravděpodobně k otevření pórů polymeru a snadnější desorpci **Ibu**. Také to vedlo k výrazné tlakové ztrátě, takže bylo nutné snížit průtok na desetinu (0,05 ml/min) oproti standardně zvolenému průtoku. Při proplachu **KOLP50** čistým MeOH došlo postupně k nárůstu absorbance odpovídající eluci v koloně vázaného **Ibu**. Dalším průtokem čistého MeOH byl tedy eluován **Ibu**, který byl v koloně vázán odlišně od toho, který lze vymýt 50% vodným MeOH. Teoreticky to odpovídá rozdílu kapacit a tato hodnota je 25 mg/g.

**Oblast F:** Opět proplach kolony 50% vodným MeOH z důvodu přípravy kolony na další zachytávající experiment. Průtok eluátu se během tohoto proplachu zvýšil z 0,05 ml/min opět na 0,5 ml/min, protože opět pracujeme v systému MeOH/voda kdy nedochází k tak markantní bobtnavosti polymeru a tlaková ztráta je výrazně menší.

Po sérii těchto zjištění byl proveden další sorpční experiment pouze s čistým MeOH jako čistou mobilní fází při sníženém průtoku na 0,05 ml/min. Jako mobilní fáze určená pro adsorpci byl použit roztok **Ibu** o koncentraci  $10^{-2}$  mol/l.

Bylo zjištěno, že k zahlcení kolony dochází dříve než v případě **KOLP35** za použití 50% vodného MeOH jako mobilní fáze. Toto zjištění je poměrně zásadní a otvírá nové otázky, jejichž řešení bude předmětem dalšího studia. Adsorpční proces popisuje **Obrázek 31**.



**Obrázek 31** – Časová závislost eluovaného **Ibu** z adsorpční kolony na Absorbanci po optimalizaci procesu absorpce a vymývání. Průtok eluované mobilní fáze 0,05 ml/min, koncentrace  $10^{-2}$  mol/l. Mobilní fáze v oblasti **A**:  $10^{-2}$  mol/l **Ibu** v čistém MeOH; **B**: čistý MeOH. Sledováno při 223 nm.

**Oblast A:** Dochází k průtoku  $10^{-2}$  mol/l roztoku **Ibu** v čistém MeOH a zachycení **Ibu** v připravených kavitách polymeru. Průtok eluátu musel být opět upraven na 0,05 ml/min kvůli jeho botnavosti (vysvětleno výše). V 17 minutě experimentu se kolona začala postupně zahlcovat (docházelo k postupnému zvyšování absorbance) a v 27 minutě došlo k úplnému zahlcení a koncentrace **Ibu** v eluátu se po průchodu kolonou nezměnila. Odhadneme-li ze získaných dat kapacitu kolony vyjde nám hodnota **3,5 mg Ibu/g**.

**Oblast B:** Z předchozích zjištění se pro desorpci zachyceného **Ibu** použil čistý MeOH, který byl schopen postupně odstranit veškerý zachycený **Ibu** z kolony.

## 5. Závěr

V rámci diplomové práce byl připraven jeden funkční monomer (4-vinylbenzyl-2-(4-isobutylfenyl)propanoát) určený pro přípravu MIPs. Jeho fotoinicovanou kopolymerací se dvěma různě koncentrovanými roztoky komerčního divinylbenzenu byly připraveny polymery s různou mírou zesítnění (35 a 50 %). Jejich hydrolyzou byly připraveny molekulárně otištěné polymery **P35** a **P50** vyznačující se mírou zesítnění 35 a 50 %.

Tyto otištěné polymery byly použity pro zachytávání **Ibu** z roztoků. Zachytávání bylo prováděno v ultrazvukem míchaných vialkách (vsádkové experimenty) a v kolonách vlastní výroby **KOLP35** a **KOLP50** (průtočné experimenty).

Ze vsádkových experimentů vyšlo, že polymer **P35** je schopen zachytit za analogických podmínek méně **Ibu** z roztoku než polymer **P50**. Tyto závěry byly potvrzeny v průtočném uspořádání. **KOLP35** vykazovala počáteční sorpční kapacitu 11 mg **Ibu** na 1 g **P35**. Tato kapacita zůstala zachována po regeneraci kolony vymytím a opakované sorpci. Odhadnutá sorpční kapacita se blíží hodnotám získaných pro známé MIPs připravené kovalentní metodou z literatury. **KOLP50** vykazovala počáteční sorpční kapacitu 26 mg **Ibu** na 1 g **P50**. Tato kapacita již výrazně převyšuje dříve publikované literární hodnoty. Kolona **KOLP50** byla použita pro ověření možnosti selektivní adsorpce **Ibu** z roztoku, ve kterém byl rovněž přítomen Paracetamol. Průtočný experiment prokázal výraznou selektivní sorpci pro molekulárně otištěný **Ibu**.

Při vymývacích průtočných experimentech bylo zjištěno, že se **Ibu** na **P50** váže nejméně dvěma způsoby: Prvním způsobem je povrchová sorpce **Ibu** na polymer s hodnotou zachytu 1mg **Ibu** na 1g sorbentu. A druhý způsob je sorpce **Ibu** do připravených kavit v polymeru, tako interakce už vykazuje zásadně vyšší sorpční hodnotu 25 mg **Ibu** na 1 g sorbentu. Z toho vyplývá, že interakce templát/kavita je zásadně pevnější a při našich experimentech bylo zjištěno, že se **Ibu** nedá z polymeru vymýt 50% vodným MeOH. Proto je nutné při vymývání templátu z kavit použít čistý MeOH, ovšem z důvodu nabotnění se razantně sníží kapacita polymeru **P50** (**3,5 mg Ibu/g**), která je dokonce menší než u polymeru **P35** při použití 50% vodném MeOH jako mobilní fázi.

Toto zajímavé zjištění předmětem dalšího studia. Další výzkum si tedy vytkne za cíl objasnit závislost sorpční kapacity na gradientu mobilní fáze. Výsledky zkoumání by mohly vést ke vzniku cíleně designovaných náplní kolon pro selektivní sorpce **Ibu**.

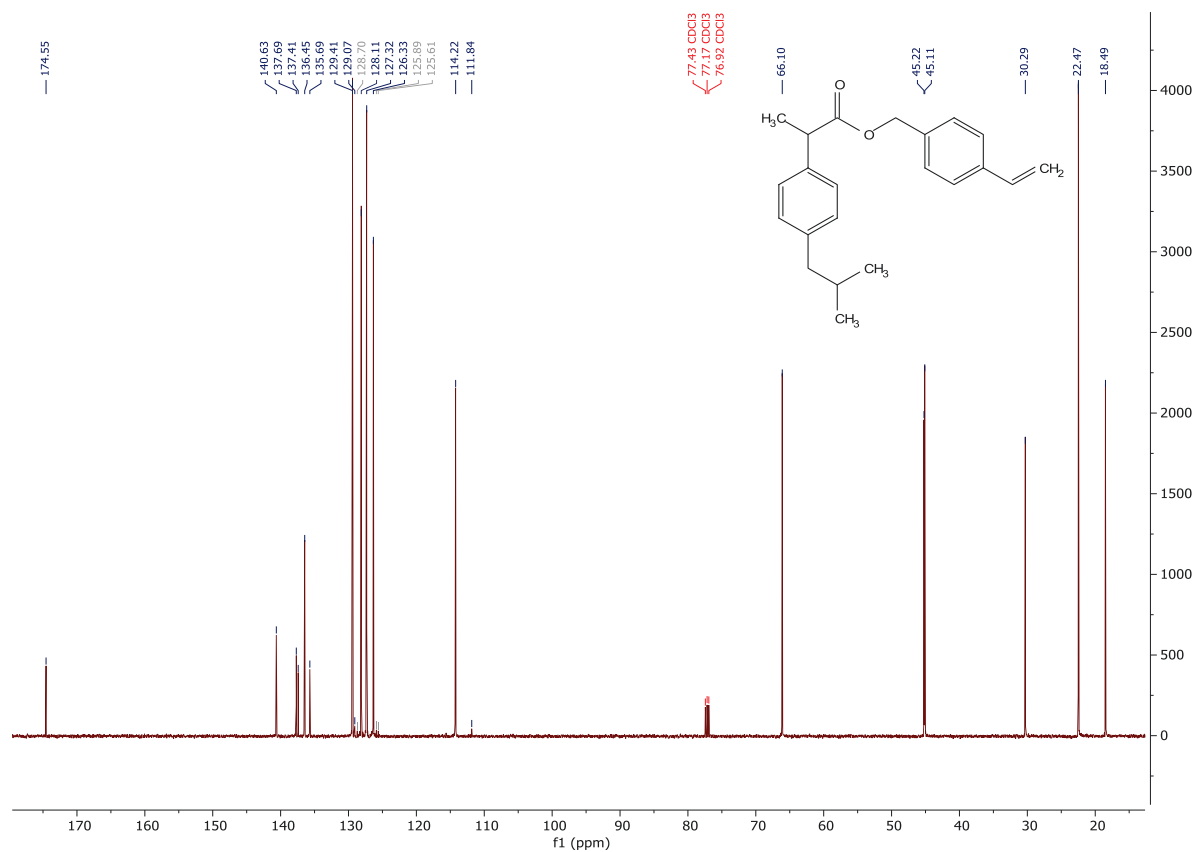
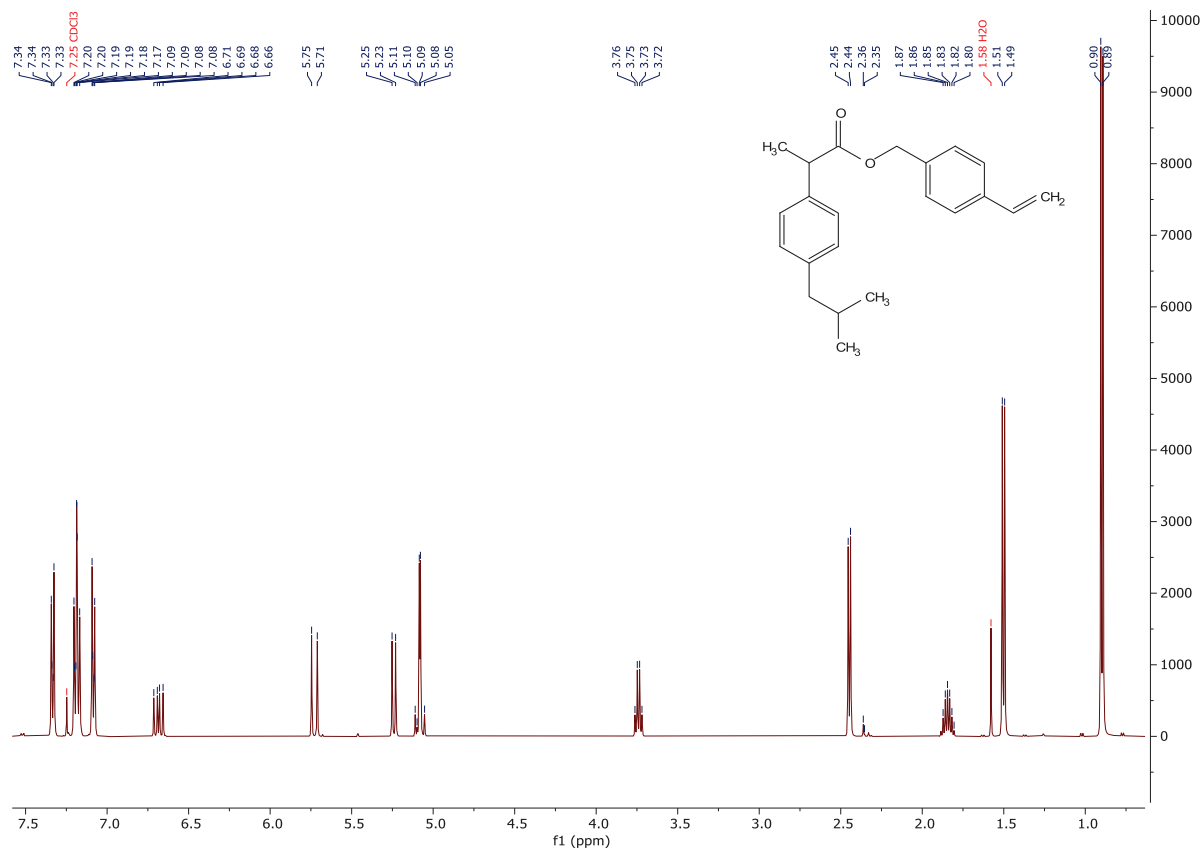
## Použitá literatura

- (1) KANTOR, T. G. Ibuprofen. *Ann Intern Med* **1979**, *91* (6), 877–882. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-91-6-877>.
- (2) Rainsford, K. D. *Ibuprofen: Pharmacology, Therapeutics and Side Effects*; Springer: Basel, 2012. <https://doi.org/10.1007/978-3-0348-0496-7>.
- (3) *Ibuprofen*. <https://go.drugbank.com/drugs/DB01050> (accessed 2024-02-27).
- (4) Dill, J.; Patel, A. R.; Yang, X.-L.; Bachoo, R.; Powell, C. M.; Li, S. A Molecular Mechanism for Ibuprofen-Mediated RhoA Inhibition in Neurons. *J. Neurosci.* **2010**, *30* (3), 963–972. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5045-09.2010>.
- (5) Stuhlmeier, K. M.; Li, H.; Kao, J. J. Ibuprofen: New Explanation for an Old Phenomenon. *Biochemical Pharmacology* **1999**, *57* (3), 313–320. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(98\)00301-3](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(98)00301-3).
- (6) Marchlewicz, A.; Guzik, U.; Wojcieszńska, D. Over-the-Counter Monocyclic Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs in Environment—Sources, Risks, Biodegradation. *Water Air Soil Pollut* **2015**, *226* (10), 355. <https://doi.org/10.1007/s11270-015-2622-0>.
- (7) Jan-Roblero, J.; Cruz-Maya, J. A. Ibuprofen: Toxicology and Biodegradation of an Emerging Contaminant. *Molecules* **2023**, *28* (5), 2097. <https://doi.org/10.3390/molecules28052097>.
- (8) Chopra, S.; Kumar, D. Ibuprofen as an Emerging Organic Contaminant in Environment, Distribution and Remediation. *Heliyon* **2020**, *6* (6), e04087. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04087>.
- (9) Shafi, S.; Zafar, S.; Aitani, A.; Fatima, L.; Hassan, Z.; Ahmad, A.; Majeed, S.; Sarwar, Z. Carbon Dots Support for Preconcentration and Analysis of Anti-Inflammatory Drug Ibuprofen: An Innovative Remedy for Wastewater Treatment. *Clean Techn Environ Policy* **2024**. <https://doi.org/10.1007/s10098-023-02731-9>.
- (10) *Molecularly Imprinted Polymers* | *Chemical Reviews*. [https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.chemrev.8b00171?casa\\_token=gb9kKiBODJ8AAA%3A4sAaIXrYj35310-FSszj0eniuukjgdw8zVclqlUEMZXUzN95PK4GkjeB-cxFNriko4-xKE8QTQy1znFy8](https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.chemrev.8b00171?casa_token=gb9kKiBODJ8AAA%3A4sAaIXrYj35310-FSszj0eniuukjgdw8zVclqlUEMZXUzN95PK4GkjeB-cxFNriko4-xKE8QTQy1znFy8) (accessed 2024-05-08).
- (11) Schirhagl, R. Bioapplications for Molecularly Imprinted Polymers. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (1), 250–261. <https://doi.org/10.1021/ac401251j>.
- (12) Cormack, P. A. G.; Elorza, A. Z. Molecularly Imprinted Polymers: Synthesis and Characterisation. *Journal of Chromatography B* **2004**, *804* (1), 173–182. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.02.013>.
- (13) Dong, C.; Shi, H.; Han, Y.; Yang, Y.; Wang, R.; Men, J. Molecularly Imprinted Polymers by the Surface Imprinting Technique. *European Polymer Journal* **2021**, *145*, 110231. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110231>.
- (14) Ye, L. Synthetic Strategies in Molecular Imprinting. In *Molecularly Imprinted Polymers in Biotechnology*; Mattiasson, B., Ye, L., Eds.; Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology; Springer International Publishing: Cham, 2015; pp 1–24. [https://doi.org/10.1007/10\\_2015\\_313](https://doi.org/10.1007/10_2015_313).
- (15) Liu, S.; Pan, J.; Zhu, H.; Pan, G.; Qiu, F.; Meng, M.; Yao, J.; Yuan, D. Graphene Oxide Based Molecularly Imprinted Polymers with Double Recognition Abilities: The Combination of Covalent Boronic Acid and Traditional Non-Covalent Monomers. *Chemical Engineering Journal* **2016**, *290*, 220–231. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.01.061>.
- (16) He, P.; Zhu, H.; Ma, Y.; Liu, N.; Niu, X.; Wei, M.; Pan, J. Rational Design and Fabrication of Surface Molecularly Imprinted Polymers Based on Multi-Boronic Acid Sites for Selective Capture Glycoproteins. *Chemical Engineering Journal* **2019**, *367*, 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.02.140>.

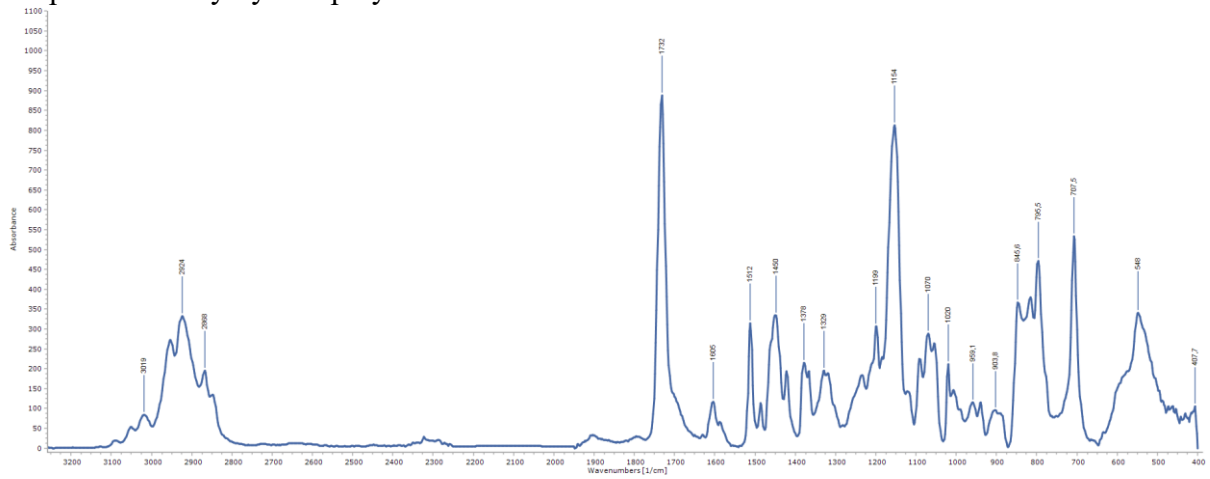
- (17) Zhao, Q.; Ma, C.; Liu, J.; Chen, Z.; Zhao, H.; Li, B.; Yang, X. Synthesis of Magnetic Covalent Organic Framework Molecularly Imprinted Polymers at Room Temperature: A Novel Imprinted Strategy for Thermo-Sensitive Substance. *Talanta* **2021**, *225*, 121958. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121958>.
- (18) Farrington, K.; Regan, F. Investigation of the Nature of MIP Recognition: The Development and Characterisation of a MIP for Ibuprofen. *Biosens Bioelectron* **2007**, *22* (6), 1138–1146. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.06.025>.
- (19) Madikizela, L. M.; Chimuka, L. Synthesis, Adsorption and Selectivity Studies of a Polymer Imprinted with Naproxen, Ibuprofen and Diclofenac. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **2016**, *4* (4, Part A), 4029–4037. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2016.09.012>.
- (20) Lagha, A.; Adhoum, N.; Monser, L. A Molecularly Imprinted Polymer for the Selective Solid-Phase Extraction of Ibuprofen from Urine Samples. *The Open Chemical and Biomedical Methods Journal* **2011**, *4* (1).
- (21) Fahri, H.; Zulfikar, M. A.; Azis, M. Y. Adsorption of Ibuprofen Compounds Using Magnetic Molecularly Imprinted Polymers. **2023**.
- (22) Stachowiak, M.; Cegłowski, M.; Kurczewska, J. Hybrid Chitosan/Molecularly Imprinted Polymer Hydrogel Beads Doped with Iron for Selective Ibuprofen Adsorption. *International Journal of Biological Macromolecules* **2023**, *251*, 126356. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126356>.
- (23) Wu, X.; Wu, Y.; Dong, H.; Zhao, J.; Wang, C.; Zhou, S.; Lu, J.; Yan, Y.; Li, H. Accelerating the Design of Molecularly Imprinted Nanocomposite Membranes Modified by Au@polyaniline for Selective Enrichment and Separation of Ibuprofen. *Applied Surface Science* **2018**, *428*, 555–565. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.09.104>.
- (24) Zhou, L.; Kong, Y.; Zhong, S.; Zhou, X. Preparation and Characterization of Molecularly Imprinted Organic–Inorganic Hybrid Materials by Sol–Gel Processing for Selective Recognition of Ibuprofen. *J Sol-Gel Sci Technol* **2013**, *66* (1), 59–67. <https://doi.org/10.1007/s10971-013-2966-0>.
- (25) AlSalem, H. S.; Monier, M.; Alatawi, R. A.; Bukhari, A. A. H.; Abdelaziz, M. A.; Hajri, A. K.; Elsayed, N. H. Enantio-Separation of (±)-Ibuprofen Racemic Mixture Using Functionalized Molecularly Imprinted Resorcinol Formaldehyde Resin. *Polymer International* **2023**, *72* (2), 195–204. <https://doi.org/10.1002/pi.6457>.
- (26) Kocúrik, M.; Bartáček, J.; Svoboda, J.; Kolská, Z.; Chýlková, J.; Sedlák, M. Covalent Molecularly Imprinted Polymers for Selective Adsorption of Plant Growth Stimulator 1-Naphthaleneacetic Acid. *Polymer* **2022**, *256*, 125189. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2022.125189>.
- (27) *Paracetamol/Ibuprofen 500 mg/150 mg film-coated tablets - referral | European Medicines Agency*. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/referrals/paracetamol-ibuprofen-500-mg-150-mg-film-coated-tablets> (accessed 2024-05-11).
- (28) *Lékopis - Ibuprofenum*. [http://www.lekopis.cz/Kap\\_6\\_1\\_Ibuprofenum.htm](http://www.lekopis.cz/Kap_6_1_Ibuprofenum.htm) (accessed 2024-05-09).

# Přílohy

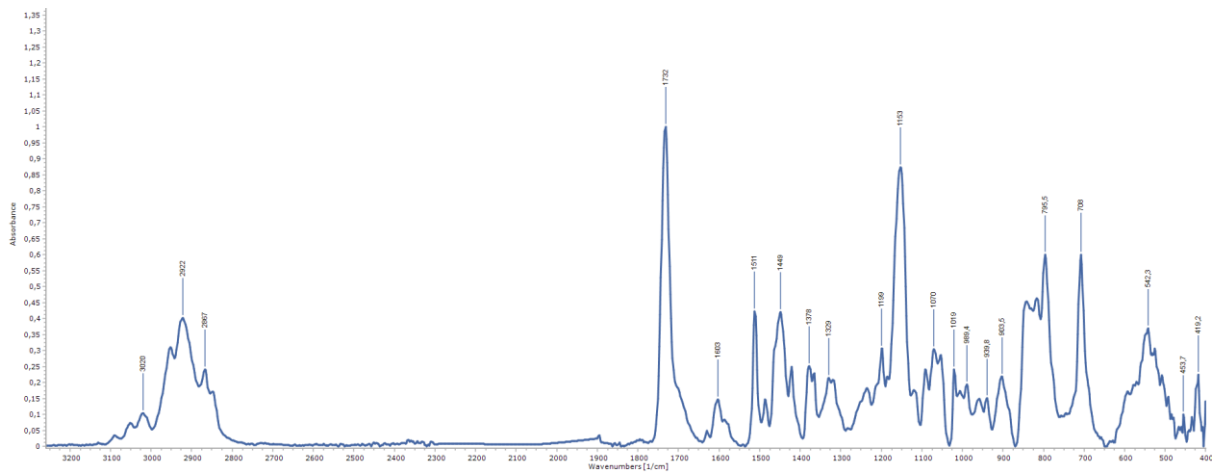
## $^1\text{H}$ a $^{13}\text{C}$ NMR spektra 4-vinylbenzyl-2-(4-isobutylfenyl)propanoátu



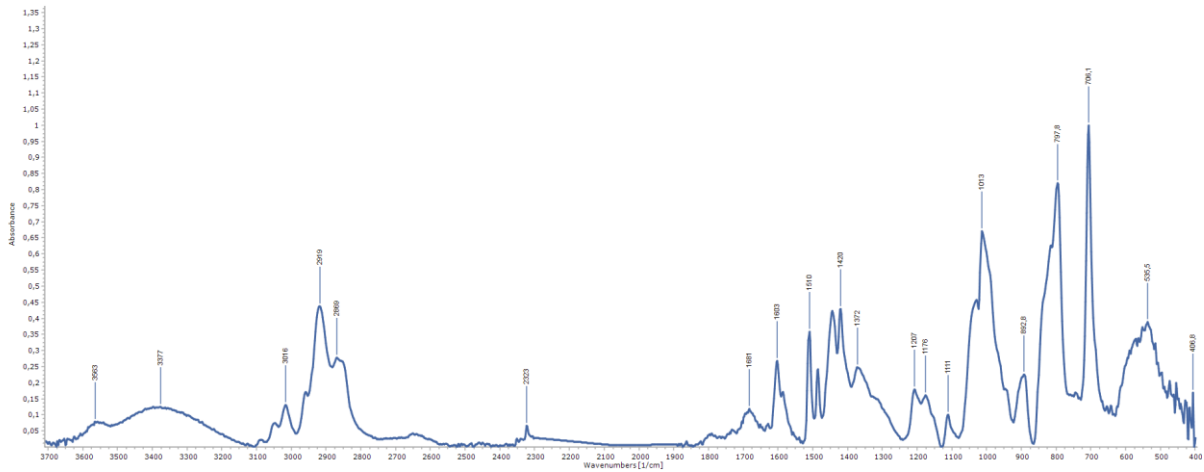
### IČ spektrum nevytýého polymeru T35



### IČ spektrum nevytýého polymeru T50



### IČ spektrum výtýého otitýného polymeru P35



# IČ spektrum vymytého otištěného polymeru P50

