

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2024

Jan Stolín

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Organické materiály pro selektivní sorpci estrogenů
Bakalářská práce

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Jan Stolín**
Osobní číslo: **C21048**
Studijní program: **B0531A130012 Farmakochemie a medicínální materiály**
Téma práce: **Organické materiály pro selektivní sorpci estrogenů**
Téma práce anglicky: **Organic materials for selective sorption of estrogens**
Zadávající katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Zásady pro vypracování

1. Provedte literární rešerši týkající se organických materiálů pro selektivní sorpci estrogenů.
2. Připravte 3 polymerní materiály nesoucí vhodné funkční skupiny pro selektivní záchyt ethinylestradiolu.
3. Připravené materiály dostupnými metodami charakterizujte.
4. Porovnejte účinnost připravených materiálů pro sorpci ethinylestradiolu z modelového roztoku.
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: **dle potřeby**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:
veškerá dostupná odborná literatura

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

Datum zadání bakalářské práce: **29. února 2024**
Termín odevzdání bakalářské práce: **1. července 2024**

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

L.S.

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

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Organické materiály pro selektivní sorpci estrogenů 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 23. 6. 2024

Jan Stolín v. r.

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěl moc poděkovat vedoucímu mé práce, Ing. Janu Bartáčkovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, vstřícnost, laskavost a za cenné rady, které mi poskytl. Největší dík mu však patří za jeho přátelský přístup, díky němuž jsem byl ochoten v laboratoři trávit tak moc času, že dle jeho slov už pro mě neměl práci. Poděkování si bezesporu zaslouží prof. Ing. Jaromíra Chýlková, CSc., která mi byla k dispozici vždy, když jsem její pomoc potřeboval, vyšla mi vstříc a poskytla rady týkající se mé práce. Dík patří i ostatním z našeho patra, jejichž pomoc mi byla v případě potřeby vždy nabídnuta. Dále bych chtěl poděkovat mému kamarádu Kubovi, který mě provází životem už řadu let a jeho umění proměnit cokoli na úsměv mi zlepšil náladu i ve složitých situacích. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat své rodině včetně přítelkyně za jejich lásku a podporu, díky níž je moje studium o poznání méně náročné.

ANOTACE

V této práci byla provedena literární rešerše zaměřená na selektivní sorpční materiály pro estrogenní látky. Cílem bylo vyvinout selektivní sorbent pro ethinylestradiol (**EE2**). Pro selektivní navázání **EE2** byla zvolena Huisgenova azido-alkynová [3+2] cykloadiční reakce, což vedlo k výběru polymerů nesoucích azidové funkční skupiny. Byly připraveny tři typy těchto polymerů: azidomethylpolystyren (**P1**) modifikovaný z Merrifieldovy pryskyřice, graftový kopolymer typu PS/PEG (**P3**) a kopolymer připravený přímou kopolymerací 4-vinylbenzyl azidu s divinylbenzenem (**P2**). Elementární analýza a infračervená spektroskopie potvrdily přítomnost azidových skupin v polymerech. Testování sorpčních vlastností ukázalo, že nejvyšší schopnost vázat **EE2** má polymer **P1**, zejména při použití CuI jako katalyzátoru a přídavku DBU jako báze. Výsledky představují důležitý krok k praktické aplikaci vyvinutých sorbentů, avšak další optimalizace jsou nezbytné pro použití ve vodném prostředí a snížení množství potřebné mědi.

KLÍČOVÁ SLOVA

selektivní sorpční materiály, estrogeny, ethinylestradiol, sorpce

TITLE

Organic materials for selective sorption of estrogens

ANNOTATION

In this work, a literature review focused on selective sorption materials for estrogenic substances was conducted. The goal was to develop a selective sorbent for ethinylestradiol (**EE2**). For the selective binding of **EE2**, the Huisgen azide-alkyne [3+2] cycloaddition reaction was chosen, leading to the selection of polymers bearing azide functional groups. Three types of these polymers were prepared: azidomethylpolystyrene (**P1**) modified from Merrifield resin, a PS/PEG graft copolymer (**P3**), and a copolymer prepared by direct copolymerization of 4-vinylbenzyl azide with divinylbenzene (**P2**). Elemental analysis and infrared spectroscopy confirmed the presence of azide groups in the polymers. Sorption property testing showed that the highest capacity to bind **EE2** was exhibited by polymer **P1**, especially when CuI was used as a catalyst and DBU as a base. The results represent an important step towards the practical application of the developed sorbents, but further optimization is necessary for use in aqueous environments and to reduce the amount of copper needed.

KEYWORDS

materials for selective sorption, estrogens, ethinylestradiol, sorption

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	10
ÚVOD.....	11
1. TEORETICKÁ ČÁST	12
1.1. Estrogeny.....	12
1.1.1. Obecná struktura estrogenů	12
1.1.2. Funkce estrogenů v organismu	13
1.1.3. Syntetické estrogeny jako hormonální antikoncepce.....	13
1.1.4. Důvod odstraňování estrogenů z vodních zdrojů	15
1.2. Materiály pro selektivní záchyt.....	16
1.2.1. MIPs.....	16
1.2.1.1. Struktura a složení MIPs	17
1.2.1.2. Příprava MIPs.....	19
1.2.1.3. Regenerace MIPs	20
1.2.1.4. Možnosti využití MIP	22
1.2.1.5. Využití MIPs pro odstranění estrogenních sloučenin z vodních zdrojů	23
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
2.1. Příprava substrátu pro sorpci estrogenů	26
2.1.1. Příprava 4-azidomethyl styrenu (P1)	26
2.1.2. Příprava 4-vinylbenzyl azidu	27
2.1.2.1. Polymerace 4-vinylbenzyl azidu (P2)	27
2.1.2. Příprava TENTAGELU s azidovou funkční skupinou (P3).....	29
2.2. Obecný postup přípravy vzorků pro měření.....	30
3. VÝSLEDKY A DISKUZE	31
3.1. Návrh selektivního sorpčního materiálu pro EE2	31
3.2. Příprava a charakterizace polymerních materiálů	32
3.3. Testování sorpčních vlastností polymerů P1-P3	35

ZÁVĚR	39
POUŽITÁ LITERATURA.....	40
SEZNAM PŘÍLOH.....	43
Příloha A: FT-IR spektrum P1	44
Příloha B: FT-IR spektrum P2	45
Příloha C: FT-IR spektrum P3	46
Příloha D: ^1H a ^{13}C NMR spektrum 4-vinylbenzyl azidu.....	47

SEZNAM ZKRATEK

MIP – molekulárně otištěné polymery

NIP – neotištěný polymer

USEPA/EPA – úřad pro ochranu životního prostředí

E1 – estron

E2 – 17 β -estradiol

E2 – 17 α -estradiol

E3 – estriol

EE2 – 17 α -ethinylestradiol

ESR/ER – estrogenový receptor

COC – kombinovaná perorální antikonceptiva

MeOH – methanol

DCM – dichlormethan

DMSO – dimethylsulfoxid

THF – tetrahydrofuran

ACN – acetonitril

NaAsc – askorbát sodný

DBU – 1,8-diazabicyklo(5.4.0)undec-7-en

BHT - 2,6-di-terc-butyl-p-kresol

ÚVOD

Ať už přírodní, či syntetické estrogenu patří tyto látky mezi skupinu látek znečišťující životní prostředí. Jsou známé díky svým negativním vlivům, kterými působí zejména na vodní organismy. Vzhledem k jejich širokému výskytu v životním prostředí a endokrinní aktivitě i při nízkých koncentracích, např. již $0,1 \text{ ng}\cdot\text{l}^{-1}$, se těmto endokrinním disruptorům dostalo zvýšené pozornosti v řízení kvality vody a zdravotní péči [1]. Dlouhodobá perzistence steroidních estrogenů vede k jejich bioakumulaci ve vodních organismech, které se mohou dále dostat k člověku cestou potravního řetězce [2] či estrogenem kontaminovaná voda vstupuje do hydrologického cyklu a dochází k její akumulaci v povrchových, podzemních i pitných vodách. Proto je třeba zavádět nové metody, abychom mohli čelit rostoucí kontaminaci odpadních vod [3]. Dosud bylo navrženo několik metod ošetření, jako je adsorpce, oxidace, fotolýza a elektrochemické techniky k odstranění estrogenů z vodních ekosystémů. Hlavními překážkami spojenými s aplikacemi ve velkém měřítku jsou však vysoké provozní náklady, nedostatečná míra odstranění, tvorba toxických kalů a nutnost kvalifikovaných pracovníků údržby a obsluhy [2]. Jako jedno z možných řešení byly v minulosti studovány synteticky připravené molekulárně otištěné polymery (MIPs), které byly použity pro selektivní odstranění estrogenních sloučenin. Většina estrogenních sloučenin je ze své podstaty hydrofobní a jsou přítomny v životním prostředí ve stopové koncentraci. Proto je adsorpce považována za jeden z vhodných procesů pro odstranění estrogenních sloučenin. Adsorpce je dokonce obhajována USEPA a národními normami pro primární pitnou vodu pro odstranění endokrinních disruptivních sloučenin [4]. Proto se cílem mé práce stalo vytvoření selektivních sorpčních materiálů a za jejich pomoci selektivně vychytávat estrogenu v roztocích, stimulující vodné prostředí.

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Estrogeny

Estrogeny jsou biologicky aktivní hormony. Jedná se o deriváty cholesterolu, jež se uvolňují z kůry nadledvin, varlat a vaječníků lidí a zvířat. Některé sloučeniny estrogenů byly však objeveny i u některých druhů rostlin. Steroidní estrogeny mohou být klasifikovány jako přírodní (estron – **E1**, 17β -estradiol – **E2**, 17α -estradiol – **E2** a estriol – **E3**), či syntetické (17α -ethinylestradiol – **EE2**) hormony (Schéma 1) a mohou působit jako chemikálie s destruktivním efektem na endokrinní systém.^[5]

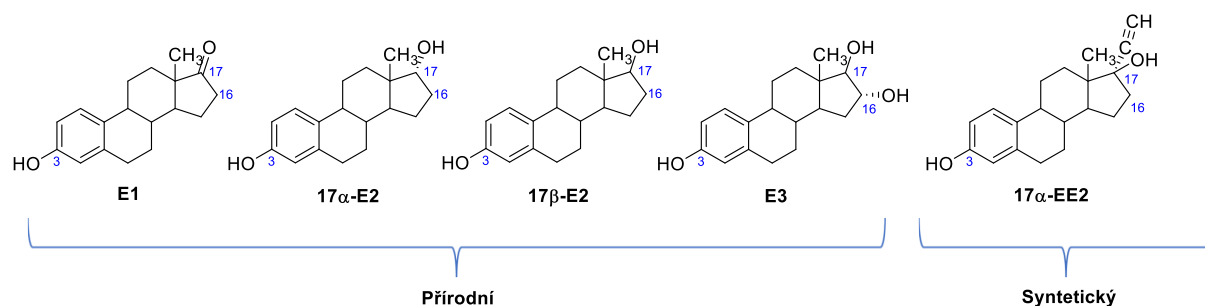


Schéma 1: Struktura a příklady přírodních a syntetických estrogenů [5]

1.1.1. Obecná struktura estrogenů

Přírodní steroidní estrogeny, známé také jako steroidní skupina C18, sdílejí stejný tetracyklický molekulární rámec, který se skládá z čtyř kruhů, jedné fenolové skupiny, dvou cyklohexanových a jednoho cyklopentanového kruhu (Schéma 2). Strukturální rozdíly uvnitř skupiny C18 spočívají v konfiguraci D-kruhu na pozicích C16 a C17. Například estron (**E1**) má karbonylovou skupinu na C17, 17β -estradiol (**E2**) má hydroxylovou skupinu na C17, zatímco estriol (**E3**) má dvě alkoholové skupiny na C16 a C17 (Schéma 2). 17β -estradiol (**E2**) existuje ve dvou stereoisomerních formách, které se liší konfigurací hydroxylové skupiny na uhlíku C17, čímž vytváří buď α - nebo β -sloučeninu.^[5]

Sloučenina 17α -ethinylestradiol (**EE2**) je syntetický hormon odvozený od přírodního estrogenu **E2** (17β -estradiol) a estradiolu, běžně používaný jako složka perorální antikoncepce. 17α -ethinylestradiol je xenoestrogen, kde je 3-hydroxysteroid (estradiol) substituován ethynylovou skupinou v poloze 17.^[6]

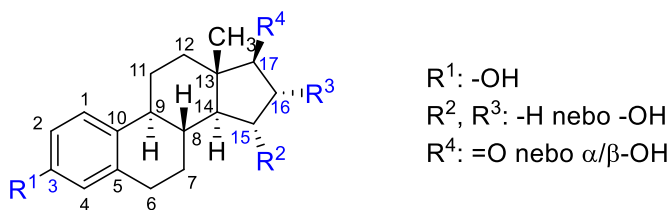


Schéma 2: Obecná struktura přírodních estrogenů [7]

1.1.2. Funkce estrogenů v organismu

Estrogeny hrají klíčovou roli ve vývoji a udržování reprodukční funkce a plodnosti. Estrogeny také hrají důležitou roli v patologických procesech pozorovaných v tkáních reprodukčního systému. Kromě toho vykazují širokou škálu biologických účinků v kardiovaskulárním, svalově-kosterním, imunitním a centrálním nervovém systému. Nejúčinnějším estrogenem produkovaným v těle je 17β -estradiol (**E2**). Ačkoli estron a estriol, dva metabolity **E2**, se vážou na estrogenové receptory (ESR) s vysokou afinitou, jsou však mnohem slabšími agonisty ve srovnání s **E2**. [8]

1.1.3. Syntetické estrogeny jako hormonální antikoncepce

Estrogenní složka kombinované perorální a parenterální antikoncepce hraje důležitou roli v hormonální antikoncepci. Plní tři důležité funkce: (1) způsobuje negativní zpětnou vazbu na osu hypotalamus-hypofýza, čímž potlačuje gonadotropiny podílející se na zrání folikulů a ovulaci; (2) zajišťuje stabilitu endometria, zabraňuje nepravidelnému odlučování a nechtěnému, neočekávanému a neplánovanému krvácení; (3) zvyšuje antikoncepční účinnost gestační složky svým inhibičním účinkem na sekreci gonadotropinu a antifertilními účinky progestinu na cervikální hlen, endometrium a případně vejcovody. Tato silnější inhibice vaječnicků je spojena s nižším rizikem tvorby folikulárních cyst, které se vyskytují u pilulek obsahujících pouze progestin a u nižšího estradiolu (**E2**) a produkce testosteronu vaječnickem. [9]

Ethinylestradiol (**EE**) je v posledních letech převládajícím estrogenem používaným v kombinovaných perorálních antikonceptivech (COC). Ačkoli je **EE** celkově bezpečný při dávkách 50 μg nebo nižších, obavy z některých jeho nežádoucích a vedlejších účinků přetrvávají. Roste potřeba najít alternativu k **EE** u COC, aby se zmírnilo riziko kardiovaskulárních komplikací, a to jak arteriálních příhod (hypertenze, mozkový infarkt či infarkt myokardu), tak žilních příhod (hluboká žilní trombóza a plicní embolie). Bylo

prokázáno, že **EE** má vzhledem na dávce závislé riziko tromboembolie, které je připisováno aktivaci koagulačních faktorů a dalším hemostatickým účinkům. Snížení dávky **EE** (<50 µg) vedlo ke snížení výskytu žilního tromboembolismu, ischemické cévní mozkové příhody a infarktu myokardu. Další snížení dávky na 20 µg může dále snížit incidenci výskytu žilního tromboembolismu, ale důkazy pro to jsou omezené. Bylo prokázáno, že i velmi nízké dávky **EE** v COC nepříznivě ovlivňují hemostatické parametry. Přestože snížení dávky **EE** v aktuálně dostupných COC významně zlepšilo bezpečnost a snášenlivost COC, úsilí o další snížení rizik souvisejících s **EE** a COC pokračuje. ^[9]

Dávka estrogenu byla farmaceutickými společnostmi snížena s cílem snížit riziko kardiovaskulárních poruch. Složka estrogenu, **EE** nebo **17α-E2**, je používána v COC dostupných v dnešní době. V průběhu let se dávka **EE** snížila z 50 na 30-35 mg a postupně na 20-15 mg. Pilulky jsou nyní rozděleny na vyšší a nižší dávku **EE** než 30 mg. Toto snížení bylo uskutečnitelné díky dostupnosti nových tříd progestinů. V sedmdesátých letech vznikla myšlenka použít přirozený **17β-E2** v COC, i když po několik let nebyly k dispozici uspokojivé formulace. Ve výjimečných případech byly pilulky obsahující **17β-E2** antikoncepční, ale ženy vykazovaly nízkou toleranci a zažívaly nadměrné krvácení. Byly komercializovány dvě kombinace obsahující estradiol (**E2**). Selektivní modulátory estrogenního receptoru jsou ve vývoji, které mají estrogenní aktivitu na kosti a endometrium, ale antiestrogenní aktivitu na prsu, například estetrol. ^[10]

1.1.4. Důvod odstraňování estrogenů z vodních zdrojů

Mnoho studií prokázalo, že určité chemické látky nazývané endokrinní disruptory (EDC) jsou schopny napodobovat hormony nebo interferovat s působením endogenních hormonů. Přírodní estrogény estron (**E1**), 17 β -estradiol (**E2**), estriol (**E3**) a zejména syntetický estrogen **EE2**; který se hojně používá jako perorální antikoncepce, se váže na estrogenový receptor a může špatně regulovat nebo narušovat normální biologické reakce. Napodobováním přirozených hormonů nebo narušováním signálních drah jako endokrinních disruptorů mohou estrogény stimulovat růst lidských buněk rakoviny prsu nebo indukovat expresi vitellogeninu u ryb, který je odpovědný za antimikrobiální aktivitu a zdroj živin pro vývoj embrií nejen ryb, ale prakticky všech vejcorodých živočichů, jako jsou například obojživelníci, plazi, ptáci, většina bezobratlých a ptakopysk, jelikož se jedná i o prekurzor bílkoviny vaječného žloutku. Souhrnně tedy můžeme říct, že indukci exprese vitellogeninu, jakožto vysokomolekulárního glykolipofosfoproteinu, dojde ke snížení obranyschopnosti ryb proti mikrobům včetně bakterií a virů, a zároveň jejich šance na správný růst a vývoj v embryonální fázi. ^[1, 11, 12]

Oba mechanismy se používají k prokázání aktivity estrogenu v biologických testech. Nemetabolizovaný **EE2** a jeho konjugáty jsou vylučovány do odpadních vod. Během čištění odpadních vod se **EE2** uvolňuje z odpovídajících konjugátů hydrolýzou a dostává se do životního prostředí prostřednictvím odpadních vod z čistíren odpadních vod. Vzhledem k neúplnému odstranění během procesu zpracování odpadu jsou syntetické a přírodní estrogény považovány za hlavní přispěvatele k estrogení aktivitě spojené s odpadními vodami z čistíren odpadních vod. ^[1]

Toto zvyšující se riziko pro životní prostředí a veřejné zdraví vyžaduje vývoj nových přístupů k odstranění těchto sloučenin z životního prostředí. Vzhledem k určité perzistenci, zejména **EE2** vůči mikrobiální transformaci, je však nutné pečlivě identifikovat mikroorganismy, které jsou schopny tuto sloučeninu transformovat a objasnit metabolické procesy, které mohou vést ke ztrátě estrogení aktivity. ^[1]

1.2. Materiály pro selektivní záchyt

1.2.1. MIPs

Molekulární otištění je proces, který umožňuje syntézu umělých receptorů pro danou cílovou molekulu na bázi syntetických polymerů. Cílová molekula funguje jako templát, kolem kterého jsou uspořádány interagující a zasíťované monomery a kopolymerovány tak, aby vytvořily skořápku podobnou odlitku. V podstatě je molekulová paměť vtištěna do polymeru, který je nyní schopen se selektivně vázat na cíl. Molekulárně otištěné polymery (MIPs) jsou tedy majiteli nejdůležitější vlastnosti biologických protilátek, a tím je specifické molekulární rozpoznání. Mohou být tak použity v aplikacích, kde probíhají důležité selektivní vazebné procesy, jako jsou imunoanalýzy, afinitní separace, biosenzory a řízená syntéza a katalýza. Od svých počátků v 70. letech 20. století se technika molekulárního imprintování, zejména v posledních desetiletích, velmi rozšířila jak z hlediska materiálů, tak z hlediska aplikací. Přesto je stále mnoho prostoru pro další zlepšení. Klíčovými výzvami, zejména homogenitou vazebných míst a kompatibilitou MIPs s vodou a možností syntézy MIPs specifických pro proteiny, jsou aktivně řešeny výzkumnými skupinami po celém světě. Další důležité body jsou koncepce kompozitních materiálů na bázi MIPs, aby byly zahrnuty do materiálu další zajímavé vlastnosti, a syntéza velmi malých a kvazi – rozpustných MIPs, velikostí blízkých proteinům.

[13]

1.2.1.1. Struktura a složení MIPs

Obecně platí, že trojrozměrná (3D) zesíťovaná struktura je typickým rysem MIP. Templát, funkční monomer, síťovadlo a iniciátor jsou nezbytnými složkami pro přípravu MIP. [14]

Templáty jsou látky, o které se výzkumníci zajímají (snaží se je separovat, detekovat nebo připravit k cílenému doručení) včetně malých organických molekul a biomakromolekul. Všechny templáty musí mít dostatečnou aktivitu, aby se spojily s funkčním monomerem a vytvořily prepolymerační komplex. V ideálních polymerech jsou funkční monomer a síťovadlo velmi důležité, protože tvoří kostru polymeru. Proto je nutný určitý stupeň hydrofilicity zvyšující biokompatibilitu. Vytvoření stabilního prepolymerizačního komplexu je klíčem k účinnému molekulárnímu imprintingu. Vysoká stabilita interakce mezi templátem a monomerem přispívá k tvorbě jednotných vazebných míst a minimalizuje přítomnost nespecifických míst. Proto je důležité vybrat vhodné funkční monomery. Běžně používané funkční monomery jsou znázorněny v příloženém schématu (Schéma 3). [14]

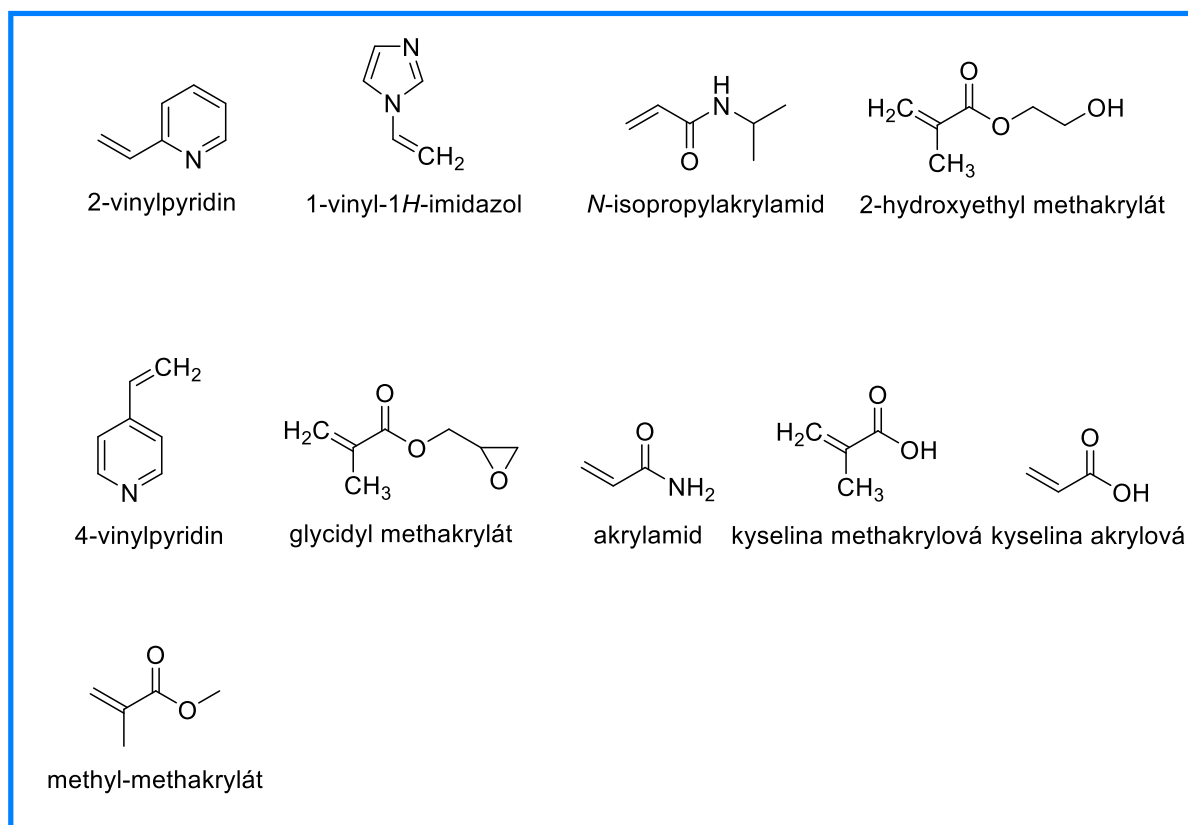


Schéma 3: Příklady monomerů využívaných pro syntézu MIPs uvedených v článku [14]

Mezitím se síťovadla používají k vytvoření trojrozměrné sítě se střední tuhostí a flexibilitou. Na jedné straně existence síťovadel zajišťuje tuhost materiálu a prostorovou stabilitu dutiny. Na druhé straně musí být získaný polymer dostatečně pružný, aby zajistil, že vhodné rozpouštědlo může snadno difundovat do matrice. Pro dodávání léčiv lze použít jak vysoce zesítěné tuhé MIP, tak nízko zesítěné imprintované hydrogely. Příklady často využívaných síťovadel jsou znázorněny pomocí Schématu 4. ^[14]

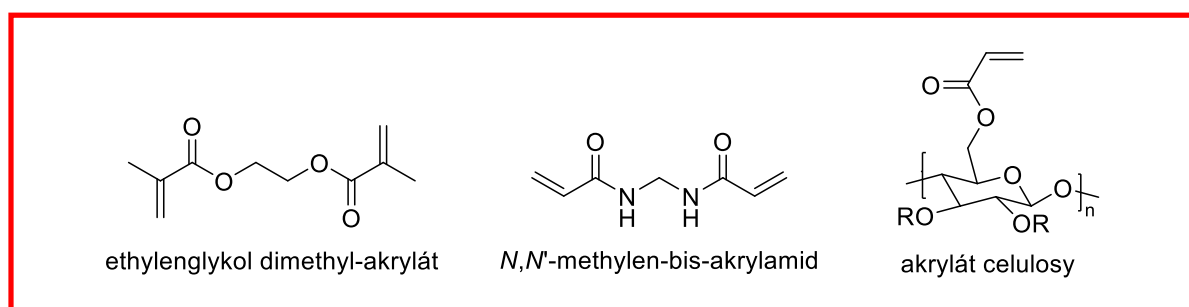
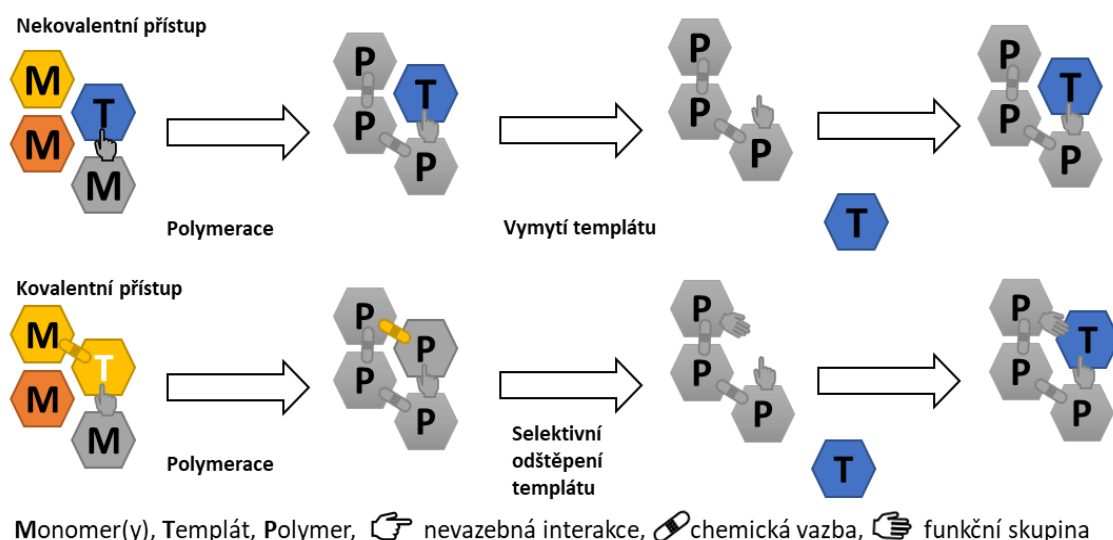


Schéma 4: Příklady síťovadel využívaných pro syntézu MIPs uvedených v článku [14]

Někdy se k modulaci vlastností polymerů používá trochu porogenu, například dimethylsulfoxidu, který také hraje roli rozpouštědla. Porogeny jsou užitečné pro modifikaci uvolňování léčiva z MIP. Funkční materiály, jako jsou magnetická činidla, složky citlivé na světlo/teplotu/pH, jsou také zahrnuty do MIPs, aby se dosáhlo specifického účinku. ^[14]

1.2.1.2. Příprava MIPs

MIPs se dají připravit prakticky dvěma způsoby. Největší skupinou MIPs jsou ty, které se připravují nekovalentní metodou, kdy se požadovaná látka smísí s monomery, které jsou schopné nevazebných interakcí s látkou (H-vazba, van der Waalsova síla) a po polymeraci se templát vymyje z výsledného polymeru (Obr. 1). Tato metoda je jednoduchá na provedení, ale klade určité nároky jak na templátovou molekulu, tak na monomery z hlediska možnosti jejich nekovalentních interakcí. Méně studovaná je kovalentní metoda, kdy je templátová molekula nejprve funkcionalizována polymerovatelnými dvojnými vazbami prostřednictvím štěpitelného linkeru. Po polymeraci se pak kovalentní vazba na templát štěpí a templát se následně eluuje. Na polymeru tak zůstane zbytková skupina, která může při opětovném vázání interagovat s templátem. Pokud se během opětovného vázání molekuly templátu do kavity vytvoří chemická vazba, přístup se nazývá kovalentní, pokud je povaha vazebné interakce nekovalentní, nazývá se semikovalentní. [15]



Obrázek 1: Schématické znázornění způsobů přípravy MIPs kovalentní a nekovalentní cestou [15]

Využití nekovalentní metody je snazší v provedení, protože nevyžaduje syntézu monomerů. Následné odstranění templátu je jednodušší, protože nevyžaduje přerušení chemické vazby. Lze zavádět různé funkční skupiny. Na druhou stranu použitím nekovalentního postupu je vyžadována přesná empirická optimalizace poměru každého monomeru, templátu a porogenu. Kovalentní metoda je tedy obecně náročnější na syntézu (jak monomeru, tak výsledných MIPs), ale optimalizace poměru monomerů nebo množství porogenu je podstatně snazší. Obecně lze říci, že vyšší poměr síťování vede k lepší selektivě. [15]

1.2.1.3. Regenerace MIPs

Na rozdíl od jednorázového použití analytických zařízení většina chemických a inženýrských aplikací vyžaduje regeneraci MIPs, aby se zvýšila účinnost, ekonomika a udržitelnost. ^[16]

Opětovná použitelnost imprintovaných materiálů hraje klíčovou roli ve vývoji aplikací, které jsou spolehlivé, ekonomické a udržitelné. Nicméně studie znovupoužitelnosti jsou v literatuře omezeny na přibližně 10 adsorpčních cyklů a neexistují žádné odhady dlouhodobé stability a opětovné použitelnosti imprintovaných polymerů. Přestože sestavy monomer-templát a jejich stabilita byly důkladně prostudovány jak teoreticky, tak i experimentálně, jediný výzkum stability MIPs byl uveden Svensonem a jeho spolupracovníky pro imprintovaný theofylin kopolymerem na bázi methakrylátu. Bylo prokázáno, že při expozici kyselinám (1–10 M HCl), zásadám (5–25 % NH₃), zpracování v autoklávu a při expozici zvýšené teplotě až ke 150 °C po dobu více než 24 hodin nevede ke ztrátě afinity templátu. Navzdory své důležitosti je literatura o samotné extrakci templátu také nedostatečná a je určena k redukci vyluhování templátu. ^[16]

Tato studie systematicky zkoumá vliv síťovacích činidel, funkčních monomerů a podmínek pro extrakci templátu na dlouhodobou stabilitu a znovupoužitelnost potištěných polymerů. Čtyřiadvacetihodinové adsorpčně-regenerační cykly byly provedeny více než 100krát duplicitně za použití jedenácti různých L-fenylalanin methyl esterových otištěných polymerů s různým složením. Ačkoli methyl estery mají biologický význam, protože jsou prekurzory a metabolity syntetického sladidla aspartamu, použití připravených otištěných polymerů není ústředním bodem této studie. Methyl ester byl vybrán jako templát kvůli své mnohostranné chemické povaze, která má donorová a akceptorová místa vodíku a také aromatickou část schopnou π - π interakcí. Mít v ruce tak všestrannou šablonu umožnilo zkoumat širokou škálu funkčních monomerů, jako jsou karboxylové kyseliny, močovina, amid, amin a deriváty kyseliny borité. ^[16]

Polymery na bázi akrylátu, akrylamidu a styrenu byly připraveny pomocí běžně používaných síťovadel, jako je ethylenglykoldimetakrylát (EDMA), divinylbenzen (DVB) a *N,N'*-metylenbis(akrylamid) (BMA). Síťovadlo je důležité při kontrole morfologie polymerní matrice, slouží ke stabilizaci otištěných vazebných míst a dodává polymerní matici mechanickou stabilitu, aby si zachovala svou schopnost molekulárního rozpoznávání. Stupeň zesíťování byl stanoven na 1/15 a 1/30 funkčního monomeru k poměru síťovadla. Extrakce templátu byla provedena s promývacími rozpouštědly s různou eluční silou jak při pokojové (25 °C), tak při zvýšené (65 °C) teplotě. ^[16]

Bez ohledu na stupeň zesíťování vykazovaly polymery na bázi divinylbenzenu stabilnější chování ve srovnání s polymery na bázi methakrylátu a akrylamidu. Tyto polymery lze znovu použít nejméně 100krát bez ztráty afinity k templátové molekule za kyselých a zásaditých podmínek, a i při zvýšené teplotě (65 °C). Naproti tomu účinnost polymerů na bázi methakrylátu a akrylamidu se časem zhoršuje jak za kyselých, tak i zásaditých extrakčních podmínek. Bylo prokázáno, že kromě dobře známého vyluhování templátu a monomerů mohou produkty degradace polymerů také vést ke kontaminaci vzorků během aplikace adsorbentů. [16]

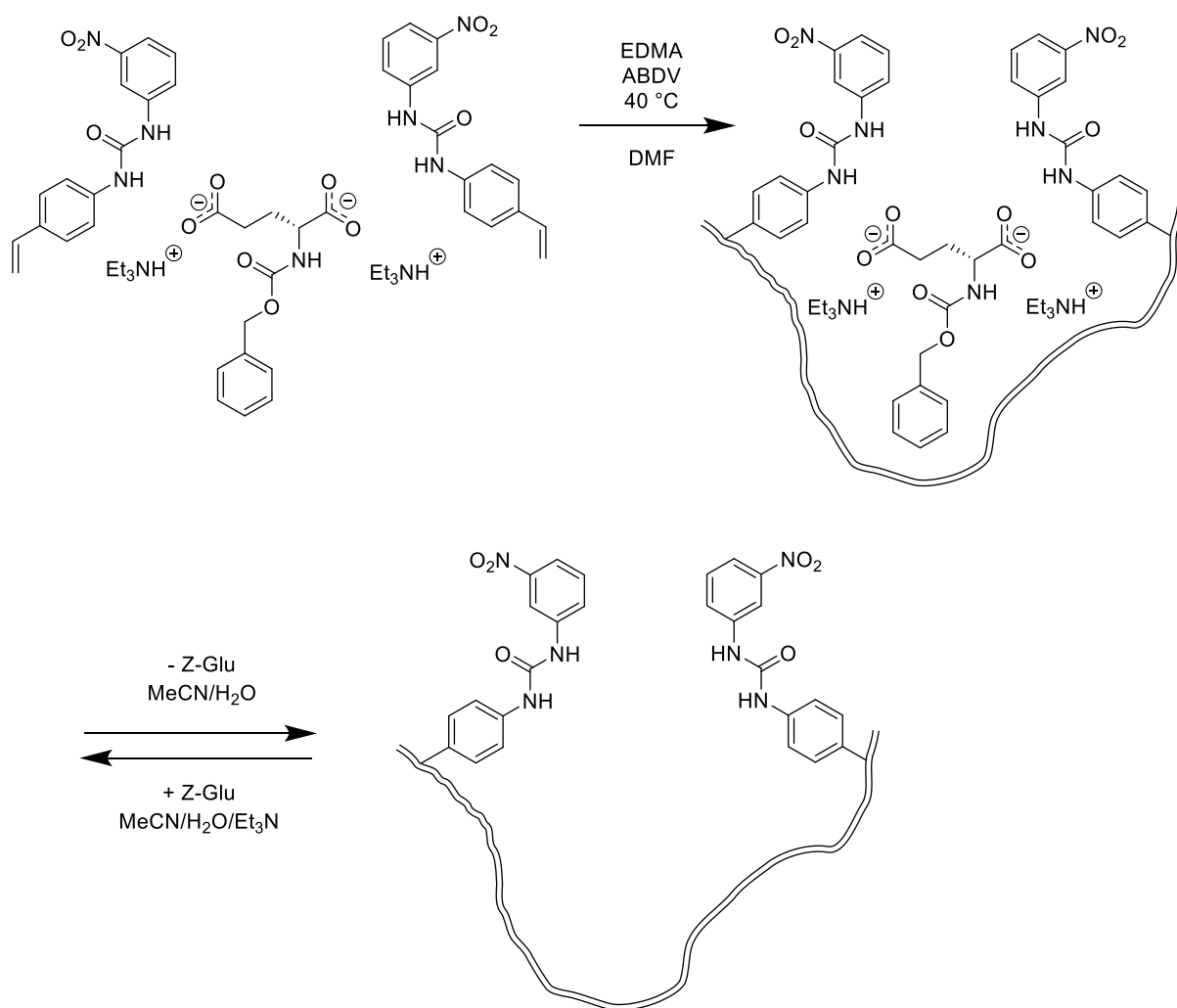


Schéma 5: Otištění Z-D-glukosy za využití hostitelského monomeru na bázi močoviny, ethyleglykol dimethakrylátu (EDMA), jakožto síťovacího monomeru a dimethylformamidu (DMF), sloužícího jako rozpouštědlo [16]

1.2.1.4. Možnosti využití MIP

Zvláštní vlastnosti MIP z nich učinily velmi zajímavý nástroj pro různé oblasti použití, včetně separačních věd a čistících metod, senzorů a biosenzorů, katalýzy a dodávání léčiv.^[13] Chromatografie s molekulárním imprintingem je jednou z nejrozsáhleji studovaných aplikačních oblastí MIP, které jsou velmi vhodné pro chromatografickou separaci, což umožňuje přípravu nosičů na míru s předem stanovenou selektivitou. Zvyšující se poptávka po opticky čistých sloučeninách činí MIPs pro chirální separace další důležitou aplikaci zejména pro získání racemického rozlišení léčiv. MIPs se také objevily jako nové selektivní sorbenty pro postupy využívající extrakce tuhou fází, které umožňují nejen prekoncentraci a čištění vzorků, ale také selektivní extrakci cílových analytů ze složitých matic.^[17]

V poslední době několik studií prokázalo, že MIP mohou sloužit také jako umělé vazebné napodobeniny přirozených protilátek a mohou být použity jako rozpoznávací prvky v analýzách typu imunitestů. K dnešnímu dni byly MIP úspěšně používány s různými typy snímačů a bylo použito několik metod k dosažení úzké integrace transdukční platformy s polymerem. Byly rovněž provedeny rozsáhlé výzkumy týkající se použití MIPs jako aktivních materiálů pro katalýzu některých reakcí. MIP s katalytickými vlastnostmi lze považovat za napodobeniny přírodních enzymů a aplikovat je v enzymové katalýze. Neexistuje totiž žádný přirozený enzym, který by mohl katalyzovat takové reakce, jako je například alkylace fenolu, přesto vyvinuté syntetické katalyzátory mají mnoho charakteristik enzymu, včetně reakce blízké fyziologickým podmínkám, enzymová kinetika Michaelis-Mentenové a mimořádné substrátové specificity.^[17,18]

A konečně oblastí, která představuje největší výzvu pro postupy MIPs, je terapeutická a lékařská terapie. Schopnost MIPs vázat bioaktivní molekuly ve specifických podmínkách činí z molekulárního otiskování technologii s obrovským potenciálem pro vytváření vhodných lékových forem.^[17]

Do lékařské terapie můžeme uvést i řízení transportu léčiv, což je široce studovaný obor, jehož principem je dodávání léčiva k cíli a kontrolování jeho účinnosti. Kromě toho je nutné některé léky podávat po delší dobu (řízené uvolňování), aby bylo dosaženo maximálního terapeutického účinku u léků, které jsou po podání rychle metabolizovány a vylučovány z těla. Je také všeobecně známo, že nižší nebo vyšší dávka léku může způsobit škodlivé účinky, jako je toxicita nebo vůbec žádné účinky. Proto, aby bylo dosaženo kontrolovaného uvolňování a maximálního terapeutického přínosu léčiv, je integrován a využíván synergický efekt různých přístupů zahrnujících farmaceutickou vědu, polymerní chemii a molekulární biologii.^[19]

1.2.1.5. Využití MIPs pro odstranění estrogenních sloučenin z vodních zdrojů

Selektivní odstranění estrogenních sloučenin je slibnou myšlenkou pro odstranění estrogenních účinků, protože estrogenními účinky přispívají především estrogenní sloučeniny s odlišnou molekulární strukturou, fenolickým benzenovým kruhem. Selektivní adsorpce estrogenních sloučenin pomocí biologické protilátky a estrogenového receptoru (ER) cílové molekuly byla zkoumána některými výzkumníky. Tato aplikace však měla podstatnou nevýhodu v tom, že regenerace protilátek mohla být problémem, protože aktivita protilátky a/nebo receptoru by byla po několikanásobné regeneraci snížena v důsledku drsných regeneračních podmínek. Stručně řečeno, protilátky a receptory jsou vysoce selektivní, ale postrádají stabilitu. Molekulárně otištěný polymer (MIP), umělý receptor, je nový druh adsorbentu s funkcí selektivní adsorpce molekul s podobnou molekulární strukturou. Použití MIP k odstranění estrogenních sloučenin je založeno na základním principu a to, že jelikož se tyto sloučeniny mohou vázat na přírodní estrogenní receptory, lze MIP, které by mohly být produkovány jako druh ER, použít k jejich vázání v proudu vody a k jejich odstranění, aby se zabránilo jejich ovlivnění organismů. V důsledku toho by MIP mohly být volbou pro selektivní odstranění estrogenních sloučenin, protože: (1) ve srovnání s jinými adsorbenty, jako jsou přírodní protilátky a receptory, je mnohem stabilnější, pokud jde o chemické a mechanické vlastnosti adsorbentů, a (2) většina estrogenních sloučenin obsahuje ve své molekulární struktuře fenolický aromatický kruh, který je nezbytný pro vysoce afinitní vazbu estrogenních sloučenin se specifickými vazebnými místy na ER a/nebo MIP. ^[4]

Bylo prokázáno, že MIP může adsorbovat mnohem více **E2** než **E1** a **EE2** v acetonitrilu, což ukazuje selektivitu MIP na templátové molekuly. Adsorpční kapacita MIP pro **E2** v této studii byla 0,72 $\mu\text{mol/g}$, což je více než 3,5násobek adsorpční kapacity neotištěného polymeru (NIP) pro **E2**. Pro srovnání, Le Noir a kol. (2007) získali adsorpční kapacitu na úrovni pmol/g v toluenu díky velmi nízké počáteční koncentraci **E2** (475,6 fmol E2/ml). ^[4]

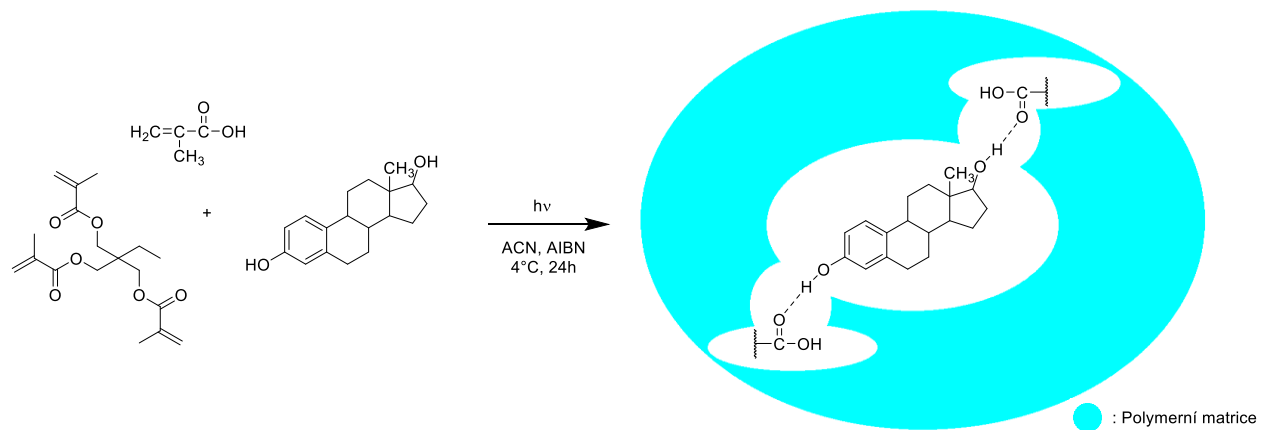


Schéma 6: Syntéza polymeru využitého k odstranění E2 dle [4]

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Chemikálie byly pořízeny od společností Sigma-Aldrich, Acros Organics, TCI, Alfa Aesar, Fischer Chemical, Lachema, Rapp Polymere nebo Penta a používány bez dalšího čištění.

Ke stanovení koncentrace estrogenů byl použit elektrochemický analyzátor EP100VA od firmy HCS servis Bratislava a koncentrační článek, který se skládal z indikační borem dopované diamantové elektrody, referentní chloridostříbrné elektrody a pomocné platinové elektrody.

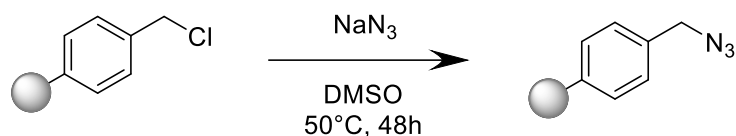
Spektra v infračervené oblasti byla měřena na přístroji FT-IR Nicolet iS50, technikou zeslabené úplné reflektance (ATR) na jednodrazovém diamantovém krystalu, ve střední infračervené oblasti, v rozsahu vlnočtů $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ se spektrálním rozlišením 4 cm^{-1} .

NMR spektra byla měřena při laboratorní teplotě na přístroji Bruker AVANCE III 400 pracujícím při $400,13 \text{ MHz}$ (^1H) a $100,62 \text{ MHz}$ (^{13}C). ^1H NMR spektra byla pro roztoky látek v CDCl_3 kalibrována na tetramethylsilan ($\delta 0,00 \text{ ppm}$). ^{13}C NMR spektra byla kalibrována na středový signál multipletu rozpouštědla ($\delta 77,16 \text{ ppm}$ v CDCl_3). ^{13}C NMR spektra byla měřena s protonovým dekaplingem.

Elementární analýzy byly provedeny na přístroji Flash 2000 CHNS Analyzer (ThermoFisher Scientific).

2.1. Příprava substrátu pro sorpci estrogenů

2.1.1. Příprava 4-azidomethyl styrenu (P1)



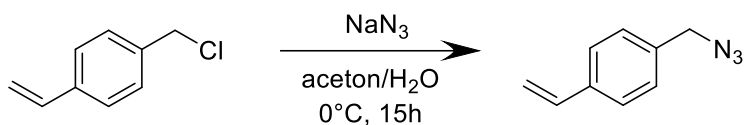
Adaptací předpisu [20] byla do 25 ml baňky předložena Merrifieldova pryskyřice (0,21 mmol Cl, 0,5 g), NaN₃ (7,69 mmol, 0,5 g) a DMSO (5 ml). Baňka s reakční směsí opatřená zátkou a míchadlem menší velikosti, byla umístěna do pískové lázně na magnetickou míchačku, kde docházelo k míchání směsi po dobu 48 hodin při teplotě 70 °C.

Po uplynutí reakční doby byla reakční směs zfiltrována na fritě zrnitosti 4 a promyta pomocí demineralizované vody (3×15 ml), MeOH (3×15 ml), THF (3×15 ml), a nakonec pomocí DCM (5×15 ml). Produkt byl ponechán volně k dosušení na vzduchu ve fritě přiklopené filtračním papírem. Bylo získáno 482,5 mg produktu. [20]

Elementární analýza: 81,74 % C, 6,89 % H, 11,07 % N, <0,3 % Cl

FT-IR (ATR; cm⁻¹): 3084, 3060, 3025, 2921, 2848, 2092, 697.

2.1.2. Příprava 4-vinylbenzyl azidu



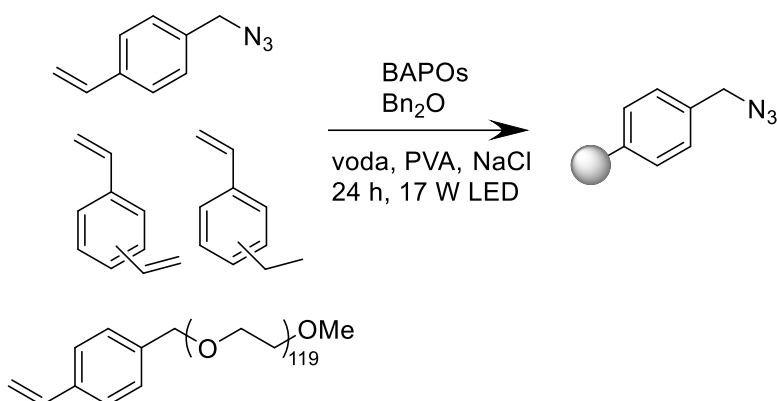
Adaptací předpisu [21] byl do 250 ml baňky předložen 4-vinylbenzyl chlorid (19,7 mmol, 2,78 ml) k němu byl přidán roztok acetonu ve vodě (70 ml, 85,5 % v/v), výsledný roztok byl zchlazen na ledové lázni na 0 °C. Následně byl ke směsi v několika porcích přidán roztok NaN_3 (98,3 mmol, 6,39 g) rozpuštěný v demineralizované vodě (7 ml). Vznikající žlutá směs se ponechala zazátkovaná míchat za laboratorní teploty na elektromagnetickém míchadle.

Po 15 h bylo k směsi přidáno 20 ml ledové vody a byla provedena extrakce reakční směsi pomocí EA (4×30 ml). Vzniklá organická vrstva byla vysušena pomocí Na_2SO_4 , přefiltrována do baňky pomocí skládaného filtru, odpařena na vakuové odparce a vzniklý čistý produkt byl uskladněn do mrazáku. Byl získáno produkt ve formě žlutého oleje (2,48 g, 15,6 mmol, 83 %). NMR v souladu s literaturou. [21]

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 7.45 – 7.33 (m, 2H), 7.24 – 7.21 (m, 2H), 6.69 (dd, $J = 17.6, 10.9$ Hz, 1H), 5.74 (dd, $J = 17.6, 0.9$ Hz, 1H), 5.25 (dd, $J = 10.9, 0.9$ Hz, 1H), 4.26 (s, 2H).

$^{13}\text{C NMR}$ (101 MHz, CDCl_3) δ ppm: 137.62, 136.24, 134.83, 128.46, 126.64, 114.43, 54.48.

2.1.2.1. Polymerace 4-vinylbenzyl azidu (P2)



Nejprve byla připravena separační fáze, která se skládala z PVA (1,6 g) NaCl (15 g) a demineralizované vody (400 ml). Ta byla zahřívána do vzniku homogenního roztoku a následně

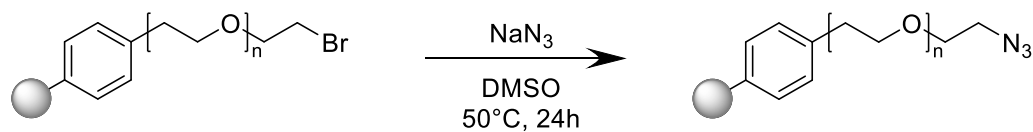
zfiltrována do vícedrdlé baňky a probublávána argonem. Do 25 ml baňky navážen methoxypolyethylenglykol-4-vinylbenzyl éter ($M_w = 5000$ g/mol; 119 mg), který byl rozpuštěn v Bn_2O (5 ml). Po rozpuštění byl přidán DVB (50% roztok 1,3- a 1,4-isomeru v ethylstyrenech; 1,25 g) a 4-vinylbenzylazid (1 g). Jako poslední byl ke směsi přidán fenylobis(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphin oxid (100 mg). Výsledná směs byla pomocí injekční stříkačky nadávkována do vícedrdlé baňky a vzniklá směs byla ozařována po dobu 24 h 17.2 W bílou LED diodou.

Po uplynutí reakční doby byl produkt filtrován na fritě zrnitosti 4 a promýván nejprve pomocí demineralizované vody (2×20 ml) a THF (2×20 ml), poté pomocí EtOH (2×20 ml) a DCM (2×20 ml). Následně byl produkt převeden do patry opatřené fritou a byla provedena extrakce na Soxhletově extraktoru pomocí směsi THF/ H_2O (4:1) Bylo získáno 1,72 g produktu.
[21]

Elementární analýza: 77,56 % C, 7,09 % H, 9,56 % N

FT-IR (ATR; cm^{-1}): 3091, 3053, 3024, 2964, 2920, 2875, 2852, 2092, 796, 706.

2.1.2. Příprava TENTAGELU s azidovou funkční skupinou (P3)



TENTAGEL S–Br (400 mg) byl společně s NaN_3 navážen do 25 ml baňky a ke směsi bylo pomocí injekční stříkačky přidán DMSO (5 ml). Baňka opatřená plastovou zátkou a míchadlem menší velikosti byla usazena do lázně s pískem na magnetickém míchadle a reakční směs byla míchána při teplotě 50°C .

Po 24 h byla směs přefiltrována přes fritu zrnitosti 4 a promývána nejprve pomocí MeOH (3×15 ml), následně pomocí demineralizované vody (3×15 ml), THF (3×15 ml), DCM (3×15 ml), a nakonec opět pomocí MeOH. Produkt byl dosušen v sušárně při teplotě 50°C . Bylo získáno 316 mg produktu.

Elementární analýza: 64,20 % C, 8,88 % H, 0,93 % N, 1,51 % Br

FT-IR (ATR; cm^{-1}): 3084, 3060, 3028, 2878, 2100, 1099, 699.

2.2. Obecný postup přípravy vzorků pro měření

Do vialky byl odvážen polymer **P1-P3**, zdroj Cu a případně další aditiva. Následně byla vialka opatřena malým míchadlem a byl přidán 1 ml 1×10^{-3} M roztok **EE2** v THF. Vialky byly umístěny do pískové lázně na magnetické míchačce a vzorky byly míchány při zvolené teplotě.

Po uplynutí stanovené doby byl obsah vialky přefiltrován do 5 ml odměrných baněk přes skleněnou Pasteurovu pipetu, ve které byla upěchována vata sloužící jako filtr. Baňky byly doplněny po rysku pomocí ACN, v případě přidavku báze do sorpčního experimentu byly baňky opatřeny míchadlem a byl přidán Amberlite (30 mg) a opět byly umístěny na magnetické míchadlo alespoň na 24 h.

Výsledné vzorky byly následně elektrochemicky analyzovány. ^[22]

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

Jak vyplývá ze rešeršní části práce kontaminace vod estrogenními látkami je značným problémem moderní doby a vede k hledání nových analytických metod pro sledování obsahu estrogenů ve složkách životního prostředí. Ve spolupracující elektrochemické skupině se zabývají vývojem voltametrického stanovení estrogenů, kdy většina těchto látek poskytuje prakticky shodnou odezvu, a není tak možné v rámci stanovení rozlišit o jakou látku se přesně jedná. Záměrem je vytvořit sorbent elektivní na **EE2**, kdy bude možné stanovit sumární obsah estrogenů ve vzorku, následně z analytu selektivně odstranit **EE2** a z rozdílu určit jeho obsah ve vzorku. Aby byla realizace takového záměru možná, je nejprve nezbytné vyvinout selektivní sorpční materiál pro sorpci **EE2** z jeho směsi s dalšími látkami estrogenní povahy.

3.1. Návrh selektivního sorpčního materiálu pro **EE2**

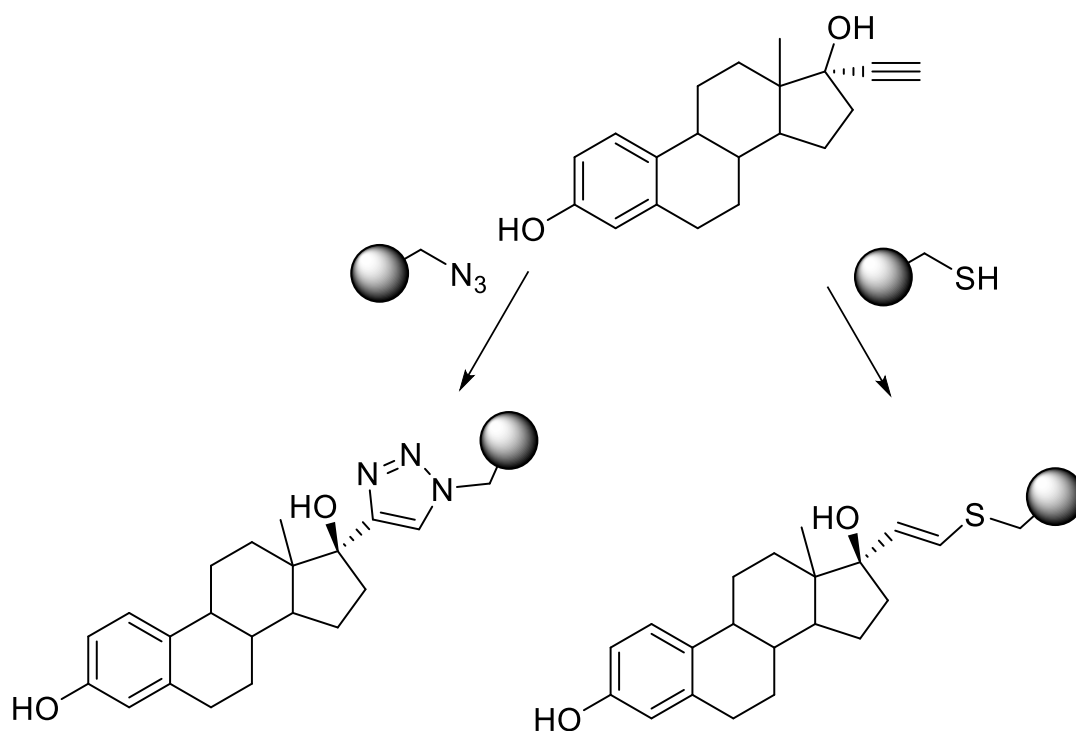


Schéma 7: Vazba sorpčních materiálů s rozdílnými funkčními skupinami na **EE2**

Z hlediska chemické struktury je největší odlišností **EE2** od ostatních estrogenních látek přítomnost ethinylové skupiny, a ta se tedy nabízí jako možná funkční skupina, přes kterou by bylo možné **EE2** navázat na polymerní nosič, a tím jej odstranit z roztoku. Ze selektivních reakcí trojných vazeb se pak nabízí Huisgenova azido-alkynová [3+2] cykloadiční reakce, nebo například thiol-ynová klik reakce. Navržené způsoby odstranění **EE2** z roztoku pak vyžadují mít k dispozici polymerní materiál opatřený vhodnými funkčními skupinami – azidovou nebo thiolovou. V literatuře je popsána celá řada reakcí **EE2** s azidy, zároveň jsou polymerní azidy

často využívanými činidly například pro imobilizaci katalyzátorů [23]. Pro přípravu sorpčního materiálu pro **EE2** byla tedy zvolena příprava polymerních nosičů nesoucích azidovou funkční skupinu.

3.2. Příprava a charakterizace polymerních materiálů

Jako nejjednodušší polymer nesoucí azidovou funkční skupinu byl vybrán azidomethylpolystyren (**P1**), který byl připraven nukleofilní substitucí Merrifieldovy pryskyřice (chlormethylpolystyren; 2,67 mmol Cl/g polymeru) pomocí azidu sodného.

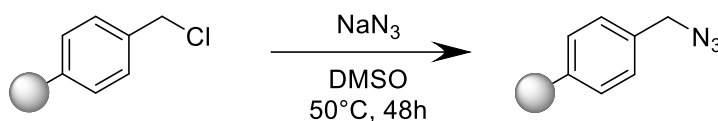
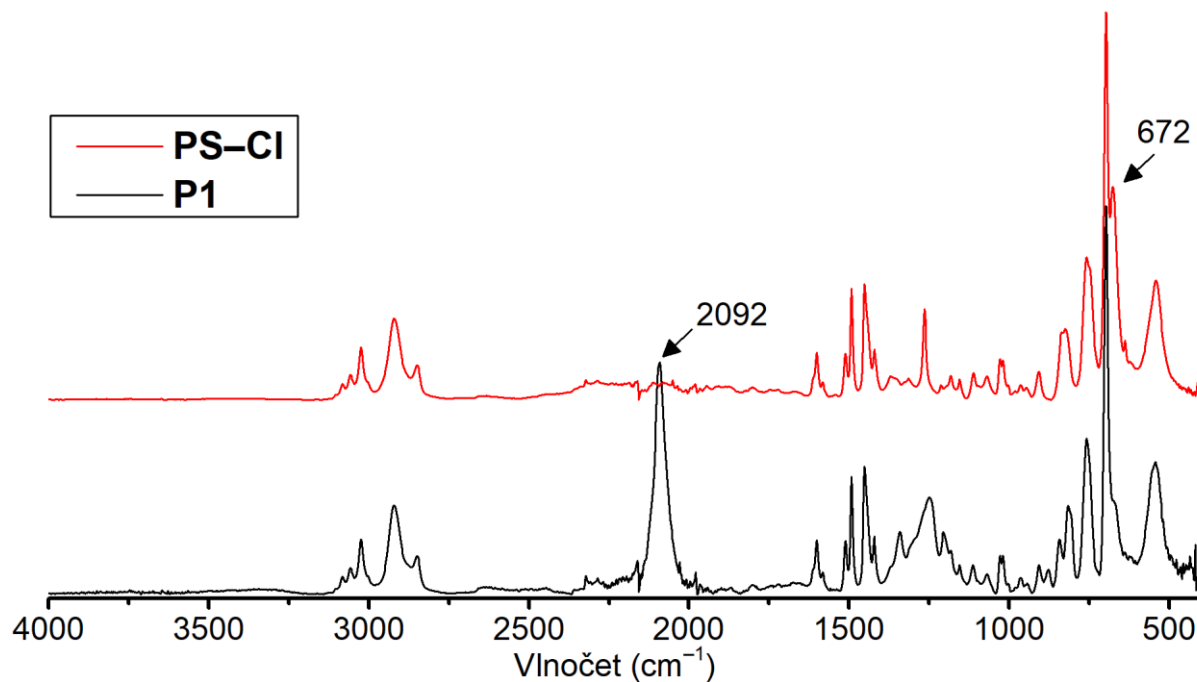
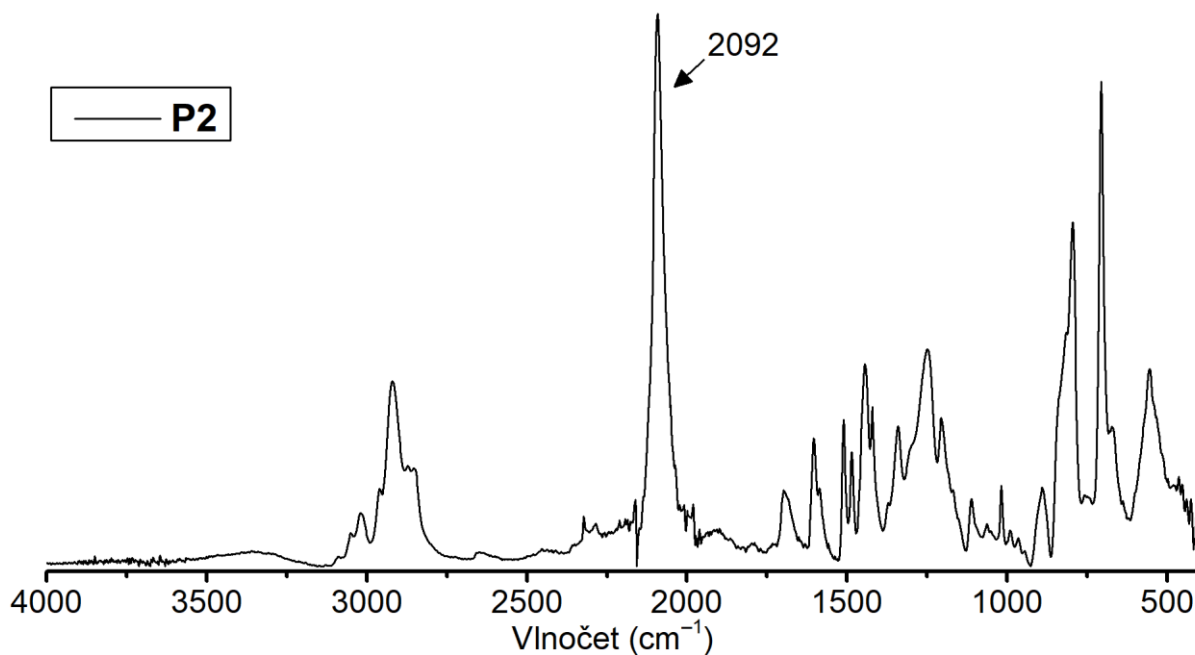


Schéma 8: Nukleofilní substituce chloru v Merrifieldově pryskyřici za azidovou skupinu

O proběhnutí reakce svědčí elementární analýza, kde ve výsledném **P1** bylo nalezeno <0,3 % Cl a 11,07 % N, což odpovídá obsahu funkčních skupin 2,64 mmol N₃/g polymeru. Další potvrzení poskytuje infračervená spektroskopie (Obr. 2), kdy porovnáním spektra **P1** se spektrem výchozího **PS-Cl** zaniká pás 672 cm⁻¹ odpovídající valenční C-Cl vibraci a objevuje se velice intenzivní pás 2092 cm⁻¹ odpovídající valenční vibraci azidových skupin.



Obrázek 2: FT-IR spektra Merrifieldovy pryskyřice (**PS-Cl**) a **P1**



Obrázek 3: FT-IR spektrum P2

Poslední variantu představuje využití graftového kopolymeru typu PS/PEG TentaGel S Br (0,26 mmol Br/g polymeru), kde byl atom bromu substituován azidovou skupinou (**P3**).

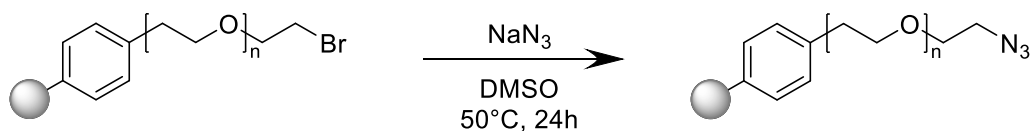
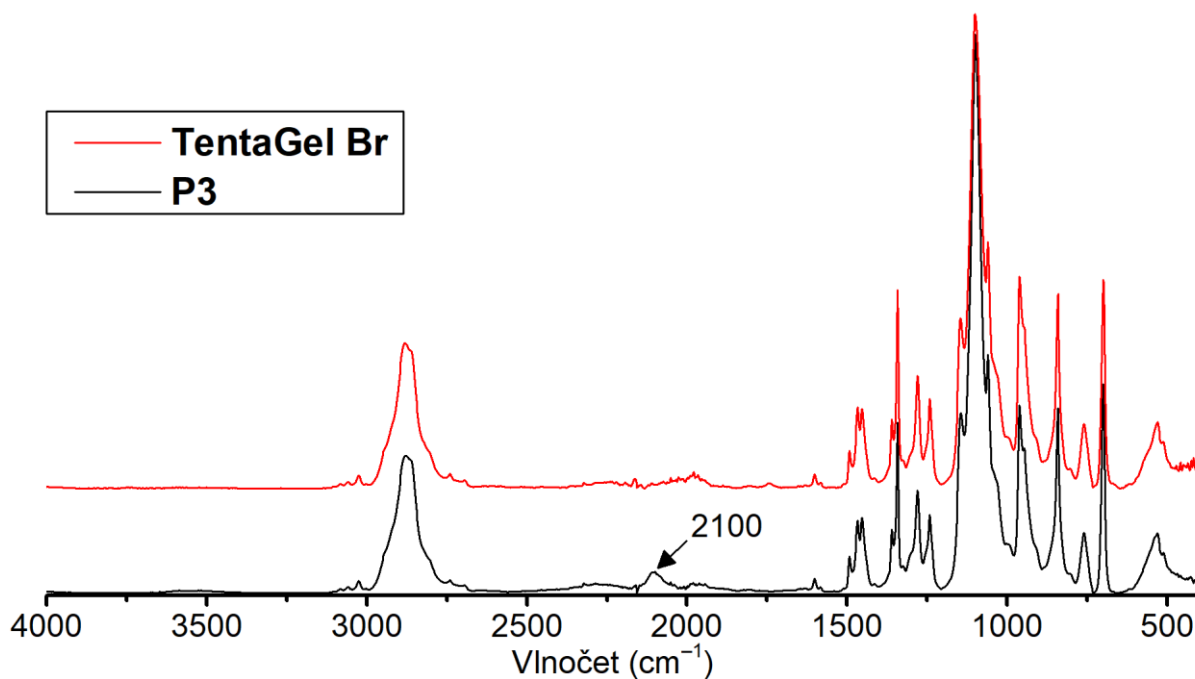


Schéma 11: Nukleofilní substituce Br v molekule TentaGel S Br za skupinu azidovou

Elementární analýza, výsledného **P3** prokázala obsah 0,93 % N (0,22 mmol N₃/g polymeru) a zbytkových 1,51 % Br, což může být způsobeno obsahem bromidů ve vzorku. Další potvrzení struktury poskytuje infračervená spektroskopie (Obr. 4), kdy v porovnání se spektrem výchozího **PS-Br** se objevuje pás 2100 cm⁻¹ odpovídající valenční vibraci azidových skupin.

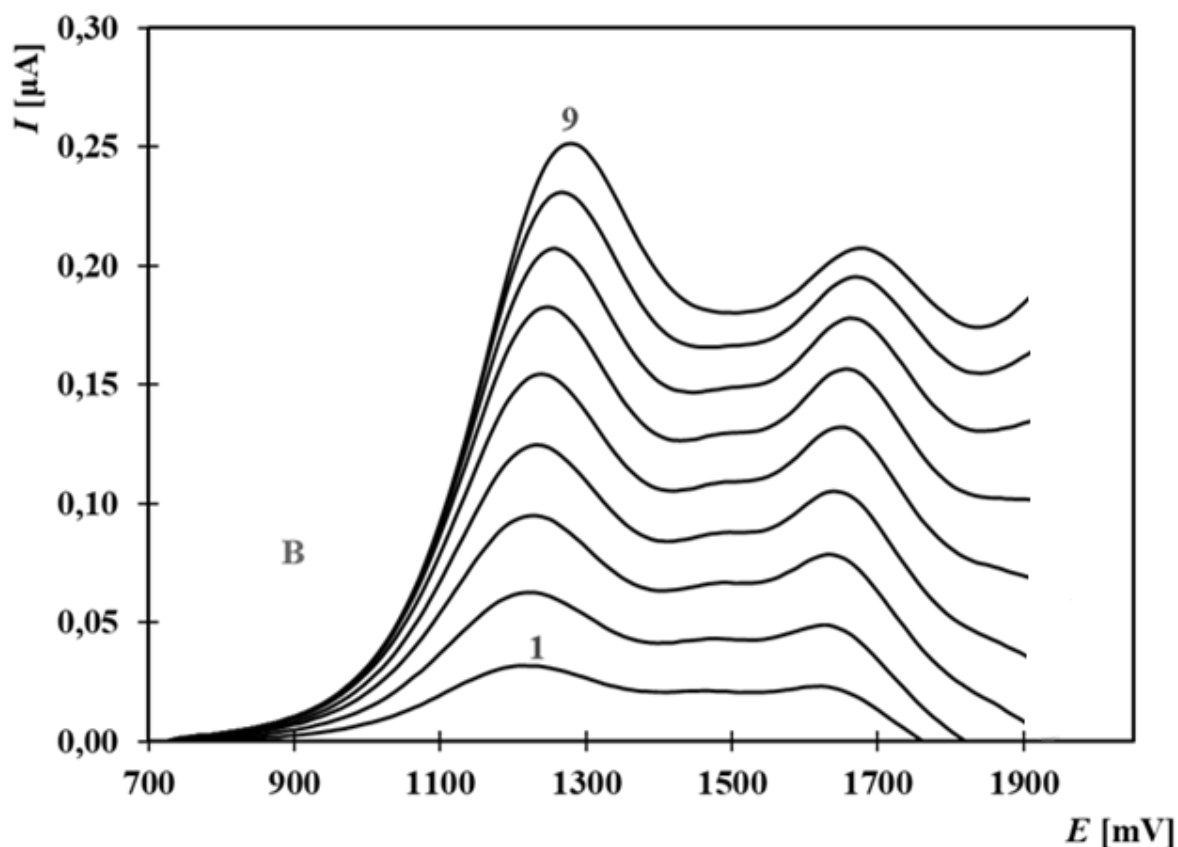


Obrázek 4: FT-IR spektra TentaGel Br a P3

3.3. Testování sorpčních vlastností polymerů P1-P3

Po přípravě polymerů následovalo studium jejich sorpčních vlastností. V našem případě předpokládáme reakci mezi trojnou vazbou **EE2** a polymerním azidem **P1-P3** jako chemisorpce ve smyslu Huisgenova [3+2] cykloadiční reakce. Ta může probíhat i nekatalyzovaně [25], avšak typicky bývá katalyzována měďnými ionty, které jsou generovány *in situ* redukcí měďnatých iontů pomocí askorbátu sodného, případně použitím CuI.

Vlastní experiment byl postaven tak, že byl připraven modelový zásobní roztok **EE2** v předestilovaném THF (pro odstranění stabilizátoru, který by rušil následné analytické stanovení) o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ M. THF byl zvolen jako modelové rozpouštědlo ve kterém všechny studované polymery vykazují dobrou botnavost a zároveň je typicky popsán jako rozpouštědlo pro Huisgenovu reakci [26]. Do vialky bylo odváženo příslušné množství polymeru **P1-P3**, byl přidán zdroj Cu^+ , 1 ml roztoku **EE2**, případná aditiva a vialka byla ponechána míchat při teplotě 25 nebo 50 °C. Po referenčním čase, který byl ve většině případů 24 h, byla reakční směs zfiltrována do odměrné baňky a důkladně promyta acetonitrilem a doplněna po rysku. V případě použití DBU byl do odměrné baňky následně přidán kyselý katex pro zachycení DBU, aby nedocházelo k rušení stanovení. Vlastní analytické stanovení bylo provedeno ve spolupracující elektrochemické skupině, a to metodou standardního přidavku, odečtením proudu při napětí 1250 mV.



Obrázek 5: Modelový voltamogram EE2, převzato a upraveno z [22]

Získané výsledky jsou sumarizovány v Tabulce 1. V případě použití nasyceného roztoku CuSO_4 v kombinaci s askorbátem sodným jako zdroje Cu^+ a při použití 50 mg **P1/2** v roztoku zůstává přibližně 60 % **EE2** (Tab. 1; #1,3) zvýšení množství na 75 mg vede k doporučenému zlepšení na 44 % **EE2** (Tab. 1; #4). Jako zásadní se ukázal být přídavek báze DBU (Tab. 1; #2,5,6) kdy bylo možné při navážce 75 mg **P2** dosáhnout méně než 5 % zbytkového **EE2**. V případě použití nasyceného roztoku $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ v kombinaci s askorbátem sodným jako zdroje Cu^+ při použití 50 mg polymeru **P1** nebo **P2** zůstává přibližně 55 % **EE2** v roztoku (Tab. 1; #7,9). Zvýšení množství polymeru na 75 mg vede k doporučenému zlepšení, kdy zbytkové **EE2** klesá na 33 % (Tab. 1; #10). Jako zásadní se opět ukázal být přídavek báze DBU (Tab. 1; #8,11,12), kdy bylo možné při navážce 75 mg polymeru **P2** dosáhnout méně než 5 % zbytkového **EE2**.

Při použití CuI jako měďné soli potvrdilo nezbytnost přídavku DBU jako báze a bylo možné dosáhnout méně než 5 % zbytkového **EE2** při využití již 50 mg **P1** (Tab. 1; #17), případně při prodloužení reakční doby na 72 h pouze 25 mg **P1** (Tab. 1; #16). Polymer **P2** se jevil jako méně aktivní a pro dosažení stejného výsledku bylo potřeba jej použít 100 mg **P2**

(Tab. 1; #24), případně bylo možné prodloužit čas ze 24 na 72 h (Tab. 1; #25) a postačovalo pak použít 50 mg **P2** pro dosažení zbytkových 6 % **EE2** v roztoku. Z těchto výsledků vyplývá že CuI v kombinaci s DBU je nejvhodnějším reakčním systémem po dobu 24 h při 50 °C.

Vzhledem k velmi nízkému obsahu azidových funkčních skupin v polymeru **P3** s ním byl proveden experiment pouze za optimalizovaných podmínek, kdy však po reakci se 300 mg **P3** zůstává v roztoku 69 % **EE2**.

Tabulka 1 Přehled chemisorpčních experimentů **P1-P3** a **EE2**

#	Polymer	Množství (mg)	Zdroj Cu ⁺	Aditivum	Doba (h)	Teplota (°C)	Zbývá EE2 v roztoku (%)
1	P1	50	3 kapky nasyc. roztoku CuSO ₄ + NaAsc	–	24	50	64
2	P1	50		DBU			29
3	P2	50		–			61
4	P2	75		–			44
5	P2	50		DBU			43
6	P2	75		DBU			<5
7	P1	50	3 kapky nasyc. roztoku Cu(OAc) ₂ + NaAsc	–	24	50	50
8	P1	50		DBU			14
9	P2	50		–			56
10	P2	75		–			33
11	P2	50		DBU			10
12	P2	75		DBU			<5
13	P1	50	5 mg CuI	–	24	25	62
14	P1	50		DBU	24		15
15	P1	50			72	10	
16	P1	25			72	<5	
17	P1	50			24	<5	
18	P1	100			24	<5	
19	P1	50			24	<5	
20	P2	50			24	33	
21	P2	50			24	14	
22	P2	75			24	14	
23	P2	50			24	14	
24	P2	100			24	<5	
25	P2	50			72	6	
26	P2	50			–	24	25
27	P2	50		DBU	24	46	
28	P3	300	–	DBU	24	50	69

Z výsledků je patrné že za optimalizovaných podmínek má nejvyšší schopnost vázat **EE2** polymer **P1**. Polymer **P2**, vykázal o něco nižší efektivitu a vyžaduje dvojnásobnou navážku oproti **P1**, důvodem může být příliš vysoká míra zesílení (30 %), kdy nižší zesílení by mohlo mít pozitivní vliv na rychlost difúze v polymerní matrici. Polymer **P3** se ukázal jako zcela nevhodný, pravděpodobně díky velmi nízkému obsahu azidových skupin.

ZÁVĚR

V rámci této práce byla provedena literární rešerše zaměřená na selektivní sorpční materiály pro estrogenní látky. Cílem bylo vyvinout selektivní sorpční materiál pro ethinylestradiol (**EE2**), který by umožnil stanovení jeho obsahu ve vzorcích s estrogenními látkami. Na základě chemické struktury **EE2** byla zvolena Huisgenova azido-alkynová [3+2] cykloadiční reakce jako klíčová reakce pro selektivní navázání **EE2** na polymerní nosič.

Byly připraveny tři různé typy polymerů nesoucích azidové funkční skupiny: dva připravené modifikací komerčně dostupných nosičů – azidomethylpolystyren (**P1**) z Merrifieldovy pryskyřice a graftový kopolymer typu PS/PEG (**P3**) – a jeden připravený přímou kopolymerací 4-vinylbenzyl azidu s divinylbenzenem (**P2**). Příprava a charakterizace těchto polymerů byly provedeny pomocí elementární analýzy a infračervené spektroskopie, které potvrdily přítomnost azidových skupin v připravených polymerech.

Z výsledků je patrné, že CuI je efektivnějším zdrojem Cu^+ než kombinace měďnatých solí a askorbátu sodného, a že přídavek DBU je nezbytný pro úspěšnou sorpci **EE2**. Testování sorpčních vlastností polymerů **P1-P3** ukázalo, že nejvyšší schopnost vázat **EE2** má polymer **P1**, který při použití CuI jako katalyzátoru a přídavku DBU jako báze dosáhl zbytkového obsahu **EE2** v roztoku pod 5 % při navážce 50 mg a reakční době 24 hodin při 50 °C. Polymer **P2** vykázal o něco nižší efektivitu a vyžadoval za daných podmínek dvojnásobnou navážku oproti **P1**, což může být způsobeno vysokou mírou zesítnění, která snižuje rychlost difúze v polymerní matici. Polymer **P3** se ukázal jako zcela nevhodný pro sorpci **EE2**, pravděpodobně kvůli velmi nízkému obsahu azidových skupin.

Tyto výsledky představují důležitý krok směrem k praktické aplikaci vyvinutých sorbentů, ale je zde ještě mnoho práce k optimalizaci procesu pro použití ve vodném prostředí a snížení potřebného množství mědi, případně pro provádění reakce bez katalyzátoru. Ačkoli jsme dosáhli významného pokroku, další výzkum a vývoj jsou nezbytné k dosažení plně funkčního a prakticky využitelného systému pro odstraňování estrogenů z vodních zdrojů.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] CAJTHAML, Tomáš; KŘESINOVÁ, Zdena; SVOBODOVÁ, Kateřina; SIGLER, Karel; ŘEZANKA, Tomáš. Microbial transformation of synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol. *Environmental Pollution*. **2009**, 157 (12), 3325–3335. DOI: 10.1016/j.envpol.2009.06.027.
- [2] BILAL, Muhammad; BARCELÓ Damià; IQBAL, Hafiz Muhammad Nasir. Occurrence, environmental fate, ecological issues, and redefining of endocrine disruptive estrogens in water resources. *Science of The Total Environment*. **2021**, 800, 149635. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.149635.
- [3] HARTMANN, Jens; BEYER, Reinhard; HARM, Stephan. Effective Removal of Estrogens from Drinking Water and Wastewater by Adsorption Technology. *Environmental Processes*. **2014**, 1, 87–94. DOI: 10.1007/s40710-014-0005-y.
- [4] ZHANG, Zhongbo; JIANGYONG, Hu. Selective removal of estrogenic compounds by molecular imprinted polymer (MIP). *Water Research*. **2008**, 42 (15), 4101–4108. DOI: 10.1016/j.watres.2008.07.006.
- [5] ADEEL, Muhammad; SONG, Xiaoming; WANG, Yuanyuan; FRANCIS, Dennis; YANG, Yuesuo. Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. *Environment International*. **2017**, 99, 107–119. DOI: 10.1016/j.envint.2016.12.010.
- [6] PALMA, Tânia Luz; SHYLOVA, Anastasiia; COSTA, Maria Clara. Isolation and characterization of bacteria from activated sludge capable of degrading 17 α -ethinylestradiol, a contaminant of high environmental concern. *Microbiology*. **2021**, 167 (4). DOI: 10.1099/mic.0.001038.
- [7] YU, Weiwei; DU, Banghao; YANG, Lun; ZHANG, Zhi; YANG, Chun; YUAN, Shaochun; ZHANG, Minne. Occurrence, sorption, and transformation of free and conjugated natural steroid estrogens in the environment. *Environmental Science and Pollution Research*. **2019**, 26, 9443–9468. DOI: 10.1007/s11356-019-04402-z.
- [8] MAGALHÃES LAZARI, Maria Fatima; GAMEIRO LUCAS, Thais Fabiana; YASUHARA, Fabiana; OLIVEIRA GOMES, Gisele Renata; SIU, Erica Rosanna; ROYER, Carine; FERREIRA FERNANDES, Sheilla Alessandra; PORTO, Catarina Segreti. Estrogen receptors and function in the male reproductive system. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. **2009**, 53 (8), 923–933. DOI: 10.1590/S0004-27302009000800005.
- [9] STANCZYK, Frank Z.; WINER, Sharon A.; FOIDART, Jean-Michel; ARCHER, David Fitzgerald. Comparison of estrogenic components used for hormonal contraception. *Contraception*. **2024**, 130, 110310. DOI: 10.1016/j.contraception.2023.110310.

- [10] SHUKLA, Akshara; JAMWAL, Rohitash; BALA, Kumud. ADVERSE EFFECT OF COMBINED ORAL CONTRACEPTIVE PILLS. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2017**, *10* (1), 17–21. DOI: 10.22159/ajpcr.2017.v10i1.14565.
- [11] ZHANG, Shicui; DONG, Yuan; CUI, Pengfei. Vitellogenin is an immunocompetent molecule for mother and offspring in fish. *Fish & Shellfish Immunology*. **2015**, *46* (2), 710–715. DOI: 10.1016/j.fsi.2015.08.011.
- [12] LI, Hongyan; ZHANG, Shicui. Functions of Vitellogenin in Eggs. *Results and Problems in Cell Differentiation*. **2017**, *63*, 389–401. DOI: 10.1007/978-3-319-60855-6_17.
- [13] HAUPT, Karsten; LINARES, Ana Valvanuz; BOMPART, Marc; TSE SUM BUI Bernadette. Molecularly Imprinted Polymers. *Topics in Current Chemistry*. **2012**, *325* (1), 1–28. DOI: 10.1007/128_2011_307.
- [14] HE, Suna; ZHANG, Liping; BAI, Shangkun; YANG, Hui; CUI, Zheng; ZHANG, Xiaofei; LI, Yuanpei. Advances of molecularly imprinted polymers (MIP) and the application in drug delivery. *European Polymer Journal*. **2021**, *143*, 110179. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2020.110179.
- [15] KOCÚRIK, Martin; BARTÁČEK, Jan; SVOBODA, Jan; KOLSKÁ, Zdeňka; CHÝLKOVÁ, Jaromíra; SEDLÁK, Miloš. Covalent molecularly imprinted polymers for selective adsorption of plant growth stimulator 1-naphthaleneacetic acid. *Polymer*. **2022**, *256*, 125189. DOI: 10.1016/j.polymer.2022.125189.
- [16] KUPAI, Jozsef; RAZALI, Mayamin; BUYUKTIRYAKI, Sibel; KECILIC, Rustem; SZEKELY, Gyorgy. Long-term stability and reusability of molecularly imprinted polymers. *Polymer Chemistry*. **2017**, *8* (4), 666–673. DOI: 10.1039/c6py01853j.
- [17] VASAPOLLO, Giuseppe; DEL SOLE, Roberta; MERGOLA, Lucia; LAZZOI, Maria Rosaria; SCARDINO, Anna; SCORRANO, Sonia; MELE, Giuseppe. Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective. *International Journal of Molecular Sciences*. **2011**, *12* (9), 5908–5945. DOI: 10.3390/ijms12095908.
- [18] BAHRAMI, Foroogh; ZHAO, Yan. Rational Design and Synthesis of an Artificial Enzyme for SN2 Reactions through Micellar Imprinting. *Organic Letters*. **2024**, *26* (1), 73–77. DOI: 10.1021/acs.orglett.3c03666.
- [19] ZAIDI, Shabi Abbas. Molecular imprinting: A useful approach for drug delivery. *Materials Science for Energy Technologies*. **2020**, *3*, 72–77. DOI: 10.1016/j.mset.2019.10.012.
- [20] SLIMI, Riadh; BEN OTHMAN, Raja; SLEIMI, Noomene; OUERGHUI, Abid; GIRARD, Christian. Synthesis and Characterization of Polystyrene-Supported Piperazine-Substituted

Triazoles by CuAAC and First Evaluation for Metal Ion Extraction. *Polymers*. **2016**, *8* (5), 187. DOI: 10.3390/polym8050187.

[21] PORTA, Riccardo; BENAGLIA, Maurizio; COCCIA, Francesca; COZZI, Franco; PUGLISI, Alessandra. Solid Supported 9-Amino-9-deoxy-epi-quinine as Efficient Organocatalyst for Stereoselective Reactions in Batch and Under Continuous Flow Conditions. *Advanced Synthesis and Catalysis*. **2015**, *357* (2-3), 377–383. DOI: 10.1002/adsc.201400821.

[22] MĚCHOVÁ, Natálie. Vývoj metody pro voltametrické stanovení estrogenů ve vodách. Pardubice, 2024. Diplomová práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Ústav environmentálního a chemického inženýrství. Vedoucí práce prof. Ing. Jaromíra Chýlková, CSc.

[23] POPA, Dana; MARCOS, Rocío; SAYALERO, Sonia; VIDAL-FERRAN, Anton; PERICÀS, Miquel A. Towards Continuous Flow, Highly Enantioselective Allylic Amination: Ligand Design, Optimization and Supporting. *Advanced Synthesis & Catalysis*. **2009**, *351* (10), 1539–1556. DOI: 10.1002/adsc.200900163.

[24] KOCÚRIK, Martin; BARTÁČEK, Jan; SVOBODA, Jan; KOLSKÁ, Zdeňka; CHÝLKOVÁ, Jaromíra; SEDLÁK, Miloš. Covalent molecularly imprinted polymers for selective adsorption of plant growth stimulator 1-naphthaleneacetic acid. *Polymer*. **2022**, *256*, 125189. DOI: 10.1016/j.polymer.2022.125189.

[25] KIRMSE, Wolfgang; HORNER, Leopold. Umsetzung von Phenylacetylen mit Aziden und Diazoverbindungen. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*. **1958**, *614* (1), 1–3. DOI: 10.1002/jlac.19586140102.

[26] ALONSO, Francisco; MOGLIE, Yanina; RADIVOY, Gabriel; YUS, Miguel. Copper nanoparticles in click chemistry: an alternative catalytic system for the cycloaddition of terminal alkynes and azides. *Tetrahedron Letters*. **2009**, *50* (20), 2358–2362. DOI: 10.1016/j.tetlet.2009.02.220.

SEZNAM PŘÍLOH

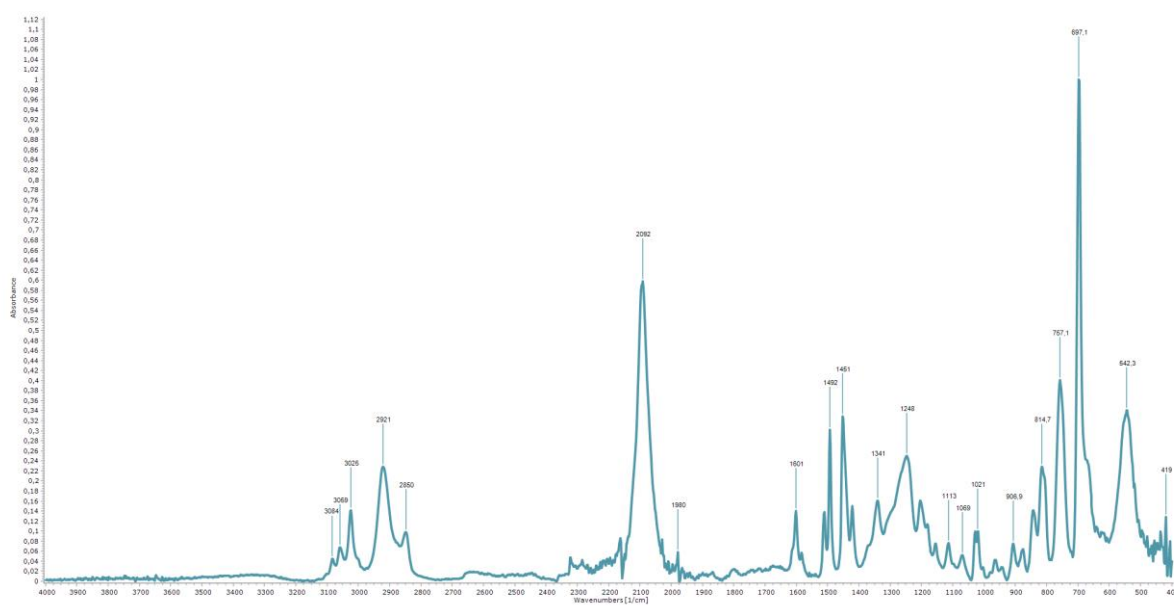
Příloha A: FT-IR spektrum P1

Příloha B: FT-IR spektrum P2

Příloha C: FT-IR spektrum P3

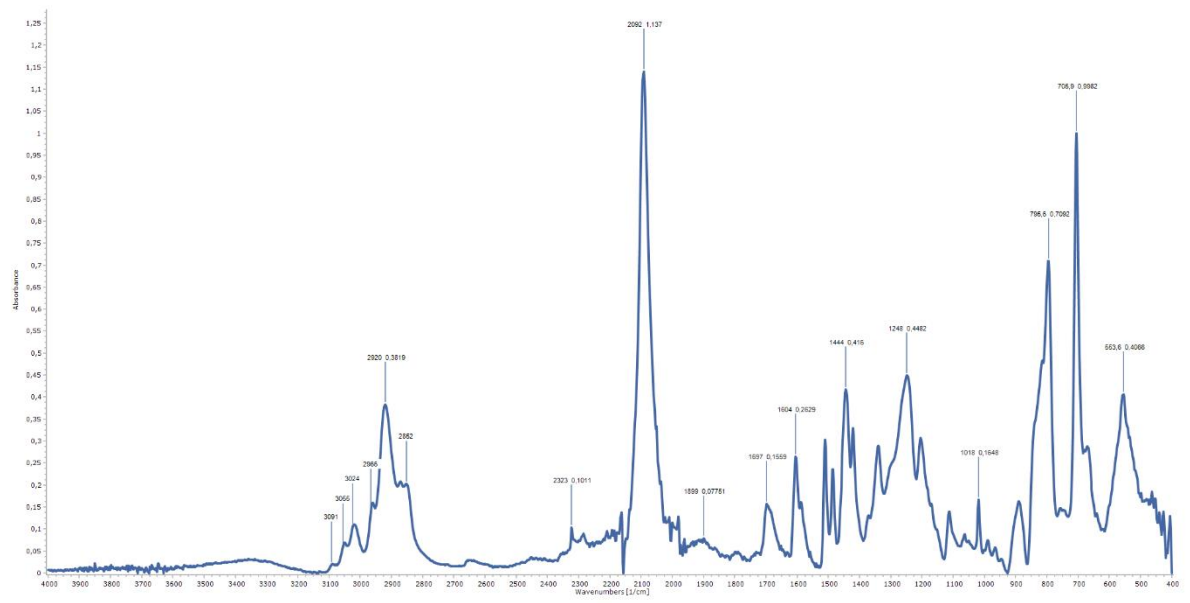
Příloha D: ^1H a ^{13}C NMR spektrum 4-vinylbenzyl azidu

Příloha A: FT-IR spektrum P1



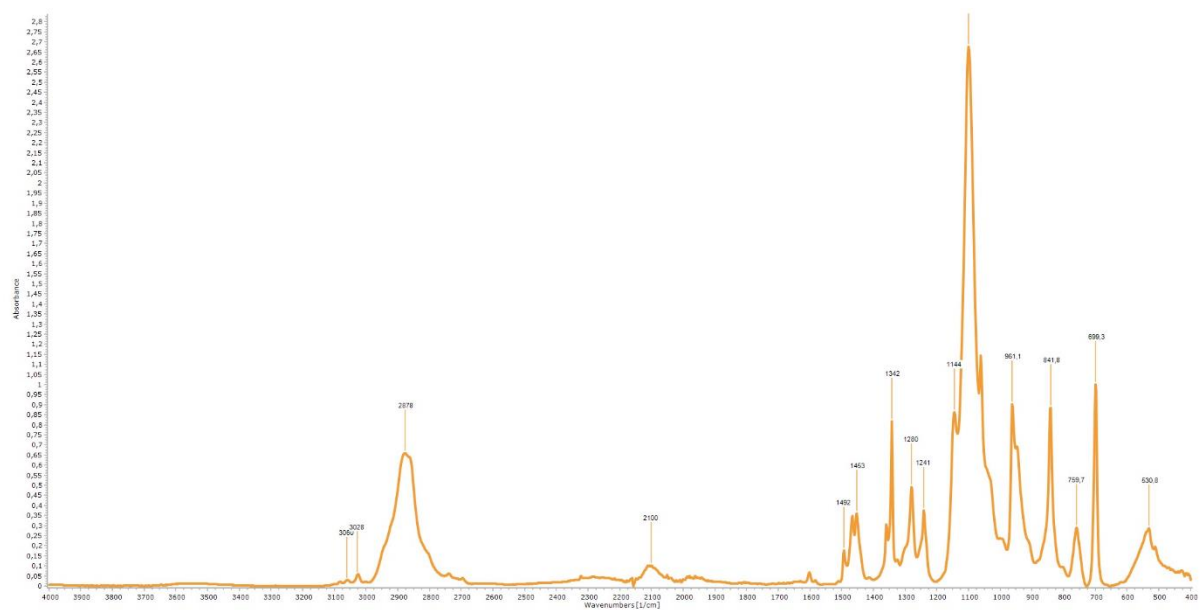
Obrázek 6: FT-IR spektrum P1

Příloha B: FT-IR spektrum P2



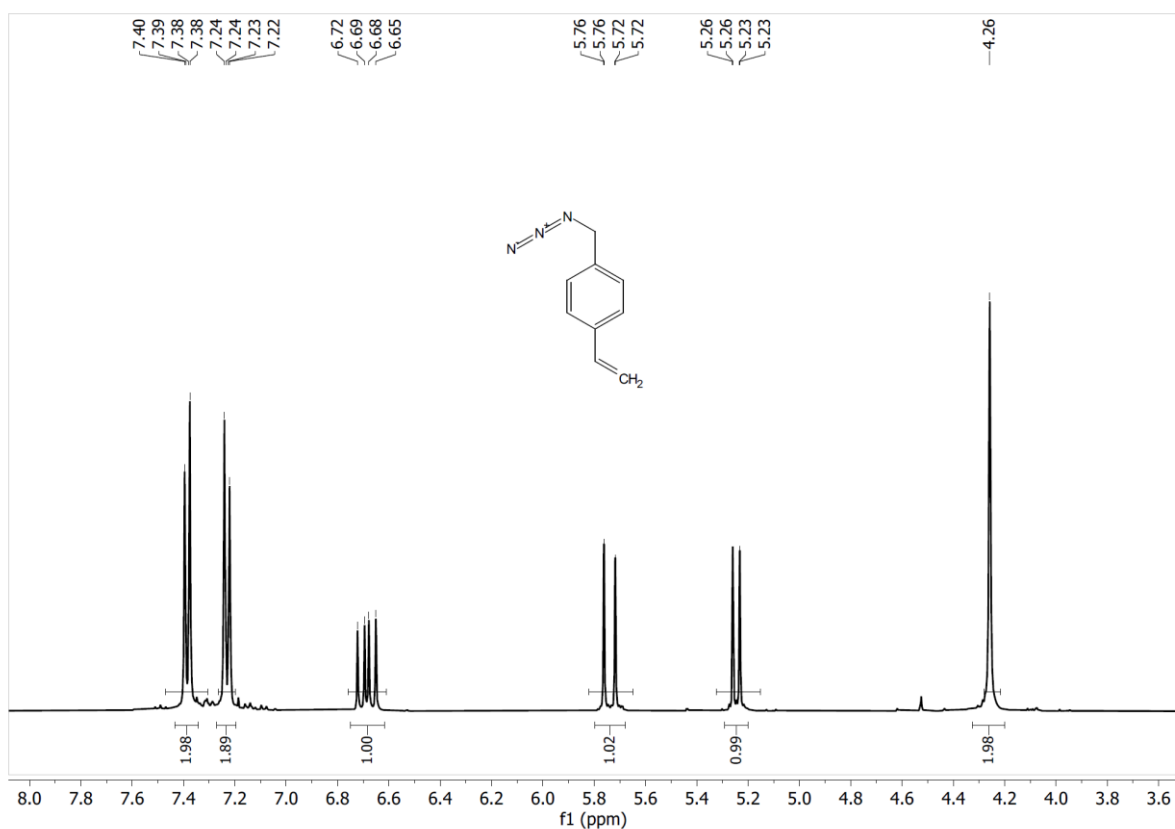
Obrázek 7: FT-IR spektrum P2

Příloha C: FT-IR spektrum P3

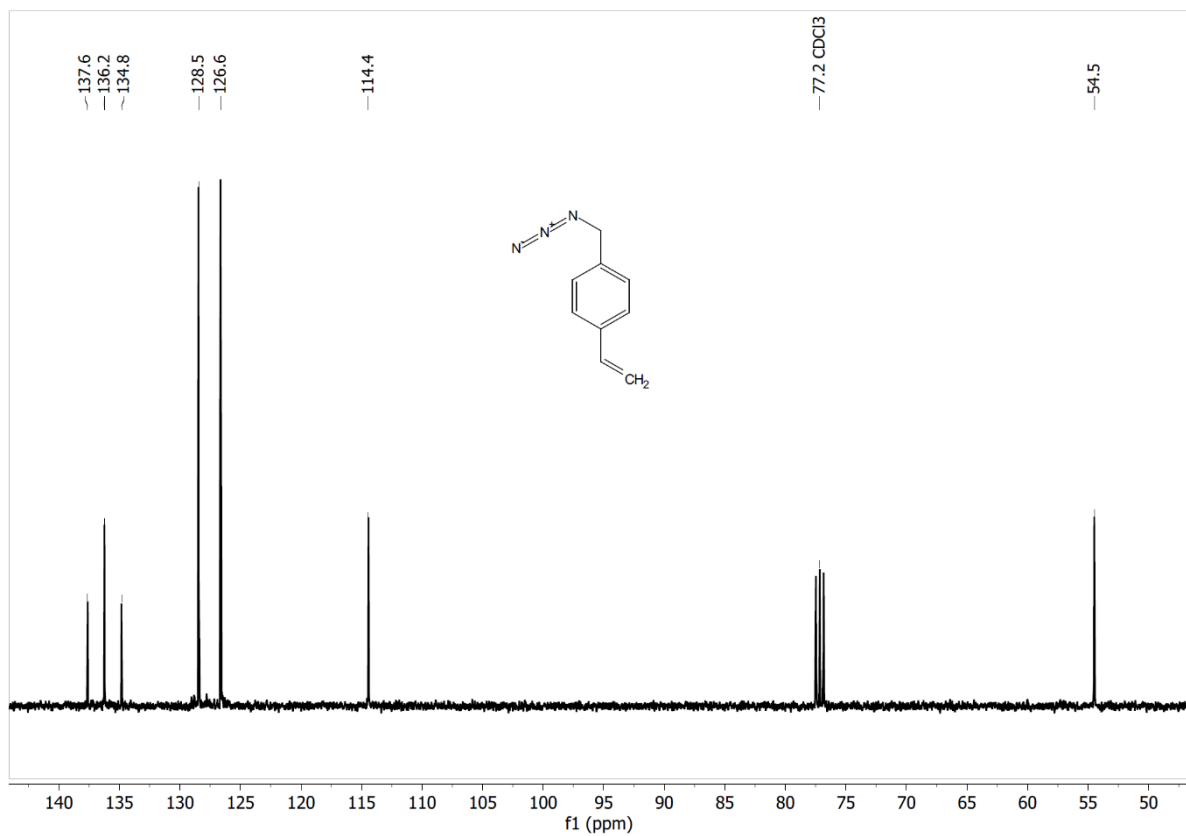


Obrázek 8: FT-IR spektrum P3

Příloha D: ^1H a ^{13}C NMR spektrum 4-vinylbenzyl azidu



Obrázek 9: ^1H NMR spektrum 4-vinylbenzyl azidu



Obrázek 10: ^{13}C NMR spektrum 4-vinylbenzyl azidu