



**VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE**  
Fakulta chemické technologie  
Ústav organické technologie

Laboratoř specializace výroba léčiv  
(M111015) a technologie organických  
látek a chemické speciality (M111012)

**A**

# **Molekulárně otištěné polymery pro extrakci na pevné fázi**

**Vedoucí práce:**

Ing. Anna Šmídová

MUDr. Michael Mareš

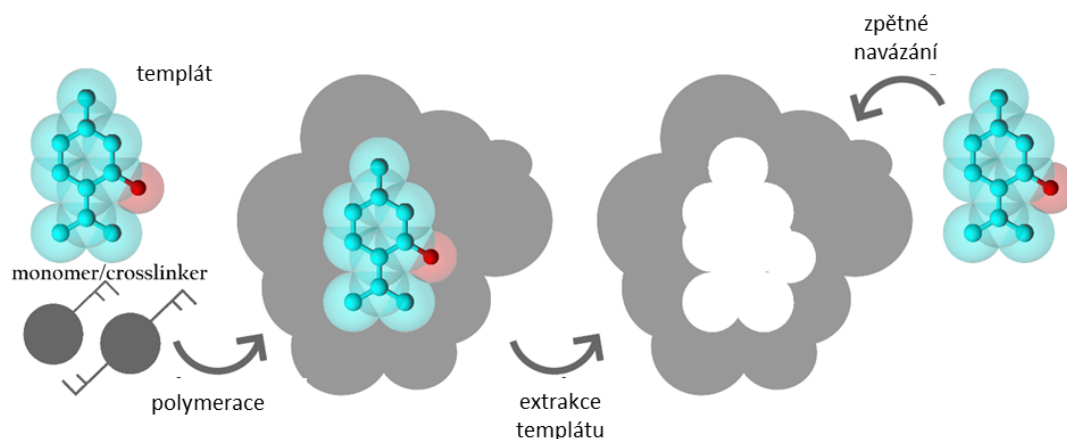
**Umístění práce:**

AS58

# 1. Úvod

Existuje řada metod, které je možné využít pro separaci analytů ze vzorku, např. extrakce typu kapalina/kapalina, precipitace proteinů ze vzorku, či extrakce na pevné fázi (SPE), která umožňuje jednak selektivní separaci, ale také zakoncentrování vzorku. Selektivitu separace pomocí extrakce na pevné fázi je možné ovlivnit volbou stacionární fáze a také optimalizací jednotlivých kroků extrakce. Molekulárně otištěné polymery (MIP) se v poslední době dostávají do popředí zájmu právě pro jejich využití v roli stacionárních fází pro SPE proces, jelikož oproti konvenčně využívaným materiálům (např. silikátové materiály) mají řadu výhod: i) jsou vysoce tepelně a tlakově stabilní, a to i při dlouhodobém skladování, ii) jsou odolné vůči působení mnoha kyselin a zásad, iii) jsou odolné vůči působení organických rozpouštědel, čímž umožňují široce optimalizovat extrakční postup bez rizika degradace stacionární fáze. A co víc, jsou vysoce selektivní k žádanému analytu díky principu jejich přípravy.

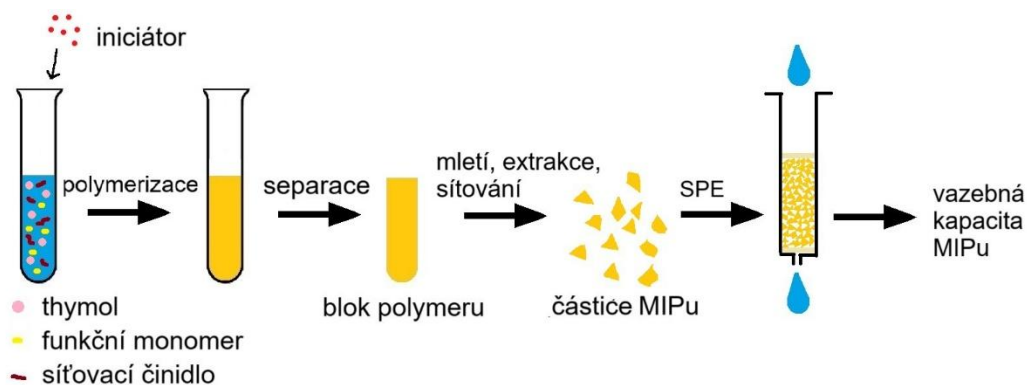
MIPy se připravují různými polymerizačními postupy (např. bloková, suspenzní, či emulzní polymerace), pro které je společné použití templátu, který je tzn. otištěn do polymerní matrice, čímž vzniká k templátu komplementární kavita (obrázek 1). Právě přítomnost kavit propůjčuje MIPu vysokou selektivitu vůči otištěné molekule – žádanému analytu, čímž zajišťuje jeho velmi efektivní a cílené vychytávání z roztoku. Volba molekuly templátu je poměrně variabilní, může jím být endogenně se vyskytující sloučenina (např. molekula neurotransmiteru, či aminokyselina) nebo látka tělu nevlastní (např. molekula léčiva). Jako templát ovšem nelze použít libovolnou molekulu. Je možné použít pouze takové molekuly, které nezabraňují polymeraci a zároveň je možné je z připraveného polymeru účinně extrahovat tak, aby vznikly zmíněné selektivní kavity, což je hlavním úskalím celého procesu.



Obrázek 1. Schéma přípravy molekulárně otištěného polymeru

## 2. Postup laboratorní práce

Práce se skládá z několika kroků (obrázek 2), které na sebe logicky navazují. Vzhledem k časové náročnosti některých kroků přípravy (např. nutnost nechat sušit polymer přes noc, či mletí a sítování) budete v některých částech pracovat s materiály již připravenými, které dodá vedoucí práce.



Obrázek 2. Schéma přípravy, zpracování a následné aplikace MIPu při SPE

### 2.1 Příprava molekulárně otištěného polymeru

MIP bude připraven s využitím thymolu jako templátu blokovou polymerací podle následujícího postupu:

Thymol (0,45 mmol) rozpustíte v methanolu (0,5 ml) v eppendorfově zkumavce. V kulaté baňce o objemu 25 ml smíchejte methanol (2 ml), 2-hydroxyethyl methakrylát (1,4 mmol) a 1,4-butandiol dimethakrylát (9 mmol), následně přidejte roztok thymolu. Baňku umístěte do předem vyhřáté olejové lázně (60 °C) a po dobu 5 minut probublávejte argonem. Udržujte inertní atmosféru po celou dobu reakce! Následně za stálého míchání (300 otáček/min) přidejte 2,2'-azobisisobutyronitril (0,4 mmol) a 1 ml methanolu a nasad'te chladič. Reakci ukončete po 40 minutách ochlazením baňky pod proudem studené vody. Připravený polymer nechte odstát po dobu 2 hodin a následně jej separujte pomocí špachtle a acetonu. Nechte sušit na Petriho misce za laboratorní teploty přes noc. Na laboratorní úlohu přijďte s vypočtenými navážkami, v případě kapalných reaktantů vypočítejte objem.

### 2.2 Soxhletova extrakce

Soxhletovu extrakci provedete z časových důvodů s již připraveným polymerem, který dodá vedoucí práce.

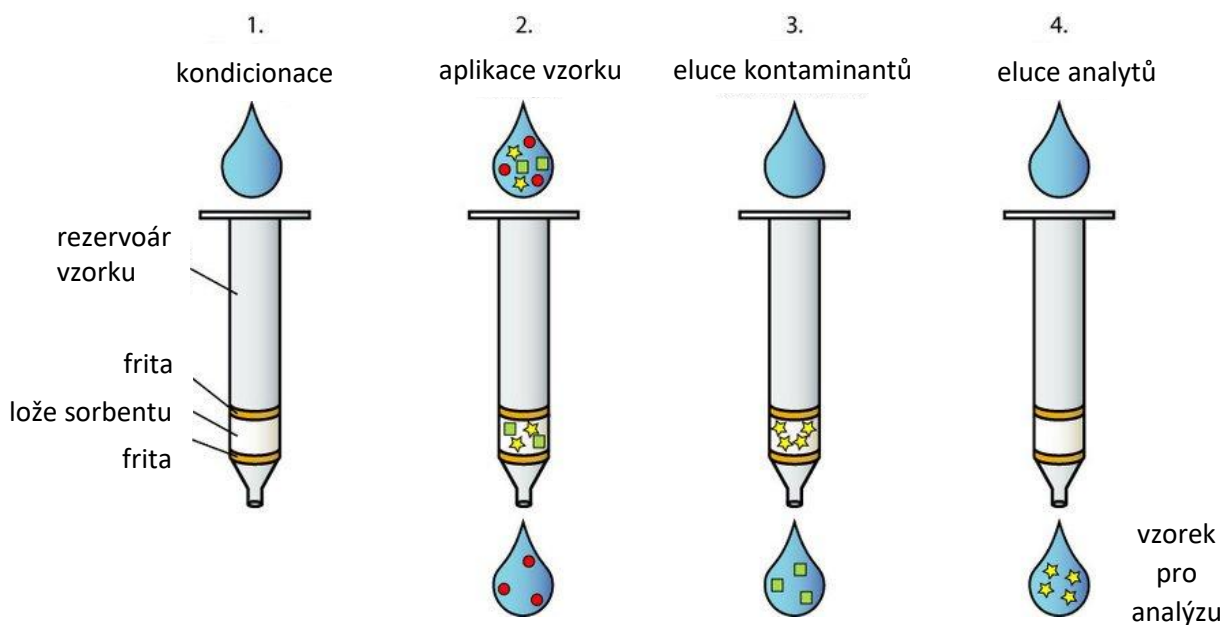
Polymer převed'te do celulózové patrony a vložte ji do Soxhletova extraktoru. Do varné baňky o objemu 250 ml převed'te 80 ml extrakčního činidla (určí vedoucí práce) a vložte magnetické míchadlo. Sestavte aparaturu, využijte předem vyhřátou olejovou lázeň (teplotu určí vedoucí práce dle složení extrakčního činidla). Extrakce bude probíhat po dobu 2 h. Po ukončení extrakce odeberte z reakční směsi vzorek a podrobte jej HPLC analýze.

### 2.3 Extrakce na pevné fázi

Extrakci na pevné fázi provedete ve 2 kolonkách pro SPE (Agilent Bond Elut Reservoir, obrázek 3). Nejprve je třeba každou kolonku naplnit 50 mg připraveného MIPu (připravený namletý MIP o vhodné velikosti částic dodá vedoucí práce). 50 mg MIPu navažte do eppendorfovy zkumavky, přidejte 1 ml methanolu a vytvořte suspenzi, kterou převed'te do SPE kolonky s fritou (opakujte přidání 1 ml methanolu, dokud je potřeba). Po převedení veškerého polymeru kolonku uzavřete druhou fritou. Následně kolonku promyjte 3x 1 ml methanolu.

V dalším kroku kolonku promyjte 3x 1 ml vody a naneste 1 ml vodného roztoku thymolu o koncentraci 0,5 mg/ml. Kolonku opět promyjte 3x 1 ml vody a jako finální krok aplikujte extrakční činidlo v množství 3x 1 ml (druh extrakčního činidla určí vedoucí práce).

Veškeré roztoky po průchodu kolonkou od nanesení vzorku thymolu podrobte HPLC analýze (celkem 7 vzorků za každou kolonku).



Obrázek 3. Schéma SPE procesu v kolonkách

## 2.4 HPLC analýza

Koncentrace thymolu bude stanovena HPLC analýzou. Využit bude kapalinový chromatograf firmy Dionex s UV detekcí. Součástí přístroje je zásobník pro mobilní fáze, pumpa, autosampler, termostat kolony a detektor diodového pole. Pro separaci analytu bude využita chromatografická kolona se stacionární fází typu C18. K měření bude použita isokratická metoda, konkrétní parametry určí vedoucí práce. Data budou vyhodnocena pomocí softwaru Chromeleon a MS Excel.

## 2.5 Vyhodnocení výsledků

Nedílnou součástí vyhodnocení výsledků je kalibrační křivka, kterou si zkonstruujete na základě analýzy 7 připravených roztoků thymolu v methanolu o známých koncentracích: 1; 0,5; 0,25; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0005 mg/ml. Budete potřebovat vždy 1 ml roztoku. Vzorky si připravíte postupným ředěním, vždy připravte pouze 1 ml. Vycházet budete z roztoku, který si připravíte rozpuštěním 10 mg thymolu v 1 ml methanolu. Další roztoky budou vycházet z tohoto roztoku. Nejmenší pipeta, kterou můžete použít, dává objem 10 µl. Postup ředění si připravte předem a předložte jej ke kontrole vedoucí práce při příchodu do laboratoře.

Na základě rovnice kalibrační křivky vyhodnotíte vzorky získané Soxhletovou extrakcí a SPE postupem. Data zpracujte do přehledné tabulky.

## 2.6 Obsah protokolu

Protokol k úloze Molekulárně otištěné polymery pro extrakci na pevné fázi bude obsahovat tyto body:

- Úvod
- Cíle práce
- Experimentální část – stručný pracovní postup včetně použitých chemikálií, přístrojů a konkrétních navážek reaktantů
  - Charakteristiku kolony, podmínky chromatografické analýzy a retenční čas thymolu
  - Kalibrační křivku včetně rovnice a koeficientu přesnosti
- Získané výsledky
  - Je možné zařadit např. fotografii připraveného polymeru po vysušení.
- Závěr

## **2.7 Seznam použité literatury**

1. Kabrhelová J., dizertační práce, VSCHT Praha; Vývoj separačních procesů pro monitorování biologicky aktivních molekul v organismu; 2019
2. Virtová T, diplomová práce, VSCHT Praha; Příprava molekulárně otištěných polymerů pro separaci vyšších mastných kyselin z biologických matric; 2022