



TECHNICKÁ UNIVERZITA V LIBERCI
Fakulta mechatroniky, informatiky
a mezioborových studií



Příprava a analýza modifikovaných polypyrrolových nanovrstev

Diplomová práce

Studijní program: N3942 – Nanotechnologie

Studijní obor: 3942T002 – Nanomateriály

Autor práce: **Bc. Martin Oškera**

Vedoucí práce: RNDr. Michal Řezanka, Ph.D.



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: Bc. Martin Oškera
Osobní číslo: M16000162
Studijní program: N3942 Nanotechnologie
Studijní obor: Nanomateriály
Název tématu: Příprava a analýza modifikovaných polypyrrolových nanovrstev
Zadávací katedra: Katedra chemie

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracovat literární rešerši o polypyrrolových vrstvách.
2. Připravit modifikované polypyrrolové nanovrstvy.
3. Vyzkoušet možnosti sledování počtu aktivních center na jejich povrchu.

Rozsah grafických prací: dle potřeby

Rozsah pracovní zprávy: 40-50 stran

Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam odborné literatury:

1. M. Martinek, S. Swar, V. Zajícová, L. Voleský, L. Blažková, J. Müllerová, M. Stuchlík, M. Řezanka, I. Stibor: Pre-treatment of polyethylene terephthalate by Grignard reagents for high quality polypyrrole coatings and for altering the hydrophobicity, Chem. Pap., 2017, in press.
2. M. Omastova, M. Micusik: Polypyrrole coating of inorganic and organic materials by chemical oxidative polymerisation, Chem. Pap., 2012, 46, 392-414.

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Michal Řezanka, Ph.D.
Katedra chemie

Datum zadání diplomové práce: 13. října 2017

Termín odevzdání diplomové práce: 14. května 2018


prof. Ing. Zdeněk Plíva, Ph.D.
děkan




prof. Ing. Josef Šedlbauer, Ph.D.
vedoucí katedry

V Liberci dne 13. října 2017

Prohlášení

Byl jsem seznámen s tím, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li diplomovou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Diplomovou práci jsem vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé diplomové práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum: 14.5.2018

Podpis: Martin Běhár

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval vedoucímu své diplomové práce RNDr. Michalu Řezankovi, Ph.D. za jeho četné rady, trpělivost a optimismus, se kterým dokázal vytvořit velmi tvůrčí pracovní prostředí. Dále Mgr. Veronice Zajícové, Ph.D. a Ing. Janu Lukáškoví za jejich konzultace k jednotlivým syntézám a vytvoření velmi přátelské atmosféry v laboratoři, ve které byla radost pracovat. Velký dík patří doc. Ing. Bohumilu Dolenskému, Ph.D. za měření NMR spekter, také Mgr. Vítu Novotnému za měření hmotnostních spekter a příležitostné konzultace k jejich identifikaci, Ing. Pavlu Kejzlarovi, Ph.D. za pořízení SEM snímků a v neposlední řadě Mgr. Kateřině Strnadové za asistenci při testování adsorpce fluorescenčních molekul.

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá přípravou cyklodextrinem (CD) modifikovaných vrstev polypyrrolu (PPy) na polykaprolaktonových (PCL) nanovlákních. V teoretické části práce jsou popsány fyzikální a chemické vlastnosti polypyrrolu, způsoby jeho přípravy, stejně jako jeho interakce s živými organismy. Dále jsou popsány vybrané případy modifikace vláknenných substrátů polypyrrolem. Pozornost je věnována také syntéze konjugátu pyrrolu a β -cyklodextrinu, který sloužil jako monomer při přípravě modifikovaných PPy vrstev. V praktické části byla připravena nemodifikovaná PPy vrstva na povrchu PCL nanovláken chemickou oxidační polymerací. Tato vrstva byla podrobena studiu morfologie jejího povrchu skenovací elektronovou mikroskopií. Dále byla na povrchu PCL nanovláken připravena vrstva kopolymeru pyrrolu a konjugátu pyrrolu a β -cyklodextrinu v molárním poměru 19:1. Za účelem sledování počtu molekul β -CD přístupných k tvorbě inkluzních komplexů na povrchu vrstvy bylo navržena řada detekčních molekul, byly diskutovány metody jejich syntézy a analýzy vzniklých produktů. Připravené vrstvy byly testovány na adsorpci proteinů pomocí spektrofotometrického měření koncentrace hovězího sérového albuminu (BSA), označeného fluorescenční molekulou. Modifikovaná PPy vrstva vykazala v tomto testu nejvyšší hodnoty adsorpce proteinů, stejně jako nejvíce podporovala proliferaci a adhezi 3T3 myších fibroblastů při *in vitro* testování připravených vrstev.

Klíčová slova: polypyrrol, cyklodextrin, nanovlákní, povrchové vrstvy, tkáňové nosiče

Abstract

This diploma thesis is dealing with preparation of cyclodextrin (CD) modified polypyrrole layers on the surface of polycaprolactone (PCL) nanofibers. In the theoretical part of this thesis, physical and chemical properties of polypyrrole are described, as well as methods of its preparation and its interaction with living organisms. Selected examples of polypyrrole modified fiber materials are presented. Synthesis of pyrrole conjugate with β -CD, which served as monomer in subsequent preparation of modified PPy layers, is also listed. In experimental part of this thesis preparation of unmodified PPy layer on the surface of PCL nanofibers was performed by chemical oxidative polymerization. Surface morphology of this layer was studied using scanning electron microscopy. Subsequently layer of pyrrole/pyrrole-cyclodextrin copolymer in molar ratio 19:1 was prepared on the surface of PCL nanofibers. Several detection molecules were designed to monitor the number of β -CD molecules available to inclusion complex formation. Methods of synthesis of these detection molecules as well as analysis of reaction products were discussed. Prepared surface layers were tested on protein adhesion by spectrophotometric measurement of concentration of bovine serum albumin (BSA) conjugated with fluorescent molecule. Layers modified with cyclodextrin showed the best protein adhesion of all samples. During *in vitro* testing of prepared layers by 3T3 mouse fibroblast, cyclodextrin-modified layers promoted cell proliferation and adhesion most of all tested samples.

Keywords: polypyrrole, cyclodextrin, nanofibers, surface layers, tissue scaffolds

Obsah

Úvod	11
1. Teoretická část	12
1.1. Pyrrol	12
1.1.1. Chemická polymerace pyrrolu.....	13
1.2. Polypyrrol.....	15
1.2.1 Interakce polypyrrolu s živými organismy.....	16
1.3. Modifikace vlákných materiálů polypyrrolem	17
1.4. Konjugáty pyrrolu a cyklodextrinu.....	19
1.4.1. Cyklodextriny.....	19
1.4.2. Syntéza konjugátu pyrrolu a β -CD	21
2. Experimentální část	24
3. Výsledky a diskuze	29
3.1. Příprava polypyrrolových vrstev.....	29
3.2. Příprava modifikovaných polypyrrolových vrstev	35
3.3. Metody sledování počtu aktivních center	37
3.3.1. Detekční molekula obsahující síru.....	37
3.3.2. Detekční molekuly s obsahem fluoru	38
3.3.3. Detekční molekuly obsahující fluorescein.....	44
Závěr	49
Seznam použité literatury	50

Seznam obrázků

Obrázek 1 Chemická struktura pyrrolu	12
Obrázek 2 Schéma iniciační reakce polymerace pyrrolu	13
Obrázek 3 Schéma vzniku dimeru při polymeraci pyrrolu	13
Obrázek 4 Re-inicializační reakce polymerace pyrrolu	14
Obrázek 5 Propagace polymerace pyrrolu	14
Obrázek 6 Hmotnost polypyrrolu na jeden metr čtvereční, na jednotlivých druzích vláken. Zleva: vlna, bavlna, hedvábí, polyester, nylon, polyakrylát, polypropylen. Převzato z [14]..	17
Obrázek 7 Tvar molekuly cyklodextrinu. Převzato z [18]	20
Obrázek 8 Syntéza derivátu 4	21
Obrázek 9 Syntéza derivátu 8	22
Obrázek 10 Syntéza konjugátů 9 a 10	23
Obrázek 11 Upevňovací válečky pro rovnoběžně orientovaná PCL mikrovláken.	29
Obrázek 12 SEM obrázek textilního vzorku A – PCL nanovlákná	30
Obrázek 13 SEM obrázek textilního vzorku B – PCL nanovlákná omytá v roztoku NaOH	31
Obrázek 14 SEM obrázek textilního vzorku C – PCL nanovlákná s vrstvou PPy	31
Obrázek 15 SEM obrázek textilního vzorku D – PCL nanovlákná s dopovanou vrstvou PPy	32
Obrázek 16 Defektní místo v PPy vrstvě v textilním vzorku D	33
Obrázek 17 Měření tloušťky PPy vrstvy na povrchu textilního vzorku D	33
Obrázek 18 SEM obrázek mikrovláknenného vzorku A	34
Obrázek 19 SEM obrázek řezu mikrovláknenného vzorku C	34
Obrázek 20 SEM obrázek mikrovláknenného vzorku D	35
Obrázek 21 Chemická struktura derivátů pyrrolu 9 a 10	35
Obrázek 22 Chemická reakce pro přípravu sloučeniny 11	37
Obrázek 23 Chemická reakce pro přípravu sloučeniny 12	38
Obrázek 24 Hmotnostní spektrum produktu 12	39
Obrázek 25 Schéma chemické reakce přípravy sloučeniny 13	40
Obrázek 26 $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ HSQC spektrum derivátu 13	41
Obrázek 27 Alifatická část ^1H NMR spektra derivátu 13	42
Obrázek 28 ^1H NMR spektrum derivátu 13	42
Obrázek 29 ^{19}F NMR spektrum derivátu 13	43
Obrázek 30 ^{19}F COSY spektrum derivátu 13	43

Obrázek 31 Schéma přípravy detekční molekuly 14	44
Obrázek 32 Hmotnostní spektrum části produktu 14 rozpuštěné v EtOAc	45
Obrázek 33 Hmotnostní spektrum části produktu 14 rozpuštěné v EtOAc	45
Obrázek 34 ^1H - ^{13}C HMBC spektrum molekuly 14	46
Obrázek 35 Graf koncentrace přichyceného a nepřichyceného BSA – FITC na polypyrrolových vrstvách	47
Obrázek 36 Obrázky 3T3 myších fibroblastů na různých substrátech. Zleva: PCL nanovlákna, PPy vrstva, PPy-CD vrstva	48

Seznam zkratek a symbolů

BuLi – Butyllithium

BSA – Bovine serum albumine (hovězí sérový albumin)

CCK-8 – Cell counting kit 8

CD – Cyklodextrin

COSY – Correlation spectroscopy

CXI – Ústav pro nanomateriály, pokročilé technologie a inovace

DCM – Dichlormethan

DIPEA – *N,N*-diisopropylethylamin

DMEM – Dulbecco's modified eagle medium

DMF – Dimethylformamid

Et_3N – Triethylamin

EtOAc – Ethylacetát

FITC – Fluoresceinisothiokyanát

FT – Fakulta textilní

HMBC – Heteronuclear multiple bond correlation

HSQC – Heteronuclear single quantum coherence spectroscopy

KNT – Katedra netkaných textilií

LD_{50} – Lethal dose 50 %

MeOH – Methanol

NBS – *N*-bromosukcinimid

NGF – Nervový růstový faktor

NMR – Nukleární magnetická rezonance

PBS – phosphate buffer saline (fyziologický roztok pufovaný fosfátovým puforem)
PCL – Polykaprolakton
PMMA – Polymethylmethakrylát
PPy – Polypyrrol
PTSA – (*p*-toluensulfonová kyselina)
Py – Pyrrol
PyBOP - (benzotriazol-1-yloxy)tripyrrolidino-fosfonium hexafluorofosfát
R.T. – Room temperature (pokojová/laboratorní teplota)
SEM – Skenovací elektronová mikroskopie
SNS – 2-naftalensulfonát sodný
THF – Tetrahydrofuran
TIPS – Triisopropylsilyl
TLC – Thin layer chromatography (tenkovrstvá chromatografie)
TUL – Technická univerzita v Liberci
VŠCHT – Vysoká škola chemicko-technologická
WST-8 – (2-(2-methoxy-4-nitrofenyl)-3-(4-nitrofenyl)-5-(2,4-disulfofenyl)-2*H*-tetrazolium

Úvod

Polypyrrol se společně s dalšími vodivými polymery již delší dobu těší velkému zájmu vědecké veřejnosti. Je to zejména díky své elektrické vodivosti, která je způsobena konjugovaným systémem π -elektronů. Společně s dalšími vodivými polymery, jako je polyanilin a polyacetylen, daly dokonce vzniknout zcela novému souboru látek nazývaných syntetické kovy. Polypyrrol je z těchto materiálů pravděpodobně nejperspektivnější díky jeho odolnosti vůči vnějšímu prostředí, snadnosti přípravy a dobré biokompatibilitě. V této práci se budu zabývat jistými aspekty jeho využití coby materiálu pro přípravu tkáňových nosičů. Bylo ukázáno, že u některých typů buněk dochází k lepší proliferaci, pokud jsou vystaveny působení elektrického pole. [1]

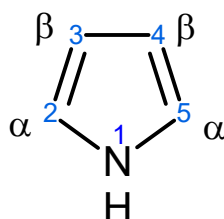
Jednou z nevýhod polypyrrolu je jeho křehkost a špatná zpracovatelnost. Například jeho bod termického rozkladu je nižší než bod tání. Z tohoto důvodu se v případě polypyrrolu přistupuje velmi často k tvorbě kompozitních materiálů, ve kterých je přítomen ve formě povrchové vrstvy, připravené *in situ* polymerací pyrrolu. Vlastnosti takovéto vrstvy však lze ještě vylepšit pomocí vhodné modifikace.

Cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy, jejich molekula má tvar dutého komolého kužele. Tyto oligosacharidy našly své uplatnění jako složka léčiv, v potravinářství či kosmetice, a to zejména pro svou vlastnost vytvářet komplexy s lipofilními látkami ve vodném prostředí. Pokud by se podařilo vytvořit polypyrrolovou vrstvu modifikovanou pomocí cyklodextrinů, znamenalo by to značné rozšíření jejích vlastností. Tou hlavní by byla schopnost nekovalentně vázat biomolekuly zlepšující adhezi buněk, růstové faktory a další podpůrné látky.

Pokud by se příprava takové vrstvy podařila, bylo by nutné sledovat počet molekul cyklodextrinu, neboli aktivních center, které jsou skutečně k dispozici pro tvorbu komplexů. Pokud bychom se o to pokusili pomocí tradičních instrumentálních metod analytické chemie, mohli bychom zjistit chemické složení celé vrstvy, ale informace o počtu přístupných molekul by byla ztracena. Navrhli jsme proto postup nepřímý, kdy nejprve proběhne tvorba komplexu se specifickou detekční molekulou a až poté proběhne analýza počtu detekčních molekul na povrchu.

1. Teoretická část

1.1. Pyrrol



Obrázek 1 Chemická struktura pyrrolu

Pyrrol (Py) je pětičlenný heterocyklický aromát, jehož struktura hraje významnou roli ve funkci živých organismů. Deriváty pyrrolu, zejména cyklické tetrapyrroly, hrají důležitou roli v mechanismu dýchání (hemoglobin, cytochromy) a fotosyntéze (chlorofyl). Deriváty pyrrolu se používají také jako antibiotika. Friedlieb Ferdinand Runge, německý analytický chemik, objevil pyrrol v roce 1834 jako součást uhelného dehtu. [2]

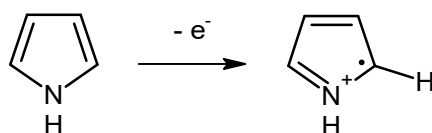
Pyrrol je za laboratorních podmínek čirá kapalina, zápachem připomínající chloroform. Jeho bod tuhnutí je $-23,4\text{ }^{\circ}\text{C}$, bod varu $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ za normálního tlaku. Po vystavení vzduchu hnědne a postupně houstne až pryskyřicovatí, což je způsobeno polymerací jednotlivých pyrrolových jader. Hustota čistého pyrrolu je $0,9698\text{ g/cm}^3$, index lomu 1,5085, viskozita $1,31\text{ mPa}\cdot\text{s}$.

Uhlíky 2 a 5 ve struktuře pyrrolu se označují jako α , zatímco uhlíky 3 a 4 jako β (Obrázek 1). Na rozdíl od dalších pětičlenných heterocyklů furanu a thiofenu, představuje heteroatom kladný konec dipólů. Je to způsobeno tím, že na rozdíl od kyslíku a síry, má dusík pouze jeden nevazebný elektronový pár. Díky vysoké hustotě π -elektronů je typickou reakcí, která na pyrrolu probíhá, elektrofilní substituce. Ta probíhá zejména v poloze α , která je reaktivnější. Příklady těchto reakcí jsou Friedel-Craftsova acylace, sulfonace pomocí komplexu SO_3 -pyridin, nitrace pomocí acetyl nitrátu (kyselina dusičná/anhydrid kyseliny octové), nebo halogenace bromem, jenž vede přímo k tetrasubstituovanému derivátu [3].

Výsledkem delokalizace elektronového páru na dusíku je slabá kyselost pyrrolu ($\text{pK}_a = 17,5$). Příslušné soli mohou být připraveny s alkalickými kovy v amoniaku, nebo s hydridy kovů v inertních rozpouštědlech (třeba THF). Ty se dají převést na *N*-alkylpyrroly reakcí s alkyhalogenidy.

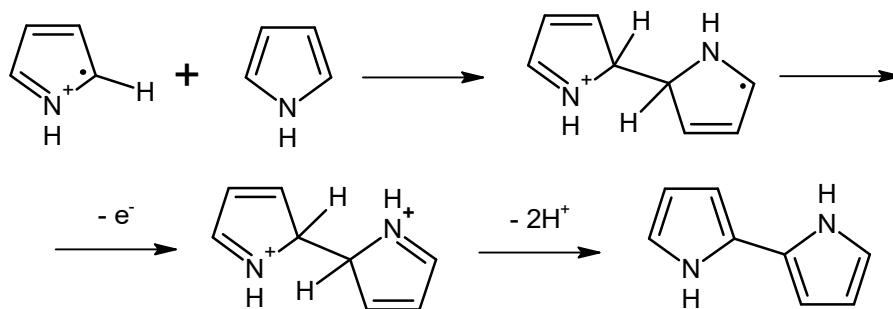
1.1.1. Chemická polymerace pyrrolu

Chemická polymerace pyrrolu probíhá za přítomnosti oxidačního činidla jako je například FeCl_3 , které je nejčastěji používaným činidlem při polymeraci pyrrolu. Mezi další oxidační činidla používaná při oxidaci pyrrolu patří: peroxodisíran amonný, peroxid vodíku, chloristan měďnatý, či hexakynoželezitan draselný (ferrikyanid draselný, nebo červená krevní sůl)[4]. Další nepříliš prozkoumanou možností je použití enzymatických reakcí. Bouldin et al. [5] použili k oxidativní polymeraci peroxidázu ze sójových bobů. Nevýhodou chemické polymerace pyrrolu je nižší elektrická vodivost výsledného produktu, která se pohybuje okolo $10 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$, oproti tomu elektrická vodivost polypyrrolu připraveného elektrochemickou cestou je $10^2 \text{ S}\cdot\text{cm}^{-1}$ [6]. Tan et al. [7] ve svém článku detailně popsal kinetiku a mechanismus chemické polymerace pyrrolu. Mechanismus polymerace byl popsán následujícím způsobem. Prvním krokem je iniciace (Obrázek 2), při níž je pyrrol oxidován a dojde k vytvoření kationtového radikálu pyrrolu.



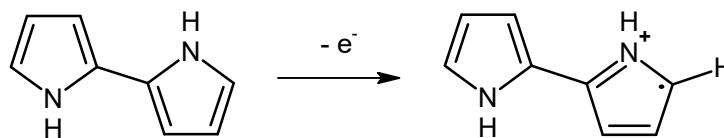
Obrázek 2 Schéma iniciační reakce polymerace pyrrolu

Tento radikálový kationt reaguje s monomerem, dojde k oxidaci a deprotonaci, čímž vznikne dimer (Obrázek 3). V tomto kroku se Tan odchyluje od obecného přesvědčení, že dimer vzniká couplingem dvou pyrrolových radikálů. [6]

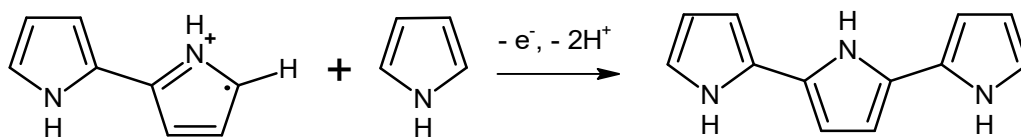


Obrázek 3 Schéma vzniku dimeru při polymeraci pyrrolu

Tento děj se opakuje, čímž dochází k prodlužování polymerního řetězce. Dimer je okamžitě oxidován na kationtový radikál (Obrázek 4), který reaguje s dalším monomerem za vzniku trimeru (Obrázek 5).



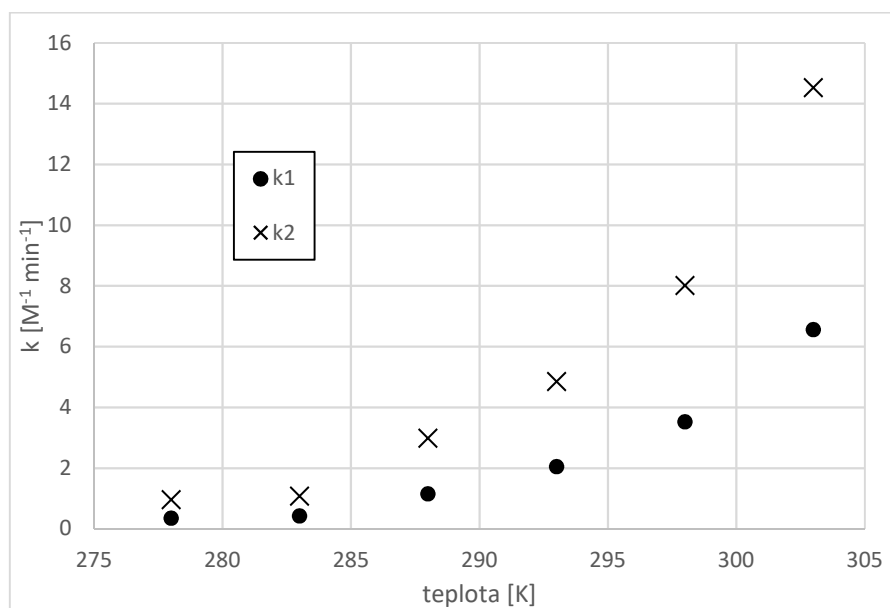
Obrázek 4 Re-inicializační reakce polymerace pyrrolu



Obrázek 5 Propagace polymerace pyrrolu

Bylo zjištěno, že při elektrochemické polymeraci pyrrolu je oxidace oligomeru, nebo polymeru s konjugovaným řetězcem snadnější než oxidace monomeru. Oxidační potenciál pyrrolu se nachází v oblasti 0,7 – 0,8 V, zatímco oxidační potenciál polypyrrolu je roven přibližně 0,2 V. Čím větší je délka polymerního řetězce, tím se také snižuje jeho oxidační potenciál, tedy delší řetězce snadněji podléhají oxidaci. Řídícím dějem během polymerace pyrrolu je tedy oxidace monomeru. Rozdíl je vidět i v aktivačních energiích jednotlivých dějů. Pro iniciační reakci byla spočítána jako (79 ± 17) kJ/mol, propagační reakce má aktivační energii (73 ± 13) kJ/mol.

V Tanově článku [7] se také zabývali rychlostními konstantami a jejich změnami v závislosti na teplotě, při níž reakce probíhala. Byly zavedeny dvě rychlostní konstanty k_1 (pro rychlost iniciační reakce) a k_2 (pro rychlost propagačních reakcí).



Graf 1 Graf závislosti rychlostních konstant polymerace pyrrolu na teplotě. Data převzata z článku [7]

Z grafu (Graf 1) je vidět, že teplota má velký vliv na rychlost polymerace. Konstanta k_2 roste se zvyšující se teplotou rychleji než konstanta k_1 . Dále bylo pozorováno, že při polymeraci při vyšší teplotě dochází ve větší míře k síťování polymeru. Častěji tedy vznikají vazby mezi α - β a β - β atomy pyrrolu. Pokud tedy požadujeme polypyrrol s menší mírou síťování, je nutné provést polymerační proces při nižší teplotě.

1.2. Polypyrrol

Polypyrrol patří do skupiny vodivých polymerů s konjugovaným systémem dvojných vazeb. V této skupině patří k nejvíce studovaným materiálům díky své stabilitě vůči vnějšímu prostředí, snadné přípravě a vyšší elektrické vodivosti, než jakou disponují jiné vodivé polymery. Má houbovitou strukturu, počáteční teplotu rozkladu 180 – 237 °C, teplotu skelného přechodu 160 – 170 °C a elektrickou vodivost pod 3 S·cm⁻¹ [8]. Nejčastější metodou přípravy polypyrrolu je chemická oxidativní polymerace pyrrolu. Mezi další možné způsoby patří: elektrochemická polymerace, fotochemická polymerace, „solid-state“ polymerace, plazmatem asistovaná polymerace a další [6]. Stirke et al. [9] zkoumal také možnosti přípravy pyrrolu pomocí různých bakteriálních kmenů *Streptomyces spp.* Z pyrrolu se jim po inkubační době 4 dnů podařilo připravit mikročástice polypyrrolu o velikosti 10 – 25 μm. Polypyrrol lze připravit v celé řadě tvarů jako jsou: nanočástice, nanovlákná, nanotrubky [10], nanovrstvy a nanokompozity [11]. Nevýhodou polypyrrolu je jeho nerozpustnost a netavitelnost, což omezuje možnosti jeho dalšího zpracování.

Polypyrrol stejně jako další vodivé polymery je ve své podstatě polovodičem. Stejně jako u polovodičů může docházet u polypyrrolu k dopování za účelem zvýšení jeho elektrické vodivosti. Obecně můžeme typy dopantů rozdělit na oxidační (p-typ) a redukční (n-typ), pomocí kterých se neutrální řetězce stávají polykationty či polyanionty. Vnější projevem tohoto děje je zvýšení elektrické vodivosti o několik řádů. PPy se od ostatních vodivých polymerů liší vysokou hladinou svého zakázaného pásu, což má za následek relativní lehkost, se kterou je možné ho p-dopovat. Naopak n-doping u něj prakticky neprobíhá.

1.2.1 Interakce polypyrrolu s živými organismy

Čistý pyrrol je poměrně toxický, jeho akutní LD₅₀ (perorálně podáno) u potkanů je 137 mg/kg. LD₅₀ (intraperitoneální), u myši je 98 mg/kg. Nezpůsobuje podráždění kůže, nicméně má vliv na tvorbu očních lézí. Nevykazuje žádnou mutagenní aktivitu [2].

Naproti tomu polypyrrol je považován za biokompatibilní materiál. *In vivo* studie biokompatibility publikoval článek [12], který zkoumal vliv částic polypyrrolu o velikosti 1 µm na organismus myši. Částice byly připraveny oxidativní chemickou cestou (oxidační činidlo H₂O₂) a důkladně promyty fyziologickým roztokem, aby se zamezilo kontaminaci jinými látkami. Po vysušení částic byly připraveny roztoky o třech koncentracích PPy ve fyziologickém roztoku a to 1, 5 a 10 mg/l. Všechny roztoky prošly sterilizací autoklávkem. Na myších byly provedeny dva různé experimenty.

V prvním z nich bylo do myši intraperitoneálně vpraven 1 ml roztoku částic polypyrrolu o třech výše zmíněných koncentracích. Po třech dnech po injekci byly myši zabity a byl zkoumán vliv nanočástic na jednotlivé orgány, ve srovnání s kontrolní skupinou, které byl vpraven 1 ml fyziologického roztoku. Ve druhém experimentu byla myšim podána dávka 1 ml o koncentraci 5 mg/l a byly sledovány změny po 1, 3 a 6 týdnech.

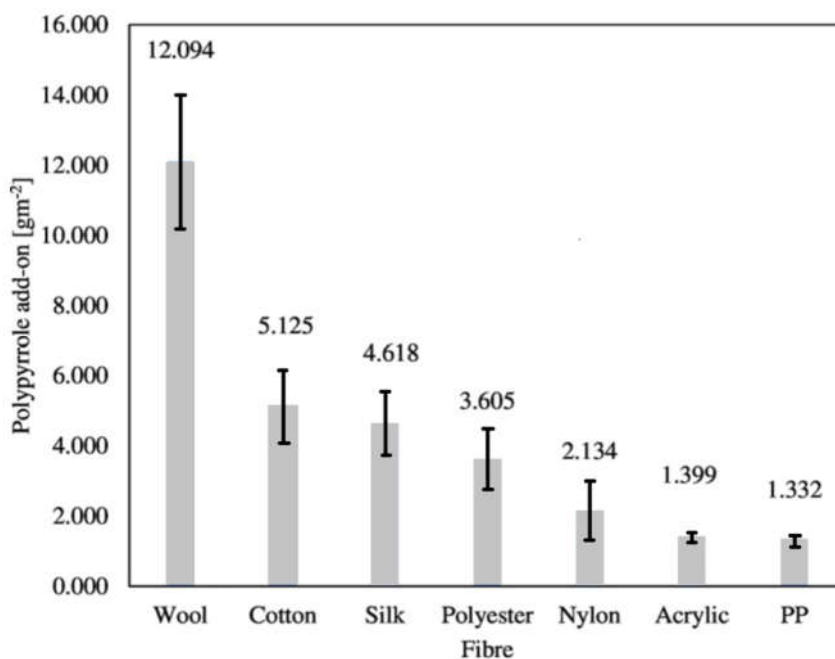
Díky tomu že nemodifikovaný polypyrrol není biodegradabilní a zůstává v organismu po dlouhou dobu, existovala obava, zda polypyrrol způsobuje chronické záněty. Tomu by do jisté míry nasvědčovaly výsledky prvního experimentu, kde došlo k významnému zvýšení počtu zánětlivých buněk (neutrofilů) a makrofágů. Avšak počet leukocytů v krvi nepřekračuje standardní limity, což akutnímu zánětu nenasvědčuje. Bylo konstatováno, že PPy částice nezpůsobují žádné symptomy alergické reakce, ani nemají jiné cytotoxické efekty. Také nebyly pozorovány žádné změny na slezině, ledvinách a játrech.

Biokompatibilitou polypyrrolu se zabýval také rešeršní článek [1]. Konstatoval, že *in vivo* implantovaný polypyrrol se setkává s naprosto minimální negativní odezvou organismu. Na výsledné vlastnosti vůči buňkám má také vliv volba dopantu. PPy dopovaný pomocí nervového růstového faktoru (NGF) dokonce podporuje proliferaci nervových buněk na svém povrchu, tento efekt byl více umocněn při stimulaci neuronů slabým elektrickým proudem, kdy docházelo k významnému prodloužení axonů jednotlivých neuronů. Dopování kyselinou hyaluronovou podporuje vaskularizaci při implantaci *in vivo*, dopování heparinem podporuje proliferaci buněk endotelu. Zlepšení adheze neuronů k povrchu bylo dosaženo dopováním pomocí peptidy odvozenými od lamininu.

1.3. Modifikace vlákenných materiálů polypyrrolem

Špatná zpracovatelnost a mechanické vlastnosti omezují použití polypyrrolu jako samostatného materiálu v nejrůznějších oblastech. To platí také o tkaninách a jiných vlákenných materiálech. *In situ* polymerace se ukazuje jako nejlépe proveditelná metoda úpravy povrchu vlákenných materiálů. *In situ* oxidativní chemická polymerace se výrazně neliší od klasické oxidativní chemické polymerace, pouze je zde navíc přítomen substrát, na který vzniklý polymer adhezuje. Existují dva možné způsoby provedení této metody. První je jednokrokový, kdy se substrát vloží do polymerační lázně s pyrrolem a oxidačním činidlem. Druhý, dvukrokový, spočívá v namočení substrátu do lázně s monomerem a poté je substrát nasycený pyrrolem přenesen do lázně s oxidačním činidlem. Jedinou podmínkou je, aby měl PPy jistou míru afinity k textilnímu substrátu [13].

Chatterjee a Maity [14] ve své studii zkoumali kinetiku *in situ* polymerace pyrrolu na různých, běžně se vyskytujících vláknech (bavlna, vlna, hedvábí, polyester, nylon, polyakrylová a polypropylenová vlákna). Vlákna byla nejprve vyčištěna od běžně se vyskytujících vosků a nečistot. Polymerace probíhala za přítomnosti FeCl_3 jako oxidačního činidla a *para*-toluensulfonové kyseliny (PTSA) jako dopantu, za teploty 5 °C po dobu 1 hodiny. Vlákna byla poté důkladně promyta deionizovanou vodou, vysušena a zvážena. Byl zjištěn přírůstek hmotnosti na jeden metr čtvereční povrchu vláken (Obrázek 6).



Obrázek 6 Hmotnost polypyrrolu na jeden metr čtvereční, na jednotlivých druzích vláken. Zleva: vlna, bavlna, hedvábí, polyester, nylon, polyakrylát, polypropylen. Převzato z [14]

Povrch vláken byl spočítán jako povrch dokonale hladkého vlákna o definovaném průměru. Ve skutečnosti však všechny vlákna mají jistou míru nedokonalostí, různých šupin a dalších nerovností, které velikost povrchu zvyšují. To se obzvláště týká přírodních vláken vlny a bavlny. V důsledku toho se jeví přírůstek hmotnosti na vypočítaný metr čtverečný jako vyšší číslo než odpovídá skutečnosti.

Dále bylo provedeno měření, jak ovlivňuje přítomnost vláken výtěžek reakce a její rychlostní konstantu.

Tabulka 1 Výtěžky a rychlostní konstanty polymerací pyrrolu za přítomnosti různých druhů vláken

Druh vlákna:	m PPy [mg]	k [$\text{min}^{-1} \cdot 10^{-3}$]
kontrola bez vláken	276,8	59,9
bavlna	316,8	241,3
hedvábí	280,9	124,4
vlna	317,9	125,7
polyester	314,1	291,0
nylon	280,8	240,5
polyakrylát	278,0	72,6
polypropylen	278,0	76,2

Z tabulky je vidět, že různá vlákna ovlivňují proces polymerace rozdílně. Nejvyšší výtěžek byl zaznamenán na vláknech vlny, bavlny a polyesteru. Zásahu na tom má jiná morfologie povrchu a chemické složení jednotlivých vláken.

Maiti et al. [15] vytvořili na polyesterové tkanině (tloušťka 0,19 mm, 58 g/m²) pomocí *in situ* oxidativní chemické a elektrochemické polymerace PPy vrstvu a následně zkoumali její elektrické vlastnosti. Tkanina byla nejprve očištěna pomocí roztoku NaOH (100 g/l, 90 °C, 20 min.). Prvním krokem byla chemická oxidativní polymerace. Tkanina byla vložena do 0,5 M roztoku pyrrolu na 20 minut a poté přenesena do 0,75 M roztoku FeCl₃ ochlazeném na 5 °C na 5 minut. Následovalo důkladné promytí deionizovanou vodou a usušení při 60 °C. Druhým krokem byla elektrochemická polymerace. Reakce probíhala v 0,3 M vodném roztoku pyrrolu a 0,05 M PTSA. Tkanina byla připevněna na anodu. Doba polymerace, teplota a použité napětí se lišily pro vytvoření většího množství různých vzorků. Při výzkumu elek-

trických vlastností jednotlivých vrstev ukázali, že rezistivita vzniklé vrstvy je závislá na drsnosti povrchu. Pro vrstvy o nízké elektrické rezistivitě je tedy výhodná jejich depozice na hladké povrchy.

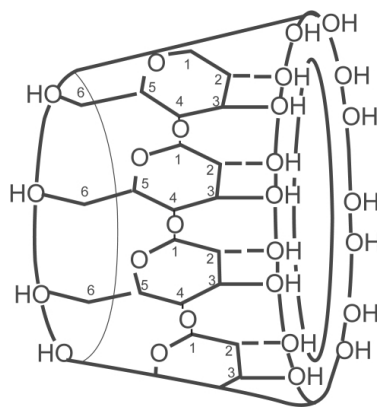
V článku [16] byla upravena polypyrolem bakteriální celulóza. Ta má oproti celulóze rostlinné vyšší míru krystalinity, vyšší stupeň polymerace, vyšší čistotu a dobrou míru biokompatibility. Opět se jednalo o *in situ* polymeraci za použití FeCl_3 , avšak nyní následovalo pokrytí vláken vrstvou polysiloxanu, pro získání jak hydrofobních, tak oleofobních vlastností. Nejvyšší změřené kontaktní úhly pro vodu a olej byly po řadě $160,3^\circ$ a $136,7^\circ$.

Číková et al. [17] vytvořili vrstvu PPy na PCL nanovláčkách připravených metodou elektrospinningu. Nejprve byl připraven 15 hm. % roztok ve směsi rozpouštědel DCM/DMF (1:1). Poté byly přidány různé koncentrace pyrrolu. Výsledný roztok byl míchán alespoň 5 hodin (750 rpm). Nanovláčka byla připravena elektrospinningem z jehly (0,6 ml/hod, 15,6 kV, vzdálenost elektrod 15 cm). Analýza SIMS ukázala, že připravená nanovláčka skutečně obsahuje pyrrol. Při přípravě povrchové PPy vrstvy byl pyrrol rozpuštěn v 180 ml vody a 60 ml methanolu společně se surfaktantem 2-naftalensulfonátem sodným (SNS). Oxidační činidlo FeCl_3 bylo rozpuštěno v 60 ml vody a promícháno s roztokem pyrrolu. Do této polymerační lázně byla okamžitě vložena dříve připravená nanovláčka. Reakce ponechána 8 hodin, poté byla vlákna promyta destilovanou vodou a acetonem a vysušena. Článek se dále zabýval vlivem koncentrace Py v PCL roztoku před elektrostatickým zvlákňováním na výsledné vlastnosti materiálu.

1.4. Konjugáty pyrrolu a cyklodextrinu

1.4.1. Cyklodextriny

Cyklodextriny jsou cyklické oligosacharidy, vyráběné enzymatickou degradací škrobu. Přírodní cyklodextriny se označují jako α , β , nebo γ podle počtu D-glukopyranózových jednotek spojených pomocí glykosidických $\alpha(1,4)$ vazeb. Průměr vnitřní kavity, ohraničené pláštěm glukopyranózových jednotek, roste se zvyšujícím se počtem těchto jednotek. α -CD se skládá z 6 jednotek a vnitřní průměr kavity má 5,7 Å, β -CD ze 7 jednotek a má vnitřní průměr 7,8 Å a γ -CD z 8 jednotek a jeho kavita má vnitřní průměr 9,5 Å. Ve všech případech je výška molekuly 7,8 Å.



Obrázek 7 Tvar molekuly cyklodextrinu. Převzato z [18]

Na Obrázek 7 je zobrazen tvar molekuly cyklodextrinu. Na levé straně (o menším průměru) se nachází jedna primární hydroxylová skupina na každou glukopyranózovou jednotku. Pravá strana molekuly (o větším průměru) je lemována dvěma sekundárními hydroxylovými skupinami na glukopyranózovou jednotku. Vnější strana molekuly má hydrofilní charakter, zatímco vnitřní strana má charakter hydrofobní. Tato skutečnost vede k schopnosti cyklodextrinů vytvářet obzvláště ve vodných roztocích inkluzní komplexy s jinými molekulami, či částmi molekul a tím měnit jejich fyziologické vlastnosti [19]. Nejrozšířenějším použitím této skutečnosti je zvyšování rozpustnosti ve vodě nepolárních molekul. Nepolární molekuly takovýmto způsobem „schované“ v kavitě cyklodextrinu se stávají ve vodě rozpustnými. Toho se využívá například v případě různých léčiv [20, 21].

Nejpoužívanějším typem cyklodextrinu je β -CD díky snadnosti jeho výroby a tím pádem jeho nízké ceny. Ten má však ze tří zmíněných cyklodextrinů nejnižší rozpustnost ve vodě. Je to pravděpodobně způsobeno jeho rozměry, které jsou ideální pro tvorbu intramolekulárního prstence vodíkových vazeb, který narušuje hydrataci samotné molekuly. Řešením je substituce několika hydroxylových skupin na obou okrajích β -CD, čímž se přeruší tvorba intramolekulárního prstence vodíkových můstků. Z těchto derivátů navíc některé přinášejí výhodu zlepšených toxikologických vlastností a tak tvoří substituované cyklodextriny více než 1/3 všech cyklodextrinů používaných v lékařství [20].

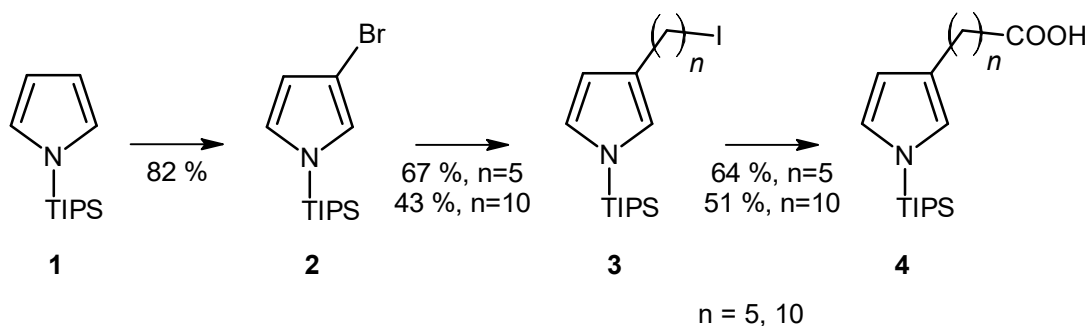
Inkluzní komplexy, tedy takové komplexy, kdy jedna molekula vstupuje do druhé, se nazývají také komplexy „hosta a hostitele“. Cyklodextrin je typickým příkladem hostitele. Na tvorbě těchto komplexů se podílí celá řada sil. Kromě již zmíněného vlivu hydrofobního prostředí, také dochází k interakci hosta a hostitele pomocí Van der Waalsových sil, či vodíkových můstků. Velikost molekuly hosta hraje při tvorbě inkluzního komplexu velkou roli. Prvním předpokladem je, aby byla molekula či její část, která má vytvořit inkluzní komplex, menší

než je velikost kavity cyklodextrinu. Teoreticky by bylo možné, aby se molekula či její část, vnořila do kavity cyklodextrinu velmi natěsno, avšak komplexy s molekulami o něco menšími se vyznačují značně vyšší stabilitou. [22]

1.4.2. Syntéza konjugátu pyrrolu a β -CD

V této podkapitole budu pojednávat o syntéze konjugátů pyrrolu a β -CD **1** a **2**, které budou použity k přípravě modifikovaných polypyrrolových vrstev. Tato syntéza je popsána v dosud nevydaném článku autorů Ing. Jana Lukáška, Ing. Markéty Řezankové, Ph.D., prof. Ing. Ivana Stibora, CSc. a RNDr. Michala Řezanky, Ph.D.

Díky vysoké reaktivitě pyrrolu na α pozici probíhá naprostá většina elektrofilních substitucí právě na této pozici. Ovšem deriváty pyrrolu s již obsazenou α pozicí nepodléhají polymeračním reakcím. Proto je potřeba směřovat modifikaci pyrrolu do β pozice. Existují také případy polypyrrolu s substituovaným vodíkem na dusíku, avšak tyto polymery se vyznačují výrazně zhoršenými vlastnostmi, zejména špatnou elektrickou vodivostí. Možným řešením tohoto problému je snížení reaktivity α -polohy, některou z chránících skupin. Jedná se o navázání konkrétních funkčních skupin na dusík pyrrolu. Tyto chránící skupiny mohou fungovat na několika principech. Jedním z nich je snížení elektronové hustoty aromátu připojením elektron akceptorní skupiny, čehož využívá například *p*-toluensulfonylová skupina. Nevýhodou tohoto přístupu je znemožnění reakce některých elektrofilních činidel, či nevýhodné poměry výtěžků α a β substituovaných derivátů. Další možností je sterické chránění α pozice, kdy se na dusík připojí velmi objemná skupina, která znemožní elektrofilnímu činidlu atak na α pozici. Jednou z nejpoužívanějších chránících skupin založených na tomto principu je triisopropylsilyl (TIPS). Toto chránění není 100% a vznikají i α substituované deriváty pyrrolu, nicméně ty většinou není problém odstranit pomocí sloupcové chromatografie. Další výhodou této skupiny je snadná odstranitelnost pomocí fluoridu tetraalkylamonného. TIPS-pyrrol **1** je komerčně dostupný a právě on posloužil jako prekurzor pro další syntézu.

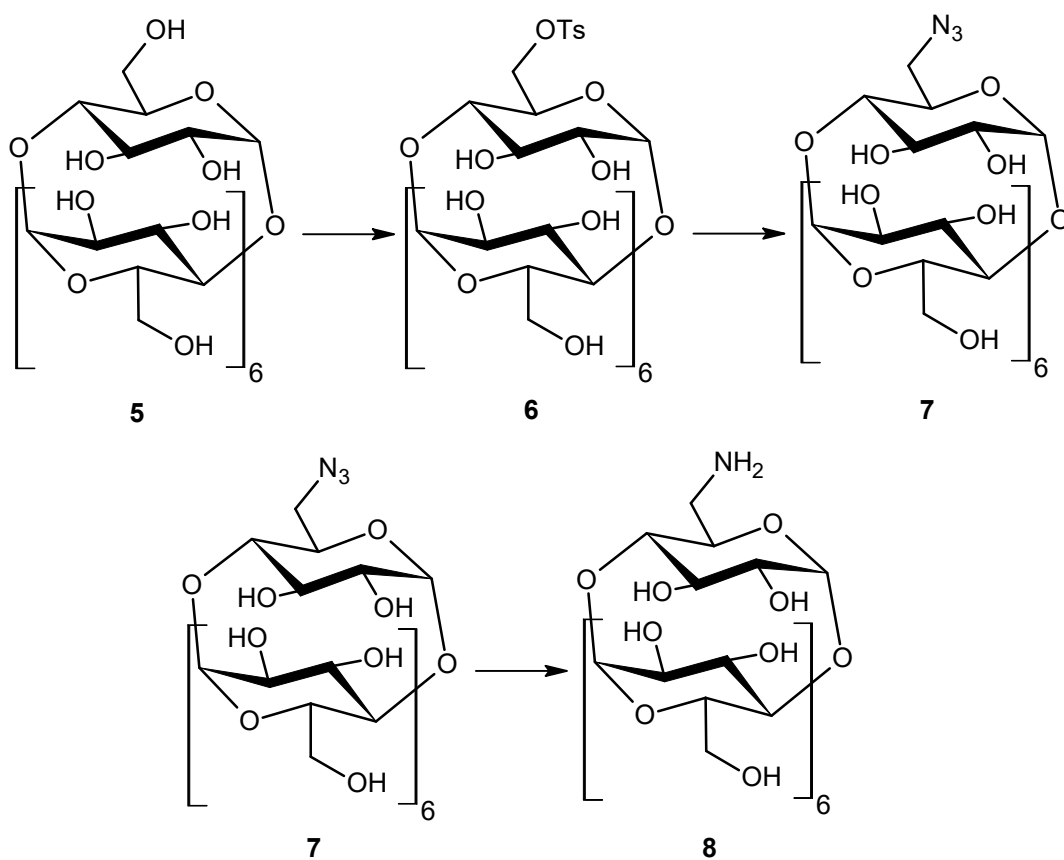


Obrázek 8 Syntéza derivátu 4

Prvním krokem byla bromace derivátu **1** pomocí bromočinidla NBS. Tato reakce s 1. ekv. NBS dává vzniknout směsi monosubstituovaných derivátů pyrrolu. Jejich poměr závisí na zvolené teplotě reakce. Při laboratorní teplotě je poměr $\beta:\alpha$ substituovaných derivátů pyrrolu asi 2:1. Při snížení teploty na $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ se tento poměr dostane na 19:1. [23] Výtěžek tohoto reakčního kroku byl 82 %.

Dalším krokem byla syntéza β substituovaných jodoalkylů pyrrolu, což bylo provedeno alkyací lithných intermediátů. Ty byly připraveny lithiací **2** pomocí *n*-BuLi při $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po jedné hodině míchání byl přidán 1,5-dijodopentán, nebo 1,10-dijododekan. Reakce byla ukončena přidáním nasyceného roztoku NH_4Cl a vyextrahována hexanem. Získaný produkt musel být přečištěn pomocí sloupcové chromatografie. Výtěžek tohoto reakčního kroku byl 67 % pro $n=5$ a 43 % pro $n=10$.

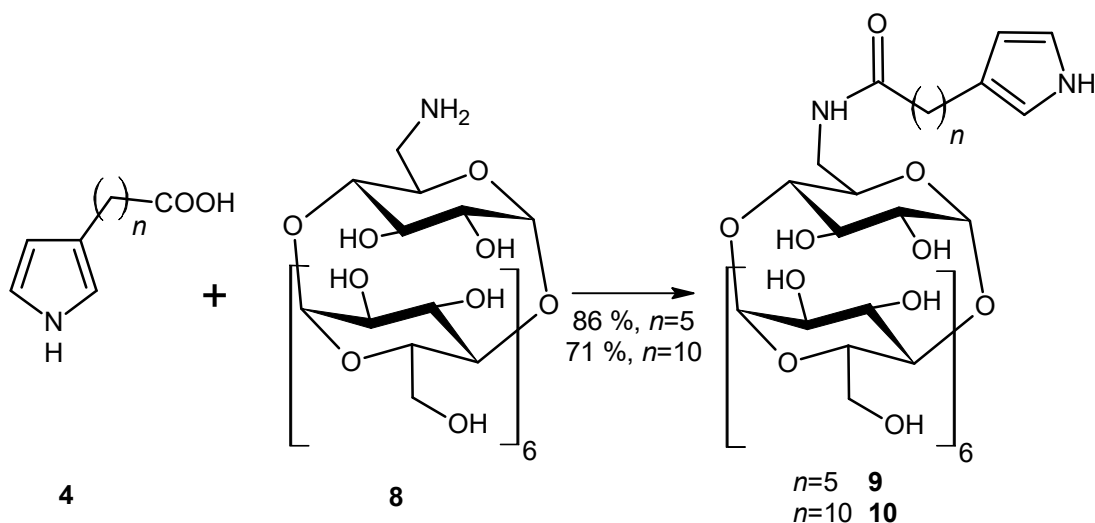
Podobným postupem byl z **3** připraven **4**. Derivát **3** byl lithiován pomocí *t*-BuLi a následně probublán CO_2 . Reakce byla ukončena přidáním nasyceného roztoku NH_4Cl a vyextrahována chloroformem. Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie. Výtěžek tohoto reakčního kroku byl 64 % pro $n=5$ a 51 % pro $n=10$.



Obrázek 9 Syntéza derivátu **8**

Dále byla provedena syntéza 6^A-amino-6^A-deoxy-β-cyklodextrinu podle článku [24]. Jedná se o poměrně jednoduchou syntézu, která je avšak více náročná na čas potřebný k přečišťování jednotlivých produktů. U jednotlivých kroků (kromě prvního) je dosahováno téměř kvantitativních výtěžků.. Prvním krokem byla tosylování β-cyklodextrinu pomocí tosyl (*p*-toluensulfonyl) chloridu **6**. Dále následovala záměna tosyly za azid **7** pomocí azidu sodného a jeho následná redukce na amin **8** pomocí trifenylofosfinu.

Zbývala pouze konjugace již připravených derivátů **4** a **8**. Ty byly společně vloženy do baňky, navíc k nim byl přidán PyBOP, rektant používaný při couplingu peptidů a sloužící k aktivaci karboxylové skupiny. Tyto sloučeniny byly rozpuštěny v DMF, následně k nim byl přidán DIPEA. Reakční směs byla nechána míchat po 16 hodin při laboratorní teplotě. Dále k nim byl přidán Et₃N a HF, pro odstranění TIPS chránící skupiny. Po další hodině byly všechny rozpouštědla odpařeny a nažloutlý olejovitý produkt byl vysrážen v acetonu. Bílá sraženina byla zfiltrována na fritě. Reakce proběhla ve výtěžku 86 % pro konjugát **9** a 71 % pro konjugát **10**. Výtěžek celé syntézy vůči výchozímu TIPS-Py **1** je 20 % pro konjugát **9** a 13 % pro konjugát **10**.



Obrázek 10 Syntéza konjugátů **9** a **10**

2. Experimentální část

Analytické metody:

NMR spektra byla měřena na přístroji JEOL JNM-ECZR 500 MHz. Jako rozpouštědlo byl použit deuterovaný chloroform či dimethylsulfoxid, ke kterému byly vztaženy posuny v ppm. Spektra měřil doc. Ing. Bohumil Dolenský, Ph.D. na Ústavu analytické chemie VŠCHT Praha.

Hmotnostní spektra byla měřena na hmotnostním spektrometru AB Sciex 3200 QTRAP s připojeným kapalinovým chromatografem Thermo Ultimate 3000.

SEM snímky pořídil Ing. Pavel Kejzlar, Ph.D. z Oddělení přípravy a analýzy nanostruktur CXI TUL na přístroji UHR FE-SEM ZEISS Ultra Plus.

Chromatografické metody:

TLC analýzy byly prováděny na silikagelových foliích Silica gel F₂₅₄ (Merck). Detekce byla prováděna pomocí UV lampy P-lab s vlnovým rozsahem 254 a 365 nm. Sloupcová chromatografie byla prováděna na silikagelu 60 (Merck).

Chemikálie a rozpouštědla:

Použité chemikálie byly dodány firmami Sigma-Aldrich, Acros, Penta a před použitím nebyly dále čištěny, pokud není uvedeno jinak. Rozpouštědla byla před použitím destilována, a pokud bylo nutné tak sušena podle klasických laboratorních předpisů a skladována nad aktivovanými molekulovými sítí o průměru 1,6 mm s velikostí pórů 4 Å.

2.1. Příprava polypyrrolových vrstev

Z PCL nanovláken byl vystřižen čtverec o rozměru 7 x 7 cm a následně upevněn do teflonového rámečku pomocí nerezových šroubů. Nanovlákná byla ponořena do 0,01 M roztoku NaOH na 5 minut, z toho první minutu byla sonifikována. Po pěti minutách byla nanovlákná opláchnuta destilovanou H₂O proudem ze stříčky, 1 minutu sonifikována v H₂O a znovu opláchnuta proudem ze stříčky.

Ve 250 ml Erlenmayerově baňce bylo smícháno 120 ml methanolu a 80 ml destilované vody, pro vytvoření 60% (v/v) methanolu, který sloužil jako rozpouštědlo. Do uzavíratelné plastové nádoby bylo nalito 120 ml rozpouštědla a přidáno 140 µl čerstvě destilovaného pyrrolu (tak

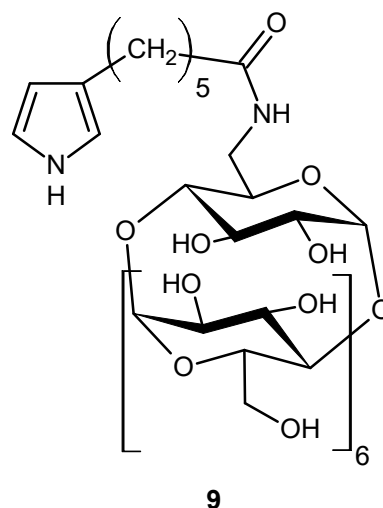
aby výsledná koncentrace v lázni byla 0,01 mol/l). Do nádoby bylo přidáno magnetické míchadlo a roztok pyrrolu byl důkladně promíchán. Poté byl do lázně ponořen rámeček s vlákny, který zde byl ponechán po dobu 90 minut, za mírného míchání (100 rpm). Po této době bylo do lázně přidáno 380 mg PTSA (1 ekv.) a 779 mg FeCl₃ (2,4 ekv.) rozpuštěné v 80 ml 60% MeOH. Ponecháno míchat po dobu tří dnů. Po této době původně bílá vlákna úplně zčernala, což je znakem vytvoření polypyrrolové vrstvy.

Po vyndání vzorku z polymerační lázně byl důkladně opláchnut vodou a ponořen na 5 minut do destilované vody a zároveň sonifikován, aby došlo k rozpuštění a vymytí zbytků FeCl₃ a k odpadnutí částic polypyrrolu, které se vytvoří na povrchu vrstvy. Strídání oplachů a sonifikace po dobu jedné minuty ve vodě bylo provedeno třikrát. Následoval oplach a sonifikace v methanolu a poslední oplach a sonifikace ve vodě. Vzorky byly vysušeny v exikátoru.

2.2. Příprava modifikovaných polypyrrolových vrstev

Vzorky PCL nanovláken byly připraveny stejně jako v případě nemodifikovaných vrstev, tedy upevněny do rámečky a opláchnuty v roztoku NaOH.

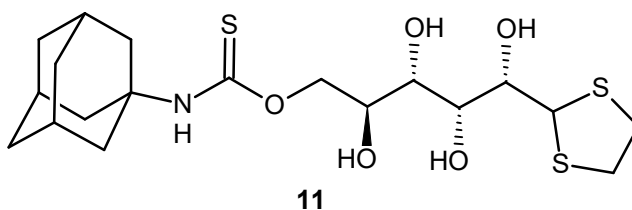
V Erlenmayerově baňce bylo připraveno 80 ml 60% methanolu. Do uzavíratelné plastové nádoby bylo vloženo 40 ml rozpouštědla a 32,5 mg derivátu pyrrolu **9** (tak aby výsledná koncentrace v polymerační lázni byla 0,5 mmol/l). Roztok byl po dobu jedné minuty podroben sonifikaci, čímž se látka **9** rozpustila. Dále bylo do roztoku vloženo 33 μ l čerstvě destilovaného pyrrolu (tak aby výsledná koncentrace v polymerační lázni byla 9,5 mmol/l). Nádobka byla vložena na třepačku, protože díky sníženému objemu polymerační lázně se již pod rámeček s PCL nanovlákný nevešlo magnetické míchadlo. Po krátkém protřepání lázně do ní byl vložen rámeček s vlákny, který v ní byl ponechán třepat na dalších 90 minut (50 rpm). Po této době byl do roztoku přidáno 195 mg FeCl₃ (2,4 ekv. vůči celkovému množství pyrrolu) a 95 mg PTSA (1 ekv. vůči celkovému množství pyrrolu) rozpuštěných v 10 ml 60% MeOH. Polymerace byla ponechána probíhat za laboratorní teploty a mírného třepání (50 rpm) po další 3 dny. Po této době vlákna zcela zčernala.



Černé vzorky byly poté opláchnuty stejným způsobem jako nemodifikované polypyrrolové vrstvy. Tedy: oplach a sonifikace po dobu 5 minut ve vodě, 3x oplach a sonifikace ve vodě po dobu 1 minuty, oplach a sonifikace v methanolu po dobu 1 minuty a oplach a sonifikace ve vodě po dobu 1 minuty. Vzorky byly vysušeny v exikátoru.

2.3. *O*-[(2*S*,3*S*,4*R*,5*S*)-(1,3-dithiolan-2-yl)-2,3,4,5-tetrahydroxypentyl]adamant-1-ylkarbamothionát

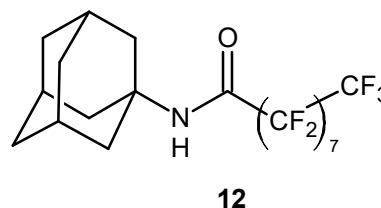
Do dvou 10 ml baněk bylo naváženo 2x 25 mg adamantylisothokyanátu společně s magnetickými míchadly a následně rozpuštěno v 1 ml suchého DMF. Do jedné z baněk bylo dále vlo-



ženo 0,1 ml pyridinu. Do obou baněk bylo přikapáno 50 mg 2-D-glukozyl-1,3-dithiolanu rozpuštěného v 1 ml DMF. Ponecháno reagovat za laboratorní teploty a stálého míchání do druhého dne. Pomocí TLC (eluent EtOAc : MeOH 5:1) bylo zjištěno, že nedošlo k reakci a oba reaktanty zůstávají v reakční směsi. Teplota reakce byla upravena na 40 °C. Za těchto podmínek byla ponechána za stálého míchání do dalšího dne. Další TLC analýza prokázala stálou přítomnost obou reaktantů.

2.4. *N*-(adaman-1-yl)heptadekafluorononan-1-ylamid

Do 4 ml vialky s víčkem uzpůsobeným pro přístup jehlou bylo naváženo 20 mg adamantylaminu. Do vialky bylo vloženo magnetické míchadlo a 1 ml čerstvě destilovaného THF. Hamiltonovou sříkačkou bylo přidáno 6 µl pyridinu.

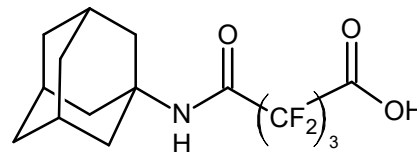


Po chvíli míchání bylo přidáno 35 mg heptadekafluoronan-1-ylchloridu rozpuštěných v 0,5 ml THF. Okamžitě po přidání se vytvořila bílá sraženina. Reakční směs byla nechána reagovat za laboratorní teploty a stálého míchání po 2 hodiny. Poté byla reakční směs přefiltrována přes kolonu silikagelu (eluent hexan: EtOAc 3:1). Filtrát byl odpařen za sníženého tlaku na vakuové rotační odparce. Bylo získáno 41 mg bílého prášku.

2.5. 5-[(adamant-1-yl)amin]-2,2,3,3,4,4-hexafluoro-5-oxopentanova kyselina

2.5.1. Postup A a B

Do 25 ml baňky bylo naváženo 100 mg adamantylaminu (0,66 mmol) a ponecháno sušit v exikátoru. Druhého dne bylo do baňky vloženo magnetické míchadlo a baňka byla uzavřena septem. Dále byly do baňky přidány 3 ml čerstvě destilovaného THF a probublány argonem. Po



13

probublání byla do septa zabodnuta jehla připojená k balónku naplněnému argonem. Do suché zaseptované 10 ml srdcové baňky bylo dáno 1,5 ml THF a následně probubláno argonem. Dále do ní bylo přidáno 98 μ l hexafluoroglutaranhydridu (1,1 ekv.). Po promíchání byl obsah srdcové baňky přikapán k roztoku adamantylaminu. Při přikapávání se vytvořila bílá mlha, která po ukončení přikapávání zmizela. Prázdná srdcová baňka byla propláchnuta dalším 1,5 ml THF, které bylo přidáno do reakční směsi. Po 30 minutách byla pomocí TLC (eluent hexan:EtOAc 1:1, obarveno molybdenanem amonným ceričitým) zjištěna nepřítomnost adamantylaminu v reakční směsi. Přebytek hexafluoroglutaranhydridu byl odpařen na rotační vakuové odparce za sníženého tlaku, při 30 °C. Bylo získáno 150 mg bílého prášku.

Postup B používá Et₃N jako rozpouštědlo a poloviční navážky reaktantů proti postupu A. Po odpaření rozpouštědla bylo získáno 43 mg naoranžovělé látky medovité konzistence.

2.5.2. Postup C

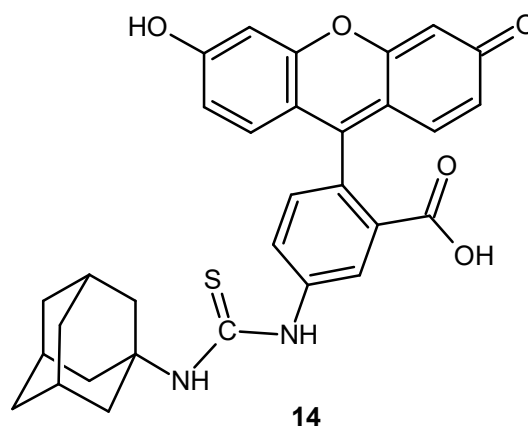
Do 25 ml baňky bylo naváženo 50 mg adamantylaminu (0,33 mmol) a 2 ekv. K₂CO₃. Po přidání magnetického míchadla byla baňka zaseptována a reaktanty byly rozpuštěny v 6 ml čerstvě destilovaného THF, probublány argonem a ponechány míchat pod balónkem s argonem. 1,1 ekv. hexafluoroglutaranhydridu (50 μ l) bylo rozpuštěno v 1 ml THF a přikapáno do reakční směsi. Zbytky roztoku hexafluoroglutaranhydridu byly rozpuštěny v 1 ml THF a též přikapány do reakční směsi. Reakce byla monitorována pomocí TLC. Po 1 hodině byl přebytek hexafluoroglutaranhydridu odpařen za sníženého tlaku na vakuové rotační odparce společně s rozpouštědlem. Produkt byl rekrystalován z vody, pro zbavení se K₂CO₃. Bylo získáno 20 mg bílého prášku, který byl odeslán na NMR analýzu.

2.5.3. Postup D

Do suché 50 ml baňky s magnetickým míchadlem bylo vloženo 100 mg adamantylaminu (0,66 mmol), zaseptováno a následně rozpuštěno v 10 ml čerstvě destilovaného DCM. Roztok byl probublán argonem a ponechán pod balonkem s argonem. Do baňky bylo dále přidáno 6 ekv. Et_3N (550 μl) a reakční směs byla ochlazená na 0 °C. 1,5 ekv. hexafluoroglutaranhydridu bylo rozpuštěno v 3 ml DCM a pomalu přikapáno do reakční směsi. Další 2 ml DCM byly použity k vypláchnutí baňky se zbytky hexafluoroglutaranhydridu, které byly také přikapány do reakční směsi. Reakce byla dále chlazená na 0 °C za stálého míchání. Po 3 hodinách byla reakce ukončena přidáním vody. Reakční směs byla extrahována mezi 1% HCl a chloroform. Vodná fáze byla odpařena a byly získány číré krystaly, které byly rekrystalovány z DCM. Jejich analýzou však byly identifikovány jako Et_3NHCl . Po odpaření organické fáze bylo získáno 17 mg bílého prášku.

2.6. *N*-adamant-1-yl-*N*-fluoresceinthiomocovina

V 50 ml baňce s magnetickým míchadlem bylo naváženo 310 mg FITC (0,79 mmol) a 1 ekv. adamantylaminu (120 mg). Reaktanty byly rozpuštěny v 30 ml čerstvě destilovaného THF, probublány argonem a drženy pod septem s balonkem naplněným argonem. Reakční směs byla ponechána při laboratorní teplotě reagovat po dobu 3 dní. Po této době bylo rozpouštědlo odpařeno za sní-



ženého tlaku při 40 °C na rotační vakuové odparce. Produkt byl přečištěn pomocí sloupcové chromatografie (silikagel, jako eluent bylo použito $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ v opměru 5:1). Bylo získáno 316 mg oranžového prášku.

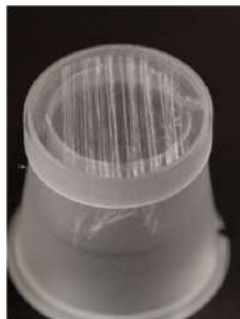
3. Výsledky a diskuze

3.1. Příprava polypyrrolových vrstev

Jak ukázal článek [14], průběh *in situ* polymerační reakce je ovlivněn použitým substrátem, na kterém PPy vrstva vzniká. Proto bylo nejprve přistoupeno k tvorbě nemodifikované polypyrrolové vrstvy. Dalším důvodem pro tvorbu nemodifikované vrstvy byla možnost následného porovnání jejích adsorbčních vlastností s vrstvou modifikovanou. Pro tvorbu vrstvy byly použity dva druhy substrátu: prvním byla PCL nanovlákná o průměru 1 μm , připravená elektrostatickým zvlákňováním, a druhým byla rovnoběžně orientovaná PCL mikrovlákná vytvořená metodou „drawing“ (tažením).

Vzorky z nanovláknenné textilie byly připraveny následujícím způsobem: nejprve byl upraven jejich tvar na čtverec o rozměrech 7 x 7 cm, což byla velikost rámečků, do kterých byla textilie následně upevněna. Vnitřní rozměr rámečku byl 4 x 4 cm, což byla také plocha, kterou byla textilie přístupná pro depozici polypyrrolu. Upevnění do rámečku bylo nutné z důvodů zachování tvaru vzorků při polymeraci, při neupevnění by docházelo ke srolování textilie do koule, kterou by vznikající polypyrrol spojil do jednolitého celku, již obtížně rozmotatelného. Teflon jako materiál, ze kterého byly rámečky vyrobeny, má tu výhodu, že je chemicky inertní vůči běžným rozpouštědlům a kyselinám. Po proběhnutí polymerační reakce ho tedy lze jednoduše vyčistit od usazeného polypyrrolu peroxosírovou kyselinou a využít znovu.

Rovnoběžně orientovaná vlákna byla upevněna na PMMA válečku o průměru 1 cm (Obrázek 11). Ten byl v jednom místě přeříznut a následně stažen plastovým kroužkem o menším průměru, než měl válec ve volném stavu. Mezi tento kroužek a válec byla vložena vlákna, která zde tlakem sevřeného válce na kroužek držela. Vlákna byla takto upevněna již z procesu jejich výroby na KNT FT TUL.



Obrázek 11 Upevňovací válečky pro rovnoběžně orientovaná PCL mikrovlákná.

Pro možnost komparativního sledování změn na vláknech byly vzorky rozděleny do následujících skupin:

A – Nemodifikované vzorky - kontrola

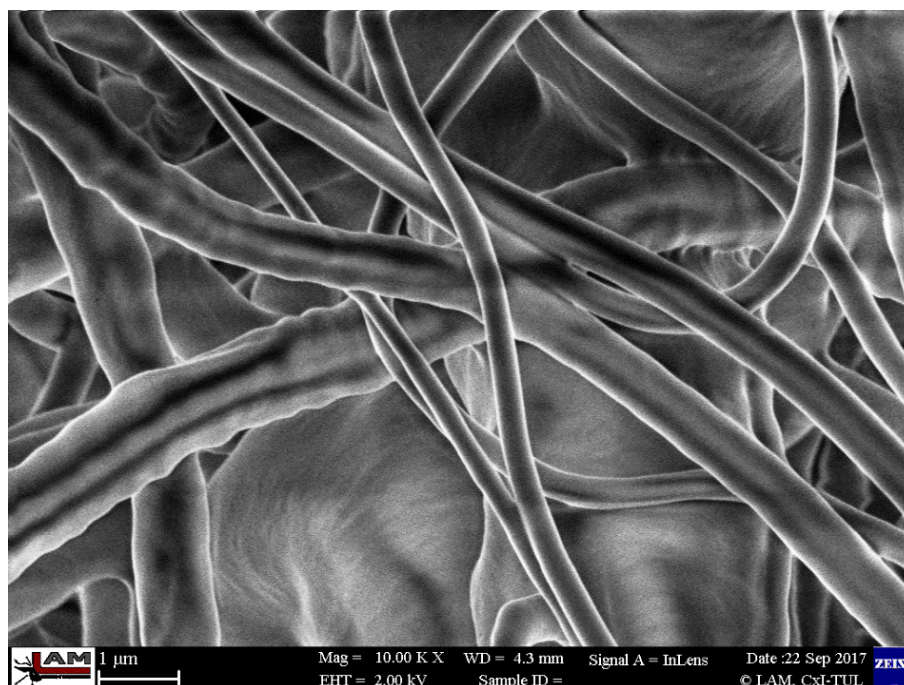
B – Oplach 0,01 M roztokem NaOH

C – Oplach 0,01 M roztokem NaOH + polymerace pyrrolu

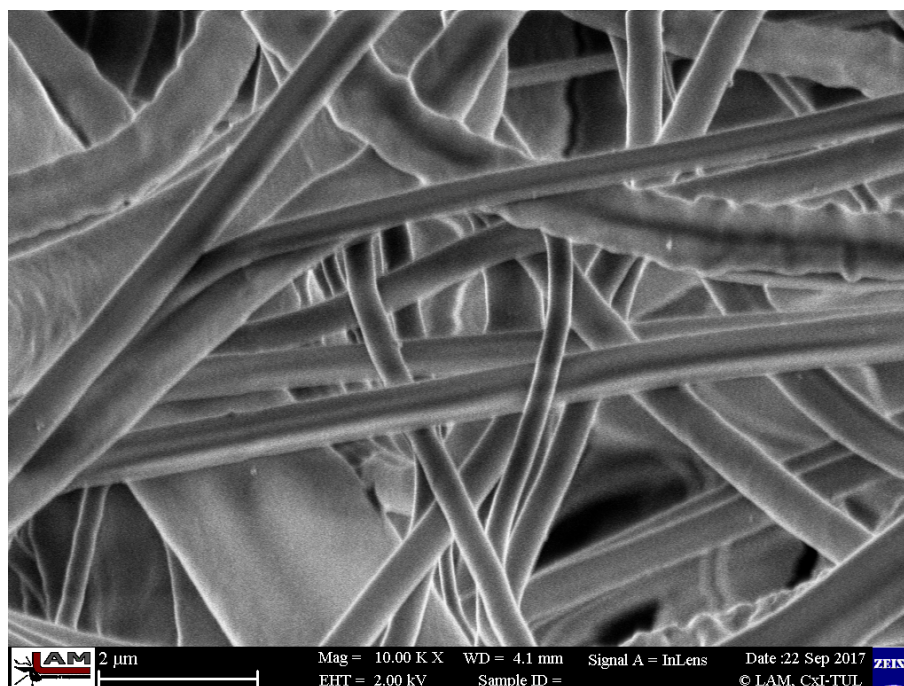
D – Oplach 0,01 M roztokem NaOH + polymerace pyrrolu s přidavkem dopantu (PTSA)

Vzorky B, C, a D byly nejprve vloženy do 0,01 M roztoku NaOH kvůli odstranění případných nečistot z jejich povrchu. Vzorky C a D byly dále pokryty vrstvou polypyrrolu. Detailní postup polymerační reakce je uveden v experimentální sekci. Nejprve probíhalo syčení vzorků v roztoku pyrrolu, díky tomu mohl pyrrol plně prostoupit celou strukturu textilie a po polymeraci vytvořit obal kolem jednotlivých vláken. Po nasycení vzorků bylo přidáno oxidační činidlo. Za to bylo zvolen FeCl_3 , jednak díky své ceně a dostupnosti, ale zejména proto, že poskytuje polypyrrol o velmi dobré kvalitě a el. vodivosti. Při použití sinějšího oxidačního činidla by vznikalo více iniciačních center a vznikaly by kratší PPy řetězce. K vzorku D byla navíc přidána kys. *para*-toluensulfonová (PTSA) jako dopant. Svou přítomností by měla výrazně zlepšit el. vodivost výsledného produktu.

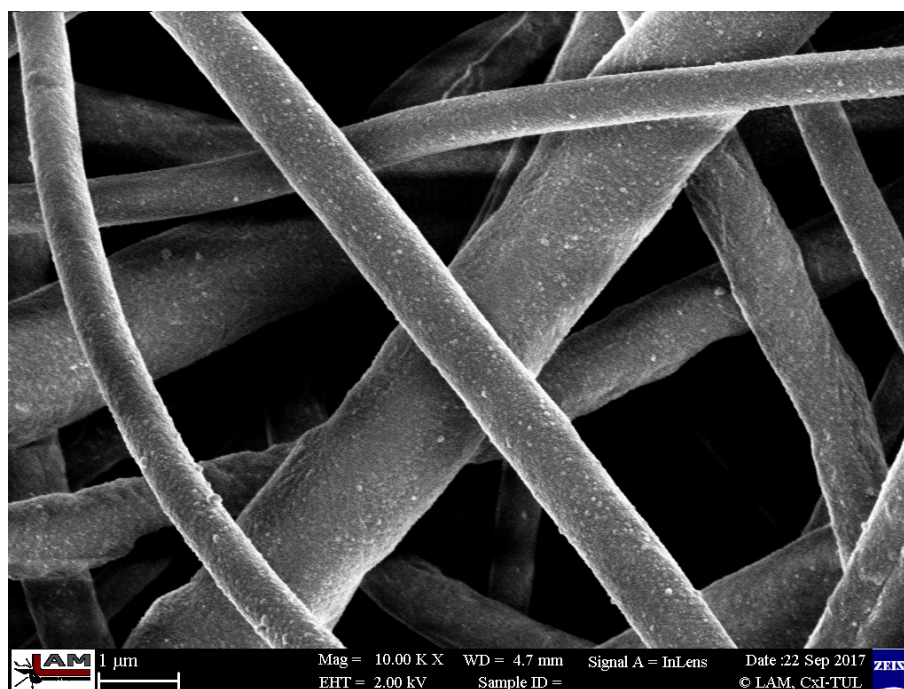
Všechny vzorky byly podrobeny zkoumání morfologie jejich povrchu na SEM.



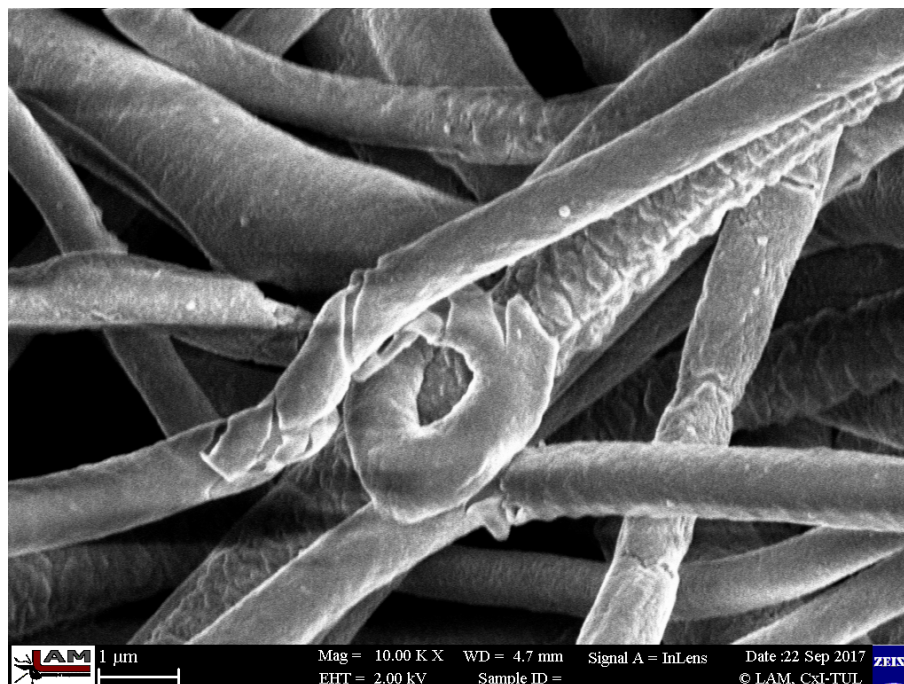
Obrázek 12 SEM obrázek textilního vzorku A – PCL nanovlákn



Obrázek 13 SEM obrázek textilního vzorku B – PCL nanovlákná omytá v roztoku NaOH

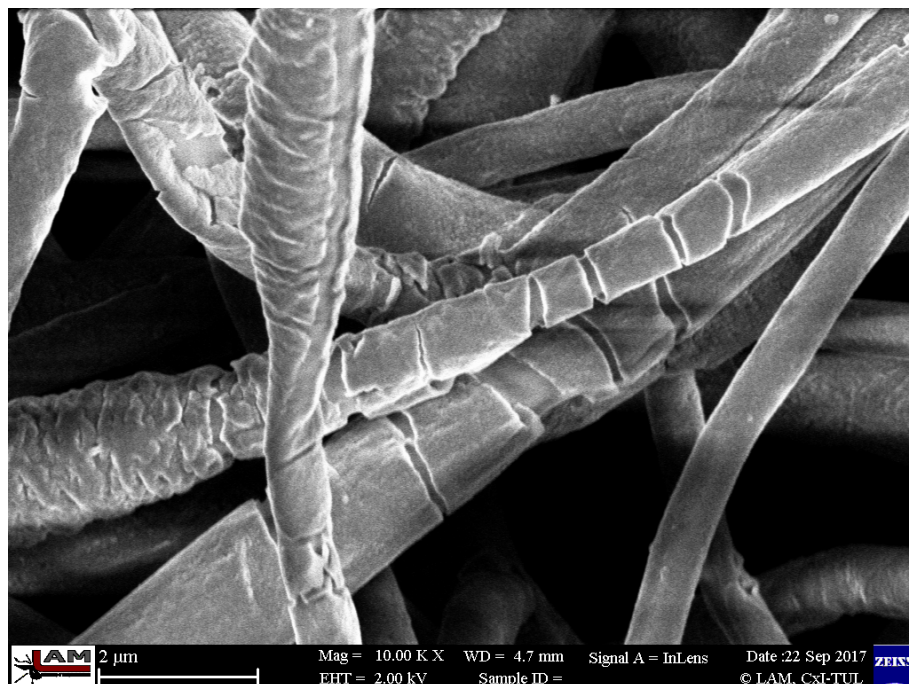


Obrázek 14 SEM obrázek textilního vzorku C – PCL nanovlákná s vrstvou PPy

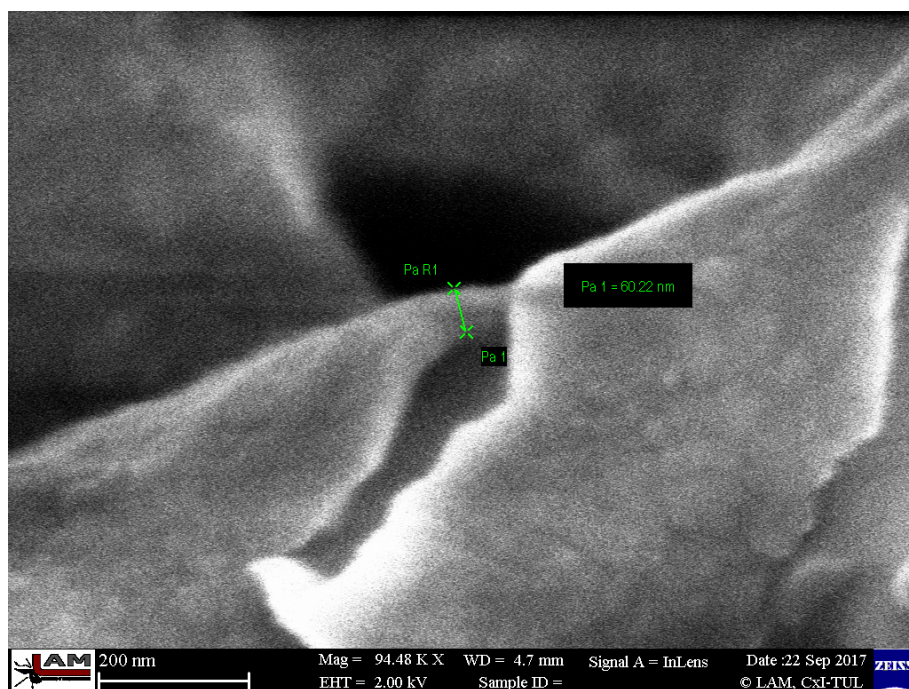


Obrázek 15 SEM obrázek textilního vzorku D – PCL nanovlákná s dopovanou vrstvou PPy

Na všech SEM snímcích vidíme, že se jedná o náhodnou spleť vláken, tak typickou pro produkty elektrostatického zvlákňování. Vlákná mají skutečně průměr kolem $1\ \mu\text{m}$, avšak rozpětí průměrů je poměrně široké. Vzorky A (Obrázek 12) a B (Obrázek 13) se od sebe morfologií povrchu příliš neliší. Oplach na roztoku NaOH tedy nezanechal žádné viditelné změny. Na vzorcích C (Obrázek 14) a D (Obrázek 15) již můžeme pozorovat drobné nerovnosti na povrchu nanovláken způsobené deponováním PPy. Také můžeme pozorovat, že mikroskop je schopen lepšího rozlišení a vlákna tolik „nesvítlí“. Zhoršená kvalita obrazu na obrázcích 12 a 13 je způsobena nabíjením vzorku, ke kterému již na obrázcích 14 a 15 nedochází, díky vodivé vrstvě PPy na povrchu vláken. Mezi vzorky C a D nejsou pozorovatelné větší rozdíly, můžeme tedy usoudit, že dopování polypyrrolu pomocí PTSA nemá vliv na morfologii povrchu. Na některých místech na vzorcích C a D se však objevují v PPy vrstvě defekty (Obrázek 17), v podobě přerušení vrstvy polypyrrolu, které zde mohly vzniknout při manipulaci se vzorkem. V jednom takovém defektu byla změřena tloušťka PPy vrstvy (Obrázek 17), která v tomto místě byla $60\ \text{nm}$. Obecně z měření na více místech víme, že tloušťka vrstvy se pohybuje mezi 50 a $80\ \text{nm}$.



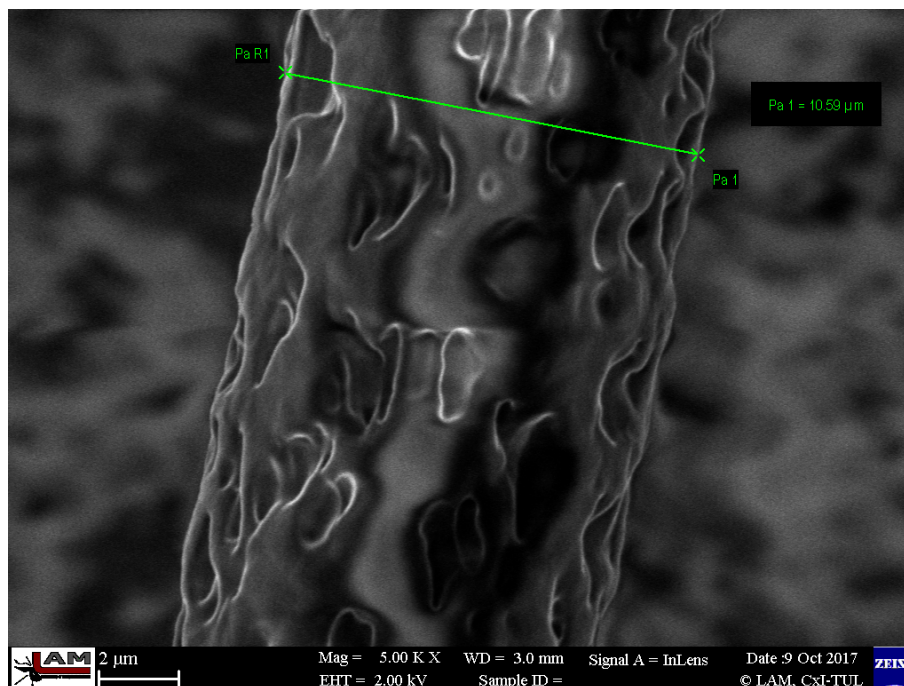
Obrázek 16 Defektní místo v PPy vrstvě v textilním vzorku D



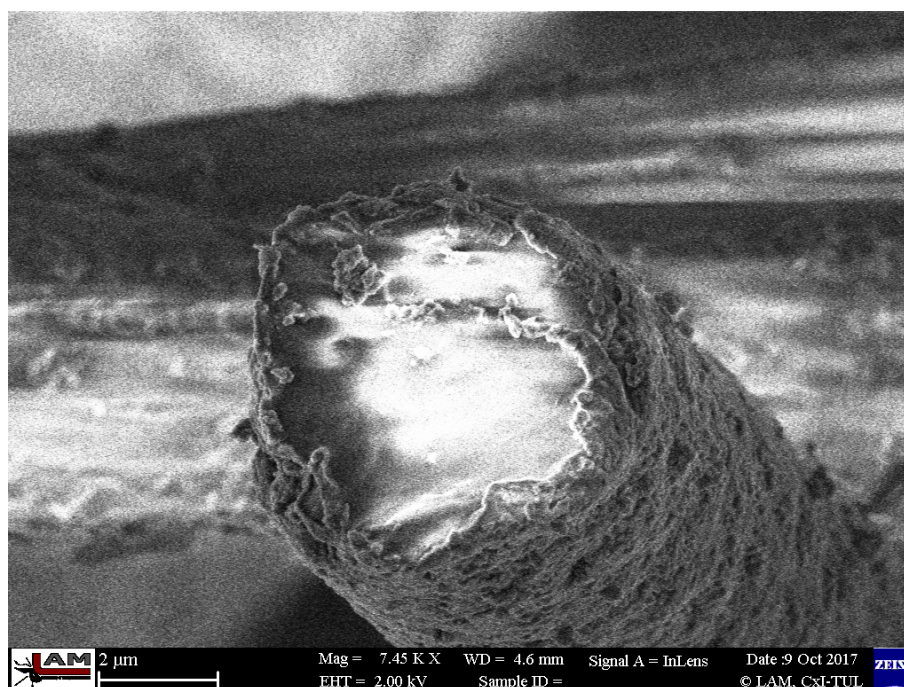
Obrázek 17 Měření tloušťky PPy vrstvy na povrchu textilního vzorku D

Podobně na tom morfologicky byly také vzorky rovnoběžně orientovaných mikrovláken. Na obrázku 14 vidíme mikrovláknko o průměru 10 μm bez jakékoliv modifikace. Na povrchu lze pozorovat póry charakteristické pro PCL mikrovláknka vyrobená metodou „drawing“. Vzorek B vypadal stejně jako v případě textilních vzorků, měl shodnou morfologii se vzorkem A, proto zde není zobrazen. Vzorky C a D jsou zastoupeny v podobě obrázků řezů vláken.

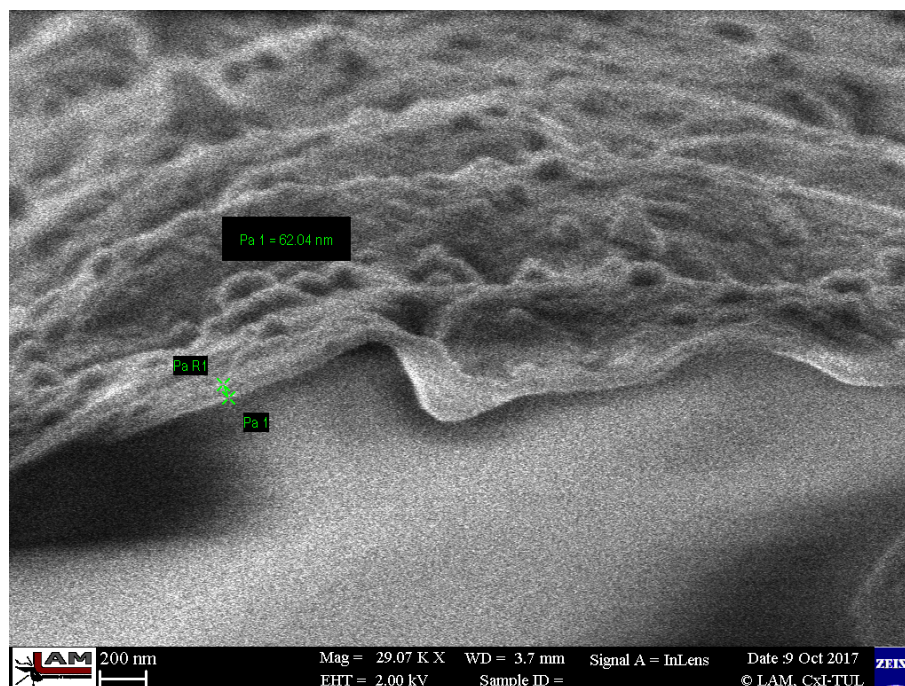
Ty vznikly zmražením vzorku v kapalném dusíku a následným kolmým řezem zmraženého vzorku skalpelem. Na obrázku vzorku C (Obrázek 19) si můžeme detailně prohlédnout morfologii PPy vrstvy a pozorovat efekt nabíjení nevodivého PCL jádra vlákna. Na obrázku 20 vidíme změřenou tloušťku vrstvy vzorku D, která i v tomto případě byla mezi 50 a 80 nm, konkrétně 62 nm.



Obrázek 18 SEM obrázek mikrovlákného vzorku A

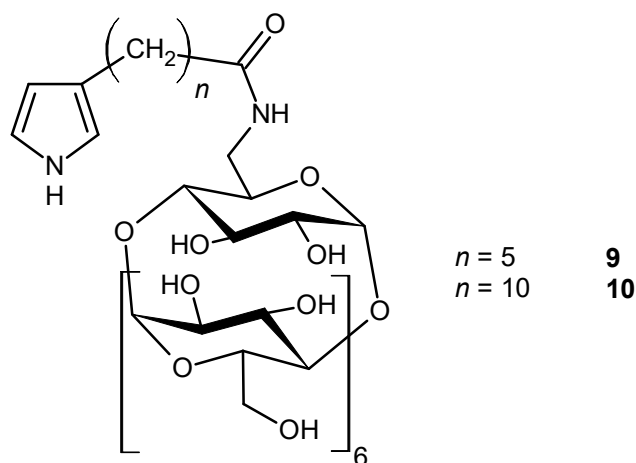


Obrázek 19 SEM obrázek řezu mikrovlákného vzorku C



Obrázek 20 SEM obrázek mikrovlákného vzorku D

3.2. Příprava modifikovaných polypyrrolových vrstev



Obrázek 21 Chemická struktura derivátů pyrrolu **9** a **10**

Nejprve byl proveden pokus o polymeraci pyrrolového derivátu **10** v malém množství rozpouštědla, za použití různých oxidačních činidel, pro zjištění jejich schopnosti iniciovat polymerační reakci. Oxidační činidla byla vybrána dle článků [25, 26], které porovnávají účinky jednotlivých oxidačních činidel. Byla vyzkoušena následující oxidační činidla: FeCl_3 , $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, CuCl_2 a $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$. Několik mg modifikovaného pyrrolu se nechalo rozpustit ve vodě a za přídavku oxidačního činidla se nechalo míchat při pokojové teplotě. Po jednom dni, kdy nenastala žádná barevná změna (polypyrrol se vyznačuje výrazně černou barvou, která by v reakční směsi byla lehce pozorovatelná), byla směs zahřívána 1 den

na 50 °C a další den na 70 °C. Bohužel ani po této době a za této teploty se ani v jedné reakci nevytvořila černá sraženina indikující úspěšnou polymerační reakci. Jedním z možných vysvětlení nemožnosti tvorby polymerního řetězce mohou být sterické důvody. Tedy že poměrně velké molekuly cyklodextrinu nemají dostatek místa, aby se mohly energeticky výhodně uspořádat okolo řetězce polypyrrolu. Dalším důvodem by mohlo být, že dochází k rychlé tvorbě intra-, nebo intermolekulárních inkluzních komplexů CD – Py. Pyrrol je pak nepřístupný dalším reakcím. Z tohoto důvodu byla provedena polymerace derivátu **2** znovu, tentokrát s přídavkem toluenu, který vytváří s β – cyklodextriny velmi stabilní komplexy, kavita cyklodextrinu by pak měla být nepřístupná k tvorbě komplexů CD – Py. Polymerace však za těchto podmínek ani po dvou dnech neproběhla. Do reakce byl dále přidán cetrimonium bromid jako surfaktant, nicméně bez jakéhokoli efektu, derivát pyrrolu stále zůstal v reakční směsi nepolymerován.

Bylo proto přistoupeno k tvorbě kopolymeru složeného z modifikovaného a nemodifikovaného pyrrolu v molárním poměru 1:19 (více nemodifikovaného pyrrolu). Tento poměr byl zvolen nižší z důvodu vysoké molekulové hmotnosti modifikovaného pyrrolu (M_w **9** = 1296,5 g/mol, M_w **10** = 1367,36 g/mol) a poměrně dlouhé a nákladné syntéze. Byly provedeny pokusy s deriváty pyrrolu **9** a **10**. Pyrrol má molekulovou hmotnost M_w = 67,09 g/mol, výsledný poměr hmotností jednotlivých navážek monomerů byl tedy skoro 1:1. Detailní postup přípravy kopolymerních vrstev je popsán v experimentální části. Jako substrátu bylo použito stejných PCL nanovláken jako v kapitole 3.1. Tyto vrstvy byly úspěšně připraveny, jejich barva se příliš nelišila od vrstev připravených z nemodifikovaného pyrrolu. Po proběhnutí *in situ* polymerace derivátu **9** byla z obsahu polymerační lázně vyhotovena hmotnostní spektra. Z nich lze pozorovat, že v polymerační lázni se žádný derivát pyrrolu **9** nevyskytuje a pravděpodobně tedy všechen zpolymeroval.

Nabízí se otázka, jaké množství molekul cyklodextrinu je doopravdy přístupné k tvorbě inkluzních komplexů. Vhodné molekuly se musí nacházet na povrchu vrstvy a nesmí mít již obsazenou kavitu jinou molekulou. Při polymeraci může dojít například k vytvoření intermolekulárního komplexu, který však bude zpolymerován, a tak bude polymerní řetězec procházet skrz kavitu cyklodextrinu. Pro kvantifikaci těchto „aktivních center“ bylo v další kapitole navrženo několik metod.

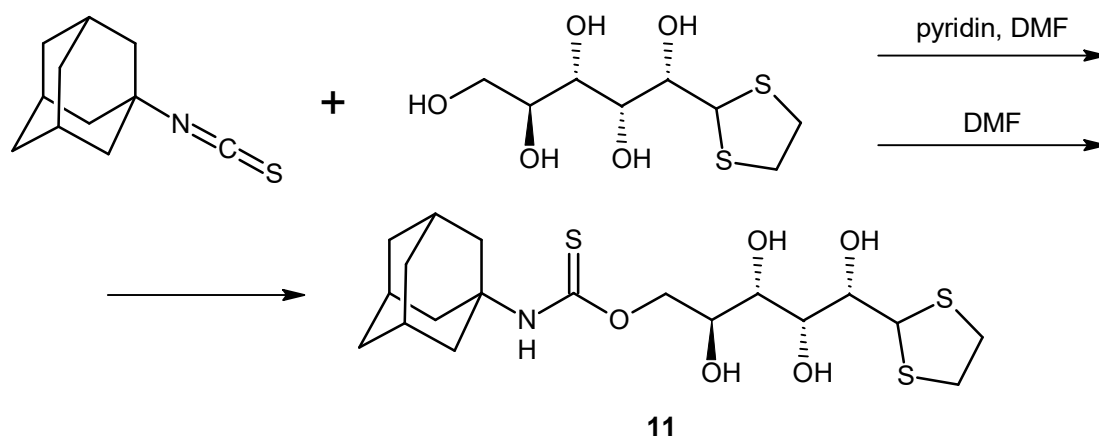
3.3. Metody sledování počtu aktivních center

Pro kvantifikaci aktivních center na povrchu modifikované polypyrrolové vrstvy byla navržena dvojice přístupů, které byly použity. Oba spočívají v návrhu a syntéze takové molekuly, která bude schopná tvorby inkluzního komplexu s β -cyklodextrinem. Protože tyto komplexy mají nejvyšší stabilitu ve vodném prostředí, je vhodné, aby byla námi navržená molekula rozpustná ve vodě. Metody se liší ve způsobu detekce molekul.

První metoda je založená na rozdílném prvkovém složení vrstvy a detekčních molekul. V nejideálnějším případě by měla detekční molekula obsahovat prvek, který se v chemickém složení polypyrrolové vrstvy nevyskytuje. Po vytvoření komplexů bude zjištěno, jaký je obsah tohoto nového prvku ve vrstvě, například pomocí plošné analýzy EDS, a z tohoto údaje bude možné jednoduše spočítat, jaká je koncentrace aktivních center na povrchu modifikované vrstvy. Také byla snaha o návrh látek s co nejjednodušší syntézou. Proto jsou základem navržených molekul především komerčně dostupné látky.

Druhá metoda spočívá v přidání fluorescenční části molekuly. Po vytvoření komplexů bude možné provést spektrofotometrickou analýzu a porovnat její výsledky s vrstvou nemodifikovanou. Kvantitativní analýza by mohla být provedena porovnáním s referenční řadou. Nebyla by to však kvantifikace velmi přesná, protože bychom porovnávali intenzitu emise z pevné látky a z roztoku. Pro přesnou kvantifikaci bychom museli vytvořit řadu vrstev s definovanými počty aktivních center a následně určit neznámou koncentraci aktivních center podle Lambert-Beerova zákona. Což bohužel neumíme. Postačíme si tedy s informací, jak se změní intenzita emitovaného záření ve srovnání s nemodifikovanou vrstvou.

3.3.1. Detekční molekula obsahující síru

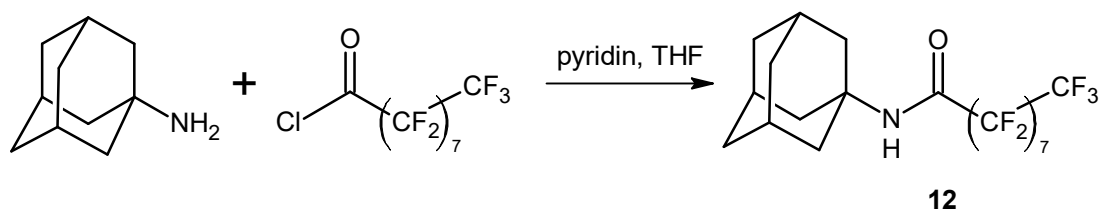


Obrázek 22 Chemická reakce pro přípravu sloučeniny 11

První navrženou molekulou byla sloučenina **3**. Skládá se z adamantylové části, která bude s β -CD vytvářet komplex, glukózová část by měla zajistit rozpustnost ve vodě a thioacetal obsahuje dva další atomy síry, které zvýší intenzitu signálu při EDS analýze. Síru také obsahuje isothiokyanát, který vytvoří spojkou mezi adamantylovou a glukózovou částí molekuly.

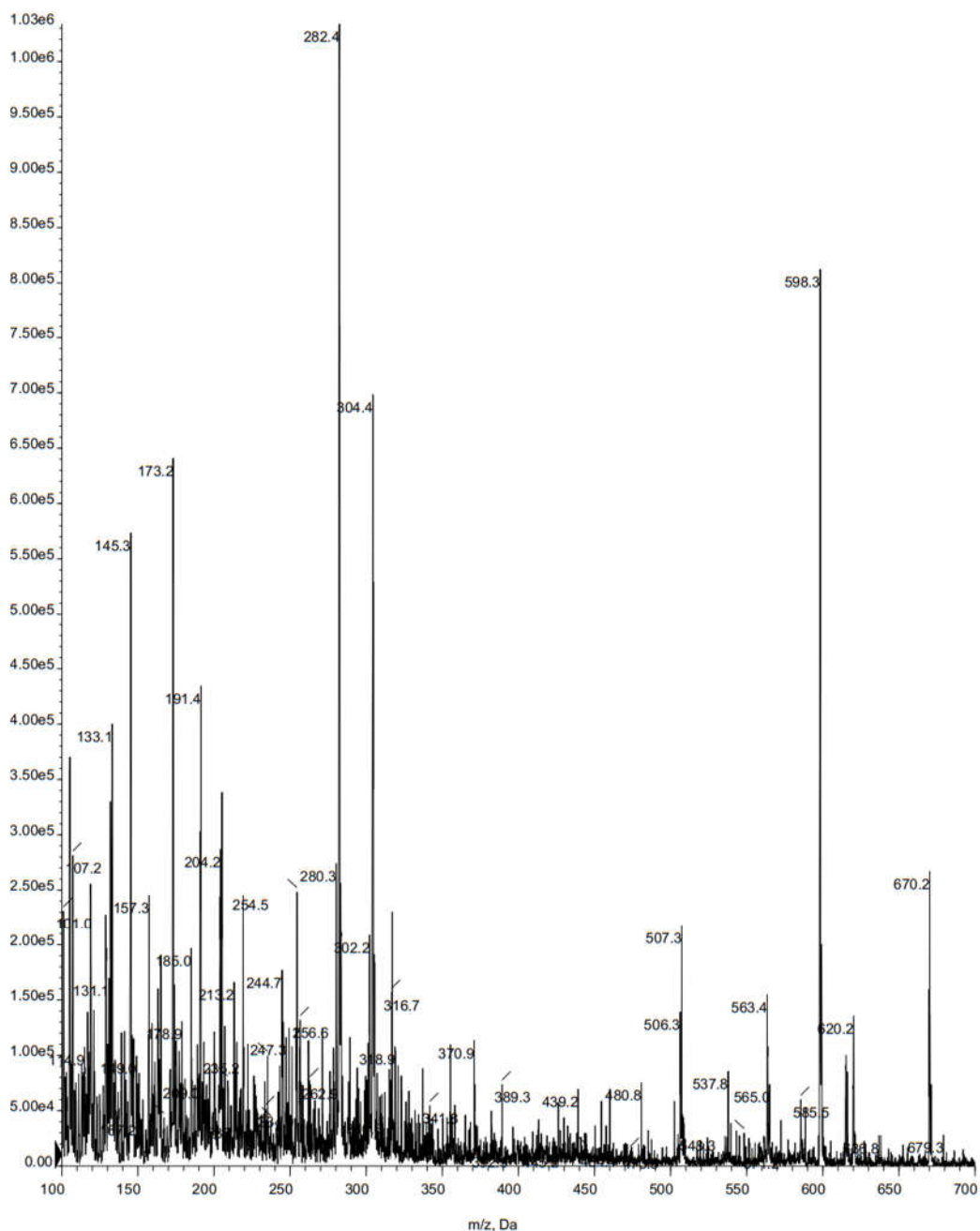
Syntéza byla provedena v suchém DMF v inertní atmosféře, za pokojové teploty. V jednom případě i s přidavkem pyridinu jako báze. Po jednom dni reakce bylo TLC analýzou zjištěno, že obě výchozí látky zůstávají stále v reakční směsi. Teplota byla proto zvýšena na 40 °C. Po dalších dvou dnech byla opět provedena TLC analýza, která prokázala pouze přítomnost obou reaktantů v reakční směsi. Bylo tedy přistoupeno k syntéze jiných molekul.

3.3.2. Detekční molekuly s obsahem fluoru



Obrázek 23 Chemická reakce pro přípravu sloučeniny **12**

Další navrženou molekulou byla sloučenina **12**, tentokrát obsahující fluor. Opět byla použita adamantylová část, která bude tvořit komplex s β -CD. Reakce byla provedena v THF, v inertní atmosféře, s přidavkem pyridinu, za pokojové teploty. Produkt byl přefiltrován na koloně silikagelu a odpařen do sucha. Byl získán bílý prášek, který byl následně analyzován pomocí hmotnostní spektrografie. Nevýhodou této molekuly je, že není rozpustná ve vodě, tedy vzniklé komplexy nebudou tak stabilní.

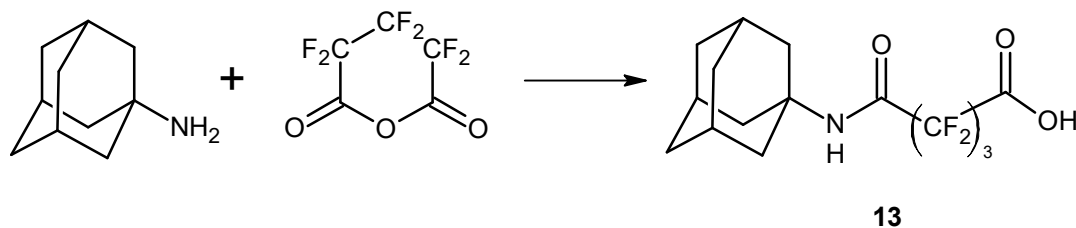


Obrázek 24 Hmotnostní spektrum produktu **12**

V hmotnostním spektru můžeme spolehlivě určit pík 598,3 patřící k sloučenině **12**. Také můžeme pozorovat, že se zde nevyskytují výchozí reaktanty ($M_w = 151,25$ g/mol a 482,52 g/mol). Nicméně vidíme že látka není úplně čistá, neboť se zde vyskytují i další nepřirazené píky, zejména 282,4 a 304,4. Z důvodu potřeby dalšího čištění vzniklého produktu a zároveň toho, že molekula **12** není rozpustná ve vodě, byla další práce v tomto směru ukončena.

Další navrženou molekulou byla molekula **13**. Ta podobně jako molekula **12** obsahuje atomy fluoru a spojení adamantylové části a fluorovaného řetězce je realizováno pomocí amidické

vazby. Molekula nicméně obsahuje karboxylovou skupinu, tedy půjde z ní reakcí se zásadou vytvořit příslušná sůl, která by již mohla být rozpustná ve vodě.



Obrázek 25 Schéma chemické reakce přípravy sloučeniny **13**

Reakce byla provedena v několika verzích, které se navzájem lišily použitým rozpouštědlem, molárními ekvivalenty hexafluorglutaranhydridu, přidavkem dalších látek, či způsobem ukončení a zpracování reakce.

Tabulka 2 Různé metody přípravy sloučeniny **13**

	Rozpouštědlo	6F-glutaranhydrid [ekv.]	Další přidané látky:	Podmínky:
A	THF	1,1		R.T.; 0,5 hod. inert.
B	Et ₃ N	1,1		R.T.; 0,5 hod. inert.
C	THF	1,1	K ₂ CO ₃ (2 ekv.)	R.T.; 0,5 hod. inert.
D	DCM	1,5	Et ₃ N (6 ekv.)	0 °C; 3 hod. inert.

Postup **A** využíval jako rozpouštědlo čerstvě sušený THF. Do reakce bylo vloženo 1,1 ekv. hexafluorglutaranhydridu, aby došlo k úplné konverzi adamantylaminu. Přebytek hexafluorglutaranhydrid lze snadno odpařit z reakční směsi za sníženého tlaku společně s rozpouštědlem a tím reakci ukončit. NMR analýza vzniklého produktu ukázala, že v průběhu reakce vznikající kyselina dále reaguje s adamantylaminem, vzniká tedy její amoniová sůl, pravděpodobně také dochází k hydrolýze hexafluorglutaranhydridu a vzniká příslušná dikyselina, která také reaguje s adamantylaminem, za vzniku jejích solí.

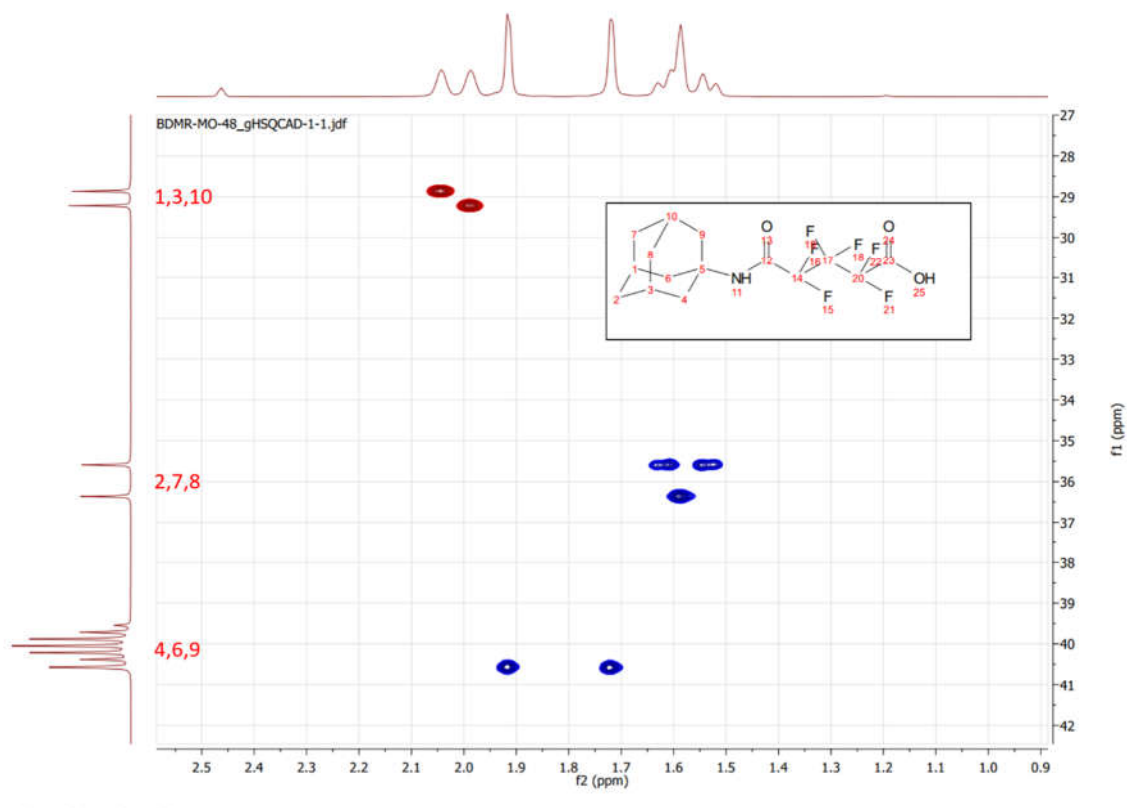
Během postupů **B**, **C** a **D** byla v reakční směsi přítomna báze, se kterou by měla vzniklá kyselina vytvořit sůl. I přes toto opatření se nepodařilo zabránit vzniku jiných, blíže neurče-

ných, vedlejších produktů. Během všech postupů vznikala směs látek, která je prakticky nedělitelná pomocí preparativní sloupcové chromatografie, hlavně z důvodu obtížného barvení sloučeniny **13** na TLC.

Za tímto účelem bylo vyzkoušeno barvení pomocí jodových par, bromkresolové zeleni a hassianova barviva (molybdenan amonný ceritý). Byly také vyzkoušeny různé TLC destičky včetně silikagelu, aluminy a silikagelu s reverzní fází. Bohužel ani jednou z těchto kombinací nebylo možné sloučeninu **13** identifikovat.

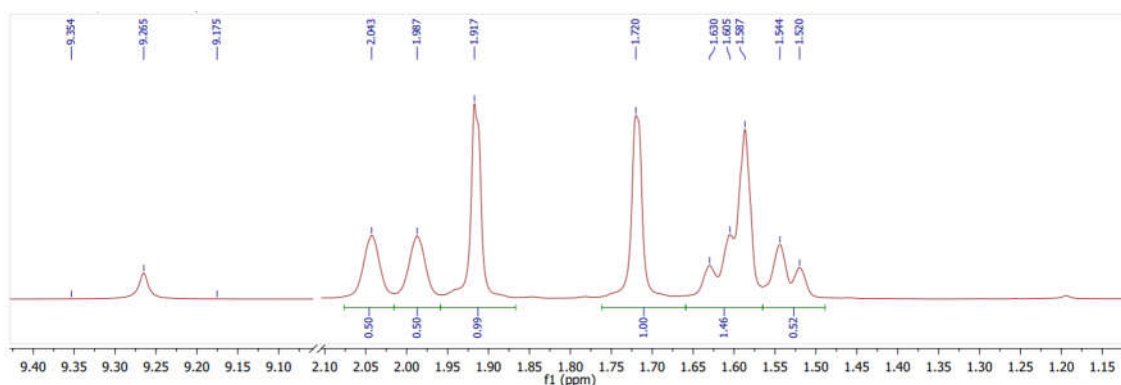
Během postupu **D** byla reakce ukončena přidáním vody a poté extrahována mezi 1% HCl a chloroformem. Z vodné fáze byly získány krystaly, které po přečištění rekrystalizací byly identifikovány jako Et₃NHCl. V organické fázi byla přítomna již z předešlých postupů známá směs látek obsahující také derivát **13**.

I přes všechny tyto komplikace se nám z nepřečištěného produktu podařilo vytvořit poměrně čistá NMR spektra potvrzující přítomnost námi hledané látky. Jako vzorek pro tyto spektra posloužil produkt MO-48 připravený metodou **C**. Na ¹H-¹³C HSQC (Obrázek 26) spektru vidíme sekci ¹³C NMR spektra příslušející adamantylu a k nim příslušející vodíky. Tento NMR experiment ukazuje interakci různých druhů atomů přes jednu vazbu.



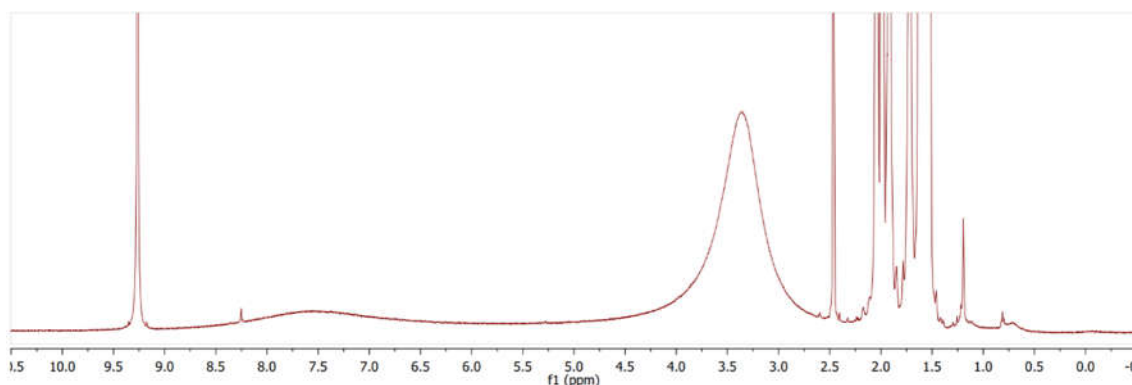
Obrázek 26 ¹H – ¹³C HSQC spektrum derivátu **13**

V obrázku 23 jsou červenými čísly přiřazena čísla příslušných uhlíků jednotlivým signálům ^{13}C NMR spektra molekuly **13** tak, jak je očíslovaná ve výřezu. Toto přiřazení potvrzují také integrální intenzity alifatické části ^1H NMR spektra (Obrázek 27). Integrální intenzity jednotlivých píků jsou vyznačeny modrým číslem pod zelenými úsečkami, které ohraničují integrovanou oblast. Jedná se však pouze o poměr signálů, v tomto případě každá jednotka integrální intenzity reprezentuje signál tří vodíků.



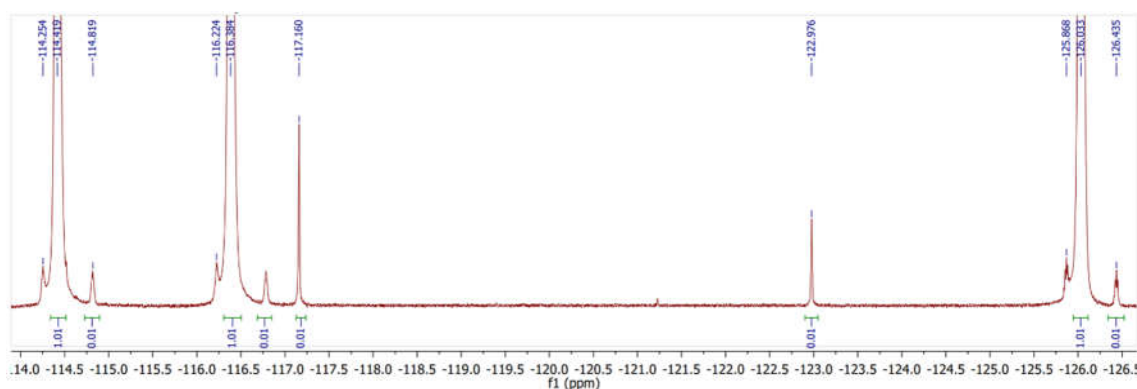
Obrázek 27 Alifatická část ^1H NMR spektra derivátu **13**

Protože se vodíky v molekule vyskytují hlavně na adamantylové části molekuly, dále také jeden vodík na dusíku amidické skupiny a jeden kyselý vodík, v případě čisté látky by se mnoho jiných signálů, než těch přiřazených na obrázku 24, vyskytovat nemělo. Při pohledu na celé ^1H NMR spektrum (Obrázek 28) zjistíme, že signálů se zde vyskytuje více. Pík 9,265 ppm přísluší amidickému vodíku, zatímco signál vodíku karboxylové kyseliny, není v tomto spektru pozorovatelný, či vůbec ve struktuře není. Zbývají neurčené signály 2,5 ppm a široké píky 3,35 a 7,5 ppm, které jsou pravděpodobně způsobené přítomností nečistot.



Obrázek 28 ^1H NMR spektrum derivátu **13**

Díky tomu, že molekula **13** obsahuje poměrně dost atomů fluoru, které spolu mohou interagovat, bylo změřeno velmi zajímavé ^{19}F NMR spektrum (Obrázek 29). Kromě třech nejsilnějších signálů, každý o integrální intenzitě 1, najdeme ve spektru několik dalších píků velmi slabých intenzit. Tyto slabé signály patří nečistotám, které se ze vzorku nepodařilo vyčistit. Naopak 3 silné signály -114,419 ppm, -116,384 ppm a -126,033 ppm patří 6 atomům fluoru na alifatickém řetězci molekuly **13**. Jejich vzájemnou interakci potvrzuje také ^{19}F COSY spektrum (Obrázek 30). To je však vyhotoveno ze vzorku, ve kterém se vyskytují nečistoty s obsahem fluoru, takže kromě 3 signálů z molekuly **13**, vidíme také 2 signály, které spolu interagují, ale již neinteragují s žádným ze tří signálů fluoru molekuly **13**.



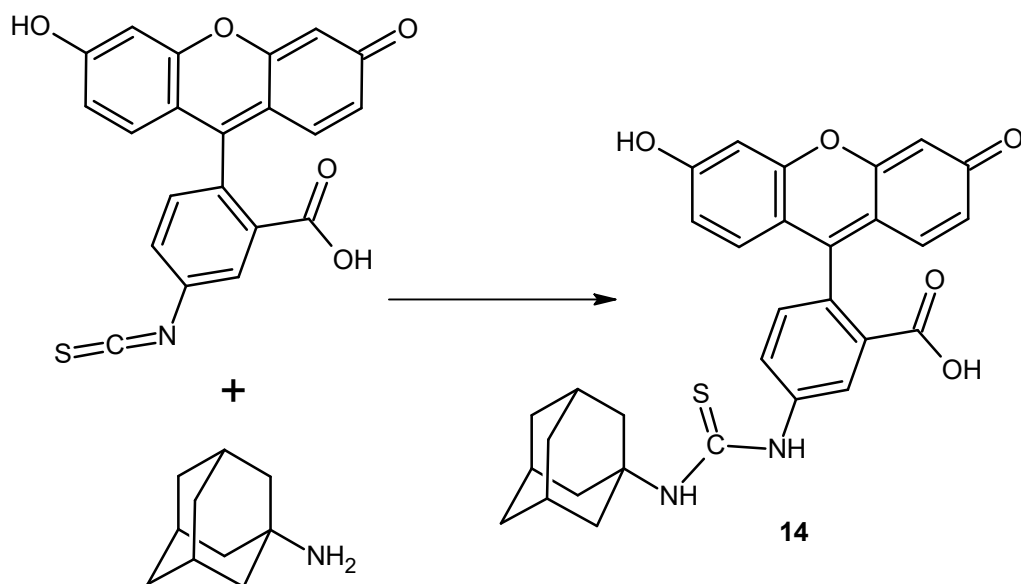
Obrázek 29 ^{19}F NMR spektrum derivátu **13**



Obrázek 30 ^{19}F COSY spektrum derivátu **13**

Podle výsledků NMR spektroskopie se nám tedy podařilo sloučeninu **13** připravit, bohužel obtíže při jejím čištění znamenaly, že pro jakékoli použití jako detekční molekula je vyloučené. Zároveň s touto molekulou bychom totiž na polypyrrolové vrstvy přidávali nečistoty o neznámém složení a tím bychom také snížili citlivost této metody.

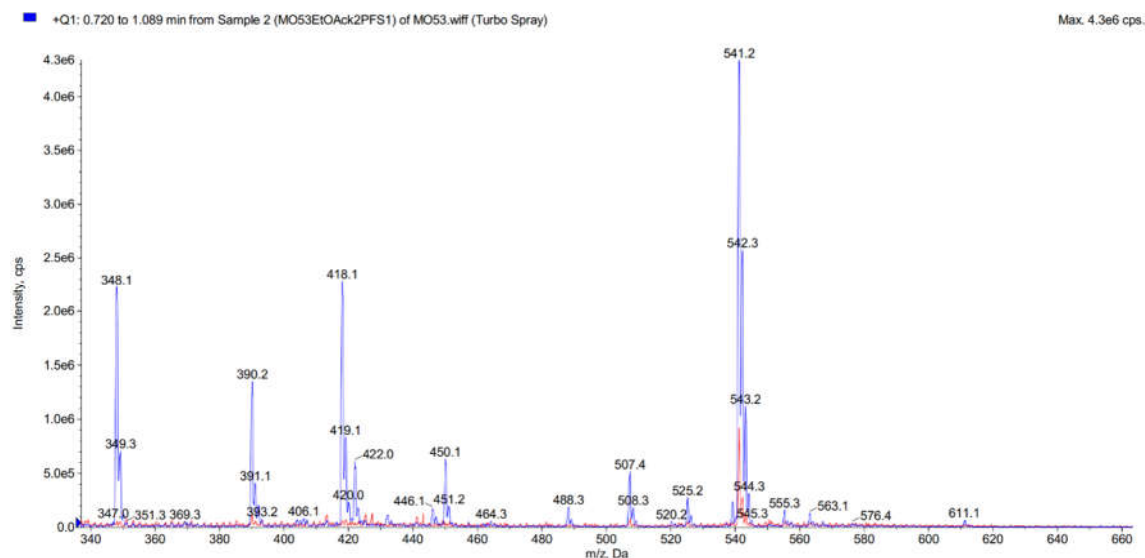
3.3.3. Detekční molekuly obsahující fluorescein



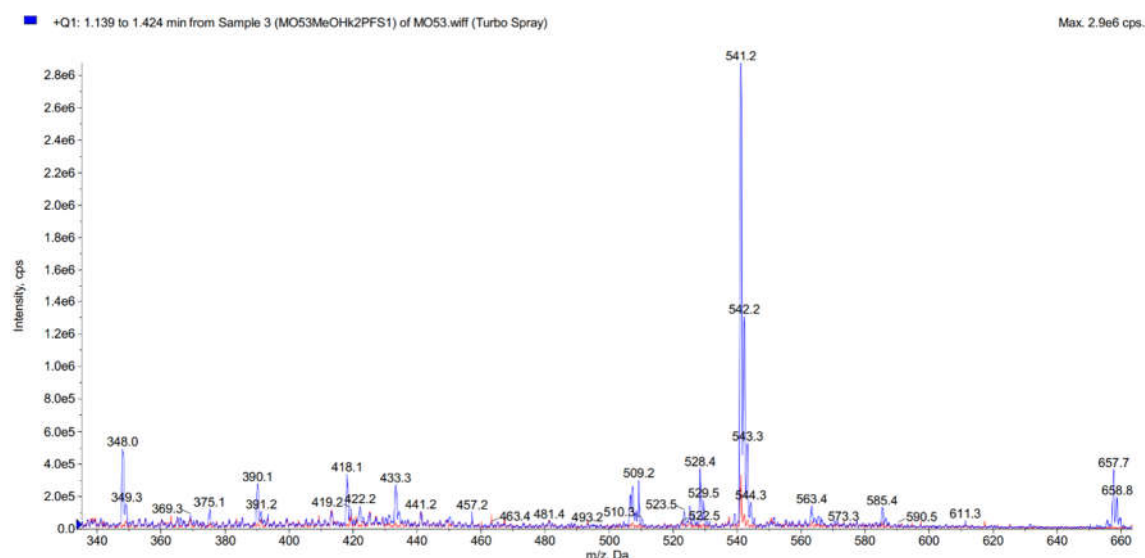
Obrázek 31 Schéma přípravy detekční molekuly **14**

Detekční molekula **6** opět využívá adamantylové části pro tvorbu komplexu s β -cyklodextrinem. Pro syntézu bylo využito reakce fluoresceinisothiokyanátu (FITC) a adamantylaminu provedená v THF jako rozpouštědle. I v tomto případě museli být překonány jisté potíže s přечиštěním vzniklého produktu. Pomocí sloupcové chromatografie byl oddělen FITC a další nečistoty. TLC po osvětlení UV světlem (365 nm) odhalila, že se ve směsi vyskytují alespoň 2 různé fluorescenční látky. Tato směs byla dále pomocí sloupcové chromatografie na silikagelu nedělitelná.

Nejllepších výsledků bylo dosaženo pomocí rozpuštění látky v EtOAc, na dně baňky zůstala usazenina, která byla rozpuštěna v methanolu. Při pohledu na hmotnostní spektra (obrázky 29 a 30) je vidět, že kromě nejintenzivnějšího signálu 541,2, který patří molekule **14**, došlo ve spektru směsi rozpuštěné v methanolu k poklesu intenzit signálů 348,1, 390,2 a 418,1, které pravděpodobně náleží některému z vedlejších produktů reakce. TLC prokázalo, že i ve zbytku rozpuštěném v methanolu se stále vyskytuje větší množství fluorescenčních látek. Je možné že se jedná o různé izomery fluoresceinu, protože hmotnostní spektra nasvědčují tomu, že se jedná o látky se stejnou hmotou.

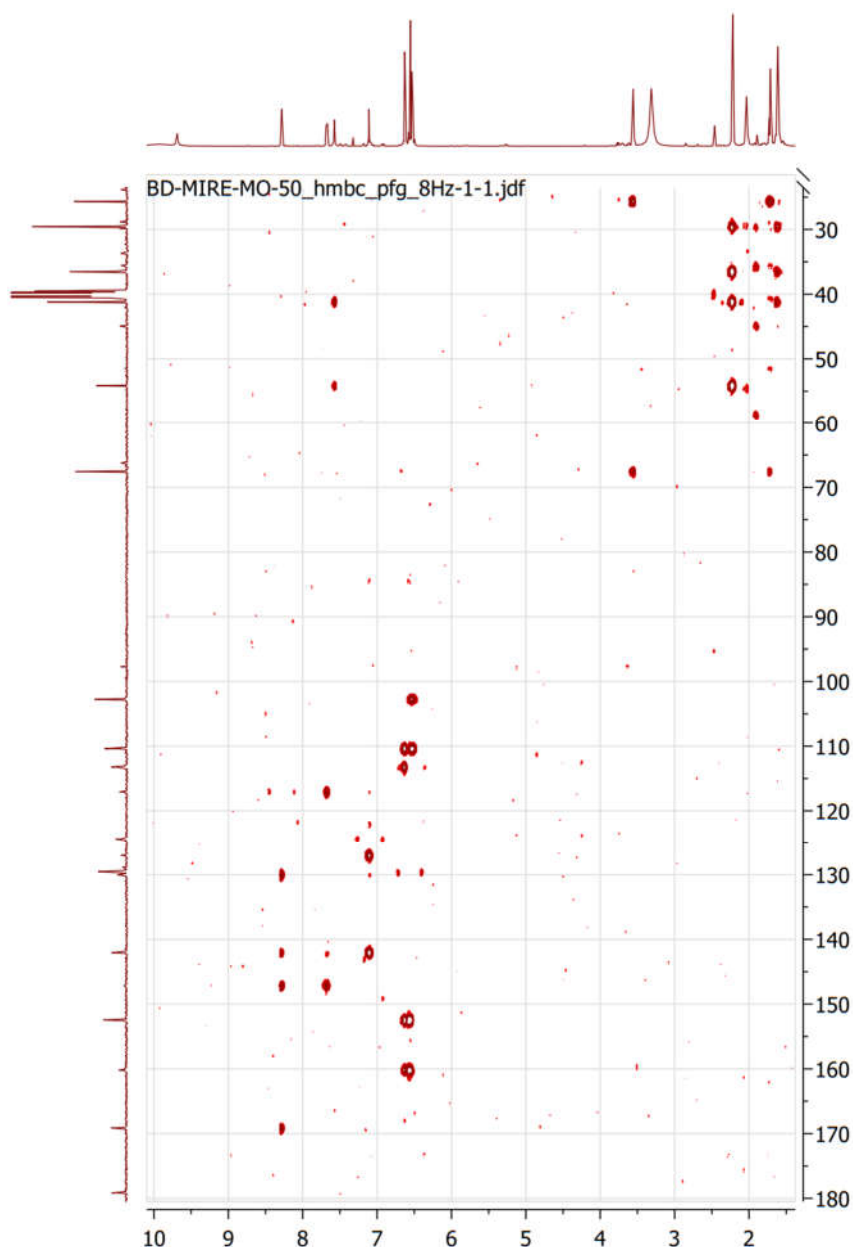


Obrázek 32 Hmotnostní spektrum části produktu **14** rozpuštěné v EtOAc



Obrázek 33 Hmotnostní spektrum části produktu **14** rozpuštěné v EtOAc

Byla také vyhotovena různá NMR spektra vzniklého produktu. Jak ^{13}C , tak ^1H spektra potvrzují, že se ve směsi nachází jak adamantylová, tak fluoresceinová část molekuly. ^1H - ^{13}C HMBC spektrum (Obrázek 34) ukazuje interakce mezi uhlíky a vodíky přes 2 a 3 vazby. Interakce přes jednu vazbu jsou ve spektru potlačeny. Měla by tedy být viditelná interakce uhlíku s vodíky na dusících thiomocoviny, která spojuje adamantylovou a fluoresceinovou část molekuly **14**.

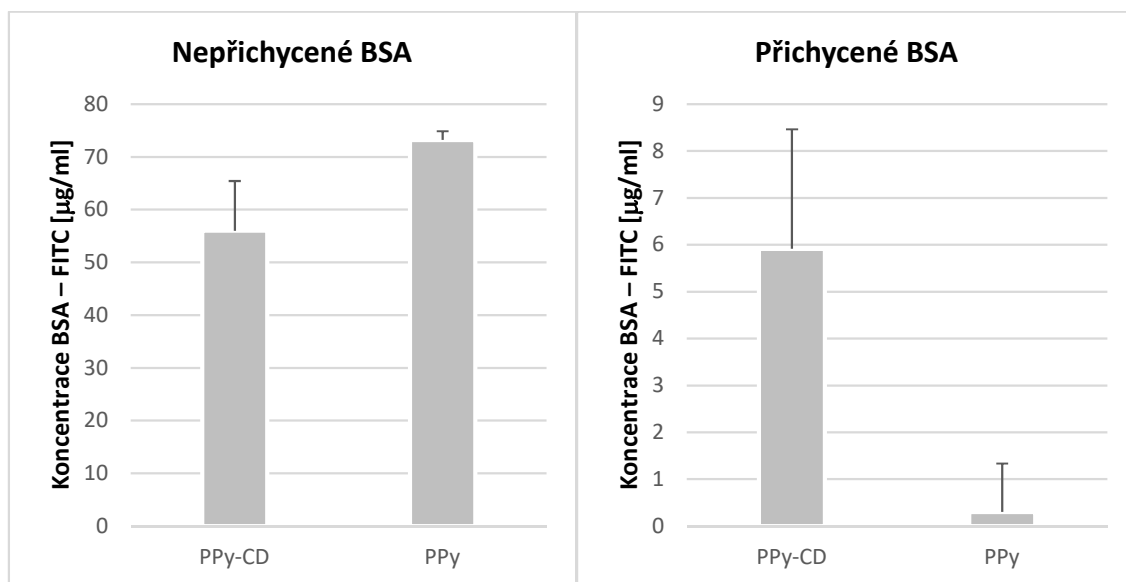


Obrázek 34 ^1H - ^{13}C HMBC spektrum molekuly **14**

S látkou **14** byla provedena zkouška na polypyrrolových vrstvách. Protože se však látka špatně rozpouštěla ve vodě, byly výsledky nevyhovující. Rozhodli jsme se proto využít komerčně dostupnou látku fungující na podobném principu. Hovězí sérový albumin (BSA – Bovine Serum Albumine) je protein nacházející se v krvi krav. Protože jde o velmi dobře charakterizovaný protein, má mnoho využití, mezi jinými je také součástí živného média, ve kterém se provádí *in vitro* experimenty. S BSA, na který bylo navázáno několik molekul FITC, bylo provedeno testování polypyrrolových vrstev.

Vzorky PCL nanovláken pokryté buď vrstvou čistého polypyrrolu, nebo kopolymeru PPy a modifikovaného Py (příprava těchto vrstev byla diskutována v kapitolách 3.1. a 3.2.).

Z těchto vzorků byla vyříznuta kolečka o průměru 6 mm tak, aby se každé kolečko vešlo do standardní 96 jamkové inkubační destičky. Zde byly vzorky ponořeny do roztoku BSA – FITC o koncentraci 0,1 mg/ml, na 3 hodiny. Po vyjmutí vzorků bylo spektrofotometricky změřena koncentrace BSA – FITC ve zbylém roztoku. Ze vzorků byl také BSA – FITC vypláchnut a byla změřena jeho koncentrace ve výplachu (Obrázek 35).

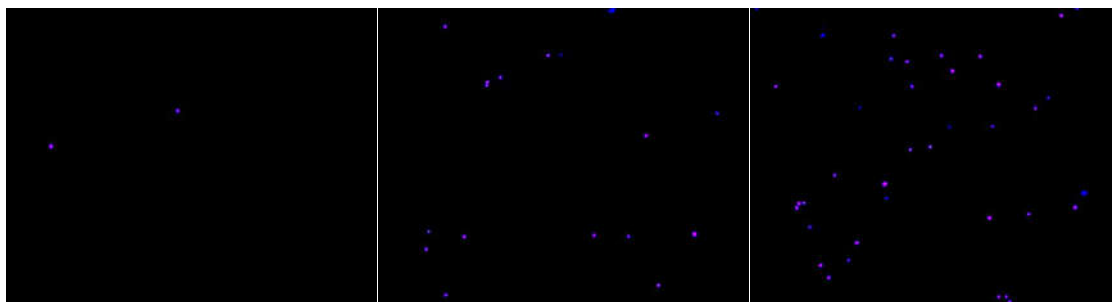


Obrázek 35 Graf koncentrace přichyceného a nepřichyceného BSA – FITC na polypyrrolových vrstvách

Z grafů je vidět, že proteiny adherují k modifikované polypyrrolové vrstvě lépe než k vrstvě čistého polypyrrolu.

Dalším provedeným testem byl *in vitro* test růstu 3T3 myších fybroblastů na povrchu námi připravených vrstev. Jako kontrolní vzorek posloužila nanovláknenná textilie připravená z PCL ($M_w = 80\,000$) elektrostatickým zvlákňováním, která sloužila jako substrát pro přípravu PPy vrstev. Opět byly připraveny vzorky ve tvaru koleček o průměru 6 mm tak, aby se vešly do standardní 96 jamkové kultivační destičky. Všechny vzorky byly sterilizovány ponořením do 70% ethanolu na 30 minut a poté dvakrát opláchnuty PBS pufrům (pH = 7,4) a jednou DMEM (médiem pro kultivaci savčích buněk).

Všechny vzorky byly osazeny 3T3 myšími fibroblasty a jejich stav kontrolován pomocí CCK-8 testu. Ten je založen na enzymatické redukci sloučeniny WST-8 na oranžový formazan. Tedy obarví živé buňky, které jsou pozorovatelné pod fluorescenčním mikroskopem



Obrázek 36 Obrázky 3T3 myších fibroblastů na různých substrátech. Zleva: PCL nanovlákná, PPy vrstva, PPy-CD vrstva

Na obrázcích pořízených po 1 dni od nasazení buněk můžeme pozorovat zřetelné rozdíly počtu adherovaných buněk k povrchu substrátů. Nejvyššího počtu dosáhla kopolymerní vrstva, s modifikovaná molekulami β -CD, a druhého nejvyššího počtu vrstva čistého PPy. Tyto dva testy (test adsorpce BSA-FITC a *in vitro* test s 3T3 myšími fibroblasty) byly vypracovány ve spolupráci s Mgr. Kateřinou Strnadovou z KNT.

Závěr

Cílem této práce bylo připravení modifikovaných polypyrrolových vrstev, což bylo splněno. Byla také ukázána zvýšená adheze proteinů k této modifikované vrstvě, ve srovnání s vrstvou nemodifikovaného polypyrrolu, což bylo ukázáno testem pomocí BSA-FITC. *In vitro* test viability 3T3 myších fibroblastů také prokázal zlepšené vlastnosti námi připravených vrstev ve srovnání s nanovláknennou PCL textilií. Dále bylo navrženo poměrně velké množství detekčních molekul, které by umožnily přesnější analýzu koncentrace aktivních center na povrchu modifikované vrstvy, ale bohužel se každá potýkala se svým specifickým problémem.

Detekční molekula **12** byla připravena v dobrém výtěžku a čistotě, avšak nebyla rozpustná ve vodě, což omezuje její použití na nepolární rozpouštědla, ve kterých je stabilita inkluzních komplexů cyklodextrinu velmi nízká. Molekula **13** vykazovala poměrně slibné vlastnosti, nebýt problémů při její identifikaci na TLC destičkách. Bohužel bez jejího dočištění by byla metoda vyžívající tuto detekční molekulu velmi nepřesná. Fluorescenční molekula **14**, opět měla problémy s čistotou vzniklých produktů, tentokrát z důvodu nedělitelné směsi dvou, či více izomerů, které mezi sebou volně přecházely. Pokud by se podařilo vyřešit zmíněné problémy, zejména u molekul **13** a **14**, bylo by zajímavé zjistit nakolik, je tento způsob zjišťování koncentrace přesný.

Seznam použité literatury

- [1] HUANG, Zhong-Bing, Guang-Fu YIN, Xiao-Ming LIAO a Jian-Wen GU. Conducting polypyrrole in tissue engineering applications. *Frontiers of Materials Science* [online]. 2014, **8**(1), 39–45. ISSN 2095-025X, 2095-0268. Dostupné z: doi:10.1007/s11706-014-0238-8
- [2] HARREUS, Albrecht Ludwig. Pyrrole. In: WILEY-VCH VERLAG GMBH & CO. KGAA, ed. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000 [vid. 2018-04-28]. ISBN 978-3-527-30673-2. Dostupné z: doi:10.1002/14356007.a22_453
- [3] EICHER, Theophil. Five-Membered Heterocycles: Sections 5.1–5.21. In: *The Chemistry of Heterocycles* [online]. B.m.: Wiley-Blackwell, 2004, s. 52–121. ISBN 978-3-527-60183-7. Dostupné z: doi:10.1002/352760183X.ch5a
- [4] KAUSAITE-MINKSTIMIENE, Asta, Viktor MAZEIKO, Almira RAMANAVICIENE a Arunas RAMANAVICIUS. Evaluation of chemical synthesis of polypyrrole particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* [online]. 2015, **483**, 224–231. ISSN 09277757. Dostupné z: doi:10.1016/j.colsurfa.2015.05.008
- [5] BOULDIN, Ryan, Sethumadhavan RAVICHANDRAN, Akshay KOKIL, Rahul GARHWAL, Subhalakshmi NAGARAJAN, Jayant KUMAR, Ferdinando F. BRUNO, Lynne A. SAMUELSON a Ramaswamy NAGARAJAN. Synthesis of polypyrrole with fewer structural defects using enzyme catalysis. *Synthetic Metals* [online]. 2011, **161**(15–16), 1611–1617. ISSN 03796779. Dostupné z: doi:10.1016/j.synthmet.2011.05.026
- [6] OMASTOVÁ, Mária a Matej MIČUŠÍK. Polypyrrole coating of inorganic and organic materials by chemical oxidative polymerisation. *Chemical Papers* [online]. 2012, **66**(5) [vid. 2018-04-29]. ISSN 1336-9075. Dostupné z: doi:10.2478/s11696-011-0120-4
- [7] TAN, Yang a Khashayar GHANDI. Kinetics and mechanism of pyrrole chemical polymerization. *Synthetic Metals* [online]. 2013, **175**, 183–191. ISSN 03796779. Dostupné z: doi:10.1016/j.synthmet.2013.05.014
- [8] WANG, Lin-Xia, Xin-Gui LI a Yu-Liang YANG. Preparation, properties and applications of polypyrroles. *Reactive and Functional Polymers* [online]. 2001, **47**(2), 125–139. ISSN 13815148. Dostupné z: doi:10.1016/S1381-5148(00)00079-1
- [9] STIRKE, Arunas, Roxana-Mihaela APETREI, Monika KIRSNYTE, Lina DEDELAITE, Vladimiras BONDARENKA, Vitalija JASULAITIENE, Milda PUČETAITE, Algis SELSKIS, Geta CARAC, Gabriela BAHRIM a Arunas RAMANAVICIUS. Synthesis of polypyrrole microspheres by *Streptomyces* spp. *Polymer* [online]. 2016, **84**, 99–106. ISSN 00323861. Dostupné z: doi:10.1016/j.polymer.2015.12.029
- [10] DELJOO KOJABAD, Zohreh a Seyed Abbas SHOJAOSADATI. Chemical synthesis of polypyrrole nanostructures: Optimization and applications for neural microelectrodes. *Materials & Design* [online]. 2016, **96**, 378–384. ISSN 02641275. Dostupné z: doi:10.1016/j.matdes.2016.02.045

- [11] JANG, Jyongsik. Conducting Polymer Nanomaterials and Their Applications. In: *Emissive Materials Nanomaterials* [online]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006 [vid. 2018-04-24], s. 189–260. ISBN 978-3-540-31250-5. Dostupné z: doi:10.1007/12_075
- [12] RAMANAVICIENE, Almira, Asta KAUSAITE, Stasys TAUTKUS a Arunas RAMANAVICIUS. Biocompatibility of polypyrrole particles: an in-vivo study in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* [online]. 2007, **59**(2), 311–315. ISSN 00223573. Dostupné z: doi:10.1211/jpp.59.2.0017
- [13] MAITY, Subhankar a Arobindo CHATTERJEE. Conductive polymer-based electro-conductive textile composites for electromagnetic interference shielding: A review. *Journal of Industrial Textiles* [online]. 2018, **47**(8), 2228–2252. ISSN 1528-0837, 1530-8057. Dostupné z: doi:10.1177/1528083716670310
- [14] CHATTERJEE, Arobindo a Subhankar MAITY. A comparative study of reaction kinetics of in-situ chemical polymerization of polypyrrole onto various textile fibres. *Surface and Coatings Technology* [online]. 2017, **324**, 569–576. ISSN 02578972. Dostupné z: doi:10.1016/j.surfcoat.2017.06.018
- [15] MAITI, Syamal, Dipayan DAS a Kushal SEN. Characterization of electro-conductive fabrics prepared by in situ chemical and electrochemical polymerization of pyrrole onto polyester fabric. *Materials Science and Engineering: B* [online]. 2014, **187**, 96–101. ISSN 09215107. Dostupné z: doi:10.1016/j.mseb.2014.05.003
- [16] TANG, Lian, Jinlu HAN, Zhenlin JIANG, Shiyang CHEN a Huaping WANG. Flexible conductive polypyrrole nanocomposite membranes based on bacterial cellulose with amphiphobicity. *Carbohydrate Polymers* [online]. 2015, **117**, 230–235. ISSN 01448617. Dostupné z: doi:10.1016/j.carbpol.2014.09.049
- [17] ČÍKOVÁ, Eliška, Matej MIČUŠÍK, Alena ŠIŠKOVÁ, Michal PROCHÁZKA, Pavol FEDORKO a Mária OMASTOVÁ. Conducting electrospun polycaprolactone/polypyrrole fibers. *Synthetic Metals* [online]. 2018, **235**, 80–88. ISSN 03796779. Dostupné z: doi:10.1016/j.synthmet.2017.11.011
- [18] WELLIVER, Mark, John MCDONOUGH, Nicholas KALYNYCH a Robert REDFERN. Discovery, development, and clinical application of sugammadex sodium, a selective relaxant binding agent. *Drug design, development and therapy*. 2008, **2**, 49–59. ISSN 1177-8881.
- [19] DUCHÊNE, Dominique a Amélie BOCHOT. Thirty years with cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2016, **514**(1), 58–72. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2016.07.030
- [20] KURKOV, Sergey V. a Thorsteinn LOFTSSON. Cyclodextrins. *International Journal of Pharmaceutics* [online]. 2013, **453**(1), 167–180. ISSN 03785173. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijpharm.2012.06.055
- [21] BREWSTER, Marcus E. a Thorsteinn LOFTSSON. Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers. *Advanced Drug Delivery Reviews* [online]. 2007, **59**(7), 645–666. ISSN 0169409X. Dostupné z: doi:10.1016/j.addr.2007.05.012

- [22] CONNORS, Kenneth A. The Stability of Cyclodextrin Complexes in Solution. *Chemical Reviews* [online]. 1997, **97**(5), 1325–1358. ISSN 0009-2665, 1520-6890. Dostupné z: doi:10.1021/cr960371r
- [23] BRAY, Brian L., Peter H. MATHIES, Reto NAEF, Dennis R. SOLAS, Thomas T. TIDWELL, Dean R. ARTIS a Joseph M. MUCHOWSKI. N-(Triisopropylsilyl)pyrrole. A progenitor „par excellence" of 3-substituted pyrroles. *The Journal of Organic Chemistry* [online]. 1990, **55**(26), 6317–6328. ISSN 0022-3263. Dostupné z: doi:10.1021/jo00313a019
- [24] TANG, Weihua a Siu-Choon NG. Facile synthesis of mono-6-amino-6-deoxy- α -, β -, γ -cyclodextrin hydrochlorides for molecular recognition, chiral separation and drug delivery. *Nature Protocols* [online]. 2008, **3**(4), 691–697. ISSN 1754-2189, 1750-2799. Dostupné z: doi:10.1038/nprot.2008.37
- [25] RAPI, S., V. BOCCHI a G.P. GARDINI. Conducting polypyrrole by chemical synthesis in water. *Synthetic Metals* [online]. 1988, **24**(3), 217–221. ISSN 03796779. Dostupné z: doi:10.1016/0379-6779(88)90259-7
- [26] LEE, J.Y., D.Y. KIM a C.Y. KIM. Synthesis of soluble polypyrrole of the doped state in organic solvents. *Synthetic Metals* [online]. 1995, **74**(2), 103–106. ISSN 03796779. Dostupné z: doi:10.1016/0379-6779(95)03359-9