

**UNIVERZITA KARLOVA**

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie



Diplomová práca

**Optimalizácia extrakcie neonicotinoïdov s využitím nanovlákién  
v systéme sekvenčnej injekčnej analýzy**

Vedúca diplomovej práce: PharmDr. Ivana Horstkotte Šrámková, PhD.

Hradec Králové 2020

Monika Zouharová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové, dňa

.....

Monika Zouharová

## **PodĎakovanie**

Týmto by som sa chcela poĎakovať PharmDr. Ivane Horstkotte Šrámkovej, PhD., vedúcej mojej diplomovej práce, za jej odborné vedenie pri riešení tejto práce, za cenné rady, zmysel pre detail a trpezlivosť, ktorú si veľmi vážim. V neposlednom rade Ďakujem svojim rodičom za podporu počas celého štúdia.

## Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Monika Zouharová

Školiteľ: PharmDr. Ivana Horstkotte Šrámková, Ph.D.

Názov: Optimalizácia extrakcie neonikotínoidov s využitím nanovlákien v systéme sekvenčnej injekčnej analýzy

V diplomovej práci bolo testované použitie rôznych typov nanovlákien ako sorbentov pre extrakciu neonikotínoidov v spojení so systémom sekvenčnej injekčnej analýzy. Pri vypracovaní práce bolo testovaných sedem typov nanovlákien, a to polyamid (PA6), polykaprolaktón (PCL), polyimid (PID) a polydopamínom poťahovaný polyamid (PA6)<sub>coated</sub>, polykaprolaktón (PCL)<sub>coated</sub>, polyimid (PID)<sub>coated</sub> a kombinácia polyimidu a polykaprolaktónu (PID/PCL)<sub>coated</sub>. Tieto nanovlákná boli vyrobené metódou elektrostatického zvlákňovania.

Testované nanovlákná boli umiestnené v držiaku vyrobenom 3D tlačou, ktorý bol zapojený do systému sekvenčnej injekčnej analýzy. Ako detekčná metóda bola použitá UV spektrofotometria.

Analyzovanými látkami boli insekticídy zo skupiny neonikotínoidov. Extrakcia týchto látok bola skúmaná na všetkých siedmich typoch nanovlákien. V rámci týchto meraní boli pozorované retencie jednotlivých analytov na nanovláknach v závislosti na ich chemickej štruktúre a fyzikálne-chemických vlastnostiach. Najviac meraní bolo prevedených s použitím polydopamínom poťahovaných polyimidových nanovlákien, na ktorých boli zaznamenané najvyššie retencie všetkých analytov.

Cieľom diplomovej práce bolo vyvinúť jednoduchú metódu pre otestovanie vhodnosti použitia nanovlákien ako sorbentov pre extrakciu neonikotínoidových insektícídy v spojení so systémom sekvenčnej injekčnej analýzy.

## **Abstract**

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Monika Zouharová

Supervisor: PharmDr. Ivana Horstkotte Šrámková, Ph.D.

Title: Optimization of neonicotinoids extraction using nanofibers in sequential injection analysis system

In this diploma thesis, we tested the use of various nanofibers as sorbents for solid phase extraction of neonicotinoids connected with sequential injection analysis system. Seven types of nanofibers were tested, specifically polyamide (PA6), polycaprolactone (PCL), polyimide (PID) and polydopamine coated polyamide (PA6)<sub>coated</sub>, polycaprolactone (PCL)<sub>coated</sub>, polyimide (PID)<sub>coated</sub> and a combination of polyimide and polycaprolactone (PID/PCL)<sub>coated</sub>. These nanofibers were produced by electrospinning.

The studied nanofibers were placed in the 3D printed holder, which was connected into sequential injection analysis system. UV spectrophotometry was used as a detection method.

The substances to analyse were neonicotinoid insecticides. The retention of these analytes was examined with all seven types of nanofibers. Retention of the analytes on the tested nanofibers depending on their chemical structures and physical-chemical properties was studied in these measurements. The most experiments were performed with polydopamine coated polyimide nanofibers, due to the highest retention of all tested analytes.

The aim of this diploma thesis was to develop a simple method for testing the suitability of nanofibers as sorbents for solid phase extraction of neonicotinoid pesticides.

## Obsah

Zoznam použitých skratiek .....	8
1. Úvod.....	9
2. Cieľ a zadanie práce.....	10
3. Teoretická časť .....	11
3.1 Sekvenčná injekčná analýza .....	11
3.2 Extrakcia tuhou fázou.....	14
3.2.1 SPE sorbenty.....	16
3.3 Nanovlákná .....	19
3.3.1 Charakteristika nanovláknien.....	19
3.3.2 Príprava nanovláknien .....	19
3.3.3 Použitie nanomateriálov.....	21
3.3.4 Vybrané typy nanovláknien .....	24
3.4 Analyzované látky .....	26
4. Experimentálna časť .....	32
4.1 Použité prístroje a pomôcky.....	32
4.2 Použité chemikálie a testované látky.....	33
4.3 Príprava roztokov.....	35
4.3.1 Príprava zásobných a pracovných roztokov.....	35
4.3.2 Príprava elučných činidiel .....	35
4.4 3D- tlačený držiak na nanovlákná .....	36
4.5 Modifikácia povrchu nanovláknien (poťahovanie polydopamínovou vrstvou) .....	38
4.6 Metóda merania .....	38
5. Výsledky a diskusia .....	40
5.1. Výber vlnových dĺžok a testovanie držiaka .....	40
5.2 Výber a porovnanie nanovláknien.....	42

5.3 Efekt polydopamínového poťahovania nanovlákien na retenciu analytov .....	43
5.4 Optimalizácia typu a koncentrácie elučného činidla .....	46
5.5 Vplyv pH na retenciu analytov.....	49
5.6 Kapacita nanovlákien .....	50
5.7 Kalibračné krivky elučnej fázy.....	52
6. Zhrnutie.....	58
7. Záver .....	59
8. Použitá literatúra.....	60
Zoznam obrázkov .....	65
Zoznam tabuliek.....	65
Zoznam grafov.....	65

## Zoznam použitých skratiek

6-CnA	6-chloronikotínová kyselina
ACET	acetamiprid
ACN	acetonitril
CLTD	klotianidin
DNTF	dinotefuran
FIA	prietoková injekčná analýza
HPLC	vysokoučinná kvapalinová chromatografia
IMID	imidaklopid
LD <sub>50</sub>	stredná smrteľná dávka
LLE	extrakcia kvapalina/kvapalina
LOD	medza detekcie
LOQ	medza stanoviteľnosti
MeOH	metanol
MIPS	molekulárne vtlačené polyméry
MS	hmotnostná spektrometria
nAChRs	nikotínové acetylcholínové receptory
NTP	nitenpyram
NV	nanovlákná
PA	polyamid
PAN	polyacetonitril
PCL	polykaprolaktón
PID	polyimid
PVDF	polyvinylidénfluorid
RAM	materiály s obmedzeným prístupom
SIA	sekvenčná injekčná analýza
SPE	extrakcia tuhou fázou
TIA	tiaklopid
TMTX	tiametoxám
UV	ultrafialové žiarenie
VIS	viditeľné žiarenie



# 1. Úvod

Vo väčšine prípadov je potrebné pred vlastným analytickým procesom vykonať vhodnú úpravu vzorky. Úprava vzorky predstavuje zásadný krok, ktorý býva v porovnaní s rýchlymi analýzami často zdĺhavý, náchylný k chybe a vo vysokej miere ovplyvňuje citlivosť, selektivitu a výsledky analýz a tiež zabraňuje poškodeniu používanej analytickej inštrumentácie. Dôležitým aspektom úpravy vzorky je aj kompatibilita so zamýšľanou analytickou technikou.

V súčasnosti je dominantnou metódou úpravy vzoriek extrakcia tuhou fázou, ktorá je obľúbená najmä pre svoju rýchlosť, jednoduchosť, nízke náklady a možnosť stanovenia nízkych koncentrácií látok v malom objeme vzorky. Nespornou výhodou je tiež možnosť automatizácie celého procesu.

Nanovlákná sú špeciálne vyrábané textilné vlákna o priemere menšom než 1  $\mu\text{m}$ . Nanoštruktúrne materiály získali vďaka ich výhodným vlastnostiam v posledných rokoch veľkú pozornosť v oblasti extrakcie tuhou fázou, medzi tieto výhodné vlastnosti patrí najmä veľký povrch vzhľadom k objemu, veľký počet väzbových miest, vysoká sorpčná kapacita a porozita. Vzhľadom na množstvo polymérnych materiálov s rôznymi chemickými vlastnosťami umožňujú rôzne aplikačné možnosti a vývoj týchto sorbentov napreduje oveľa rýchlejšie než u klasických sorbentov. Nanovláknenné sorbenty sú využívané najmä pri extrakciách polutantov životného prostredia. Výber nanovláknien v tejto práci bol založený na výsledkoch Dr. Horstkotte Šrámkovej, ktoré získala počas jej stáže na Univerzite v Granade v Španielsku.

V tejto diplomovej práci boli testované nanovlákná manuálne vkladané do držiaka vyrobeného 3D tlačou a bola študovaná vhodnosť použitia týchto nanovláknien ako sorbentov pre extrakciu tuhou fázou a zároveň bolo testované zapojenie týchto nanovláknien do systému sekvenčnej injekčnej analýzy.

## 2. Cieľ a zadanie práce

Cieľom práce bolo porovnanie extrakčnej účinnosti polyamidových, polykaprolaktámových a polyimidových nanovlákien a ich polydopamínom poťahovaných foriem ako moderných sorbentov v extrakcii tuhou fázou za pomoci systému sekvenčnej injekčnej analýzy. Tieto nanovlákná boli poskytnuté Technickou univerzitou v Liberci, Katedrou textilní. Extrakčná účinnosť nanovlákien bola študovaná na ôsmich analyzovaných neonikotinoïdoch.

Medzi špecifické ciele tejto práce patrí:

- overenie vhodnosti aplikácie nanovlákien ako sorbentov v extrakcii tuhou fázou v spojení s prietokovým systémom,
- optimalizácia špecifických podmienok použitia konkrétnych nanovlákien,
- overenie efektivity polydopamínového poťahovania testovaných nanovlákien na retenciu analytov,
- porovnanie kapacity a extrakčnej účinnosti neupravovaných nanovlákien a ich polydopamínom poťahovaných foriem,
- optimalizácia elučného činidla,
- testovanie retencie ôsmich neonikotinoïdov na siedmich nanovlákných sorbentoch.

## 3. Teoretická časť

### 3.1 Sekvenčná injekčná analýza

Sekvenčná injekčná analýza (SIA) bola vyvinutá kolektívom vedeným prof. Jaromírom Růžičkom v roku 1989 počas odstraňovania nedokonalostí techniky prietokovej injekčnej analýzy (FIA) spojených s pulzujúcim tokom a nutnosťou kontinuálneho čerpania nosného prúdu, resp. činidiel či pomocných látok. Preto je označovaná ako druhá generácia prietokových metód. Ide o nízkotlakovú, neseparačnú metódu, ktorá je nestacionárna, kinetická a diskontinuálna [1, 2].

K výhodám tejto techniky patrí automatizácia, miniaturizácia, malé objemy roztokov potrebných pre analýzu a teda zníženie produkovaného odpadu, rýchlejšie merania v porovnaní s manuálnym prevedením, vyššia robustnosť a uzavretý systém, čím je eliminovaná expozícia obsluhy potenciálne toxickými látkami a tiež obmedzenie vonkajších vplyvov na analýzu [3].

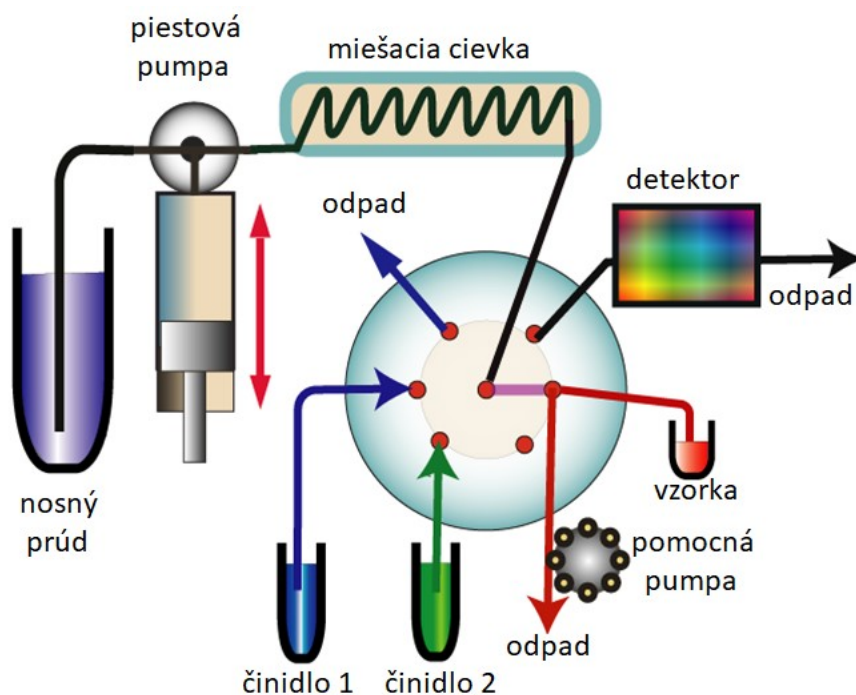
#### SIA systém

Základné prístrojové vybavenie SIA sa skladá z viaccestného selekčného ventilu (typicky 6, 8, 12-cestný), ktorý je centrom systému. Na jeho centrálny port je pripojená nízkotlaková piestová pumpa s miešacou cievkou a na bočné porty sú pripojené nosný prúd, vzorky, činidlá, detekčná cela detektoru a odvod do odpadu. Celý systém je prepojený teflónovými hadičkami o vnútornom priemere najčastejšie 0,8 mm. Pomocou piestovej pumpy umožňujúcej obojsmerný tok je podľa prepínania portov na viaccestnom ventilu nasávaný nosný prúd a následne vzorky a činidlá. Ich zóny sú potom premiešané v miešacej cievke vďaka spätnému pohybu piestovej pumpy, čím vzniká detekovateľný produkt. Miešacia cievka okrem toho zabraňuje vniknutiu vzoriek a činidiel do pumpy. Produkt reakcie je následne transportovaný príslušným portom selekčného ventilu do detektoru. Celý systém je riadený počítačom s príslušným softvérom, ktorý riadi jednotlivé kroky analýzy a zároveň umožňuje ukladanie a vyhodnocovanie dát [1, 3].

Priamo v systéme dochádza k analytickým procesom vedúcim k premene vzorky do stavu vhodného k detekcii a kvantifikácii ako je napr. redukcia, derivatizačná reakcia, dialýza, plynová difúzia či extrakcia. Výber detektoru v SIA systéme závisí od použitej

analytickej reakcie. Najviac využívanými sú spektrofotometrické detektory (UV, VIS), fluorescenčné, chemiluminiscenčné a elektrochemické detektory (potenciometrické, voltametrické, ampérometrické) [1, 3, 4].

Variabilnosť tohto systému ho umožňuje jednoducho modifikovať rôznymi prvkami vhodnými napr. na extrakciu tuhú fázou (SPE), extrakciu kvapalina/kvapalina (LLE) či oxidačne-redukčnými reaktormi [4]. Na obrázku 1 je znázornená schéma konvenčného usporiadania systému SIA [5].



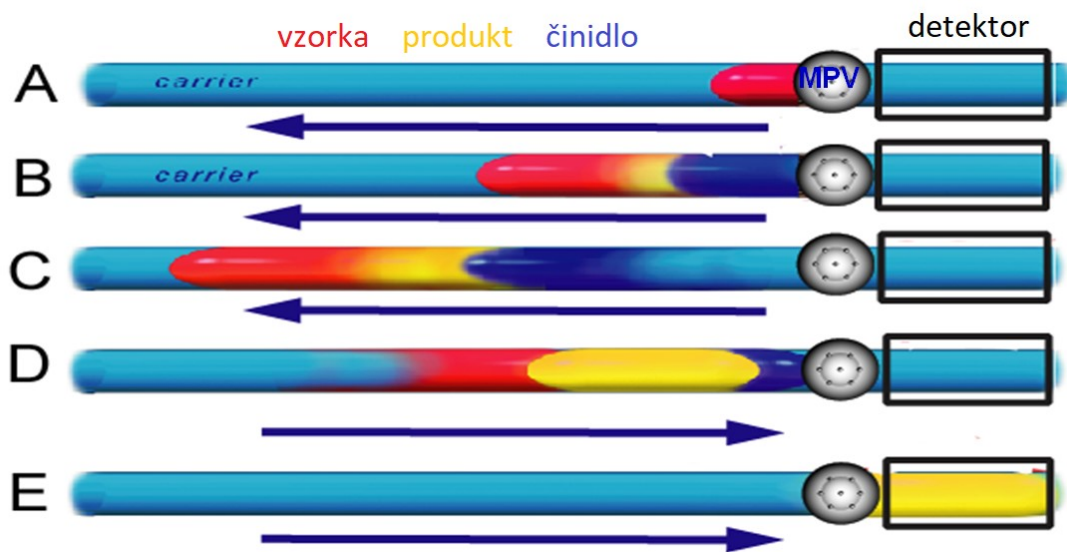
Obrázok 1: Schéma systému SIA [5]

### **Princíp SIA**

Systém SIA je založený na presnom dávkovaní jednotlivých zón činidiel a vzoriek, kontrolovanej disperzii pri miešaní jednotlivých zón a presnom načasovaní daných krokov. Charakteristickým prvkom tejto analytickej metódy sú oddelené meracie cykly. Jeden cyklus pozostáva z aspirácie presne daných objemov nosného prúdu, vzorky a činidla do systému pomocou selekčného ventilu a čerpadla. Vďaka obojsmernému piestovému čerpadlu dochádza k premiešaniu jednotlivých zón a chemickej reakcii. Vzniknutý reakčný produkt je meraný v detektore a jeho signál je zaznamenaný

počítačom. Odozva signálu je znázornená píkom, ktorý je záznamom zmeny koncentračného gradientu reakčného produktu pri prechode jeho zóny detektorom [1].

Vzhľadom k tomu, že technika SIA je postavená na presnom dodržiavaní konštantných experimentálnych podmienok, sú dosahované reprodukovateľné výsledky analýz, aj keď je miešanie vzorky a činidla neúplné, chemická reakcia nedosahuje rovnováhu a získaný signál je nestacionárny [4]. Na obrázku 2 je znázornený princíp systému SIA [6].



Obrázok 2: Znázornenie princípu SIA [6]

*A - aspirácia vzorky, B - aspirácia činidla, C - tvorba reakčného produktu, D - premiešanie zón spätným tokom, E - detekcia*

### **Aplikácie SIA**

Technika SIA sa uplatňuje najmä pri analýzach zložiek životného prostredia, ďalej v potravinárstve, farmaceutickom priemysle a pri monitorovaní chemických a biologických procesov. Umožňuje stanoviť väčšinu bežných anorganických iónov vo vode za účelom kontroly jej kvality, obsah pesticídov či stopových množstiev ťažkých kovov v pôdach a môže byť tiež využitá pri imunoanalytických reakciách. Metóda SIA môže byť použitá aj pri úpravách vzoriek pred HPLC či MS analýzami pomocou extrakcie tuhrou fázou [1].

## 3.2 Extrakcia tuhou fázou

Vo väčšine prípadov je potrebné pred vlastnou analýzou vykonať vhodnú úpravu vzorky, ktorá umožní jednak izoláciu a zakoncentrovanie analytov, prečistenie extraktov, ale aj relatívne odstránenie interferencií a tiež získanie vzorky kompatibilnej s analytickou inštrumentáciou. Úprava vzorky je zásadným krokom, ktorý vo vysokej miere ovplyvňuje výslednú presnosť a správnosť stanovenia. V súčasnosti je dominantnou metódou úpravy vzoriek nielen pri SIA analýzach extrakcia tuhou fázou (SPE), ktorá prináša mnoho výhod ako napríklad možnosť účinného zakoncentrovania analytu, vysokú výťažnosť, selektivitu a tiež možnosť automatizácie a miniaturizácie. Nevýhodou klasického SPE postupu však naďalej ostáva relatívne vysoká spotreba organických rozpúšťadiel aj vzoriek [7].

### Princíp SPE

Princípom extrakcie na tuhú fázu je naviazanie analyzovanej látky (kvapalnej fázy) na sorbent (tuhú fázu), ktorým je naplnená extrakčná kolónka, prípadne iné zariadenie. Balastné látky obsiahnuté vo vzorke sú na rozdiel od analytu vymyté z kolónky preč. K extrakcii analytu dochádza vďaka polárnym, nepolárnym, iónovým či afinitným interakciám medzi tuhou fázou v extrakčnej kolónke a kvapalnou fázou, ktorú tvorí vzorka obsahujúca analyzovanú látku. Aby prebehla extrakcia úspešne, je potrebné, aby mal analyt vyššiu afinitu k sorbentu, než k matrici vzorky [7].

Kľúčovým je výber sorbentu, ktorý volíme na základe vlastností stanovovaných látok, matrice vzorky a typu interferencií. Ako náplne SPE kolóniek sú využívané obdobné sorbenty ako pri HPLC. Dostupná je široká škála sorbentov od klasických nepolárnych ako C8, C18, polárnych ako silikagél či oxid hlinitý až po iónovymenné a rôzne polymérne materiály. K dispozícii sú okrem jednorazových extrakčných kolóniek aj extrakčné disky či membrány, ktoré umožňujú skrátenie procesu extrakcie a zníženie objemu rozpúšťadiel. Kolónky pozostávajú z plastového polypropylénového tela, stacionárnej fázy a zátky či frity, ktorá zaisťuje udržanie sorbentu [7].

Celý extrakčný proces môže prebiehať v SPE manifolde, čo je špeciálne zariadenie, kde je prietok vzorky aj rozpúšťadiel urýchľovaný podtlakom [7].

SPE prebieha vo viacerých krokoch:

- Kondicionácia

Ide o premytie kolónky organickým rozpúšťadlom (napr. MeOH), ktorý aktivuje povrch sorbentu tzv. narovnaním funkčných skupín k interakciám s analytom. Toto organické rozpúšťadlo je následne vymyté vodou či vodným roztokom pufru, aby elučná sila rozpúšťadla neznížovala možnosť interakcie analytu so sorbentom.

- Nanesenie vzorky

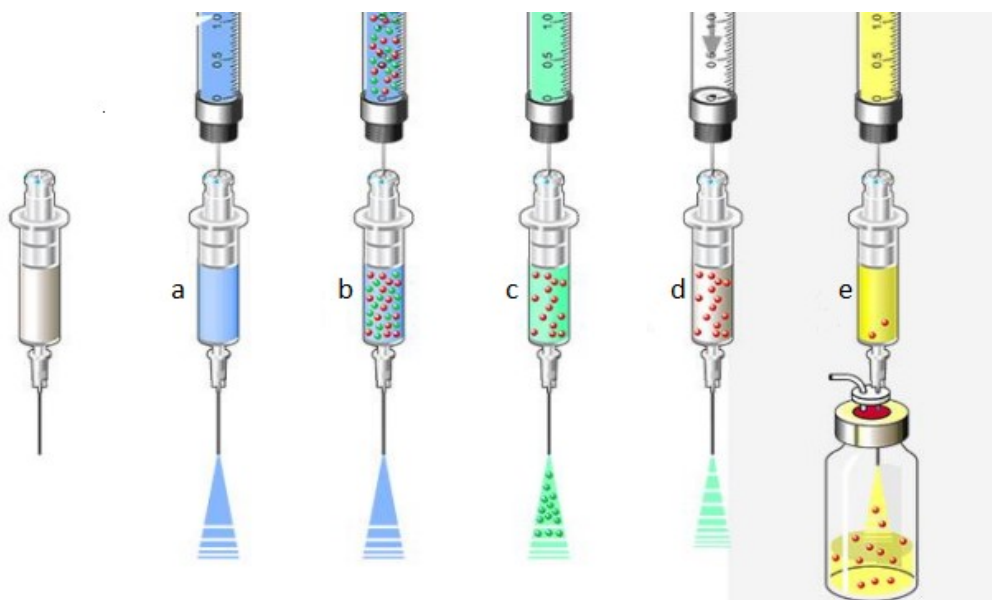
Vzorka môže byť aplikovaná na kolónku priamo alebo po nariadení rozpúšťadlom nízkej elučnej sily. Stanovovaná látka je zachytená na sorbente, zatiaľ čo časť matrice pretečie kolónou.

- Vymytie balastov

Premytím kolónky vodou či pufrom sú odstránené interferencie matrice.

- Elúcia analytu

Po nanesení rozpúšťadla (metanol, acetonitril) je prerušená väzba analytu na povrch sorbentu. Následne je extrakt obsahujúci analyt stanovovaný či ďalej upravovaný [7].



Obrázok 3: Princíp SPE [8]

A - kondicionácia kolónky, B - nanesenie vzorky, C - premytie a vymytie balastných látok, D - vysušenie kolónky, E - elúcia analytov

### 3.2.1 SPE sorbenty

Voľba sorbentu zohráva pri SPE kľúčovú rolu, keďže ovplyvňuje čistotu a mieru selektivity získaného produktu z matrice vzorky. K najlepšej retencii analytov dochádza vtedy, ak je polarita analytu podobná polarite stacionárnej fázy. Výber stacionárnej fázy je daný najmä chemickými vlastnosťami analytov ako je polarita či disociačná konštanta a tiež vlastnosťami použitého rozpúšťadla (pri použití polárneho rozpúšťadla sú používané nepolárne sorbenty a naopak) [7, 9].

#### Klasické sorbenty

Sorbenty delíme podľa polariry fázy na reverzné (nepolárne), medzi ktoré patrí nepolárne modifikovaný silikagél (C8, C18, C4, CH, PH, CN) a normálne (polárne) ako nemodifikovaný silikagél, oxid hlinitý, florisil, polárne modifikovaný silikagél (CN, diol, NH<sub>2</sub>). Radené sú sem taktiež iónomeniče - katexy a anexy. Katex je teda menič katiónov, má záporne nabitú funkčnú skupinu (zvyšok organickej či anorganickej kyseliny naviazaný na silikagél). Anex je naopak meničom aniónov a obsahuje kladne nabitú funkčnú skupinu (napr. kvartérny či sekundárny amín naviazaný na silikagél) [9].

#### Moderné sorbenty

Vzhľadom k faktu, že úprava vzoriek patrí medzi časovo najnáročnejšie kroky analýzy, sú trendy smerované najmä ku skráteniu doby analýzy, automatizácii, miniaturizácii, zlepšeniu reprodukovateľnosti, zvýšeniu selektivity, zníženiu objemov rozpúšťadiel a vzoriek a zvýšeniu extrakčnej účinnosti [10].

#### Molekulárne vtlačené polyméry (MIPS)

Technika MIPS je selektívnou metódou úpravy vzoriek s vysokou výťažnosťou. Sorbentom je polymér, ktorý v štruktúre obsahuje interakčné miesta schopné špecificky rozpoznať daný analyt, či skupinu štruktúrne blízkych látok. Sorbent je pripravovaný polymeráciou monoméru s prídavkom tzv. templátu, ktorým je analyt či štruktúrny analóg. Templát po vymytí zanechá v polymére otlaky svojej molekuly, vďaka čomu sú pri extrakcii na sorbente zachytávané látky štruktúrne podobné templátu [10].

#### Metalo-organické siete (MOFs)

Ide o kryštalické porézne materiály tvorené iónmi kovov a organickým skeletom. Sú charakteristické veľkým povrchom, uniformnou poréznu štruktúrou a vysokou



tepelnou stabilitou. Je možné jednoducho funkcionalizovať vnútro pórov aj povrchovú štruktúru. Ich aplikácia v praxi ako SPE sorbentov je pomerne obmedzená a väčšie využitie majú ako stacionárne fázy v kvapalinovej chromatografii [11].

#### Materiály s obmedzeným prístupom (RAM)

Sorbenty RAM sú založené na gélovej permeačnej chromatografii a chromatografii na reverzných fázach. Sú vhodné najmä pre analýzu látok s nízkymi molekulovými hmotnosťami v komplexných biologických matriciach. Vonkajší povrch tvorí hydrofilná bariéra umožňujúca vniknutie malých molekúl do vnútra materiálu a vylúčenie makromolekúl. Vnútorne povrchy sú hydrofóbne a prebieha tam zakonzentrovanie analytu. Niektoré RAM sorbenty boli aplikované pri analýzach environmentálnych a biologických vzoriek a v súčasnosti sa používajú v spojení s MIPs [11].

#### Nanoštruktúrne materiály

Moderné nanomateriály sa začali využívať v SPE vďaka ich unikátnym vlastnostiam vyplývajúcich z veľkostí ich častíc. Ich hlavnými výhodami je veľký povrch vzhľadom k objemu, veľký počet väzbových miest, vysoká adsorpčná kapacita a funkčná variabilita. Patria sem dendriméry, magnetické nanočastice, uhlíkaté nanomateriály a nanomateriály vyrábané elektrospinningom (kapitola 3.1.4).

*Dendriméry* sú unikátnou skupinou sférických polymérnych makromolekúl, ktoré sú charakteristické početne vetvenou 3D štruktúrou. Existuje mnoho typov dendrimérov a najmenšie z nich majú veľkosť len niekoľko nanometrov. Sú využívané vo viacerých oblastiach vďaka ich vysokej schopnosti zapuzdrovania liečiv či polutantov životného prostredia. Silikagél funkcionalizovaný dendrimérmí predstavuje efektívny spôsob prípravy vysoko efektívneho SPE sorbentu. Využívajú sa napr. k stanoveniu ťažkých kovov v pôdach [11].

*Magnetické nanočastice (MNPs)* sú superparamagnetickým druhom nanomateriálu, ktorý môže byť priťahovaný magnetickým poľom, no po odstránení magnetického poľa na tomto materiáli nezostáva zvyškový magnetizmus. Znamená to, že suspendované superparamagnetické častice, ktoré majú cieľene zadržiavať analyty, môžu byť veľmi rýchlo odstránené z pôvodnej matrice za použitia magnetického poľa a po odstránení tohto poľa sa nezhlukujú. Príkladom sú nanočastice  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  potiahnuté vrstvou  $\text{SiO}_2$  s naviazanými skupinami C18. Využívané sú najmä pri separáciách buniek a izolácii proteínov, peptidov či enzýmov [11, 12].

*Uhlíkaté nanomateriály* sa stali trendom v SPE už od objavenia fullerenu C60 v roku 1985. Odvtedy bolo obrovské množstvo materiálov testovaných pre využitie v SPE. Medzi tieto materiály patria fullerény, grafén a jeho oxidy, uhlíkaté nanotrúbice či nanovlákná. V praxi sú však častejšie využívané práve nanomateriály vyrábané elektrospinningom, pre možnosť jednoduchého kontrolovania orientácie nanovláknien [11].

Ďalším typom moderných sorbentov, ktoré spadajú do kategórie nanoštruktúrnych materiálov sú nanovlákná, ktorým je venovaná nasledujúca kapitola.

## 3.3 Nanovlákná

### 3.3.1 Charakteristika nanovláknien

Nanovlákná sú špeciálne vyrábané textilné vlákna, ktorých priemer je menší než 1 mikrometer, pričom ich dĺžka býva obvykle o 2 až 3 rády vyššia. Tieto vlákna majú veľký merný povrch, vysokú porozitu a malé póry (póry medzi nanovláknami majú cca 10-20 nanometrov, teda neprepustia baktérie, vírusy či alergény, prepúšťajú však molekuly vzduchu). Kvôli lepšej manipulácii bývajú nanovlákná usporiadané do vyšších štruktúrnych a priestorových celkov, podobne ako napr. mikrovlákna [13].

### 3.3.2 Príprava nanovláknien

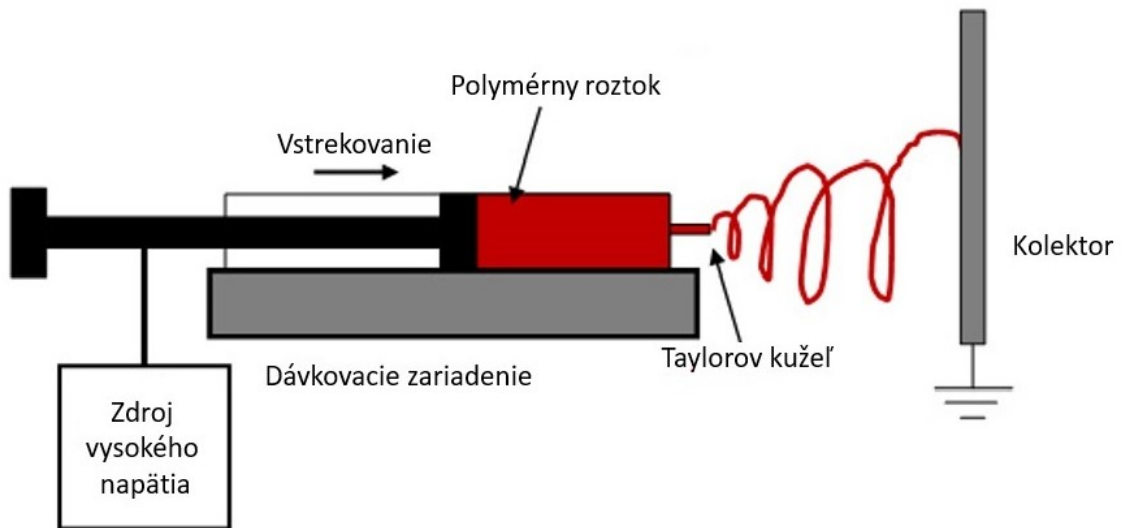
Pri príprave nanovláknien sú sledované parametre ako priemer, priemerná dĺžka či distribúcia dĺžok, plošná alebo objemová hmotnosť, porozita, distribúcia pórov a merný povrch. V súčasnosti existuje mnoho techník prípravy nanovláknien. Najčastejšie používanou technikou produkcie nanovláknien je elektrostatické zvlákňovanie zvané elektrospinning. Medzi ďalšie metódy patrí fúkanie taveniny, dĺženie, použitie šablón a fázová separácia [13].

#### Elektrostatické zvlákňovanie

Pri tejto metóde patentovanej Formhalsom už v roku 1934 sú nanovlákná vyrábané z polymérneho roztoku alebo polymérnej taveniny pomocou elektrostatických a kapilárnych síl [14]. K výrobe nanovláknien môže byť použité nespočetné množstvo materiálov od prírodných a syntetických polymérov až po rôzne kompozitné materiály. Bežne používanými polymérmi sú napr. polykaprolaktón, polyamid 6, polyimid, polyanilín, polyvinylidénfluorid, polyacetonitril, polystyrén či polyetylén.

Zariadenie pre elektrostatické zvlákňovanie je zložené zo striekačky obsahujúcej polymérny roztok, zdroja jednosmerného vysokého napätia (desiatky kV) a dvoch elektród, zvlákňovacej anódy napojenej na zdroj vysokého napätia na hrote kapiláry a katódy zvanej kolektor, ktorá je uzemnená. S rastúcou intenzitou elektrického poľa sa guľovitý tvar kvapaliny na hrote kapiláry predlžuje a vzniká kónický tvar známy ako Taylorov kužeľ, ktorý je následkom relaxácie indukovaného náboja na voľnom povrchu kvapaliny na výstupe zo zvlákňovacej trysky. Behom fázy letu kvapalinovej trysky sa

polymérny prúd enormne napína a dochádza k vytvoreniu nanovlákien. Pomocou elektrického poľa s vysokým napätím medzi kapilárou a uzemnenou zbernicou je polymérny materiál nasmerovaný k uzemnenej zbernici. Pri tomto presune dochádza k odparovaniu rozpúšťadla a na zbernicu teoreticky dopadá čistý polymér tvaru nanovlákien [13, 14, 15, 16].



Obrázok 4: Schéma princípu elektrostatického zvlákňovania [16]

Z hľadiska technologického postupu môžeme elektrospinning rozdeliť na ihlový (syn. kapilárny, konvenčný) a bezihlový (z voľnej hladiny namiesto ihly, mechanizmus podobný ako pri ihlovom, ale k iniciácii *jetov* dochádza na viacerých miestach). Ihlový elektrospinning je charakteristický nižšou produktivitou a preto je využívaný najmä v laboratóriách. Sú preň typické problémy spojené s použitím trysiek, ako upchatie roztokom či nestability spôsobené nerovnomerným elektrickým poľom. K prelomu vo vývoji nanovlákných materiálov došlo s nástupom technológie bezihlového elektrospinningu, ktorý tieto problémy eliminuje, má vyššiu produktivitu a preto sa využíva komerčne [17]. Technológia Nanospider™, ktorú vynašiel v roku 2003 tím profesora Jirsáka na Katedre netkaných textílií Technickej univerzity v Liberci sa radí k bezihlovému elektrospinningu. Táto technológia funguje na základe zvlákňovania polymérov pomocou elektrospinningu s rozdielom, že je ňou umožnené zvlákňovanie nielen z kvapky polyméru prechádzajúceho tryskou do elektrického poľa, ale aj z celej tenkej vrstvy roztoku polyméru. Táto beztrysková technológia umožňuje zariadeniam

produkovať nanovláknenný materiál s vysokou kvalitou v priemyslovom meradle (až 5 g/min, 50-500 nm) [18].

Proces elektrospinningu býva priamo ovplyvňovaný mnohými faktormi, ktoré sú rozdeľované ako parametre elektrospinningu (vložené elektrické pole, vzdialenosť medzi ihlou a kolektorom, priemer ihly, prietoková rýchlosť), roztoku (koncentrácia, viskozita, vodivosť roztoku-konduktivita) a prostredia (teplota a relatívna vlhkosť vzduchu) [19]. Optimálnym nastavením týchto parametrov je možné vyrobiť hladké nanovláknena požadovaných vlastností pre rôzne aplikácie.

### **3.3.3 Použitie nanomateriálov**

Použitie nanomateriálov je čoraz častejšie v najrôznejších oblastiach vedy a techniky. Nanomateriály sú v súčasnosti najviac využívané v oblasti vzdušnej filtrácie, kde veľmi efektívne odstraňujú submikrónové častice, vrátane vírusov a baktérií. Ďalej sú rozšírené v medicíne ako nanovláknenné filtre, respirátory, hojivé obvazy a náplasti či pri riadenom uvoľňovaní liečiv, v bioinžinierstve, pri výrobe odevov z netkaných textílií, pri premene solárnej či veternej energie na elektrickú (termo- a piezoelektrická konverzia a konverzia solárnej energie solárnymi bunkami) či v elektronike ako chemické senzory založené na nanomateriáloch (prírodné nanobiosenzory majú napr. ryby, ktoré nimi zachytávajú nepatrné chvenie vody, syntetické nanobiosenzory sú novinkou-napr. nanotechnologický čuchový senzor). Medzi ďalšie zaujímavé aplikácie patrí využitie nanovláknenných materiálov ako katalyzátorov vďaka ich selektivitě a veľkému počtu väzbových miest [18, 20, 21].

#### **Použitie nanovláknien ako sorbentov pre extrakciu tuhú fázou**

Nanoštruktúrne polyméry získali vďaka ich výhodným vlastnostiam v posledných rokoch veľkú pozornosť v oblasti SPE. Medzi ich najvýznamnejšie výhody patrí veľký povrch vzhľadom k objemu, veľký počet väzbových miest, vysoká adsorpčná kapacita a funkčná variabilita. Veľký povrch nanomateriálov zaisťuje omnoho vyššiu extrakčnú kapacitu a efektívnu v porovnaní s mikromateriálmi. Jednoduchá modifikácia povrchových funkčných skupín zlepšuje selektivitu SPE. Umožňujú nespočetné aplikačné možnosti vzhľadom na množstvo polymérnych materiálov s rôznymi chemickými vlastnosťami, ktoré závisia na chemickej štruktúre a preto vývoj nových nanovláknenných

sorbentov napreduje oveľa rýchlejšie, než u sorbentov klasických [20, 22]. Navyše všestrannosť polymérov umožňuje ich získavanie v rôznych formátoch ako sú vlákna, membrány, poťahy či disky. Polymérne nanovlákná, najmä tie získané elektrospinningom, sú typické veľkým povrchom vzhľadom k objemu, čo zvyšuje extrakčnú kinetiku a kapacitu [23].

Nanovláknenné sorbenty sú využívané najmä pri extrakciách polutantov životného prostredia, pesticídov či liečiv. Súčasný trendy vo vývoji extrakčných techník sú zamerané na zvýšenie selektivity extrakcie, minimalizáciu používania organických rozpúšťadiel, zrýchlenie a plnú automatizáciu extrakčného procesu. Nové sorbenty musia spĺňať množstvo požiadaviek ako napr. stabilita, opakované použitie, univerzálnosť a nízke náklady, v čom polymérne materiály vynikajú. Polyméry môžu byť pripravené v tvare vrstiev, vlákien či sférických častíc.

Nevýhodou SPE kolóniek naplnených nanočasticami je vysoký spätný tlak, kvôli ktorému nemôžu byť použité vysoké prietokové rýchlosti. Problémom s vysokým tlakom je možné sa vyhnúť použitím plošného usporiadania nanovlákien [20, 22].

#### Doterajšie využitie nanovlákien ako sorbentov

Qian Xu *et al.* (2010) použili disky PA6 (produkovaný elektrospinningom) s planárnou orientáciou nanovlákien pri extrakcii docetaxelu z králičej plazmy za dosiahnutia 85% výťažnosti. PA6 si zvolili na základe ich predošlého výskumu, v ktorom demonštrovali vysokú extrakčnú účinnosť PA6 pre nízko polárne zlúčeniny vo vodných roztokoch ako sú napr. estrogény či estery ftalátov. Tento polymér je bežne používaný pri izoláciách a extrakciách látok s fenolickými funkčnými skupinami ako sú flavonoidy a antokyány [24].

Hlavnými výhodami membrán či diskov oproti SPE kolónkam sú väčšia prierezová plocha a nižší spätný tlak, čo umožní úpravu vzoriek pri vyšších prietokových rýchlostiach a teda jednoduchšiu prácu so vzorkami väčších objemov [25]. Počas skúmania extrakcie docetaxelu z králičej plazmy bol skúmaný tiež vplyv pH roztokov vzoriek na proces SPE. Konkrétne v rozsahu pH 3 - 10 a bolo zistené, že v rozsahu pH 4 - 9 nebola značne zmenená efektívnosť extrakcie analytov, zatiaľ čo pri pH 3 bola výťažnosť významne znížená a PA6 mohol byť pri  $\text{pH} \leq 3$  protonizovaný na amidovej skupine a štruktúra vlákien bola narušená. Výťažnosť bola nízka aj pri pH 10 a teda úprava pH králičej plazmy nebola nutná, lebo pri jej prirodzenom pH 6 - 7 bola dosiahnutá vysoká výťažnosť [25].

Táto nová analytická metóda s použitím nanovlákien z nylonu 6 ako sorbentu, bola vyvinutá a validovaná v spojení s HPLC-UV a pre extrakciu stačilo 2,5 mg nanovlákien a 100  $\mu\text{l}$  desorpčného rozpúšťadla. LOD bol  $2 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Metóda použitá v tejto štúdií je jednoduchá, selektívna, citlivá, presná a správna, a teda zodpovedá požiadavkám analýz biologických vzoriek [25].

Háková *et al.* (2018) použili PA6 nanovlákná ako sorbent pre systém online SPE - UHPLC na analýzu bisfenolu A. Tento systém bol testovaný pre stanovenie bisfenolu A vo vzorkách riečnej vody. Bolo použitých 40 mg nanovlákná vloženého do krátkej kolónky (5 x 4,6 mm) pred UHPLC kolónou. Pre identifikáciu a kvantifikáciu bisfenolu A bola použitá fluorescenčná detekcia. LOD bol  $0,6 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Okrem toho bola testovaná aj stabilita použitých nanovlákien počas analytických stanovení. Kolónka s nanovlákným sorbentom bola odvážená pred a po analýzach a nebolo zistené ani rozpustenie, ani strata nanovlákien po všetkých prevedených analýzach. Skenovacím elektrónovým mikroskopom bola sledovaná štruktúra nanovlákien, ktorá sa po analýzach nezmenila, došlo len k miernej mechanickej deformácii. Takto vyvinutá metóda bola úspešne použitá pre stanovenie bisfenolu A vo vzorkách riek v Českej republike [26].

Podobný systém bol použitý Hákovou *et al.* (2020) pre on-line SPE-UHPLC analýzu resveratrolu v červenom víne s použitím rôznych typov nanovlákien a mikrovlákien, ktoré boli porovnávané s komerčným molitickým C18 sorbentom. Boli testované PA6, PAN a polydopamínom potiahnuté PCL nanovlákná a tiež kompozitné nano/mikrovlákné materiály nPCL/ $\mu\text{PCL}$  a nPVDF/ $\mu\text{PCL}$ . V porovnaní s nPVDF/ $\mu\text{PCL}$  a nPCL/ $\mu\text{PCL}$  polymérmi, vykazovali PCL vlákna potiahnuté dopamínom zvýšenie retencie polárnych látok vo vínach. Resveratrol sa najviac zdržal na nPVDF/ $\mu\text{PCL}$  vláknach a tiež bol u tohto materiálu pozorovaný najlepší tvar píku. Všetky materiály obsahujúce PCL mali podobnú extrakčnú efektivitu ako komerčný C18 sorbent, ale došlo k lepšiemu prečisteniu extraktu. Najvhodnejším materiálom pre extrakciu resveratrolu z červeného vína bol teda kompozitný materiál nPVDF/ $\mu\text{PCL}$ . Bolo použitých 45 mg tohto nano/mikrovlákného sorbentu vloženého do kolónky. Zistená medza detekcie bola  $2,4 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  [27].

Šrámková *et al.* (2019) testovali extrakčné vlastnosti nanovlákien v systéme SPE-SIA za použitia držiaka vyrobeného 3D tlačou. Analyzované boli látky rôzneho

charakteru, napr. nesteroidné antiflogistiká (diklofenak, ketoprofén, ibuprofén, naproxén), steroidné hormóny (etinylestradiol, desogestrel, norgestrel, noretinylestradiol), antiulceróza (cimetidín, ranitidín), antihypertenzívum hydralazín, antiastmatiká (klenbuterol, salbutamol), bisfenol A či pesticíd metsulforon metyl. Do 3D držiaka boli vložené nanovlákná s priemernou hmotnosťou 3 mg. Použité boli polyméry PA6, PVDF, PAN, PS, PE a kompozitný materiál  $\mu$ PCL/nPVDF.

Výsledky analýz ukázali, že ako najuniverzálnejšie nanovláknenné sorbenty sa javia PVDF a  $\mu$ PCL/nPVDF. PAN vykazoval vysokú afinitu pre menej lipofilné látky. PVDF nanovlákná vykazovali najlepšie výsledky s ohľadom na retenciu väčšiny zo 17 testovaných látok [20].

### **3.3.4 Vybrané typy nanovláknien**

#### **Polyamid 6 (PA6)**

Nazývaný aj nylon 6, bol syntetizovaný v roku 1952 a po polystyréne je druhým najpoužívanejším polymérom. Patrí do skupiny polyamidov, pre ktoré je typický lineárny reťazec tvorený amidovými skupinami oddelenými metylénovými mostíkmi. Význam tohto usporiadania pre extrakčné účely je nasledovný. Amidové skupiny zodpovedajú za spájanie polymérnych reťazcov vodíkovými väzbami do výsledných vlákien. Hydrofóbne uhľovodíkové reťazce umožňujú vznik nepolárnych interakcií závislých na polyamidových monoméroch, zatiaľ čo hydrofilné amidové skupiny podporujú zmáčanie vlákien vodou, čo zefektívňuje prenos cieľových zlúčenín zo vzorky na vlákna [22, 24].

Polyamidy patria medzi najčastejšie používané technické polyméry, najmä vďaka dobrému pomeru ceny a vlastností. Medzi najdôležitejšie vlastnosti polyamidov patrí dobrá odolnosť voči horeniu a oderu, vysoká chemická odolnosť, výborné dielektrické vlastnosti, odolnosť voči starnutiu, dobrá tuhosť a pevnosť aj pri nízkych teplotách, vysoká odolnosť proti mastným aromatickým materiálom, schopnosť absorpcie vody, nepriepustnosť pre kyslík a tiež dobrá dostupnosť východiskovej suroviny kaprolaktámu [28].



### **Polykaprolaktón (PCL)**

Ide o biodegradovateľný, biokompatibilný, semikryštalický, termoplastický lineárny polyester s nízkou teplotou topenia okolo 60°C, ktorá umožňuje jednoduché spracovanie a nízkou teplotou skleného prechodu okolo -60°C (pod ňou sa polymér nachádza v sklovitom stave - krehký, tvrdý). PCL je pripravovaný polymerizáciou otvorením kruhu monoméru  $\epsilon$ -kaprolaktónu za použitia katalyzátora a nízkomolekulárnych alkoholov pre kontrolovanie molekulovej hmotnosti polyméru. PCL je rozpustný v chloroforme, dichlormetáne, benzéne, toluéne či cyklohexáne pri izbovej teplote. Naopak má zľú rozpustnosť v acetóne, acetonitrile či alkohole. PCL môže byť pridávaný k ostatným polymérom pre zlepšenie odolnosti voči trhlinám v dôsledku napätia, farbitelnosti a príľnavosti. Vďaka jeho pomalej degradácii a nízkej toxicite je vhodný pre systémy s dlhodobým uvoľňovaním liečiv [29].

### **Polyimid (PID)**

Polyimidy sa radia medzi polyméry s veľmi vysokou tepelnou odolnosťou (pri dlhodobom použití sú stabilné pri teplotách do 200°C, pri krátkodobých aplikáciách až do 480°C), ich ďalšími významnými vlastnosťami je ich termo-oxidatívna stabilita, výborné dielektrické vlastnosti, vysoká odolnosť voči rozpúšťadlám a radiácii a tiež vysoká mechanická pevnosť. Tieto polyméry sú však často zle rozpustné v bežných rozpúšťadlách a majú vysoké teploty mäknutia, čo robí ich spracovanie náročným alebo príliš nákladným, môže to však predstavovať výhodu pri použití v analytickej chémii. Sú syntetizované polykondenzáciou aromatických dianhydridov a aromatických diamínov. Najbežnejším spôsobom produkcie polyimidov je využitie polyamidkarboxylovej kyseliny ako prekursoru, ktorý je následne cyklizovaný pri vysokej teplote (150 - 300°C) za odštiepenia vody na polyimid. Majú širokú škálu aplikácií napr. v leteckom priemysle, mikroeletechnike, pri výrobe displejov s kvapalnými kryštálmi (LCD monitory), pri výrobe nanočastíc, adhezív či pri membránovej separácii plynov [30].

Štruktúry polymérov, z ktorých sú pripravené použité nanovlákná sú uvedené v kapitole 4.2.

### 3.4 Analyzované látky

#### Pesticídy

Pesticídy tvoria početnú skupinu biocídnych látok používaných v poľnohospodárstve, vodohospodárstve a lesníctve najmä na ochranu úžitkových rastlín.

Z hľadiska biologickej účinnosti sú ich najvýznamnejšími podskupinami [31]:

- insekticídy – prostriedky k hubeniu hmyzu,
- herbicídy – prostriedky proti burinám,
- fungicídy – prostriedky proti škodlivým parazitickým hubám.

Z hľadiska pôsobenia na cieľový organizmus sa pesticídy delia na systémovo pôsobiace, ktoré prenikajú do celého organizmu rastliny, a na kontaktne pôsobiace, ktoré zostávajú na povrchu organizmu [31].

#### Neonikotinoidy

Neonikotinoidy patria do skupiny syntetických systémových insekticídov, teda pesticídov určených na hubenie hmyzu. Neonikotinoidy sú odvodené od pyridínového alkaloidu nikotínu. Ako insekticídy boli vyvinuté a registrované od 90. rokov 20. storočia predovšetkým kvôli rastúcej skříženej rezistencii z nadmerného používania organofosfátových a karbamátových insekticídov. Postupne sa neonikotinoidy stali celosvetovo najpredávanjšou triedou insekticídov [32].

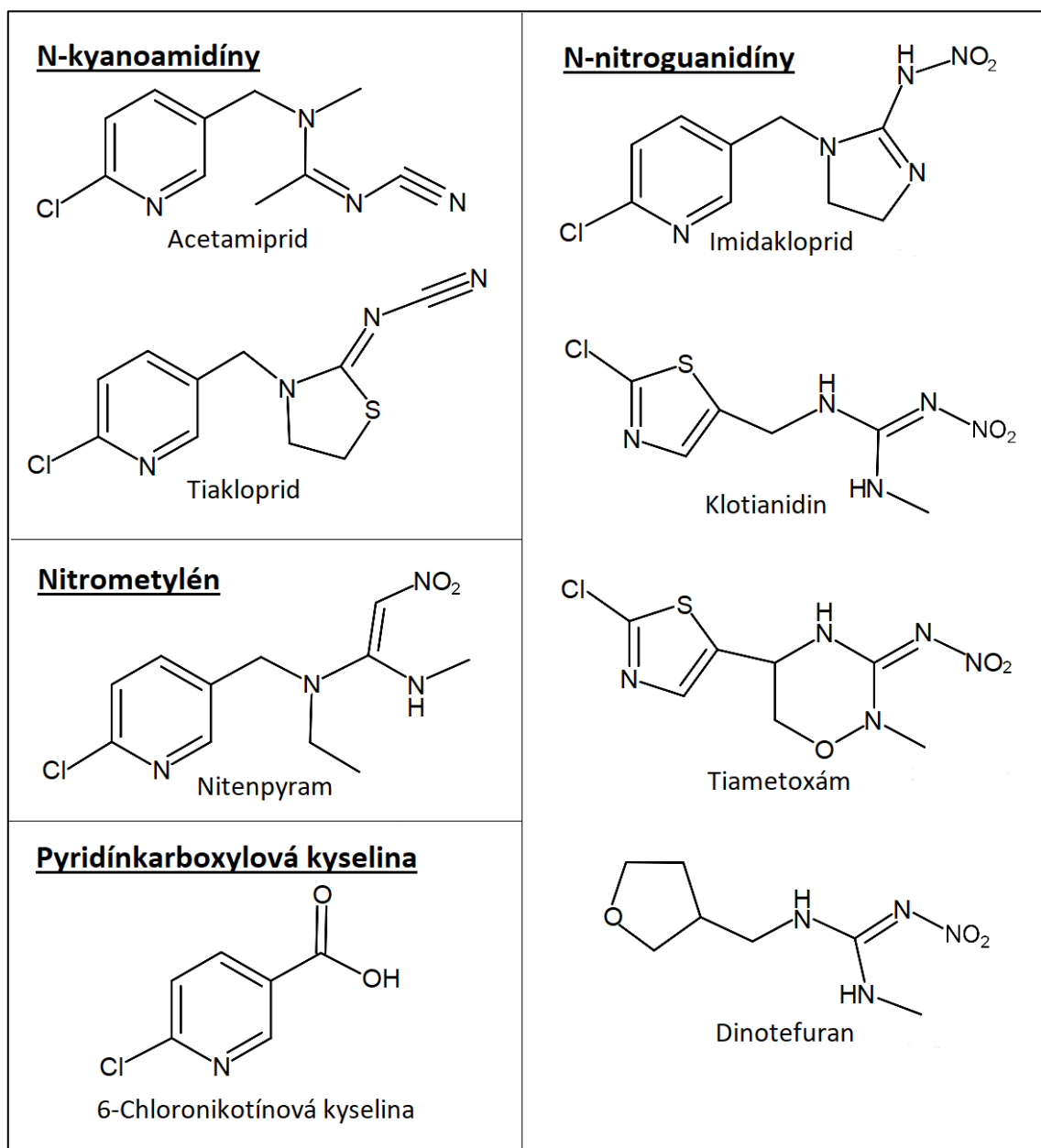
Ich hlavnými výhodami sú vysoká účinnosť, selektivita, systémový účinok, dlhotrvajúci efekt a všestranná aplikácia vhodná pre plodiny ako obilie, zelenina, ale aj rôzne druhy ovocia.

#### Chemická štruktúra analytov

Neonikotinoidy klasifikujeme na základe chemickej štruktúry ako N-nitroguanidíny (imidaklopid, tiametoxám, klotianidin a dinotefuran), nitrometylény (nitenpyram) a N-kyanoamidíny (acetamiprid a tiaklopid) [34]. Okrem týchto látok bola analyzovaná aj 6-chloronikotínová kyselina ako jeden z metabolitov imidaklopidu.

Neonikotinoidy radíme do troch generácií. Medzi neonikotinoidy prvej generácie patrí acetamiprid, imidaklopid, nitenpyram a tiaklopid, pre ktoré je charakteristický 6-chloro-3-pyridylový heterocyklus. Do druhej generácie patrí klotianidin a tiametoxám, ktoré obsahujú 2-chloro-5-tiazolylovú skupinu. Dinotefuran ako zástupca tretej

generácie obsahuje 3-tetrahydrofuranylovú funkčnú skupinu [35]. Jednotlivé štruktúry analytov sú zobrazené na obrázku 5.



Obrázok 5: Štruktúry analytov

### **Fyzikálne-chemické vlastnosti analytov**

Všetky neonicotinoidy vykazujú vysokú rozpustnosť vo vode, ktorá umožňuje ich systémové pôsobenie. Vo vode sú pri anaeróbných podmienkach a neutrálnom alebo mierne kyslom pH odolné voči hydrolýze. Pri určitých podmienkach však môžu podliehať fotodegradácii (napr. v plytkých vodách s vysokým prienikom svetla). Vysoká rozpustnosť a stálosť týchto insekticídov vo vode aj v pôde podporujú ich pohyb

povrchovým a podpovrchovým odtokom, čo vedie k nadmernej stálosti v životnom prostredí [32].

### **Mechanizmus účinku neonikotinoidov**

Ich systémový účinok je založený na neurotoxickosti spôsobenej agonistickou väzbou na postsynaptické nikotínové acetylcholínové receptory (nAChRs) v centrálnom nervovom systéme bezstavovcov, čím kompetujú s acetylcholínom ako prirodzeným neuromediátorom a teda dochádza k blokáde prenosu signálov. Ich afinita k nAChRs stavovcov je oveľa nižšia, pravdepodobne kvôli odlišnej konfigurácii podjednotiek tohto receptora, čím je zaistený selektívny účinok na hmyz [32, 36].

Neonikotinoidy sú pohlcované koreňmi, prípadne listami a postupne prenikajú do ostatných častí rastlín, vďaka čomu sú s výhodou používané na morenie semien, čiže aplikáciu insekticídov na semeno ešte pred siatím. Takto je zabezpečená ochrana nielen semena, ale následne aj celej rastliny pred škodcami. Iné formy použitia zahŕňajú napr. postreky či granule [37].

### **Toxicita neonikotinoidov**

Neonikotinoidy ako širokospektré systémové insekticídy sú toxické pre hmyz v minimálnych množstvách v porovnaní s inými skupinami insekticídov, napr. stredná smrteľná dávka LD<sub>50</sub> po ingestii imidaklopridu a klotianidinu včelami medonosnými je 5 a 4 ng na jednu včelu, čo je v porovnaní s dichlórdifenyltrichlóretánom 1/10 000 jeho LD<sub>50</sub> [38]. Koncentrácie v rastlinných tkanivách, ktoré sú schopné zabezpečiť dostatočnú ochranu pred škodlivým hmyzom sa pohybujú v rozmedzí od 5 do 10 ppb [39]. Rozdiely v toxicite jednotlivých neonikotinoidov pre suchozemský hmyz existujú na základe ich molekulárnych štruktúr. Molekuly neonikotinoidov môžu obsahovať elektronegatívnu nitro- (imidaklopid, klotianidin, dinotefuran, tiametoxám) alebo kyano- (acetamiprid, tiaklopid) substituovanú heterocyklickú skupinu. Kyano- substituované neonikotinoidy sú menej toxické pre včely medonosné v porovnaní s nitroderivátmi. Táto redukovaná toxicita vyplýva z nižšej toxicity metabolitov týchto látok a takisto zo zvýšeného metabolizmu cytochrómami P450 [40].

## Environmentálne dôsledky používania neonikotínoidov

Používanie neonikotínoidových insekticídov v poľnohospodárstve neovplyvňuje len škodcov úžitkových rastlín, ale aj prospešné druhy hmyzu ako napríklad včely medonosné. Tieto sa môžu ľahko dostať do kontaktu s neonikotínoidmi, keďže sú distribuované do rôznych rastlinných častí ako napríklad aj peľ či nektár. Po tomto kontakte môžu byť insekticídy prenesené do úľov a ich rezíduá môžu byť nájdené vo včelích produktoch [35].

Taktiež prítomnosť neonikotínoidov vo vodných ekosystémoch môže znamenať riziko pre citlivé vodné bezstavovce, na ktorých závisí výživa vodných stavovcov. Hlavnou cestou prenosu insekticídov do vodných ekosystémov je odtok povrchovej vody po dažďoch alebo topení snehu a následný prechod do podzemných vôd [32].

Nadmerné používanie neonikotínoidových insekticídov vyžaduje vhodné analytické metódy pre detekciu a kvantifikáciu ich rezíduí v rastlinných či živočíšnych produktoch. Zloženie medu závisí najmä na pôvode zberaného nektáru z kvetín. Med ako veľmi rozšírená potravina prírodného pôvodu musí podliehať mnohým bezpečnostným parametrom, jedným z nich je aj prítomnosť rezíduí pesticídov a ich metabolitov, ktorá musí byť monitorovaná. Je potrebné brať do úvahy, že včely medonosné sa na poliach ľahko dostávajú do kontaktu s plodinami ošetrovanými pesticídmi. V posledných rokoch bolo preto publikovaných mnoho analytických metód pre analýzy pesticídov prítomných vo včelích produktoch, ale i v prírodných vodách či iných vzorkách. Prehľad metód vyvinutých v rokoch 2015-2020 je v nasledujúcej tabuľke.

Tabuľka 1: Prehľad metód stanovenia neonikotínoidov vyvinutých v rokoch 2015-2020

Analyt	Matrica	Úprava vzorky	Separácia/ detekcia	LOD (ppb)	Výťažnosť (%)	Ref.
ACET, TMTX, IMID, CLTD, DNTF	kiwi	SPE (PSA+GCB) sorbent	LC-MS/MS	0,6-1,4	78-96	[41]
ACET, TMTX	Vigna čínska (fazuľa)	dSPE (MWCNTs)	GC-MS/MS	1-2	96-104	[42]
ACET, DNTF, NTP, TMTX, TIA, IMID, CLTD	ľudský moč	SPE (HLB sorbent)	UHPLC– (ESI)MS/MS	0,03-0,07	83,0-92,3	[43]

ACET, DNTF, NTP, TMTX, TIA, IMID, CLTD	víno	SPE (HLB sorbent)	SFC-ESI-MS	LOQ 1 - 10	87-104	[44]
ACET, DNTF, NTP, TMTX, TIA, IMID, CLTD	med	Iónomenič- DPX pipetové špičky s fixovanými sorbentmi	HPLC/MS/ MS	0,3 - 3	72-111	[45]
ACET, DNTF, NTP, TMTX, TIA, IMID, CLTD	med	DLLME	HPLC-DAD	1,5 - 2,5	70-120	[46]
TMTX, TIA, IMID, ACET, CLTD	včelí peľ	LLE-dSPE	UHPLC- MS/MS	0,02 - 0,72	81-87	[47]
ACET, DNTF, NTP, TMTX, TIA, IMID, CLTD, 6-CnA	pôda	SLE	MEKC-UV	1 - 2,9	73-92	[48]
TMTX, IMID, ACET	ovocie a zelenina	disperzná extrakcia tuhou fázou – modifikovaný zeolite NaY	HPLC-DAD	1 - 100	64-128	[49]

ACET - acetamiprid, IMID - imidaklopid, TMTX - tiametoxám, DNTF - dinotefuran, NTP - nitenpyram, TIA - tiaklopid, CLTD - klotianidin, 6-CnA - 6-chloronikotínová kyselina, LOD - medza detekcie, LOQ - medza stanoviteľnosti, SPE - extrakcia tuhou fázou, PSA - primárny a sekundárny amín, GCB - grafitizovaný uhlík, LC-MS/MS - kvapalinová chromatografia s tandemovou hmotnostnou spektrometriou, dSPE- disperzná extrakcia tuhou fázou, MWCNTs- uhlíkové nanotrúbice, GC - plynová chromatografia, HLB - hydrofilne-lipofilne vyrovnaný kopolymér, (U)HPLC - (ultra)vysokoúčinná kvapalinová chromatografia, ESI - ionizácia elektrosprejom, SFC - superkritická kvapalinová chromatografia, DLLME - disperzná kvapalinová mikroextrakcia, DAD - detektor s diódovým poľom, LLE - extrakcia kvapalina/kvapalina, SLE - extrakcia kvapalina/tuhá látka, MEKC - micelárna elektrokinetická chromatografia.

### **Zákaz používania neonikotínoidov v Európskej únii**

Už v roku 2013 bolo Európskou komisiou na základe varovania Európskeho úradu pre bezpečnosť potravín (EFSA) prísne obmedzené používanie troch neonikotínoidov - klotianidinu, imidaklopidu a tiametoxámu po potvrdení ich negatívneho vplyvu na včely medonosné prvými štúdiami. Vtedy sa zákaz týkal len rastlín, ktoré priťahujú včely ako napr. repka olejná či slnečnica a mal byť len dočasný na dobu 2 rokov. V ďalších

podrobnejších štúdiách však bolo zistené, že uvedené insekticídy predstavujú riziko nielen pre včely medonosné, ale aj pre divé včely [33].

V roku 2018 boli Európskou komisiou predložené návrhy o rozšírení zákazu vonkajšieho použitia týchto troch účinných látok na všetky plodiny a tieto návrhy boli podporené kvalifikovanou väčšinou členských štátov. Ich použitie je teda možné len v trvalých skleníkoch. Týkajú sa toho nariadenia č. 2018/783 (imidaklopid), 2018/784 (klotianidin) a 2018/785 (tiametoxám) Európskej komisie z dňa 29. mája 2018, ktoré platia pre Európsky hospodársky priestor. V týchto nariadeniach je uvedené, že semená ošetrované prípravkami na ochranu rastlín s obsahom imidaklopidu, klotianidinu resp. tiametoxámu sa nesmú uvádzať na trh ani používať, okrem týchto prípadov:

- a) semená sú určené výhradne na použitie v trvalých skleníkoch,
- b) a výsledná plodina zostane v trvalom skleníku počas celého svojho životného cyklu [50, 51, 52].

V súlade s nariadením (ES) č. 1107/2009 mohli členské štáty v prípade potreby najneskôr do 19. septembra 2018 zmeniť alebo zrušiť existujúce autorizácie prípravkov na ochranu rastlín s obsahom imidaklopidu, klotianidinu či tiametoxámu ako účinných látok [53].

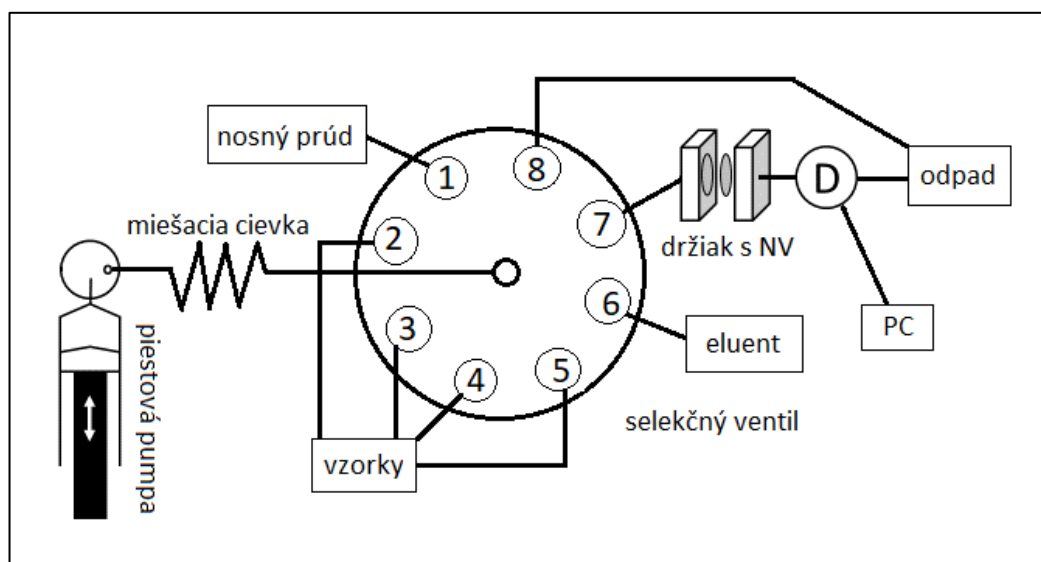
Okrem týchto troch účinných látok Európska komisia na základe odporúčania EFSA vo svojom vykonávacom nariadení (EÚ) 2020/23 z dňa 13. januára 2020 neobnovila schválenie účinnej látky tiaklopid v súlade s nariadením Európskeho parlamentu a Rady (ES) č. 1107/2009 o uvádzaní prípravkov na ochranu rastlín na trh a o zmene prílohy k vykonávaciemu nariadeniu Komisie (EÚ) č. 540/2011. Obdobie platnosti schválenia účinnej látky tiaklopid v zmysle časti A prílohy k vykonávaciemu nariadeniu (EÚ) č. 540/2011 uplynulo 30. apríla 2020. Členské štáty zrušia autorizácie prípravkov na ochranu rastlín s obsahom tiaklopidu ako účinnej látky najneskôr 3. augusta 2020 [54].

Bez obmedzení zostáva použitie acetamipridu, ktorý je zároveň posledným z piatich neonikotinoidov, ktoré boli v roku 2005 schválené pre použitie na trhu v EÚ.

## 4. Experimentálna časť

### 4.1 Použité prístroje a pomôcky

- SICrom™ system (FIALabs Instrument Systems, Inc., USA) s piestovou pumpou Sapphire™ S17PDP (objem 4 ml) a 8-cestným selekčným ventilom
- softvér FIALab® pre Windows, verzia 5.9.321
- spektrofotometer USB 4000 (Ocean Optics, Ocean Optics Inc., Dunedin, USA),
- UV lampa model D 2000 (Ocean Optics, Ocean Optics Inc., Dunedin, USA) ako zdroj svetla pripojená cez optické vlákna k detekčnej cele
- detekčná cela – Z cela, optická dráha 1 cm, Ultem
- PTFE hadičky o vnútornom priemere 0,8 mm
- držiak na nanovlákná vyrobený 3D tlačou
- analytické váhy
- pH meter Hanna Instruments
- ultrazvuková vaňa (Bandelin Sonorex Digitec DT 52)
- magnetická miešačka MM 2A, Laboratorní přístroje Praha
- automatické pipety Transferpette



Obrázok 6: Schéma usporiadania SIA, upravené podľa [20]



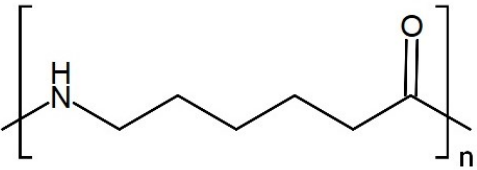
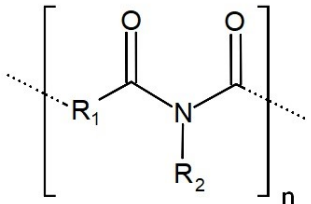
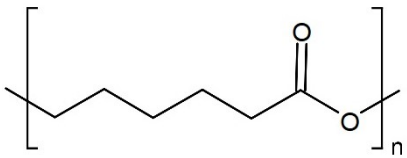
## 4.2 Použité chemikálie a testované látky

- Metanol pre HPLC, VWR, Česká republika
- Acetonitril pre HPLC, VWR, Česká republika
- Kyselina chlorovodíková p.a., Sigma Aldrich, Česká republika
- Tris(hydroxymetyl)aminometán (1,2 g/l) Sigma Aldrich, Česká republika
- Dopamín (2 g/l) Sigma Aldrich, Česká republika
- Destilovaná voda pripravená prístrojom MiliQ, odpor 18 MΩ × cm

Štandardy testovaných látok: dinotefuran, nitenpyram, tiametoxám, 6-chloronikotínová kyselina, klotianidin, imidakloprid, acetamiprid, tiakloprid (Pestanal® analytické štandardy, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Fyzikálne a chemické vlastnosti analyzovaných látok sú uvedené v tabuľke 3.

Nanovlákná boli vyrobené a poskytnuté Technickou univerzitou v Liberci, Katedrou textilní, ktorá ich vyrába elektrostatickým zvlákňovaním pomocou technológie Nanospider™. Použité nanovlákná sú uvedené v tabuľke 2.

Tabuľka 2: Nanovlákná používané v diplomovej práci

Typ nanovlákná	Použitá skratka	Štruktúra
Polyamid	PA	
Polyimid	PID	
Polykaprolaktón	PCL	

Tabuľka 3: Fyzikálne a chemické vlastnosti analytov podľa databázy PPDB: Pesticide Properties DataBase

Analyt	M <sub>w</sub> [g/mol]	logP	pKa	Rozpustnosť vo vode [mg/l]
<b>DNTF</b>	202,21	-0,55	12,6	39830
<b>NTP</b>	270,72	-0,66	3,1	590000
<b>TMTX</b>	291,71	-0,13	-	4100
<b>6-CnA</b>	157,55	2,70	3,2	2000
<b>CLTD</b>	249,68	0,73	11,1	340
<b>IMID</b>	255,66	0,57	-	610
<b>ACET</b>	222,67	0,80	0,7	2950
<b>TIA</b>	252,72	1,26	-	184

## **4.3 Príprava roztokov**

### **4.3.1 Príprava zásobných a pracovných roztokov**

Pracovné roztoky o koncentráciách 1, 2,5 a 5 ppm boli pripravované nariedením zásobných roztokov insekticídov v acetonitrile o koncentrácii 500 ppm. Z príslušných zásobných roztokov bolo pipetovaných 200  $\mu$ l do 10 ml odmerných baniek, ktoré boli následne doplnené destilovanou vodou po rysku. Takto pripravené roztoky o koncentrácii 10 ppm boli použité pre prípravu jednotlivých pracovných roztokov. Pre koncentráciu 1 ppm bol pipetovaný 1 ml, pre koncentráciu 2,5 ppm bolo pipetovaných 2,5 ml a pre koncentráciu 5 ppm bolo pipetovaných 5 ml, ktoré sme doplnili destilovanou vodou do 10 ml sklenených odmerných baniek. Zásobné aj pracovné roztoky boli uchovávané na chladnom a tmavom mieste.

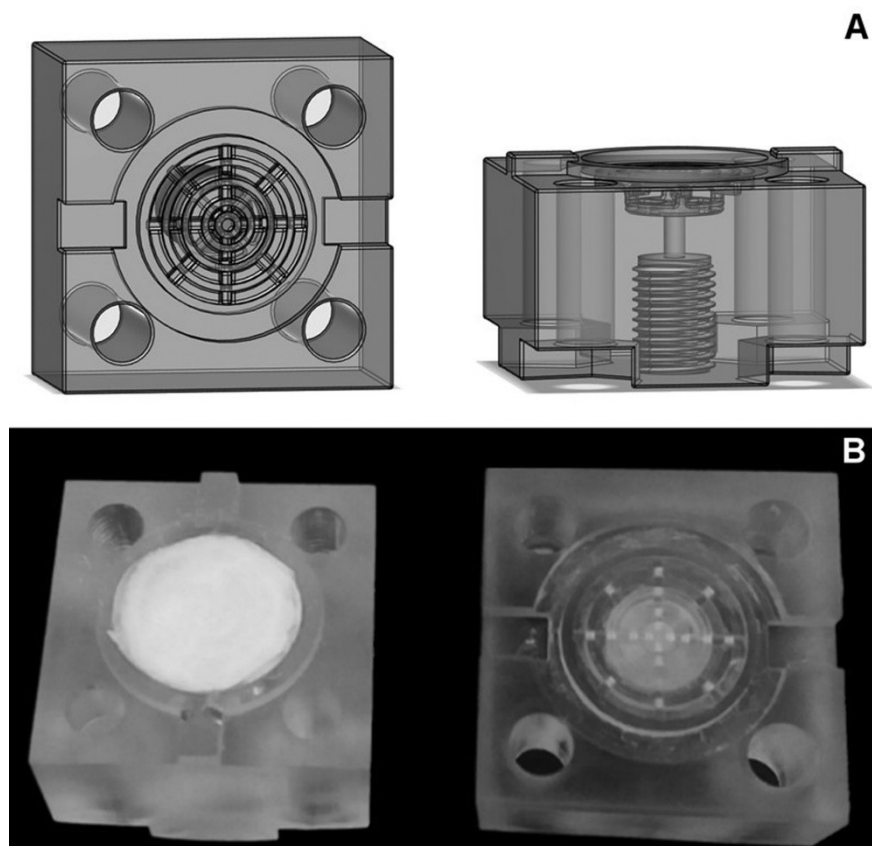
### **4.3.2 Príprava elučných činidiel**

Ako elučné činidlá boli použité rôzne koncentrácie metanolu (50%, 75%, 90%), ktoré boli pripravené odmeraním daného množstva metanolu (50, 75, 90 ml) a pridaním 50, 25 alebo 10 ml destilovanej vody. Takto pripravené roztoky boli následne odplynené vložením do ultrazvukovej vane.

#### 4.4 3D- tlačový držiak na nanovlákná

Pri analýzach bol použitý držiak vyrobený 3D tlačou firmou TriLab Company (Hradec Králové, Česká republika) za použitia tlačiarne FormLab 2 (FormLabs Inc. Massachusetts) z polyakrylátu Clear Resin. Držiak pozostáva z dvoch do seba zapadajúcich kusov o rozmeroch 25 x 25 x 15 mm, ktoré sú spájané štyrmi skrutkami. Stredová časť je navrhnutá k vloženiu nanovláknenných diskov o priemere 13 mm. Súčasťou oboch kusov je prietokový kanál rozvetvujúci sa na menšie kanáliky, aby bola zaistená distribúcia analytu na celú plochu nanovláknenného disku [20]. Mŕtvy objem tohto držiaka bol 200  $\mu$ L.

Disky nanovláknien boli pred naplnením do 3D tlačeneho držiaka vystrihované z celistvého kusu dodanej textílie. Do držiaka boli manuálne vkladané 4 vrstvy nanovláknenných diskov pomocou plastovej pinzety. Držiak bol v systéme umiestnený medzi selekčným ventilom a detekčnou celou za použitia čo najkratšej hadičky, aby nedochádzalo k disperzii eluátu pred vstupom do detekčnej cely a je zobrazený na obrázkoch 7 a 8.



Obrázok 7: Držiak vyrobený 3D tlačou [20]



Obrázok 8: Držiak vyrobený 3D tlačou

## 4.5 Modifikácia povrchu nanovlákien (poťahovanie polydopamínovou vrstvou)

Meranie analytov bolo prevedené aj s poťahovanými diskami nanovlákien. Ako poťah bola použitá zmes dopamínu a tris(hydroxymetyl)aminometánu, v ktorej došlo k polymerizačnej reakcii za vzniku polydopamínu. Polydopamínový poťah bol pripravený s cieľom zvýšiť retenciu viac hydrofilných analytov na testovaných nanovláknach, resp. overiť túto možnosť [54]. Pre poťahovanie bolo použitých 0,3 g tris(hydroxymetyl)aminometánu a 0,5 g dopamínu, ktoré boli rozpustené v 250 ml destilovanej vody. Pomocou HCl bolo pH roztoku upravené na 8,5 (zmerané digitálnym pH metrom) a do dvoch kadičiek s takto pripravenými roztokmi boli vložené disky z nanovlákien, uložené v držiakoch slúžiacich na ochranu nanovlákien a ponechané v kúpeli na magnetickej miešačke po dobu 4 hodín za stáleho miešania (*batch* protokol). Po ukončení poťahovania boli disky nanovlákien z držiakov vybrané a dôkladne premyté destilovanou vodou tak, aby sa odstránili zvyšky polymerizačnej zmesi.

Poťahovanie polydopamínom bolo takisto vyskúšané aj za použitia peristaltickej pumpy, ktorá prečerpávala polymerizačnú zmes cez držiak s nanovláknami rovnako po dobu 4 hodín pri rýchlosti 250 otáčok za minútu.

## 4.6 Metóda merania

Pred každým prvým meraním po spustení systému bolo potrebné celý systém vrátane piestovej pumpy premyť destilovanou vodou, čím bol cez každú hadičku aspirovaný určitý objem vody a všetko bolo smerované do odpadu. Následne bolo nutné zmerať tmavé spektrum a po zapnutí UV lampy zmerať referenčné spektrum. Zvolené vlnové dĺžky boli 254, 270 a 330 nm, pričom posledná vlnová dĺžka bola použitá ako referenčná. Pokračovalo sa kondicionovaním držiaka 400  $\mu$ l 75% metanolu rýchlosťou 10  $\mu$ l/s. Po prebehnutí týchto krokov bola premytá hadička vzorky a systém tým bol pripravený na meranie. V prvom kroku sa aspirovalo do priestoru čerpadla 500  $\mu$ l destilovanej vody ako nosného prúdu rýchlosťou 200  $\mu$ l/s. Potom prebehla aspirácia danej vzorky o objeme 100  $\mu$ l z príslušného portu rýchlosťou 10  $\mu$ l/s. Táto vzorka bola privedená do držiaka s nanovláknami a nasledovalo meranie absorbancie dávkovacej fázy spektrofotometrom. Následne bolo aspirovaných 500  $\mu$ l nosného prúdu rýchlosťou

100  $\mu\text{l/s}$  a ďalej 100  $\mu\text{l}$  elučného činidla rýchlosťou 200  $\mu\text{l/s}$ . Elučné činidlo prešlo držiakom prietokovou rýchlosťou 10  $\mu\text{l/s}$  a nasledovalo meranie elučnej fázy spektrofotometrom. Opakovanie celej analýzy prebiehalo podľa nastaveného programu trikrát. Po ukončení meraní bolo takisto nutné celý systém premyť destilovanou vodou. Použitý program je uvedený v tabuľke 4.

Tabuľka 4: Protokol metódy použitej v testovaní extrakčnej účinnosti nanovlákién

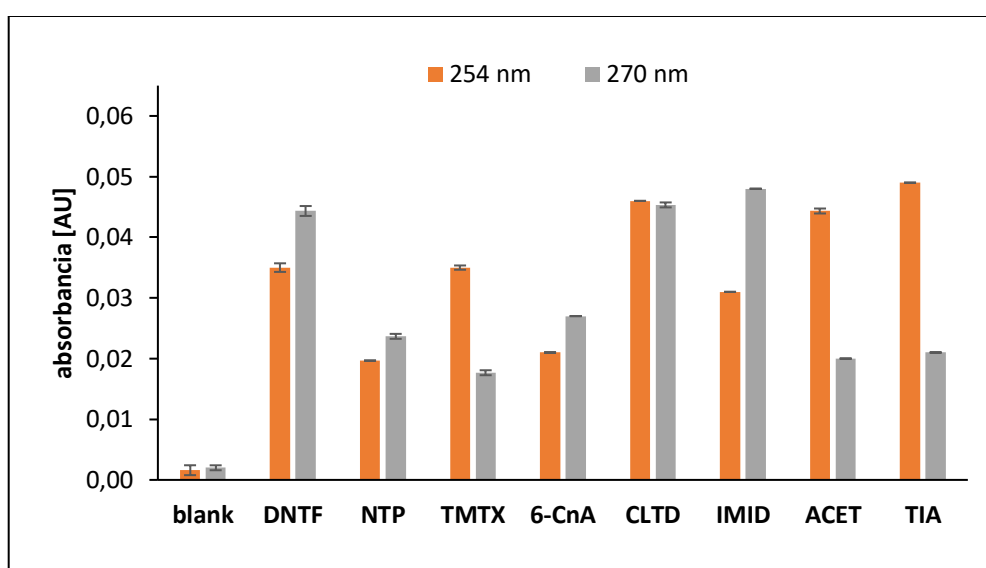
Príkaz	Objem	Prietoková rýchlosť	Port	Poznámka
Aspiration of carrier	500 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l/s}$	2	Aspirácia nosného prúdu
Sample aspiration	100 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l/s}$	2	Aspirácia vzorky
Sample loading				Dávkovanie vzorky
Spectrometer Absorbance Scanning		10 $\mu\text{l/s}$	8	Meranie absorbancie dávkovacej fázy
Spectrometer Stop Scanning				Ukončenie merania absorbancie
Aspiration of water	500 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l/s}$	2	Aspirácia nosného prúdu
Aspiration of the eluent	100 $\mu\text{l}$	200 $\mu\text{l/s}$	7	Aspirácia eluentu
Elution and measurement		10 $\mu\text{l/s}$	8	Elúcia a meranie
Spectrometer Absorbance Scanning				Meranie absorbancie elučnej fázy
Delay (sec) 55 Spectrometer Stop Scanning				Počkať 55 sekúnd Ukončenie merania absorbancie

\* za každým krokom bol vložený príkaz „Delay until done“

## 5. Výsledky a diskusia

### 5.1. Výber vlnových dĺžok a testovanie držiaka

V prvých experimentoch boli zisťované optimálne vlnové dĺžky pre stanovovanie jednotlivých analytov. Zvolené boli vlnové dĺžky v maxime absorbcie daných látok, ako je znázornené v grafe 1. Toto meranie prebehlo v prostredí destilovanej vody s roztokmi v koncentrácii 1 ppm, bol aspirovaný objem 100  $\mu$ l a slepou vzorkou bola destilovaná voda. Nebol použitý držiak s nanovláknami.



Graf 1: Porovnanie maxima absorbcie analytov v koncentrácii 1 ppm pri jednotlivých vlnových dĺžkach

V tabuľke 5 sú uvedené namerané hodnoty  $\lambda_{\max}$  jednotlivých analytov. Tieto hodnoty boli použité pri vyhodnocovaní ďalších experimentov.

Tabuľka 5: Maximálne vlnové dĺžky analytov

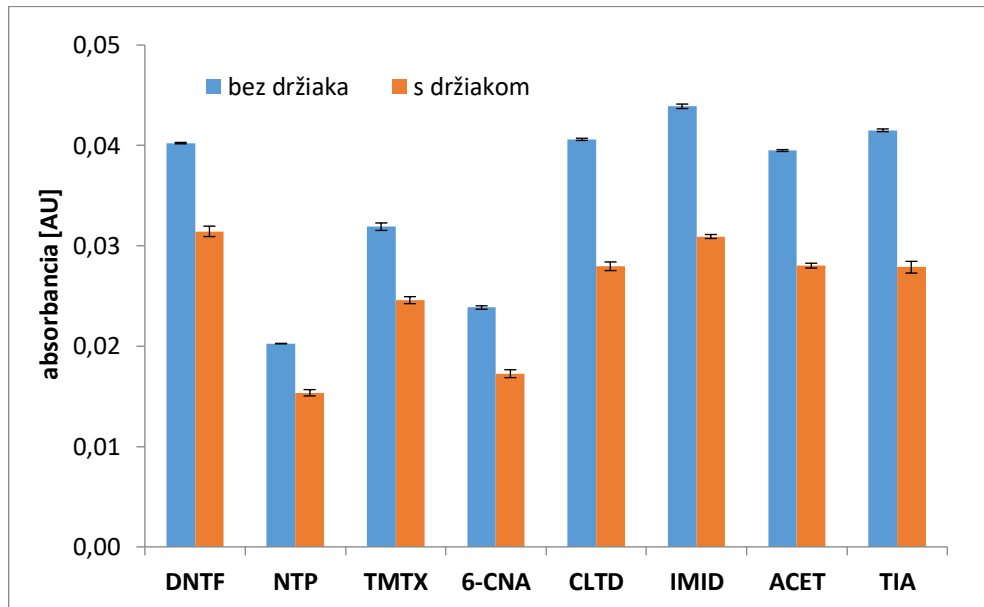
Analyt	DNTF	NTP	TMTX	6-CnA	CLTD	IMID	ACET	TIA
$\lambda_{\max}$ [nm]	270	270	254	270	254	270	254	254

Ďalším krokom bolo porovnanie hodnôt absorbcie a plôch pík analytov bez použitia držiaka a s držiakom s cieľom overiť možnosť použitia držiaka pre meranie. Výsledkom bolo zistenie, že píky absorbcie počas dávkovacej fázy boli menšie pri použití držiaka, čo by mohlo znamenať, že na samotnom držiaku boli zadržané

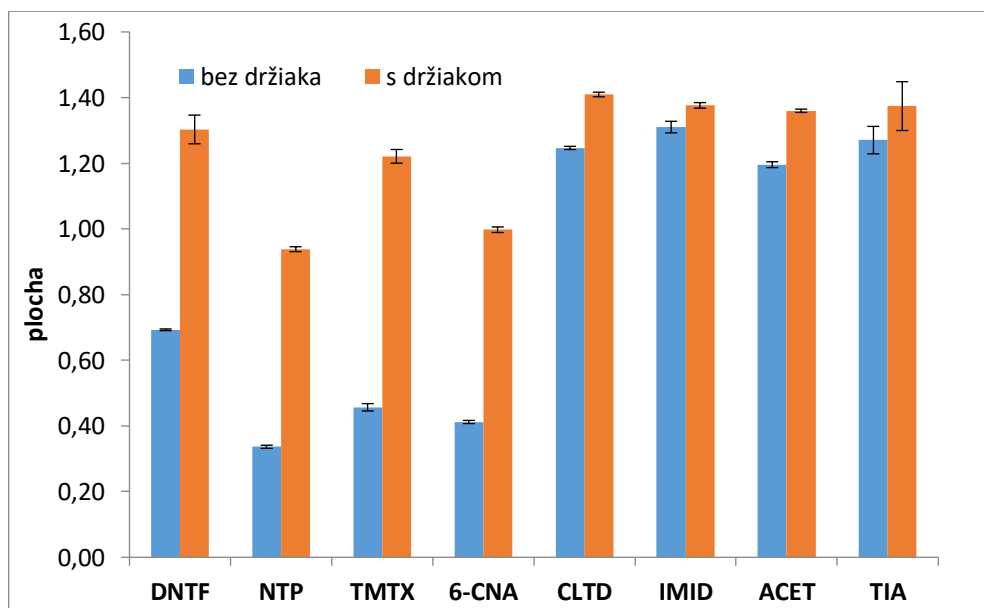


analyty. Pri porovnaní plôch píkovo bolo zistené, že tie sú väčšie pri použití držiaka. Vysvetlením je disperzia vznikajúca pri použití držiaka, kvôli ktorej došlo k zníženiu a rozšíreniu píkovo. Na držiaku by teda neonekotinoidy nemali byť zadržované a tento typ držiaka môže byť použitý pre merania.

Porovnanie hodnôt je zobrazené v grafoch 2 a 3.



Graf 2: Výška píkovo dávkovacej fázy jednotlivých analytovo v koncentrácii 1 ppm, za použitia 50% ACN ako elučného činidla

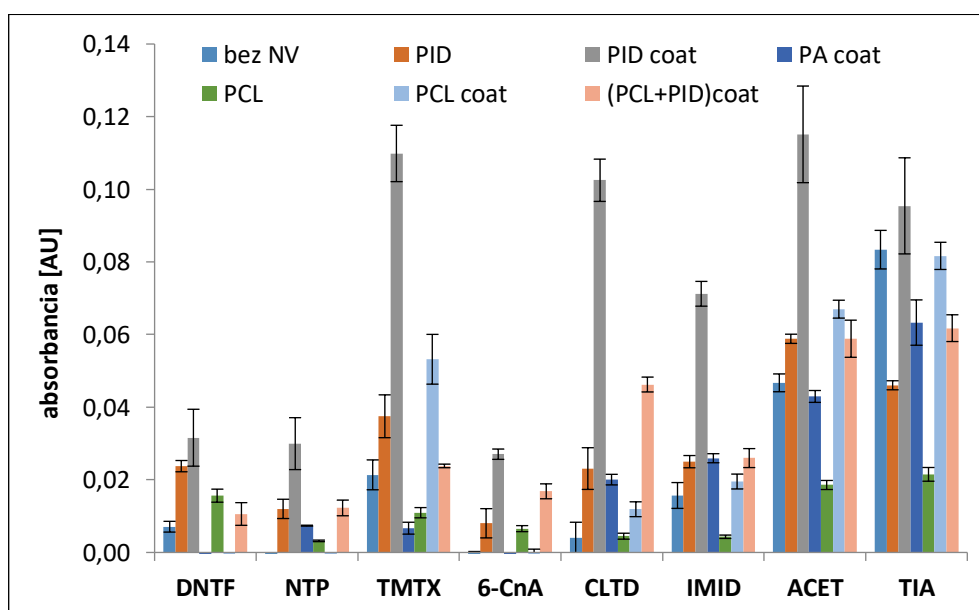


Graf 3: Plocha píkovo dávkovacej fázy jednotlivých analytovo v koncentrácii 1 ppm, za použitia 50% ACN ako elučného činidla

## 5.2 Výber a porovnanie nanovlákien

Výber nanovlákien v tejto štúdii bol založený na výsledkoch Dr. Horstkotte Šrámkovej, ktoré získala počas jej stáže na Univerzite v Granade v Španielsku.

Analýzy boli prevádzané za použitia troch typov nanovlákien, ktoré ukázali sľubné výsledky pri pilotných pokusoch. Každý použitý druh nanovlákien bol testovaný aj po polydopamínovom poťahovaní. Navyše bolo testované aj použitie kombinácie poťahovaných PID a PCL nanovlákien. Jednoznačne najvyšší signál stanovovaných látok bol zaznamenaný pri použití PID nanovlákien s polydopamínovým poťahom. Na grafe 4 je možné vidieť, že po polydopamínovom poťahovaní bola zvýšená extrakčná efektivita všetkých skúmaných nanovlákien. Takisto použitie čistých PID nanovlákien vyzerá byť sľubné a to najmä u menej polárnych analytov. Najväčšou výzvou boli elúcie polárnejších analytov, ktoré oproti ostatným analytom nevykazovali tak dobré zadržanie na nanovláknach. S cieľom zvýšiť elúciu polárnejších analytov bolo tiež skúšané použitie PID a PCL nanovlákien s polydopamínovým poťahom zároveň. Testované boli aj PA nanovlákná, avšak žiadny z analytov na nich nevykazoval retenciu. Z dôvodu prehľadnosti nie sú výsledky s PA nanovláknami zanesené v grafe 4. Pri testovaniach boli vždy použité 4 vrstvy nanovlákien s výnimkou kombinácie PID a PCL nanovlákien s polydopamínovým poťahom, kde bolo použitých spolu 8 vrstiev. Bol aspirovaný objem 100  $\mu$ l vzorky. Porovnanie jednotlivých typov nanovlákien je uvedené v grafe 4.



Graf 4: Porovnanie elučnej fázy všetkých použitých typov nanovlákien pri analýze vzoriek o koncentrácii 2,5 ppm pri elúcii 75% MeOH

### 5.3 Efekt polydopamínového poťahovania nanovlákien na retenciu analytov

Keďže jedným z cieľov tejto práce bolo overiť efektivitu polydopamínového poťahovania testovaných nanovlákien, bolo potrebné optimalizovať podmienky tohto poťahovania. Poťahovanie diskov nanovlákien umiestnených v ochranných košíčkoch bolo najprv prevedené v kadičke s pripravenou polymerizačnou zmesou (*batch* protokol). Takto potiahnuté nanovlákná sú zobrazené na obrázku 9.

Druhý testovaný spôsob poťahovania bol prevedený s peristaltickou pumpou. Takto potiahnuté nanovlákná sú zobrazené na obrázku 10. Presné postupy sú uvedené v kapitole 4.5. Vizuálnou inšpekciou sme zistili, že k efektívnejšiemu zadržaniu polydopamínu na nanovláknach došlo v prvom prípade a pre ďalšie experimenty boli použité takto poťahované nanovlákná.

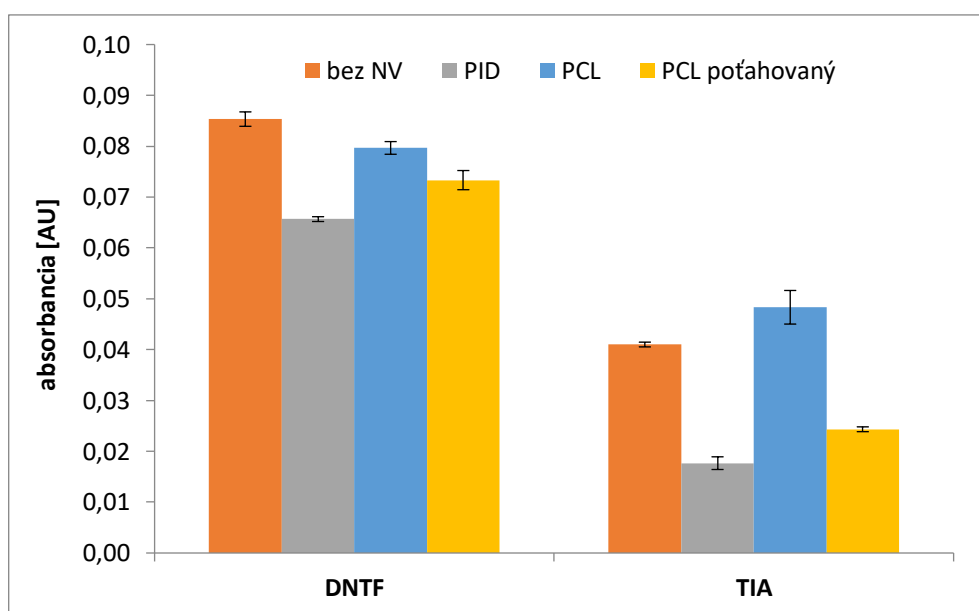


Obrázok 9: PCL nanovlákná po poťahovaní v batch protokole



Obrázok 10: PID nanovlákná po poťahovaní v online systéme

Prvým experimentom pri zisťovaní efektivity polydopamínového poťahovania bolo porovnanie meraní DNTF a TIA v koncentráciách 2,5 ppm bez nanovlákn, s použitím nepoťahovaných PID a PCL nanovlákn a PCL nanovláknami s polydopamínovým poťahom. Dôvodom voľby týchto dvoch konkrétnych analytov bola najnižšia lipofilita DNTF a najvyššia lipofilita TIA spomedzi analytov. Na grafe 5 je viditeľné, že u DNTF nastal len minimálny pokles absorpcie v dávkovacej fáze, z čoho bolo usúdené, že polydopamínový poťah u DNTF nevedol k zvýšeniu retencie analytu na nanovláknach. Naopak u TIA k poklesu píkovej dávkovacej fázy došlo a je predpoklad, že tento analyt sa na nanovláknach po poťahovaní polydopamínom zadržiava vo väčšej miere, než na PCL a PID nanovláknach bez polydopamínového poťahu.

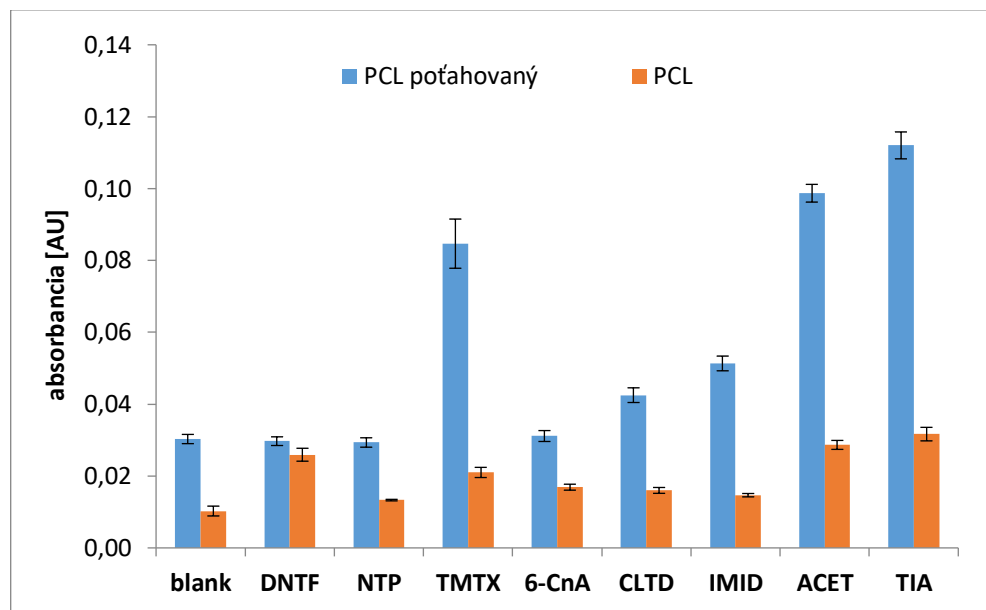


Graf 5: Porovnanie absorpcií dávkovacej fázy analytov v koncentrácii 2,5 ppm, za použitia 50% metanolu ako elučného činidla

Z grafu je ďalej vidieť, že obe látky sú silnejšie zadržované na PID nanovláknach. PID poťahované vlákna neboli pri tomto pokuse dostupné.

Ďalšie porovnanie bolo prevedené so všetkými analytmi a bolo v ňom sledované, či sa na PCL nanovláknach s polydopamínovým poťahom zachytia analyty vo väčšej miere než na PCL nanovláknach bez poťahu. Z výsledkov porovnania elučných fáz zobrazených v grafe 6 jasne vyplýva, že pri použití poťahovaných PCL nanovlákn boli retencie všetkých analytov vyššie. K zvýšeniu absorpcie však došlo aj u slepej vzorky, čo mohlo byť následkom vymývania polydopamínu z nanovlákn v priebehu analýz.

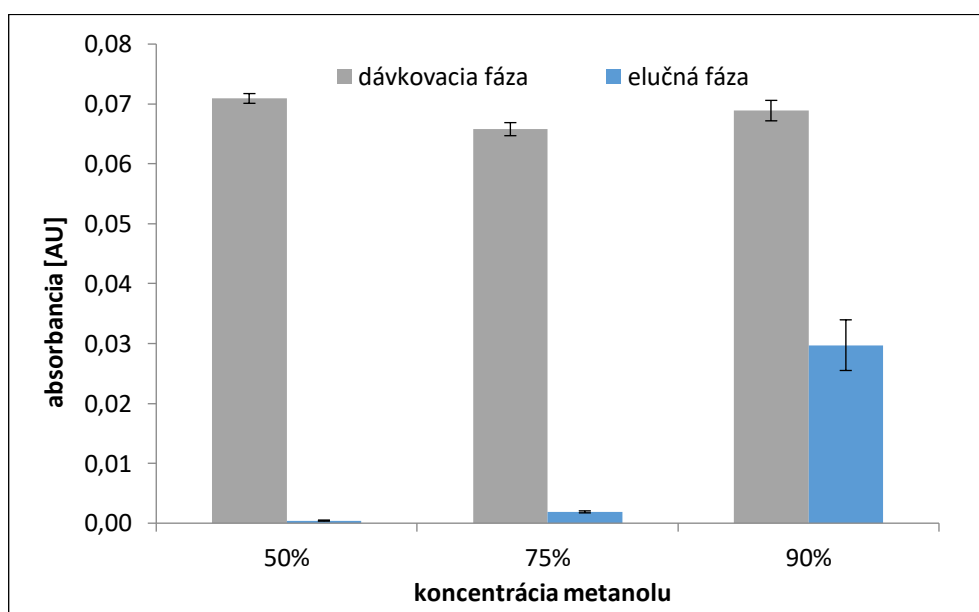
U lipofilnejších analytov (TMTX, CLTD, IMID, ACET, TIA) však došlo k výraznému zvýšeniu absorpcie v elučnej fáze a teda použitie polydopamínom poťahovaných PCL nanovláknien má pri ich analýze význam. Tým sa nepotvrdila hypotéza, že polydopamínový poťah zvýši retenciu viac polárnych analytov, resp. nie v kombinácii s použitými nanovláknami.



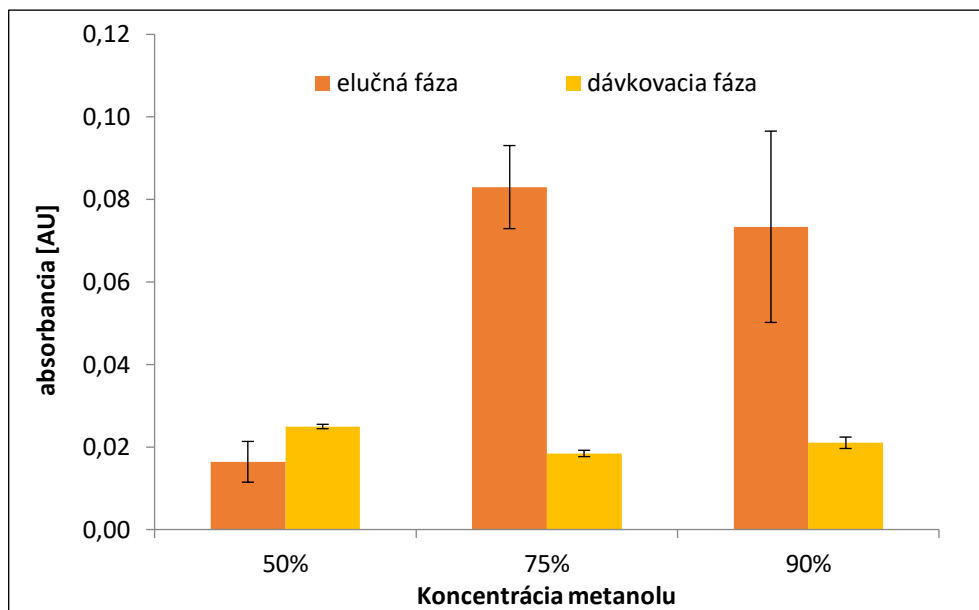
*Graf 6: Porovnanie absorbancií elučnej fázy pri meraní koncentrácie analytov 2,5 ppm za použitia 75% metanolu ako elučného činidla*

## 5.4 Optimalizácia typu a koncentrácie elučného činidla

Ako prvý bol zvolený 50% ACN, keďže by mal absorbovať v iných vlnových dĺžkach než analyty, no jeho píky absorpcie boli príliš vysoké a to až okolo 1,5 AU. Následne boli skúšané rôzne koncentrácie MeOH, s ktorým k tejto chybe nedošlo. Tieto merania boli prevedené s DNTF ako najmenej lipofilnou látkou a TIA ako najlipofilnejšou látkou zo skúmaných analytov v objeme 100  $\mu$ l. Objem elučného činidla bol takisto 100  $\mu$ l. Porovnanie výsledkov s rôznymi koncentraciami MeOH je zobrazené v grafoch 7 a 8. Z grafu 7 vyplýva, že DNTF takmer nebol zadržaný na nanovláknach. Z grafu 8 je zrejmé, že na elúciu TIA dostačuje 75% MeOH. Boli použité PID nanovlákná s polydopamínovým poťahom.

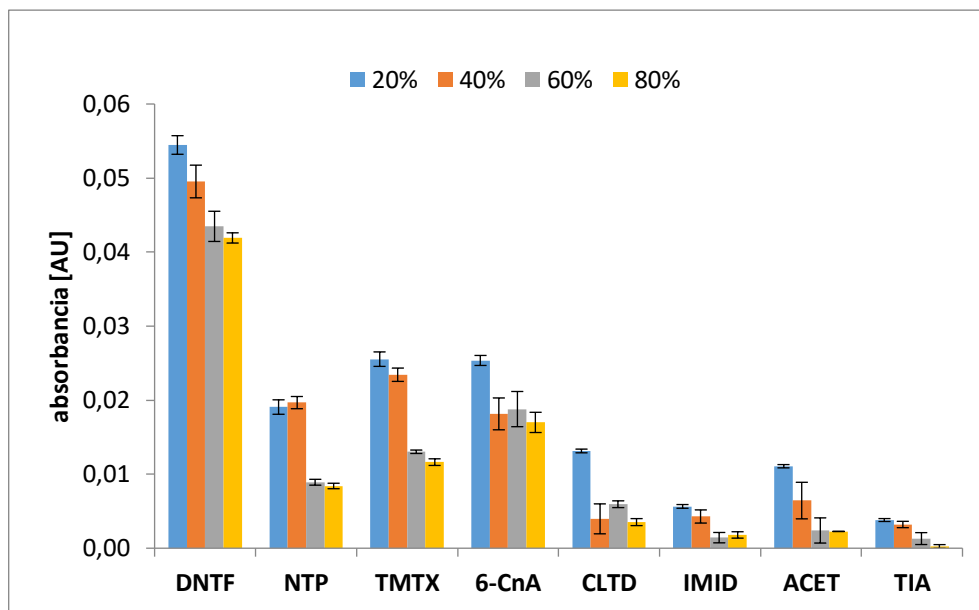


Graf 7: Dávkovácia a elučná fáza dinotefuranu s rôznymi koncentraciami metanolu

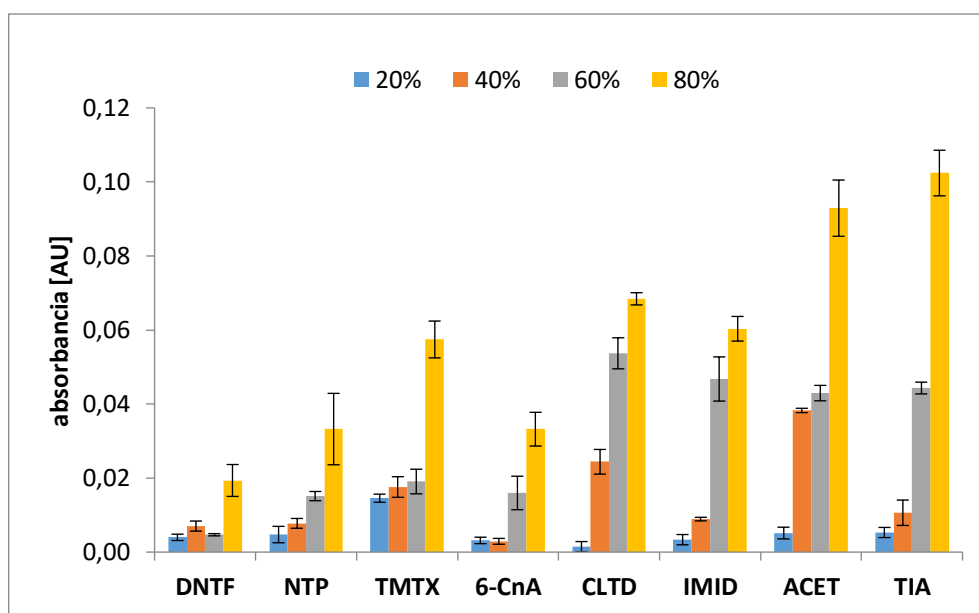


Graf 8: Dávkovacia a elučná fáza tiaklopidu s rôznymi koncentraciami metanolu

Pre zistenie optimálnej koncentrácie metanolu boli prevedené merania všetkých stanovovaných analytov za použitia rôznych koncentrácií metanolu ako elučného činidla. Pri meraní bola použitá koncentrácia analytov 2,5 ppm. Z grafu elučnej fázy jasne vyplýva, že so zvyšujúcou sa koncentráciou metanolu sa zvyšuje signál analytu v elučnej fáze. Pri nasledujúcich experimentoch bol používaný 75% MeOH ako kompromis elučnej účinnosti a odolnosti 3D tlačeného držiaka voči organickým rozpúšťadlám. Hodnoty merania slepej vzorky sú odčítané.



Graf 9: Porovnanie rôznych koncentrácií metanolu v dávkovacej fáze s použitím PID nanovláčien a koncentrácie analytov 2,5 ppm

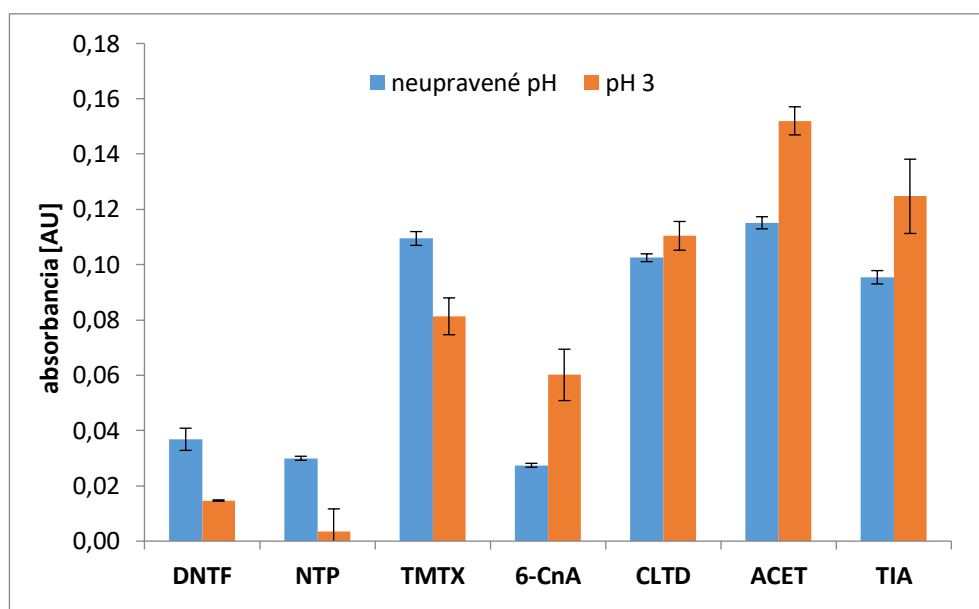


Graf 10: Porovnanie rôznych koncentrácií metanolu v elučnej fáze s použitím PID nanovláčien a koncentrácie analytov 2,5 ppm



## 5.5 Vplyv pH na retenciu analytov

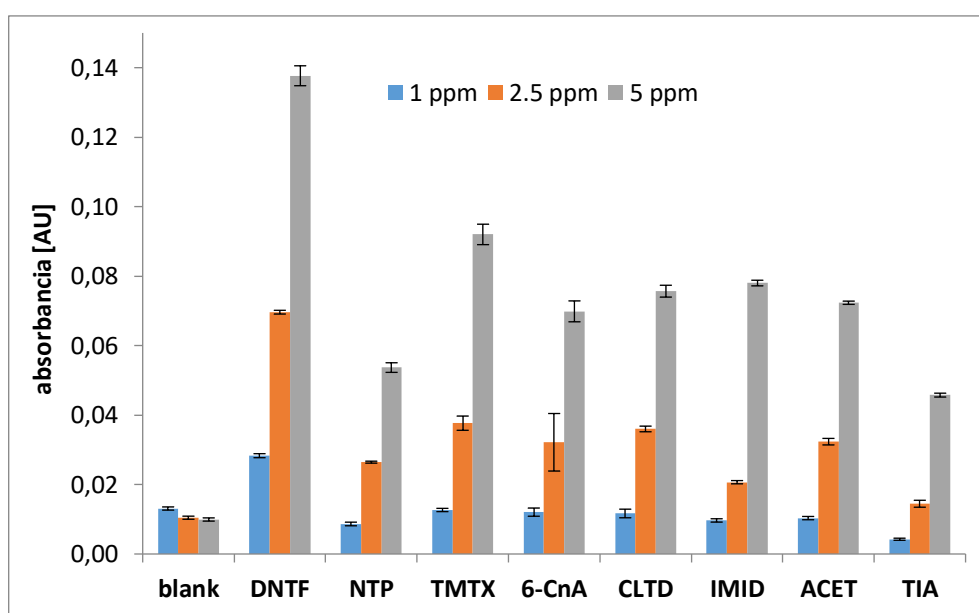
Pri tomto experimente bola použitá koncentrácia analytov 2,5 ppm a ako elučné činidlo bol použitý 75% metanol. Slepou vzorkou bola voda upravená kyselinou chlorovodíkovou na pH 3. pH bolo upravené tesne pred meraním, aby nedošlo k jeho zmenám v dôsledku vzdušného CO<sub>2</sub>. Meranie bolo prevedené s použitím PID nanovlákiem s polydopamínovým poťahom. Podľa očakávaní sa najviac zlepšila extrakcia 6-chloronikotínovej kyseliny. Hoci pre štyri stanovované analyty došlo k zlepšeniu, tak úprava na pH 3 nebola pri ďalších experimentoch použitá, keďže DNTF a NTP majú pri tomto pH veľmi nízku odozvu detektoru.



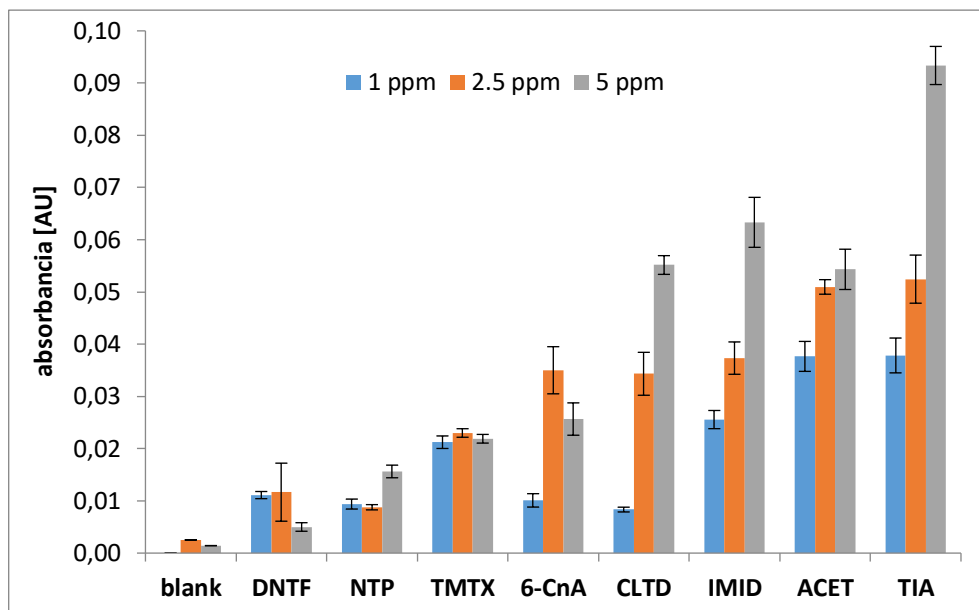
*Graf 11: Porovnanie elučnej fázy analytov bez úpravy pH a s úpravou na pH 3 za použitia 75% metanolu ako elučného činidla, objem vzorky 100 µl*

## 5.6 Kapacita nanovlákien

Meraním troch rôznych koncentrácií jednotlivých analytov bolo zisťované, aký vplyv má koncentrácia analytu na jeho retenciu na nanovláknach polyimidu. Na základe analýz z grafov 12 a 13 boli porovnané signály elučnej fázy každého analytu pri koncentráciách 1 ppm, 2,5 ppm a 5 ppm. V tabuľke 6 je percentuálne vyjadrený podiel elučnej fázy na súčte signálu v dávkovacej a elučnej fáze pri rastúcej dávkovanej koncentrácii. Cieľom bolo zistiť, či pri rastúcej koncentrácii analytov rastie aj podiel elučnej fázy. To sa však potvrdilo len u 6-CnA, CLTD a IMID, kde stúpol podiel elučnej fázy pri 2,5 ppm oproti 1 ppm, inak podiel elučnej fázy pri rastúcej koncentrácii klesal, čo svedčí o vymývaní analytov už počas dávkovacej fázy. Sorbent v používanom množstve teda nemá dostatočnú kapacitu pre vyššie koncentrácie. Ako slepá vzorka bola použitá čistená voda. Z tabuľky je ďalej zrejmé, že retencia väčšiny analytov pri zvolených podmienkach je pod 50%. Vyššie hodnoty (nad 60%) boli dosiahnuté iba pri troch analytoch s najmenšou polaritou, a to IMID, ACET a TIA.



Graf 12: Porovnanie dávkovacej fázy rôznych koncentrácií analytov s použitím PID nanovlákn a 75% metanolu ako elučného činidla



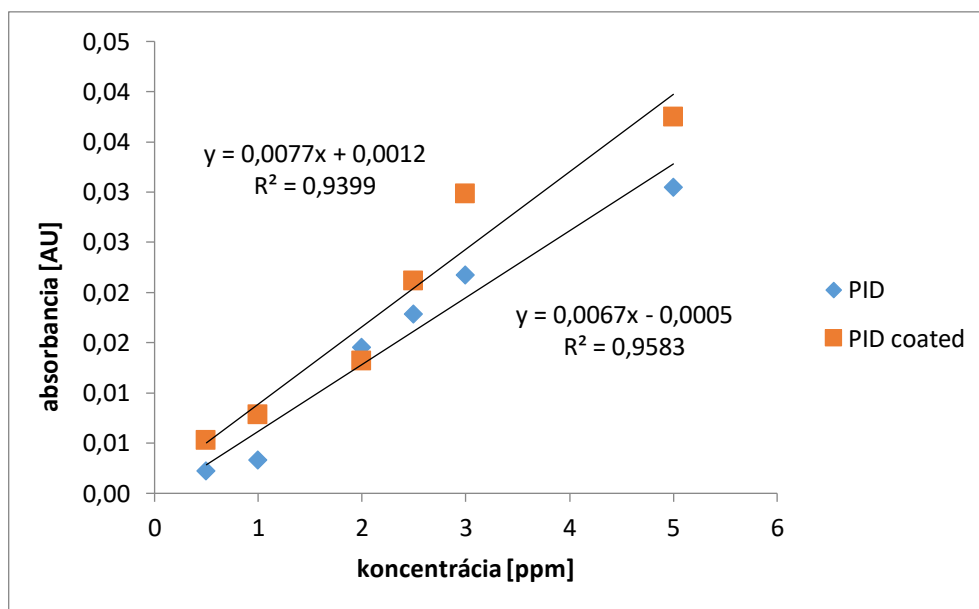
Graf 13: Porovnanie elučnej fázy rôznych koncentrácií analytov s použitím PID NV a 75% metanolu ako elučného činidla

Tabuľka 6: Signál elučnej fázy pri rôznych koncentráciách analytov

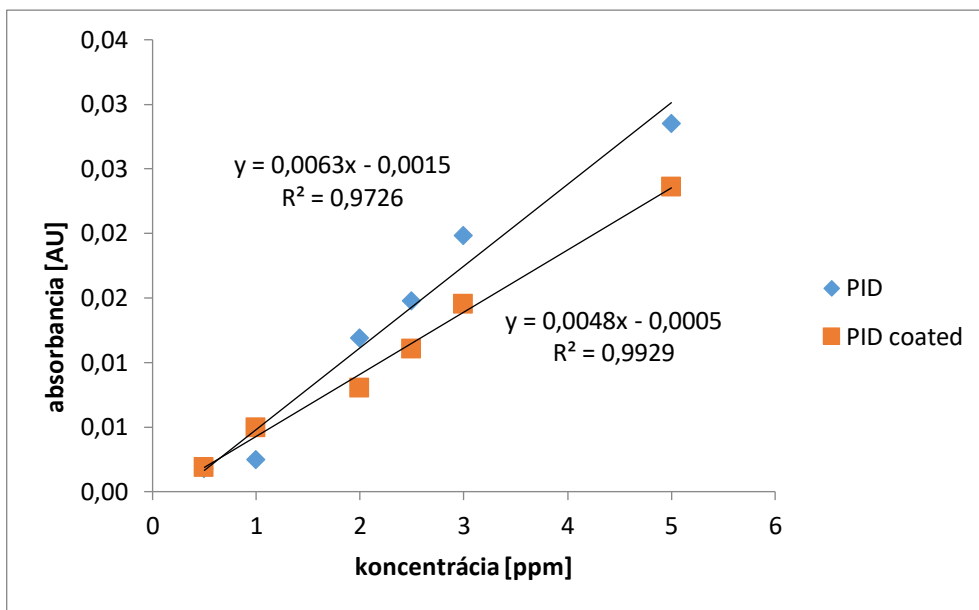
Analyt	1 ppm	2,5 ppm	5 ppm
DNTF	28,21%	14,63%	6,76%
NTP	47,37%	25,29%	23,84%
TMTX	64,91%	43,73%	27,56%
6-CnA	45,45%	52,24%	26,32%
CLTD	42,11%	47,83%	40,49%
IMID	61,54%	63,98%	44,80%
ACET	75,51%	61,77%	42,26%
TIA	89,79%	78,36%	66,57%

## 5.7 Kalibračné krivky elučnej fázy

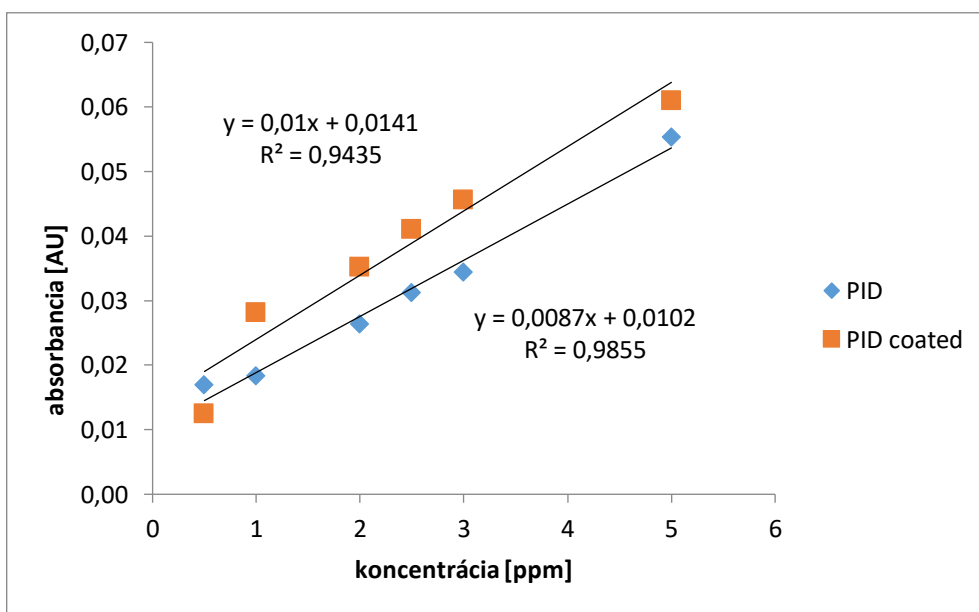
Na nižšie uvedeních grafoch sú zobrazené kalibračné závislosti jednotlivých analytov. Ide o porovnanie PID nanovlákien a PID<sub>coated</sub> nanovlákien s polydopamínovým poťahom. Vždy boli použité 4 vrstvy PID nanovlákien. Polydopamínové poťahovanie prebiehalo na trepačke 4 hodiny. Ako elučné činidlo bol použitý 75% metanol. Pri použití poťahovaných PID<sub>coated</sub> nanovlákien došlo k zlepšeniu retencie DNTF, TMTX, 6-CnA a CLTD, tj. smernica kalibračnej krivky bola vyššia ako pri použití nepoťahovaných nanovlákien. Zároveň však u niektorých analytov došlo k zvýšeniu hodnoty na ose y, čo svedčí o vyššej hodnote blanku. U ostatných analytov k zvýšeniu retencie nedošlo.



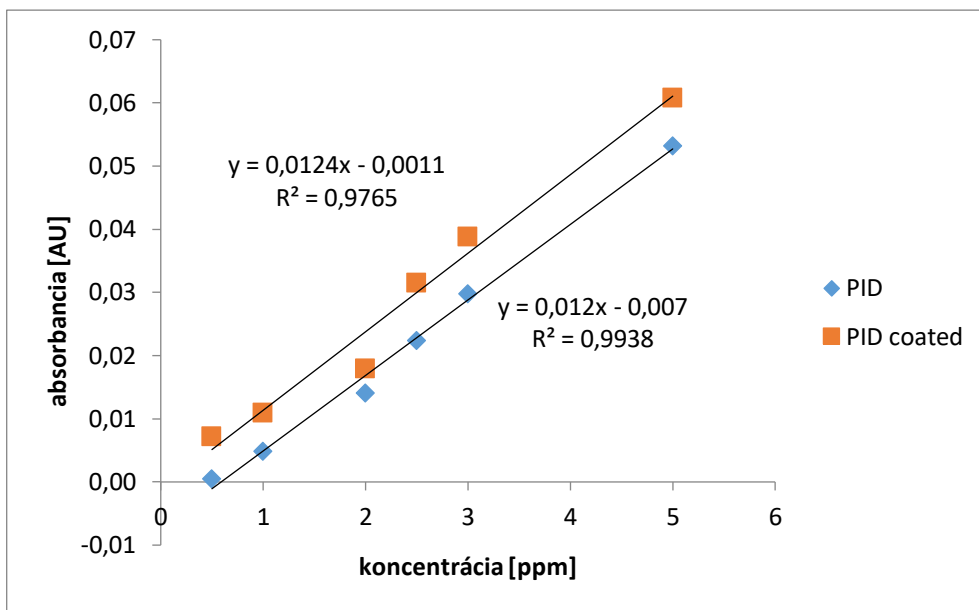
Graf 14: Kalibračná krivka dinotefuranu



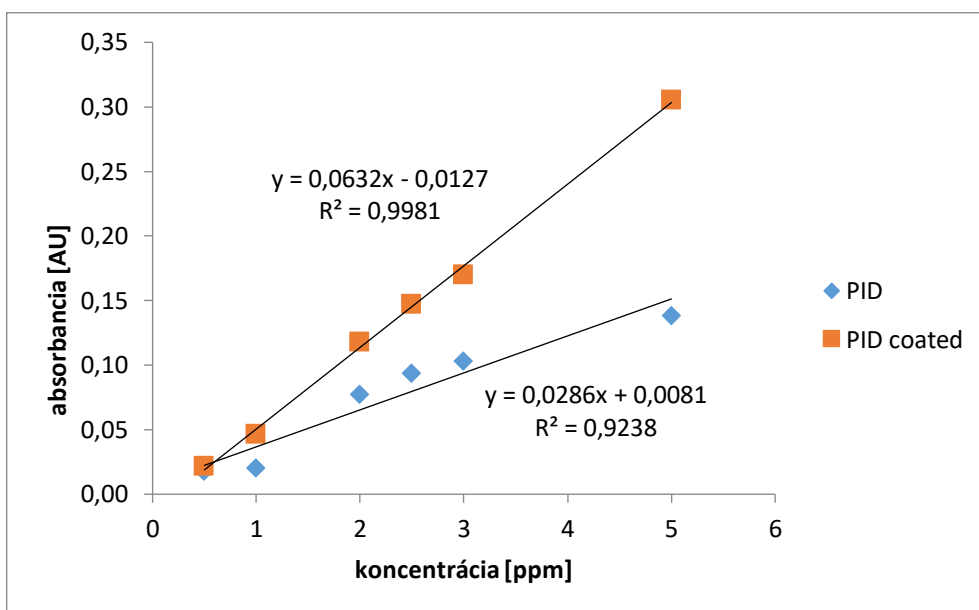
Graf 15: Kalibračná krivka nitenpyramu



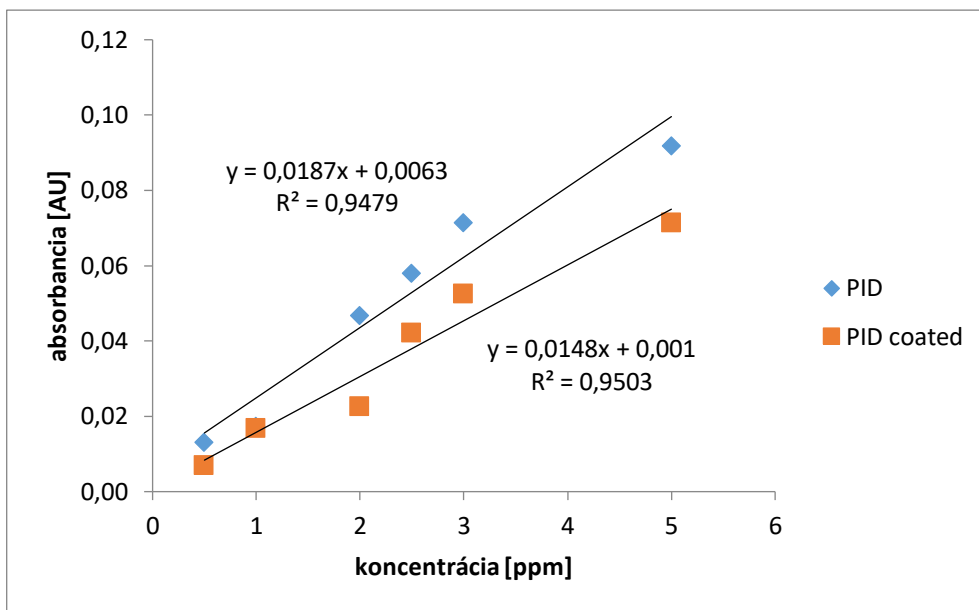
Graf 16: Kalibračná krivka tiametoxámu



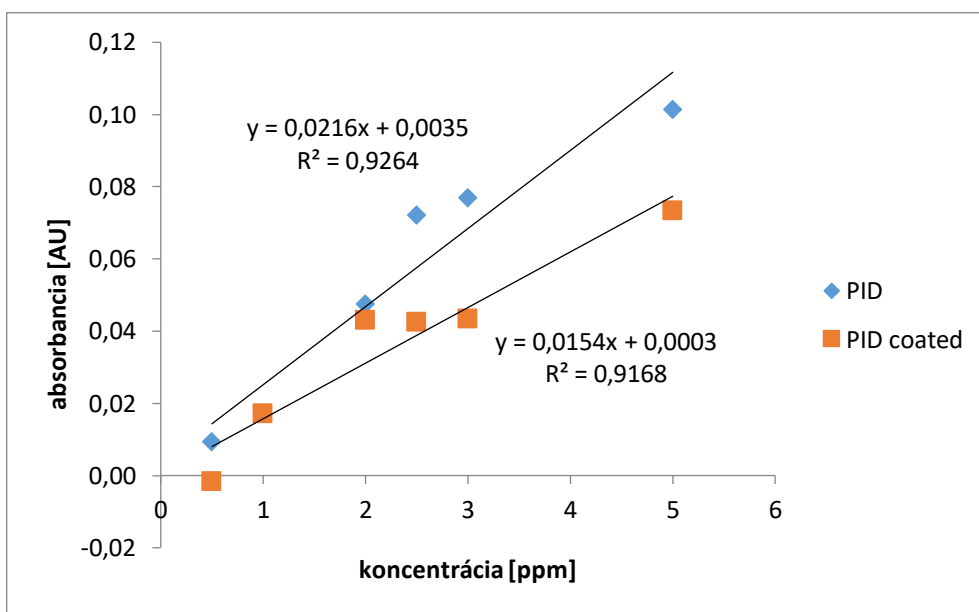
Graf 17: Kalibračná krivka 6-chloronikotínovej kyseliny



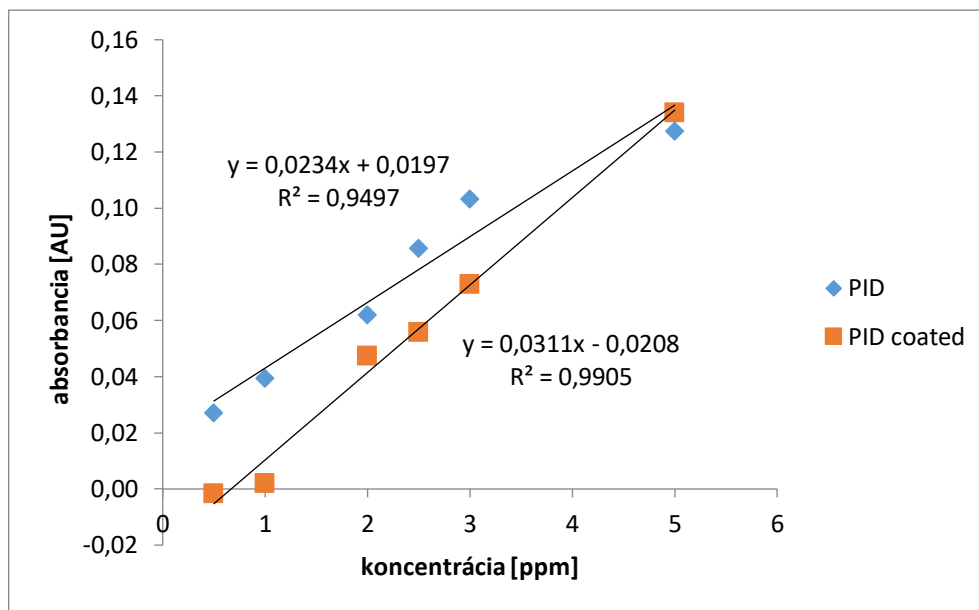
Graf 18: Kalibračná krivka klotianidinu



Graf 19: Kalibračná krivka imidaklopridu



Graf 20: Kalibračná krivka acetamipridu



Graf 21: Kalibračná krivka tiaklopidu

Z kalibračných kriviek boli vypočítané hodnoty LOD a LOQ pre polyimidové nanovlákná bez poťahu aj s polydopamínovým poťahom podľa vzorcov:

$$LOD = 3 * \frac{STD_{blank}}{a}$$

$$LOQ = 3 * LOD$$

$STD_{blank}$  - smerodajná odchýlka slepého pokusu,  $a$  - smernica kalibračnej priamky

Vypočítané hodnoty medze detekcie sú v rozmedzí 0,125 - 0,566 ppm pre PID nanovlákná a v rozmedzí 0,032 - 0,425 ppm pre PID<sub>coated</sub> nanovlákná. Medze stanoviteľnosti sú v rozmedzí 0,374 - 1,698 ppm pre PID nanovlákná a v rozmedzí 0,097 - 1,274 pre PID<sub>coated</sub> nanovlákná. Vypočítané hodnoty pre všetky analyzované látky sú uvedené v tabuľke 7.



Tabuľka 7: Medze detekcie a stanovitelnosti

Analyt	PID		PID <sub>coated</sub>	
	LOD [ppm]	LOQ [ppm]	LOD [ppm]	LOQ [ppm]
<b>DNTF</b>	0,532	1,597	0,265	0,794
<b>NTP</b>	0,566	1,698	0,425	1,274
<b>TMTX</b>	0,410	1,230	0,204	0,611
<b>6-CnA</b>	0,297	0,892	0,164	0,493
<b>CLTD</b>	0,125	0,374	0,032	0,097
<b>IMID</b>	0,191	0,572	0,138	0,413
<b>ACET</b>	0,165	0,495	0,132	0,397
<b>TIA</b>	0,174	0,522	0,066	0,197

Z grafov kalibračných kriviek je zrejmé, že lepšia linearita (vyššia hodnota koeficientu stanovenia) bola dosiahnutá pri použití PID nanovlákien pre viac polárne analyty (DNTF, TMTX, 6-CnA). Naopak, pre analyty s relatívne vyššou hodnotou logP (CLTD, IMID, TIA) bola linearita lepšia pri použití poťahovaných PID<sub>coated</sub> nanovlákien. Pre niektoré analyty, predovšetkým acetamiprid, bola linearita nevyhovujúca (hodnoty koeficientu stanovenia < 0,92).

Z porovnania hodnôt LOD vyplýva, že použitie polydopamínového poťahu na PID<sub>coated</sub> nanovláknach znižuje túto hodnotu približne 1,3-krát (NTP, IMID) až takmer 4-krát (CLTD), a teda sa zdá byť vhodnou úpravou nanovlákien pri extrakcii neonikotinoïdov, i keď efekt polydopamínového poťahu na retenciu najviac hydrofilných analytov je minimálny.

## 6. Zhrnutie

V rámci experimentálnej časti bolo testované použitie polyamidových, polykaprolaktámových a polyimidových nanovlákien ako potenciálnych sorbentov pre extrakciu tuhou fázou v systéme sekvenčnej injekčnej analýzy. Experiment sa zakladal na výsledkoch predošlých štúdií, ktoré poukázali na extrakčný potenciál týchto materiálov. Výsledky experimentu potvrdili, že nanovlákná môžu byť použité ako sorbenty pre extrakciu tuhou fázou, ale záleží tiež na ich fyzikálne-chemických vlastnostiach a takisto na vlastnostiach analyzovaných látok. Boli optimalizované rôzne parametre metódy, ako koncentrácia a dávkovacie objemy analytov, typ a koncentrácia elučného činidla či poťahovanie polydopamínom. Bol skúmaný aj vplyv zníženého pH na retenciu analytov. Najvyššiu retenciu vykazovali neonicotinoïdové analyty na PID<sub>coated</sub> vláknach. Takisto na obyčajných PID vláknach a pri použití kombinácie vlákien PCL/PID<sub>coated</sub> vykazovali všetky látky určitú retenciu, ale už v menšej miere oproti PID<sub>coated</sub>. U PA nanovlákien k retencii analytov nedošlo vôbec, avšak polydopamínový poťah u PA<sub>coated</sub> zlepšil retenciu lipofilnejších analytov CLTD, IMID, ACET a TIA, a to o 1,3- až 3,9-krát. Boli zaznamenané pomerne nízke retencie analytov na PCL nanovláknach a u varianty PCL<sub>coated</sub> došlo k zvýšeniu retencií u TMTX, CLTD, IMID, ACET a TIA. Keďže najvyššie retencie analyzovaných neonicotinoïdov boli zaznamenané na PID<sub>coated</sub>, bol tento typ nanovlákien tiež zvolený pre optimalizáciu ďalších parametrov extrakčnej metódy. S optimalizovanými parametrami boli zmerané kalibračné krivky analyzovaných neonicotinoïdov na PID a PID<sub>coated</sub> nanovláknach a vypočítané hodnoty LOD, ktoré dosahovali hodnoty 0,125 – 0,532 ppm pre PID a 0,032 – 0,265 pre PID<sub>coat</sub>. Zvolená metóda vykazovala dobrú opakovateľnosť; relatívna smerodajná odchýlka bola vo väčšine meraní < 5%, n = 3. Boli tak prevedené optimalizačné merania potrebné pri vývoji metódy na stanovenie neonicotinoïdov v reálnych vzorkách vody.

## 7. Záver

Bolo úspešne prevedené testovanie a štúdium použitia PID a PID<sub>coated</sub> nanovláknien ako SPE sorbentov pre analýzu neonikotinoïdových pesticídov v systéme sekvenčnej injekčnej analýzy s použitím 3D tlačeného držiaka. Použitie kombinácie PCL/PID<sub>coated</sub> nanovláknien sa nepreukázalo ako efektívnejšia alternatíva, keďže oproti PID<sub>coated</sub> nanovlákniam tu boli pozorované nižšie retencie analytov. Pomerne nízke retencie analytov boli zaznamenané na PCL nanovláknach a použitie PA nanovláknien sa vôbec nepreukázalo ako vhodné pre tieto analyty.

Polydopamínový poťah na PA a PCL nanovláknach zvýšil najmä retencie lipofilnejších analytov, ale na poťahovaných PID nanovláknach došlo k výraznému zlepšeniu retencií analyzovaných látok a táto úprava nanovláknien sa javí ako efektívna.

Po ďalšej optimalizácii budú vybrané nanovláknia použité na stanovenie neonikotinoïdov v prírodných vodách.

## 8. Použitá literatura

- [1] Paseková, H., Polášek, M., Solich, P. *Sekevenční injekční analýza*. Chemické Listy 93 (1999) 354–359.
- [2] Sklenářová, H. *Automatizace a průtokové analytické techniky* [online]. Moodle pro výuku 1. Dostupné z:  
[https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/281850/mod\\_resource/content/1/SIA%20%281%29.pdf](https://dl1.cuni.cz/pluginfile.php/281850/mod_resource/content/1/SIA%20%281%29.pdf) [cit 29-12-2019].
- [3] MEPS-SIA-teorie-k-uloze [online]. Dostupné z:  
<https://intranet.faf.cuni.cz/getmedia/33ccf67e-ea35-41d0-864d-58f6bab4f893/MEPS-SIA-teorie-k-uloze.aspx?disposition=attachment> [cit. 26-12-2019].
- [4] SIA-teorie k praktickým cvičením [online]. Dostupné z:  
<https://intranet.faf.cuni.cz/getmedia/9b9cc3f4-944d-4214-ac72-451fe6039d6e/SIA-teorie.aspx?disposition=attachment> [cit. 26-12-2019].
- [5] *Flow Injection Tutorial* [online]. Dostupné z:  
[http://www.flowinjectiontutorial.com/Methods 2.1.4. Configurations of SIA Systems.html](http://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%202.1.4.%20Configurations%20of%20SIA%20Systems.html). [cit. 29-12-2019].
- [6] *Flow Injection Tutorial* [online]. Dostupné z:  
[http://www.flowinjectiontutorial.com/Methods 2.1.2. Flow programming.html](http://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%202.1.2.%20Flow%20programming.html). [cit. 29-12-2019].
- [7] Nováková L., Douša M., a kol. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. 1. vydání. Praha, 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
- [8] Princíp SPE [online] Dostupné z:  
<http://gerstel.com/en/spe-step-by-step.htm> 01/2020 [cit 2020-01-28].
- [9] Riddellová, K. *Extrakce (SPE KOLONKY)* [online] 2012. Dostupné z:  
[https://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM%20Cz-6%20LSC\\_SPE\\_2012.pdf](https://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM%20Cz-6%20LSC_SPE_2012.pdf) [cit 2020-01-28].
- [10] Kovaříková, P., Stariat, J., *Trendy v úpravě vzorku* [online]. Moodle pro výuku 1, UK. Dostupné z:  
<https://dl1.cuni.cz/mod/resource/view.php?id=174057> [cit 2019-12-29].

- [11] Płotka-Wasyłka, J., Namieśnik, J. *Modern trends in solid phase extraction: new sorbent media*. Trends in Analytical Chemistry 77 (2016), 23–43
- [12] Hu, B., He, M., Chen, B. *Nanometer-sized materials for solid-phase extraction of trace elements*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 407 (2015) 2685-2710.
- [13] Petráš, D., Kimmer, D., Soukup, K., Klusoň, P. *Bezpečná nanovlákná*. Chemické listy 103 (2009) 1009–1016.
- [14] Ramakrishna, S., Fujihara, K., Teo, W., Lim, T., Ma, Z. *An introduction to electrospinning and nanofibers*. World Scientific, 2005. ISBN 978-981-256-415-3.
- [15] Elektrostatické zvlákňování, ÚSTAV PRO HYDRODYNAMIKU, Akademie věd České republiky v. v. i. [online]. Dostupné z: <https://www.ih.cas.cz/vyzkum/reologie/elektrostaticke-zvlaknovani/> [cit. 2020-02-05].
- [16] Elektrostatické zvlákňování [online]. Dostupné z: <https://www.nanopharma.cz/cs/produkty-a-technologie/technologie> [cit. 2020-02-05].
- [17] SalehHudin, H. S., Mohamad, E. N., Mahadi, W. N. L., Afifi, A. M. *Multiple-jet electrospinning methods for nanofiber processing: a review*. Materials and Manufacturing Processes 33 (2018) 479–498.
- [18] Nanovlákná, NAFIGATE Corporation [online]. Dostupné z: <http://nafigate.com/cs/nanotechnologie> [cit. 2020-04-10].
- [19] Haider, A., Haider, S., Kang, I. K. *A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology*. Arabian Journal of Chemistry 11 (2018) 1165–1188.
- [20] Šrámková, I. H., Carbonell-Rozas, L., Horskotte, B., Háková, M. *Screening of extraction properties of nanofibers in a sequential injection analysis system using a 3D printed device*. Talanta 197 (2019) 517–521.
- [21] Vajtai, R. *Springer Handbook of Nanomaterials*, Würzburg: Springer, 2013. [online] [cit. 2019-07-02].
- [22] Xu, Q., Yin, X., Wu, S., Wang, M., Wen, Z., Gu, Z. *Determination of phthalate esters in water samples using Nylon6 nanofibers mat-based solid-phase extraction coupled to liquid chromatography*. Microchimica Acta 168 (2010) 267–275.

- [23] Reyes-Gallardo, E. M., Lucena, R., Cárdenas, S. *Electrospun nanofibers as sorptive phases in microextraction*. Trends in Analytical Chemistry 84 (2016) 3–11.
- [24] Háková, M., Chocholoušová Havlíková, L., Solich, P., Švec, F., Šatínský, D. *Electrospun nanofiber polymers as extraction phases in analytical chemistry – The advances of the last decade*. TrAC Trends in Analytical Chemistry 110 (2019) 81–96.
- [25] Xu, Q., Zhang, N., Yin, X. a kol. *Development and validation of a nylon6 nanofibers mat-based SPE coupled with HPLC method for the determination of docetaxel in rabbit plasma and its application to the relative bioavailability study*. Journal of Chromatography B 878 (2010) 2403–2408.
- [26] Háková, M., Chocholoušová Havlíková, L., Solich, P., Šatínský, D. *An on-line coupling of nanofibrous extraction with column-switching high performance liquid chromatography – A case study on the determination of bisphenol A in environmental water samples*. Talanta 178 (2018) 141–146.
- [27] Háková, M., Chocholoušová Havlíková, L., Švec, F., Solich, P., Šatínský, D. *Novel nanofibrous sorbents for the extraction and determination of resveratrol in wine*. Talanta 206 (2020).
- [28] PA (Polyamid 6) Resinex [online]. Dostupné z: <http://www.resinex.cz/polymerove-typy/pa.html> [cit. 2020-02-05].
- [29] Sinha, V. R., Bansal, K., Kaushik, R., Kumria, R., Trehan, A. *Poly-ε-caprolactone microspheres and nanospheres: An overview*. In International Journal of Pharmaceutics 278 (2004) 1–23.
- [30] Liaw, D. J., Wang, K. L., Huang, S., Lee, K. R., Lai, J. Y., Ha, C. S. *Advanced polyimide materials: Syntheses, physical properties and applications*. Progress in Polymer Science 37 (2012) 907–974.
- [31] Pitter, P. *Hydrochemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2015. ISBN 978-80-7080-928-0.
- [32] Morrissey, C. A., Mineau, P., Devries, P. J., Sanchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M. C., Liber, K. *Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: A review*. Environment International 74 (2015) 291–303.
- [33] Bass, C., Field, L. M. *Quick guide Neonicotinoids*. Current Biology 28 (2018) 761–783.

- [34] Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M. *Overview of the status and global strategy for neonicotinoids*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59 (2011) 2897–2908.
- [35] Tanner, G., Czerwenka, C. *LC-MS/MS Analysis of neonicotinoid insecticides in honey: methodology and residue findings in Austrian honeys*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 59 (2011) 12271–12277.
- [36] Tomizawa, M., Casida, J. E. *NEONICOTINOID INSECTICIDE TOXICOLOGY: Mechanisms of Selective Action*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology 45 (2005) 247–268.
- [37] Hladik, M. L., Main, A., Goulson, D. *Environmental risks and challenges associated with neonicotinoid insecticides*. Environmental Science & Technology 52 (2018) 3329–3335.
- [38] Suchail, S., Guez, D., Belzunces, L. *Characteristics of imidacloprid toxicity in two Apis mellifera subspecies*. Environmental Toxicology and Chemistry 19 (2000) 1901–1905.
- [39] Castle, S. J., Byrne, F.J., Bi, J.L. & Toscano, N.C. *Spatial and temporal distribution of imidacloprid and thiamethoxam in citrus and impact on Homalodisca coagulata populations*. Pesticide Management Science 61 (2005) 75–84.
- [40] Iwasa, T., Motoyama, N., Ambrose, J.T. *Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, Apis mellifera*. Crop Protection 23 (2004) 371–378.
- [41] Kim, Y. A., Abd El-Aty, A. *Method development, matrix effect, and risk assessment of 49 multiclass pesticides in kiwifruit using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography B 1076 (2018) 130–138.
- [42] Han, Y., Song, L. *Multi-residue determination of 171 pesticides in cowpea using modified QuEChERS method with multi-walled carbon nanotubes as reversed-dispersive solid-phase extraction materials*. Journal of Chromatography B 1031 (2016) 99–108.
- [43] Zhang, Q., Wang, X. *Simultaneous determination of nine neonicotinoids in human urine using isotope-dilution ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. Environmental Pollution 240 (2018) 647–652.

- [44] Pérez-Mayán, L., Cobo-Golpe, M. *Evaluation of supercritical fluid chromatography accurate mass spectrometry for neonicotinoid compounds determination in wine samples*. Journal of Chromatography A (2020).
- [45] Song, S., Zhang, C. *Simultaneous determination of neonicotinoid insecticides and insect growth regulators residues in honey using LC–MS/MS with anion exchanger-disposable pipette extraction*. Journal of Chromatography A 1557 (2018) 51–61.
- [46] Jovanov, P., Guzsvány, V. *Development of HPLC-DAD method for determination of neonicotinoids in honey*. Journal of Food Composition and Analysis 40 (2015) 106–113.
- [47] David, A., Botías, C. *Sensitive determination of mixtures of neonicotinoid and fungicide residues in pollen and single bumblebees using a scaled down QuEChERS method for exposure assessment*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 407 (2015) 8151–8162.
- [48] Carbonell-Rozas, L., Lara, F. J. *Micellar electrokinetic chromatography as efficient alternative for the multiresidue determination of seven neonicotinoids and 6-chloronicotinic acid in environmental samples*. Analytical and Bioanalytical Chemistry (2019).
- [49] Arnnok, P., Patdhanagul, N. *Dispersive solid-phase extraction using polyaniline-modified zeolite NaY as a new sorbent for multiresidue analysis of pesticides in food and environmental samples*. Talanta 164 (2017) 651–661.
- [50] Vykonávacie nariadenie Komisie (EÚ) 2018/783 z 29. mája 2018
- [51] Vykonávacie nariadenie Komisie (EÚ) 2018/784 z 29. mája 2018
- [52] Vykonávacie nariadenie Komisie (EÚ) 2018/785 z 29. mája 2018
- [53] Nariadenie Európskeho parlamentu a Rady č. 1107/2009 z 21. októbra 2009
- [54] Vykonávacie nariadenie Komisie (EÚ) 2020/23 z 23. januára 2020
- [54] Háková, M., Chocholoušová Havlíková, L., Chvojka, J. *Polycaprolactone nanofibers functionalized with a dopamine coating for on-line solid phase extraction of bisphenols, betablockers, nonsteroidal drugs, and phenolic acids*. Microchim Acta 186 (2019).



## Zoznam obrázkov

Obrázok 1: Schéma systému SIA .....	12
Obrázok 2: Znázornenie princípu SIA .....	13
Obrázok 3: Princíp SPE.....	15
Obrázok 4: Schéma princípu elektrostatického zvlákňovania .....	20
Obrázok 5: Štruktúry analytov .....	27
Obrázok 6: Schéma usporiadania SIA .....	32
Obrázok 7: Držiak vyrobený 3D tlačou .....	37
Obrázok 8: Držiak vyrobený 3D tlačou .....	37
Obrázok 9: PCL nanovlákná po poťahovaní v batch protokole.....	43
Obrázok 10: PID nanovlákná po poťahovaní v online systéme .....	43

## Zoznam tabuliek

Tabuľka 1: Prehľad metód stanovenia neonicotinoïdov vyvinutých v rokoch 2015-2020 .....	29
Tabuľka 2: Nanovlákná používané v diplomovej práci .....	33
Tabuľka 3: Fyzikálne a chemické vlastnosti analytov .....	34
Tabuľka 4: Protokol metódy použitej v testovaní extrakčnej účinnosti nanovláknien ...	39
Tabuľka 5: Maximálne vlnové dĺžky analytov .....	40
Tabuľka 6: Signál elučnej fázy pri rôznych koncentráciách .....	51
Tabuľka 7: Medze detekcie a stanoviteľnosti .....	57

## Zoznam grafov

Graf 1: Porovnanie maxima absorpcie analytov v koncentrácii 1 ppm pri jednotlivých vlnových dĺžkach .....	40
Graf 2: Výška píkovej dávkovacej fázy jednotlivých analytov v koncentrácii 1 ppm za použitia 50% ACN ako elučného činidla .....	41
Graf 3: Plocha píkovej dávkovacej fázy jednotlivých analytov v koncentrácii 1 ppm za použitia 50% ACN ako elučného činidla .....	41

Graf 4: Porovnanie elučnej fázy všetkých použitých typov nanovlákien pri analýze vzoriek o koncentrácii 2,5 ppm pri elúcii 75% MeOH .....	42
Graf 5: Porovnanie absorbancií dávkovacej fázy analytov v koncentrácii 2,5 ppm za použitia 50% metanolu ako elučného činidla.....	44
Graf 6: Porovnanie absorbancií elučnej fázy pri meraní koncentrácie analytov 2,5 ppm za použitia 75% metanolu ako elučného činidla.....	45
Graf 7: Dávkovacia a elučná fáza dinotefuranu s rôznymi koncentráciami metanolu .	46
Graf 8: Dávkovacia a elučná fáza tiaklopridu s rôznymi koncentráciami metanolu .....	47
Graf 9: Porovnanie rôznych koncentrácií metanolu v dávkovacej fáze s použitím PID nanovlákien a koncentrácie analytov 2,5 ppm .....	48
Graf 10: Porovnanie rôznych koncentrácií metanolu v elučnej fáze s použitím PID nanovlákien a koncentrácie analytov 2,5 ppm .....	48
Graf 11: Porovnanie elučnej fázy analytov bez úpravy pH a s úpravou na pH 3 za použitia 75% metanolu ako elučného činidla .....	49
Graf 12: Porovnanie dávkovacej fázy rôznych koncentrácií analytov s použitím PID nanovláka a 75% metanolu ako elučného činidla.....	50
Graf 13: Porovnanie elučnej fázy rôznych koncentrácií analytov s použitím PID NV a 75% metanolu ako elučného činidla .....	51
Graf 14: Kalibračná krivka dinotefuranu .....	52
Graf 15: Kalibračná krivka nitenpyramu.....	53
Graf 16: Kalibračná krivka tiametoxámu .....	53
Graf 17: Kalibračná krivka 6-chloronikotínovej kyseliny .....	54
Graf 18: Kalibračná krivka klotianidinu .....	54
Graf 19: Kalibračná krivka imidaklopridu .....	55
Graf 20: Kalibračná krivka acetamipridu .....	55
Graf 21: Kalibračná krivka tiaklopridu.....	56