

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie



**NANOVLÁKNA JAKO MODERNÍ EXTRAČNÍ SORBENTY
PRO EXTRAKCI VZORKŮ
V CHROMATOGRAFICKÉ ANALÝZE**

Disertační práce

Školitel: prof. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Konzultant: doc. PharmDr. Lucie Chocholoušová Havlíková, Ph.D.

2021

Mgr. Hedvika Raabová

PODĚKOVÁNÍ

Na konci svého postgraduálního studia bych ráda poděkovala všem přátelům a kolegům z Katedry analytické chemie, kteří byli nejen zdrojem znalostí a zkušeností, ale také velké podpory. Speciální poděkování patří mému školiteli prof. RNDr. Daliborovi Šatínskému, Ph.D., který byl vždy ochotný pomoci a udělat maximum, abych si mohla splnit všechny své vědecké sny. Děkuji také své konzultantce doc. PharmDr. Lucii Chocholoušové Havlíkové, Ph.D. a to především za to, že mi dodala odvalu přihlásit se na postgraduální studium, kde jsem získala znalosti a zkušenosti nejen akademické, ale i životní.

Velký dík patří bezesporu i mé rodině, která mě podporovala a dělala potřebné zázemí, které jsem potřebovala k tomu, abych se mohla studiu plně věnovat.

Bez všech jmenovaných a řady nejmenovaných, kteří mi během uplynulých čtyř let vstoupili do života, bych nedošla tak daleko a ani by nevznikla tato práce. Tu beru nejen jako shrnutí mé vědecké činnosti, ale i životního období, na které budu vždy ráda vzpomínat.

V neposlední řadě děkuji Technické univerzitě v Liberci za poskytnuté materiály a finanční podpoře z fondů Specifického vysokoškolského výzkumu SVV 260 548, Grantové agentury Univerzity Karlovy (projekty 766 218 a 1 134 119), Grantové agentury ČR (projekty 17-08738S a 20-19297S), projektu STARSS (Reg. No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000465) a EFSA-CDN (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000841).

PROHLÁŠENÍ O DÍLE

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením svého školitele a konzultanta. 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 dne

Mgr. Hedvika Raabová

ABSTRAKT

Instituce: Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie

Kandidát: Mgr. Hedvika Raabová

Školitel: prof. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Konzultant: doc. PharmDr. Lucie Chocholoušová Havlíková, Ph.D.

Název disertační práce:

Nanovlákná jako moderní extrakční sorbenty pro extrakci vzorků v chromatografické analýze

Extrakční techniky představují jeden z nejčastějších přístupů k úpravě vzorků před analýzou. Velkou oblibu si získala především extrakce na tuhou fázi (SPE), během které lze poměrně snadno izolovat požadovaný analyt i z velmi komplexních matic. Rozmanitost komerčně dostupných sorbentů na trhu dělá tuto metodu ještě atraktivnější. S vývojem analytických metod a stále se rozšiřujícím spektru analyzovaných sloučenin roste však potřeba nových, inovativních sorbentů, disponujících patřičnou selektivitou a extrakční účinností. S těmito vlastnostmi jsou za posledních deset let stále častěji spojovány nanomateriály. Proto je jim v souvislosti s extrakcemi věnována rostoucí pozornost.

Předkládaná disertační práce se věnuje využití nanovláknenných polymerů jakožto inovativních sorbentů pro extrakci na tuhou fázi. Extrakční účinnost nanovláken byla nejprve ověřena off-line uspořádáním, kdy vzorky byly extrahovány pomocí SPE manifoldu a obsah analytů byl následně stanoven pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Většina experimentů však byla provedena v on-line zapojení extrakční kolonky přes šesticečný přepínací ventil se separační kolonou přímo v chromatografickém systému. Toto zapojení umožnilo časově a manuálně méně náročnější analýzu vzorků při zachování nebo zvýšení extrakční účinnosti. Splnilo tak požadavky pro moderní techniky úpravy vzorků před analýzou.

Kromě roztoků standardů byla testována extrakční účinnost nanovláknenných sorbentů i pro analyty v biologických vzorcích. Jako modelové matrice byly vybrány sérum a kravské mléko, na kterých byla potvrzena schopnost nanovláknenných polymerů odstraňovat interferující makromolekulární látky za současné retence analytů. Tato

skutečnost pak dělá z nanovláken slibné sorbenty i pro bioanalytické účely, což bylo ověřeno aplikací vyvinuté on-line extrakční metody nesteroidních antiflogistik na reálné vzorky séra.

Ve snaze rozšířit portfolio látek, pro které by nanovlákná byla vhodným sorbentem, byla připravena funkcionalizovaná nanovlákná, tedy nanovlákná, jejichž povrch je modifikován určitými funkčními skupinami. Pro vybrané analyty ze skupiny β -laktamových antibiotik byly zvoleny polymery nesoucí kvarterní aminoskupinu a sulfonylovou skupinu. Záměrem bylo vyzkoušet, zda by tato vlákna měla vlastnosti iontově výměnných sorbentů.

V práci jsou zahrnuta srovnání extrakčních účinností nanovláknenných polymerů produkovaných různými výrobními technologiemi a jejich vhodnosti pro on-line spojení s HPLC. V experimentech byla použita vlákna vyrobená pomocí elektrostatického zvlákňování z roztoku, extruzí polymeru do proudu horkého vzduchu a elektrostatického zvlákňování pomocí střídavého proudu. Dále je v práci diskutován vliv fyzikálně chemických vlastností analytů (konkrétně pKa a log P) na jejich retenci na různých typech nanovláknenných polymerů.

ABSTRACT

Institution: Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Analytical Chemistry

Candidate: Mgr. Hedvika Raabová

Supervisor: Prof. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Co-Supervisor: Assoc. Prof. PharmDr. Lucie Chocholoušová Havlíková, Ph.D.

Title of the dissertation thesis:

Nanofibers as modern extraction sorbents for sample extraction in chromatographic analysis

Extraction techniques represent one of the most common approaches to sample handling. The analytes of interest can be isolated easily even from complex matrices, especially by solid-phase extraction (SPE). Therefore, this technique became very popular and routinely used in laboratories. The variety of commercially available sorbents has made this method even more attractive. Nevertheless, the new sorbent materials are still looked for because of the broadening spectrum of analyzed substances and the increasing demands on selectivity and extraction efficiency. Nanomaterials have been increasingly associated with these properties over the last ten years. Therefore, they are receiving more and more attention related to extraction procedures.

The dissertation thesis is focused on the application of nanofibrous polymers as innovative sorbents for solid-phase extraction. First, the extraction efficiency of nanofibers was tested in an offline set-up. The samples were extracted using a vacuum SPE manifold, and after that, the isolated analytes were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). However, most of the experiments were performed in the online connection of an extraction cartridge with a separation column via six-port switching valve directly in the chromatographic instrument. This online coupling ensured the time- and cost-effective analysis while the extraction efficiency remained or was improved. Thus, the requirements for modern sample pretreatment methods were met.

Besides the standard analyte solutions, the extraction efficiency of nanofibrous sorbent was also tested for biological samples. The ability of nanofibers to remove interfering substances was tested with bovine milk and human serum matrices. Most of the

nanofibers were able to retain the low-molecular-weight analyte in the presence of proteins. This fact makes the nanofibrous sorbents very promising also for bioanalytical applications. The online extraction method for non-steroidal anti-inflammatory drugs was developed, validated, and applied on real samples of human serum to verify this statement.

To broaden the spectrum of analytes that are retained on the nanofibrous surface, the nanofibers were modified with specific functional groups. Since the selected analytes were β -lactam antibiotics, the quaternary ammonium group and sulphonyl group were bonded on the surface. These moieties should have to facilitate ion exchange between the sorbent and antibiotics to reach higher extraction efficiencies.

The comparison between nanofibers from different fabrication procedures is included in this thesis. The suitability of sorbents made by polymer meltblowing, needleless electrospinning, and alternating-current electrospinning for online coupling with a high-performance liquid chromatography system is evaluated. Furthermore, the influence of physicochemical properties of analytes on their retention during the extraction is discussed.

OBSAH

| | |
|---|----|
| PODĚKOVÁNÍ..... | 3 |
| PROHLÁŠENÍ O DÍLE | 5 |
| ABSTRAKT..... | 7 |
| ABSTRACT..... | 10 |
| OBSAH | 13 |
| SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK..... | 16 |
| SEZNAM OBRÁZKŮ..... | 19 |
| SEZNAM TABULEK..... | 21 |
| 1. ÚVOD..... | 22 |
| 2. CÍL PRÁCE | 24 |
| 3. TEORETICKÁ ČÁST | 27 |
| 3.1. Nanovlákná | 27 |
| 3.1.1. Úvod | 27 |
| 3.1.2. Charakteristické vlastnosti | 27 |
| 3.1.3. Výroba | 28 |
| 3.1.3.1. Elektrostatické zvlákňování využívající stejnosměrný proud | 28 |
| 3.1.3.2. Elektrostatické zvlákňování využívající střídavý proud..... | 31 |
| 3.1.3.3. Zvlákňování z taveniny polymeru | 33 |
| 3.1.4. Materiály | 34 |
| 3.1.4.1. Polymery a biopolymery | 34 |
| 3.1.4.2. Keramika a kovy | 34 |
| 3.1.4.3. Uhlík | 35 |
| 3.1.5. Využití..... | 36 |
| 3.1.5.1. Textilní průmysl..... | 36 |
| 3.1.5.2. Energetické hospodářství | 36 |
| 3.1.5.3. Chemie a životní prostředí..... | 37 |
| 3.1.5.4. Biomedicína | 37 |
| 3.1.6. Využití v analytické chemii | 38 |
| 3.1.6.1. Detekční systémy | 38 |
| 3.1.6.2. Senzory..... | 39 |
| 3.1.6.3. Chromatografické separace..... | 39 |
| 3.1.6.4. Úprava vzorku | 40 |

| | |
|---|----|
| 3.2. Extrakce na tuhou fázi..... | 42 |
| 3.2.1. Úvod | 42 |
| 3.2.2. Tradiční SPE | 43 |
| 3.2.3. Sorbenty | 44 |
| 3.2.3.1. Materiály na bázi silikagelu..... | 44 |
| 3.2.3.2. Polymerní sorbenty..... | 45 |
| 3.2.3.3. Materiály založené na uhlíku | 45 |
| 3.2.4. Uspořádání | 46 |
| 3.2.4.1. Extrakční kolonky | 46 |
| 3.2.4.2. Disky | 46 |
| 3.2.4.3. Mikrotitrační destičky | 47 |
| 3.2.5. Moderní trendy v SPE..... | 47 |
| 3.2.5.1. Imunosorbenty..... | 47 |
| 3.2.5.2. Molekulárně vtištěné polymery..... | 48 |
| 3.2.5.3. Materiály s omezeným přístupem | 48 |
| 3.2.5.4. MOFs | 49 |
| 3.2.5.5. Nanomateriály | 50 |
| 3.2.5.6. Miniaturizace | 51 |
| 3.2.5.7. Extrakční špičky..... | 52 |
| 3.2.5.8. Magnetická SPE..... | 53 |
| 3.2.5.9. On-line extrakce..... | 53 |
| 3.3. Vysokoučinná kapalinová chromatografie | 55 |
| 3.3.1. Úvod | 55 |
| 3.3.2. Moderní trendy v HPLC | 56 |
| 3.3.3. On-line spojení HPLC s SPE..... | 60 |
| 3.4. Nanovláknenné extrakční sorbenty ve spojení s chromatografickou analýzou | 63 |
| 4. KOMENTÁŘ K EXPERIMENTÁLNÍM PRACÍM | 68 |
| 4.1. Testing of nylon 6 nanofibers with different surface densities as sorbents for solid phase extraction and their selectivity comparison with commercial sorbent | 68 |
| 4.2. Poly- ϵ -caprolactone nanofibrous polymers: a simple alternative to restricted access media for extraction of small molecules from biological matrixes | 72 |
| 4.3. The role of pKa, log P of analytes, and protein matrix in solid-phase extraction using native and coated nanofibrous and microfibrinous polymers prepared via meltblowing and combined meltblowing/electrospinning technologies..... | 75 |

| | |
|--|-----|
| 4.4. Polycaprolactone composite micro/nanofibrous material as an alternative to restricted access media for direct extraction and separation of non-steroidal anti-inflammatory drugs from human serum using column-switching chromatography | 78 |
| 4.5. Native nanofibers prepared using alternating-current electrospinning and their counterparts modified with quaternary salts applied for on-line extraction of β -lactam antibiotics..... | 81 |
| 6. SHRNUTÍ..... | 84 |
| 7. REFERENCE..... | 87 |
| 8. DALŠÍ VÝSTUPY KANDIDÁTA | 96 |
| 8.1. Seznam publikovaných prací..... | 96 |
| 8.2. Prezentace výsledků..... | 98 |
| 8.3. Stáže a projekty..... | 99 |
| 9. PŘÍLOHY..... | 101 |

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|-------|---|
| μSPE | porous membrane-protected solid-phase microextraction, mikroextrakce na tuhou fázi chráněná porézní membránou |
| μTAS | mikro total analysis system |
| 2D-LC | two-dimensional liquid chromatography, dvoudimenzionální kapalinová chromatografie |
| ACE | alternating-current electrospinning, elektrostatické zvlákňování využívající střídavý proud |
| ACN | acetonitrile, acetonitril |
| BSA | bovine serum albumine, hovězí sérový albumin |
| CE | capillary electrophoresis, kapilární elektroforéza |
| CEC | capillary electrochromatography, kapilární elektrochromatografie |
| DCE | direct-current electrospinning, elektrostatické zvlákňování využívající stejnosměrný proud |
| DCF | diclofenac, diklofenak |
| DESI | desorption electrospray ionization, desorpční ionizace elektrosprejem |
| DSPME | dispersive solid-phase microextraction, disperzní mikroextrakce na tuhou fázi |
| ES | electrospinning, elektrostatické zvlákňování (obecně) |
| GC | gas chromatography, plynová chromatografie |
| HILIC | hydrophilic interaction chromatography, hydrofilní interakční chromatografie |
| HPLC | high-performance liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| IE | ion exchange, iontová výměna |
| IND | indomethacin, indometacin |

| | |
|-------|---|
| IS | immunosorbent, imunosorbent |
| KET | ketoprofen |
| LLE | liquid-liquid extraction, extrakce z kapaliny do kapaliny |
| LoC | lab-on-a-chip, laboratoř na čipu |
| MB | meltblown, zvlákňování z taveniny polymeru |
| MEPS | microextraction by packed sorbent, mikroextrakce pomocí tuhého baleného sorbentu |
| MIP | molecularly imprinted polymer, molekulárně vtištěný polymer |
| MOF | metal-organic framework |
| MSPE | magnetic solid-phase extraction, magnetická extrakce na tuhou fázi |
| MTMS | methyltrimethoxysilan |
| NAP | naproxen |
| NP | normal-phase system, systém normálních fází |
| PA | polyamide, polyamid |
| PAA | polyacrylic acid, kyselina polyakrylová |
| PAN | polyacrylonitrile, polyakrylonitril |
| PCL | poly- ϵ -caprolactone, poly- ϵ -kaprolakton |
| PI | polyimide, polyimid |
| PLA | polylactic acid, kyselina polyléččná |
| PLCL | poly (lactide-co- ϵ -polycaprolactone), kopolymer kyseliny mléčné a poly- ϵ -kaprolaktonu |
| PLGLA | poly (lactic-co-glycolic acid), kopolymer kyseliny mléčné a glykolové |
| PMMA | polymethylmethakrylate, polymethylmethakrylát |
| PVA | polyvinylalcohol, polyvinylalkohol |

| | |
|-------|--|
| PVDF | polyvinyliden difluoride, polyvinyliden difluorid |
| PVP | polyvinylpyrrolidone, polyvinylpyrolidon |
| PS | polystyrene, polystyren |
| PTFE | polytetrafluorethylene, polytetrafluorethylen |
| RAM | restricted-access material, materiál s omezeným přístupem |
| RP | reversed-phase system, systém reverzních fází |
| SALDI | surface-assisted laser desorption/ionization, laserová desorpce/ionizace za účasti substrátu |
| SB | N-octyl-N,N-dimethyl-3-ammonio-1-propane sulphonate, sulfobetain |
| SBSE | stir-bar sorptive extraction, extrakce pomocí magnetického míchadla |
| SFC | supercritical-fluid chromatography, superkritická fluidní chromatografie |
| SPDE | solid-phase dynamic extraction, dynamická extrakce na tuhou fázi |
| SPE | solid-phase extraction, extrakce na tuhou fázi |
| SPME | solid-phase microextraction, mikroextrakce na tuhou fázi |
| TLC | thin-layer chromatography, tenkovrstvá chromatografie |
| TMAC | tetramethylammonium chloride, tetramethylammonium-chlorid |
| TMOS | tetramethylsiloxane, tetramethylsiloxan |
| UHPLC | ultra high-performance liquid chromatography, ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie |
| UV | ultra-violet spectrum, ultrafialová oblast spektra |
| Vis | visible spectrum, viditelná oblast spektra |

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Srovnání průměru nanovláken vyrobených elektrostatickým zvlákňováním a lidského vlasu.

Zdroj: <https://nanomedic.com/research/> [Internet, 2.6.2021].

Obrázek 2 Schéma elektrostatického zvlákňování využívající zařízení a) s jehlou a b) bez jehly.

Obrázek 3 Schéma zařízení pro elektrostatické zvlákňování využívající střídavý proud.

Obrázek 4 Schéma zařízení pro zvlákňování z taveniny polymeru – meltblown.

Obrázek 5 Jednotlivé kroky v procesu extrakce na tuhou fázi.

Obrázek 6 Ilustrace různých velikostí komerčních SPE kolonek.

Zdroj: <https://in.vwr.com/store/product/8940350/solid-phase-extraction-cartridges-hyperseptm-c18> [Internet, 19.9.2021].

Obrázek 7 Příklad komerčních disků pro SPE.

Zdroj: <https://www.fishersci.se/shop/products/bakerbond-speedisk-sax-quaternary-amine-extraction-disk/15527694> [Internet, 19.9.2021].

Obrázek 8 Příklad komerční destičky s 96 jamkami pro SPE.

Zdroj: <https://preview.fishersci.fi/shop/products/hypersep-hypercarb-spe-96-well-plates/10009002?tab=alternates> [Internet, 19.9.2021].

Obrázek 9 Grafické znázornění mechanismu extrakce za využití materiálů s omezeným přístupem.

Obrázek 10 Průběh a) on-line extrakce a b) následné separace v HPLC systému s přepínacím ventilem pro přesměrování průtoku mobilních fází.

Obrázek 11 Off-line extrakce za využití ručně plněných kolonek nanovlákněným sorbentem.

Obrázek 12 Plnění kolonky pro on-line extrakce nanovlákněným sorbentem.

Obrázek 13 Vlákna vyrobená pomocí technologie a) meltblown, b) elektrostatického zvlákňování využívající střídavý proud, c) elektrostatického zvlákňování využívající stejnosměrný proud.

Obrázek 14 Manuálně plněné kolonky nanovlákněným sorbentem využité pro off-line extrakce.

Obrázek 15 Snímky nanovlákněného sorbentu PA6 pořízené elektronovým mikroskopem a) před extrakcemi na začátku experimentu, b) po extrakcích na konci experimentu.

Obrázek 16 Chromatogramy spikovaného séra a mléka ve srovnání se standardním roztokem parabenů pro jednotlivé extrakční kolonky. Pořadí píků: methylparaben, ethylparaben, propylparaben, butylparaben.

Obrázek 17 Chromatogram spikovaného séra po on-line extrakci modelových analytů ze skupiny nesteroidních antiflogistik.

Obrázek 18 Grafické znázornění extrakční účinnosti kompozitního mikro/nano PCL pro různé koncentrace stanovovaných nesteroidních antiflogistik v lidském séru.

Obrázek 19 Rozložení nábojů ve struktuře β -laktamových antibiotik při pH 2,4, 6 a 9 a jejich možné interakce s nanovlákněnými sorbenty obohacenými sulfobetainem a tetramethylammonium-chloridem.

Zdroj sloučenin: <https://chemicalize.com/app/calculation/> [Internet, 27.6.2021].

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Přehled extrakční účinnosti nanovlákněných kolonek a komerční kolonky Oasis HLB vyjádřené jako výtěžnost analytů v %.

Tabulka 2 Přehled vybraných analytů, jejich struktur a hodnot pKa a log P.

1. ÚVOD

Většina vzorků, které se dostanou do analytické laboratoře, nemohou být analyzovány přímo kvůli jejich nekompatibilitě s laboratorní instrumentací. Proto je nezbytné vzorky před jejich vlastní analýzou upravit. Tento krok má (a) zvýšit citlivost měření odstraněním interferujících látek a/nebo zakoncentrováním analytu; (b) umožnit analýzu prostřednictvím derivatizace stanovovaných analytů; (c) zabránit poškození analytického přístroje.

Pro úpravu vzorku se nejčastěji využívají extrakční techniky. Zejména se pak v průběhu posledních desetiletí dostává do popředí extrakce na tuhou fázi (solid-phase extraction, SPE). Základním principem SPE je izolace analytů z matrice vzorku jejich zachycením na tuhý sorbent, vyplňující extrakční kolonku nebo disk. Nejčastější materiály plnící funkci sorbentu jsou silikagel, polymery, a modifikace a kombinace těchto materiálů. V závislosti na chemii jejich povrchů probíhá extrakce analytů v systému normálních fází, reverzních fází, nebo pomocí výměny iontů.

Vysokoučinná/ultraúčinná kapalinová chromatografie (HPLC; UHPLC) je díky své všestrannosti a robustnosti považována v analytické chemii za zlatý standard. SPE tedy často předchází právě HPLC nebo UHPLC analýze a postupem času se ukázalo výhodné spojit extrakci a separaci on-line v rámci jednoho zařízení. Tato automatizace SPE prostřednictvím chromatografického systému umožňuje rychlou a spolehlivou analýzu různých vzorků. I velmi komplexní matrice jako jsou vzorky potravin nebo biologické vzorky s minimální nebo žádnou předchozí úpravou mohou být přímo po rozpuštění a filtraci dávkovány do SPE-LC systému.

Ačkoli je na trhu dostupná řada komerčních materiálů pro SPE, ne vždy jsou schopny uspokojit požadavky moderních analytických metod a výzkumných laboratoří. Proto se řada vědeckých skupin soustřeďuje na výzkum a vývoj materiálů nových, které by zajistily lepší selektivitu a extrakční účinnost pro širokou škálu látek. Imunosorbenty, magnetické částice, molekulárně vtištěné polymery (molecularly imprinted polymers, MIP) a materiály založené na uhlíku mají výrazný potenciál tyto požadavky splnit. Jak se postupem času ukazuje, platí to samé i pro nanomateriály. Nanočástice, nanovlákna a nanotrubičky jsou v extrakčních technikách využívány stále častěji, i když je jejich aplikace zatím omezena pouze na experimentální laboratoře.

Poprvé byla extrakční účinnost nanovláken zkoušena před 20 lety. Od té doby testování a studium nanovlákných sorbentů pokračuje ve snaze plně využít jejich výhody za současného překlenutí jejich slabých stránek. S vývojem sorbentů jde ruku v ruce i změna samotného extrakčního procesu. Od původního off-line módu se nanovlákná posouvají směrem k on-line spojení se separačními technikami. Tím se celý analytický proces stává jednodušší a časově méně náročný. Pro toto spojení jsou využívány příslušným sorbentem naplněné SPE kolonky, které musí splňovat jisté parametry. Jejich rozměry musí být dostatečné s ohledem na množství dávkovaného vzorku, aby nedocházelo k překročení sorpční kapacity sorbentu. Současně se zvětšujícími se rozměry musí být brán v potaz nárůst mrtvého objemu a zpětného tlaku systému. Jak je rozebráno v předkládané práci, právě zpětný tlak se zdá být limitujícím faktorem pro jinak nadějně vypadající použití nanovláken v on-line extrakcích.

2. CÍL PRÁCE

Tato disertační práce se zabývá aplikací nanovláknenných polymerů ve farmaceutické analýze. Konkrétně popisuje jejich využití jakožto extrakčních sorbentů pro izolaci analytů ze vzorků standardů a biologických matric. Cílem je definovat jejich možnosti a omezení pro úpravu vzorků probíhající buď off-line, anebo on-line ve spojení s HPLC-UV systémem. Většina popsaných experimentů představuje základní výzkum a byla provedena za použití modelových analytů. Ty byly pro tento účel vybrány z řad pomocných nebo léčivých látek.

V práci je popsáno testování různých nanovláknenných polymerů, v jehož průběhu byly stanoveny a optimalizovány základní parametry ovlivňující extrakční účinnost nanovláken. Získané výsledky byly použity pro zhodnocení jednotlivých nanovláken jakožto extrakčních sorbentů. Neméně důležité bylo srovnání polymerů připravených různým druhem výroby. Vzhledem k tomu, že výrobní proces výrazně ovlivňuje průměr vláken a tím jejich mechanickou stabilitu, pouze ta vlákna, dostatečně odolávající vysokému tlaku, mohou být použita v chromatografickém systému při on-line SPE.

Poté, co byla optimalizována extrakce analytů z roztoku standardů, mohla být nanovláknena testována i pro složitější matrice. Vzhledem k doposud získaným poznatkům vznikl předpoklad, že by se tyto sorbenty mohly uplatnit při extrakci analytů z matric bohatých na bílkoviny. Tato domněnka byla ověřena na vzorcích kravského mléka a lidského séra obohacených o modelové látky.

Testované polymery byly srovnány s komerčně dostupnými sorbenty a jejich výhody a nevýhody oproti nim jsou v práci diskutovány.

Hlavní cíle předkládané disertační práce mohou být shrnuty do následujících bodů:

- a) prokázání extrakční schopnosti nanovláknenných polymerů v off-line uspořádání,
- b) srovnání účinnosti extrakce různých nanovláknenných polymerů v on-line spojení s HPLC,
- c) testování schopnosti nanovláknenných sorbentů odstraňovat bílkoviny,
- d) vývoj metody pro SPE on-line spojený s HPLC-UV stanovením analytů ve vzorcích lidského séra,
- e) testování modifikovaných nanovláken pro extrakci na bázi iontoměničů,
- f) srovnání účinnosti extrakce nanovláknenného sorbentu získaného různými výrobními procesy,

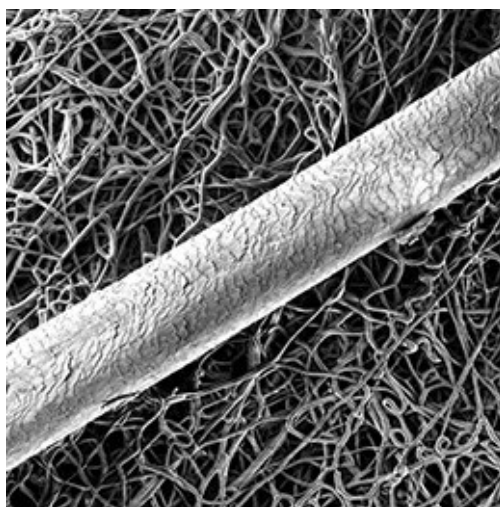
g) srovnání nanovláknenných polymerů s komerčními silikagelovými sorbenty.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1. Nanovláknna

3.1.1. Úvod

Nanovláknna jsou jedním z druhů nanomateriálů a jsou obvykle definovaná jako vlákna s průměrem menším než $1\ \mu\text{m}$ ¹. V literatuře lze však najít i přísnější definice, podle kterých jejich průměr nesmí přesáhnout $100\ \text{nm}$ ². Pro lepší představu mohou být nanovláknna přirovnána k lidskému vlasu s průměrem $20\text{--}50\ \mu\text{m}$ nebo, na druhou stranu velikostní škály, k deseti vodíkovým atomům seřazeným vedle sebe zaujímajících tloušťku $1\ \text{nm}$. Charakteristickým znakem nanovláken je jejich velký specifický povrch a variabilita. Díky množství využitelných výchozích materiálů a jejich snadným povrchovým úpravám je možné vyrobit nanovláknna rozdílných mechanických, fyzikálních a chemických vlastností. To je předurčuje pro využití v řadě aplikací od vodičů až po kosmetické přísady a hrají tak důležitou roli v řadě průmyslových a vědeckých odvětvích².



Obrázek 1 Srovnání průměru nanovláken vyrobených elektrostatickým zvlákňováním a lidského vlasu.
Zdroj: <https://nanomedic.com/research/> [Internet, 2.6.2021].

3.1.2. Charakteristické vlastnosti

Pro porozumění nanovláknům je třeba znát několik základních skutečností. Zprvé, nanorozměry propůjčují materiálům velmi unikátní vlastnosti, které jsou odlišné od materiálů běžných velikostí. Zmenšováním rozměrů dochází ke změnám fyzikálně-chemických vlastností, což se nejvíce projevuje ve velikosti povrchu a pevnosti.

Vysoký poměr plochy povrchu ke hmotnosti je nejznámější a nejvýznamnější charakteristikou nanovláken. Vlákna s průměrem 5 nm mohou dosahovat povrchu až $10\,000\text{ m}^2\text{ kg}^{-1}$. To se s výhodou využívá pro připojení funkčních skupin, adsorpci molekul a v katalytických procesech. Zároveň je velký povrch úzce spojený s využitím nanovláken pro biologické účely. Tkáňové inženýrství pěstuje a množí buňky pro nové tkáně na nanovláknenných vrstvách, a právě dostupný povrch výrazně rozhoduje o úspěšnosti experimentu.

Materiály ve vláknité podobě ve srovnání se sypkými materiály vykazují vyšší mechanickou odolnost. Mezi ní a průměrem vláken je nepřímá úměrnost. Jinými slovy, síla v tahu roste se snižujícím se průměrem vláken.

Znalost morfologie, molekulární struktury, mechanických a fyzikálních vlastností výchozích materiálů je nezbytná pro optimalizaci podmínek výrobního procesu, produkujícího vlákna vhodná pro zamýšlené užití². Pro využití v biomedicině se musí navíc zohlednit i biokompatibilita nanovláken³.

3.1.3. Výroba

Existuje řada technik, jak nanovlákna vyrobit. Depozice z chemických par, tažení, syntéza pomocí templátu, fázová separace, forcespinning, proces samosestavování, zvlákňování z taveniny a elektrostatické zvlákňování (electrospinning, ES) představují ty nejznámější z nich^{2,4}. Nicméně vývoj metod dalších a vylepšování těch stávajících je neustálý proces cílící zejména na vyšší produktivitu, zpracování nových materiálů a šetrnost k životnímu prostředí⁵.

Pro experimenty popsané v této disertační práci byla nanovlákna vyrobena prostřednictvím elektrostatického zvlákňování využívající stejnosměrný proud (direct-current electrospinning, DCE), elektrostatického zvlákňování využívající střídavý proud (alternating-current electrospinning, ACE) a zvlákňování z taveniny polymeru (meltblown, MB). Detailní popis těchto technik je v následujících kapitolách.

3.1.3.1. Elektrostatické zvlákňování využívající stejnosměrný proud

Tento způsob elektrostatického zvlákňování využívá pro výrobu nanovláken stejnosměrný elektrický proud (direct-current electrospinning, DCE). Bylo poprvé popsáno na konci 19. století a od roku 1990 představuje všestranný a oblíbený proces nanovláknenné výroby⁶. Lze pomocí něj zvláknit polymery, malé molekuly, koloidní částice a kompozity. Kromě této široké škály výchozích látek podporuje jeho oblibu

i jednoduchost celého procesu a nízké výrobní náklady. V současnosti se lze setkat s různými druhy DCE. V hledáčku vědců a výrobních společností je pak zejména elektrostatické zvlákňování s jehlou a novější elektrostatické zvlákňování bez jehly⁷.

Původní prototyp zařízení pro DCE se skládá ze zdroje vysokého napětí, pístové pumpy, zvlákňovací trysky (jehly) a kolektoru. Tvorba vláken může být shrnuta do několika kroků: (a) nabití kapky pomocí elektrického proudu, (b) tvorba Taylorova kužele, (c) odtažení proudu kapaliny, (d) jeho protahování do vláken v průběhu letu směrem ke kolektoru, (e) sběr nanovláknenné vrstvy na povrchu kolektoru^{4,6}.

Pro detailnější popis zvlákňovacího děje je však třeba začít ještě o krok dříve, kdy je tavenina nebo roztok tlačena pomocí pumpy skrz zvlákňovací trysku ve tvaru jehly. Na její špičku je vloženo napětí, které zvyšuje povrchový náboj přiváděné kapaliny. Tím nejprve dochází k vytvoření kapky, ze které se po překročení tzv. kritického napětí stává kužel. Ten je označován jako Taylorův a je známkou překročení povrchového napětí společně s viskoelastickými silami kapalně fáze. Ta je pomocí elektrického pole vymrštna z kuželovitého útvaru ve formě proudu a zároveň směřována na uzemněnou nebo opačně nabitou elektrodu – kolektor. V průběhu letu ke kolektoru je proud kapaliny protahován, ztenčován a podléhá postupnému tuhnutí, aby posléze dosáhl kolektoru ve formě vlákna^{6,8}.

Během výroby je třeba optimalizovat řadu parametrů. Mezi ty, které nejvíce ovlivňují průměr a tvorbu vláken patří napětí, rychlost vytlačování kapaliny skrz trysku a vzdálenost mezi ní a kolektorem⁹. U napětí většinou platí, že čím vyšší je, tím tenčí vlákna se formují. Pokud je však překročena jistá hraniční hodnota napětí, je z Taylorova kužele odtažováno větší množství tekutiny dávající vznik objemnějšímu proudu a po dopadu na kolektor i vláknům s větším průměrem. Tato hranice napětí je závislá na hustotě vstupního roztoku nebo taveniny. U roztoku elektrolytů hraje důležitou roli i polarita vloženého napětí. Dochází totiž k ovlivnění distribuce náboje molekul a tím i schopnosti kapaliny odtáhnout se z trysky⁶.

Změny v průtokové rychlosti kapaliny tryskou se nejvíce promítnou do průměru, a to podle pravidla: čím vyšší rychlost, tím tenčí vlákna. Stejně pravidlo platí i pro vzdálenost trysky od kolektoru. S rostoucí vzdáleností se snižuje průměr nanovláken, protože mají delší dráhu letu a mohou se tak více protáhnout. Při nastavování vhodné vzdálenosti se však musí vzít v úvahu i postupné tuhnutí vláken při letu. Optimální dráha

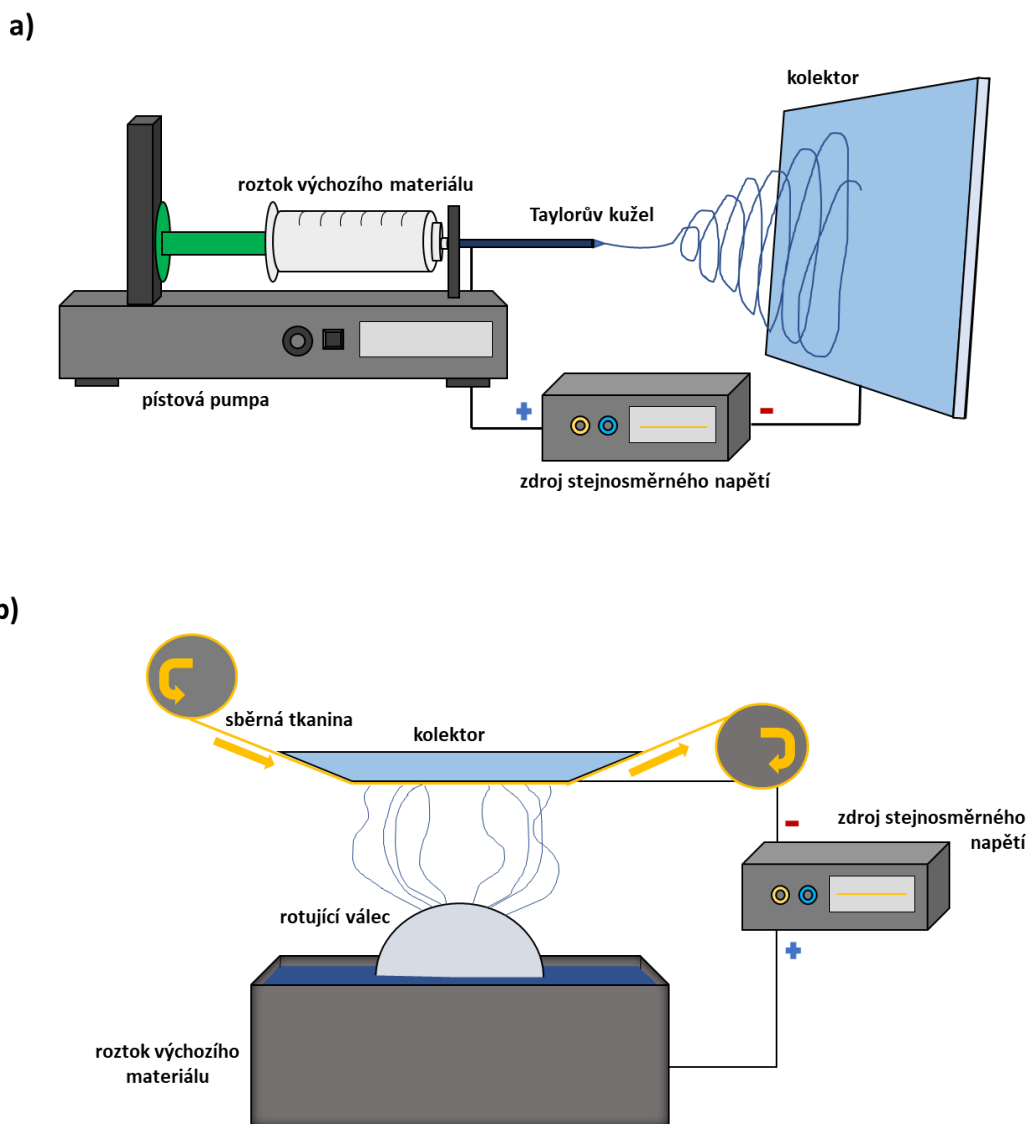
letu je tedy ta, při které se vlákna zvládnou dostatečně prodloužit před tím, než zcela ztuhnou ⁶.

Kromě výrobních parametrů je výsledný produkt ovlivněn i podmínkami okolního prostředí jako jsou teplota a relativní vlhkost, a fyzikálně-chemickými vlastnostmi výchozích materiálů. Pro dosažení požadované morfologie a vlastností vyrobeného nanovlákného materiálu musí tedy být všechny tyto aspekty zváženy a proces zvlákňování následně optimalizován jako celek ⁶.

I přes všechny výhody DCE, nízká výrobní rychlost konvenčního uspořádání limituje jeho použití pro průmyslovou výrobu ^{4,7}. Proto snahou mnoha výzkumných skupin bylo najít řešení, jak tuto nevýhodu překonat. Jednou z variant jsou vícetryskové systémy (multineedle electrospinning), kdy je plnicí roztok nebo tavenina přiváděna pumpou do několika otvorů nebo trysek současně. Po vložení napětí, je odtahován proud kapaliny z každé z nich, což vede k výraznému zvýšení produktivity ve srovnání se zařízeními, využívajícími pouze jednu trysku ¹⁰. Navíc pokud je do každé trysky nebo otvoru přiváděn odlišný materiál, mohou být tímto způsobem snadno vyráběny kompozitní materiály. Nicméně výroba nanovláken pomocí zařízení má zase svá úskalí. Jedním z nich je vznik koronového výboje mezi tryskami. Současně neřeší obecný problém tohoto uspořádání sice nebezpečí ucpání trysek ¹¹.

Logickým řešením tedy bylo vypustit jakoukoli podobu trysek, a tak vzniklo bezjehlové elektrostatické zvlákňování (needleless electrospinning). To se velmi brzy stalo nejpoužívanější výrobní technologií v oblasti komerčního využití nanovláken. Elektrické pole je aplikováno přímo na volnou hladinu roztoku. Prostřednictvím samoorganizace se vytváří mnoho proudů kapaliny odtahující se z hladiny a směřující ke kolektoru ve formě velmi jemných vláken ¹². Na základě tohoto principu byla v roce 2005 patentována technologie Nanospider® ¹³, které se podařilo až stonásobně zvýšit efektivitu produkce nanovláken ¹³. Využívá se při ní rotujícího válce pokrytého příslušným roztokem nebo taveninou jakožto povrchu, ze kterého jsou pak nanovlákná odtahována ¹⁴.

Existují i další druhy bezjehlového elektrostatického zvlákňování založené ať už na rotujících nebo statických površích, ze kterých jsou vlákna odtahována. Ve většině případů však mají ještě řadu nevýhod a limitací, které brání jejich komerčnímu využití. Slouží tak zpravidla pouze pro laboratorní účely ¹⁵.



Obrázek 2 Schéma elektrostatičkého zvlákňování využívající zařízení a) s jehlou a b) bez jehly.

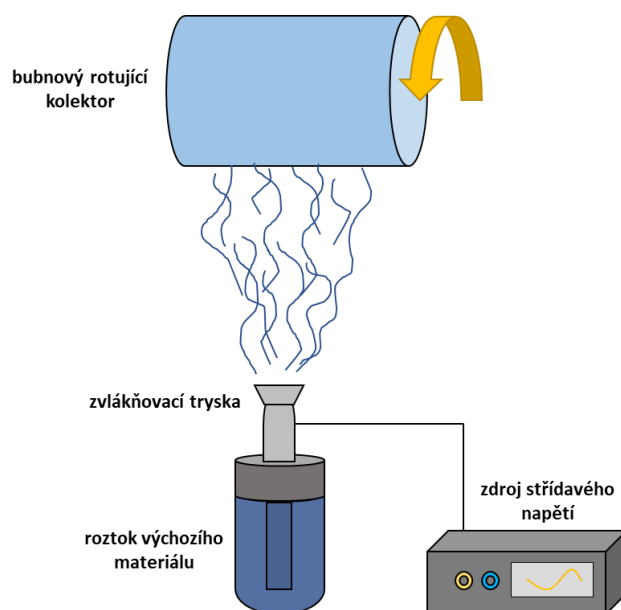
3.1.3.2. Elektrostatičké zvlákňování využívající střídavý proud

Elektrostatičké zvlákňování využívající pro tvorbu vláken střídavého proudu (alternating-current electrospinning, ACE) je další možností, jak zajistit výrobu s vyššími výstupy nanovláknenných materiálů. Jak již z názvu této technologie vyplývá, pro tvorbu a odtahování proudu kapaliny se využívá střídavého nikoli stejnosměrného napětí, jako tomu bylo v předchozím případě.

Zařízení pro ACE mohou mít různá uspořádání, vždy však jejich součástí bude elektroda, zdroj vysokého napětí a kolektor. Výrobní proces pak zahrnuje přivedení roztoku nebo taveniny na povrch kovové elektrody, ze které jsou pak díky napětí odtahována vlákna. Jejich kinetičká energie je unáší směrem ke kolektoru ve formě

nanovláknenného oblaku ¹⁶. Díky střídavému proudu jsou vlákna tvořena pozitivně a negativně nabitými segmenty. Jejich ukládání na kolektoru je tedy dílem samoorganizace a není k tomu třeba opačně nabitých elektrod ¹⁷. Kolektor má tedy ve většině případů podobu rotujícího bubnu ¹⁸. Vzniklá nanovláknenná příze je tvořena náhodně orientovanými vlákny se širokou distribucí průměrů ¹⁶.

ACE není zatím zcela prozkoumaná metoda a výrobní parametry ovlivňující morfologii a vlastnosti vláken jsou stále předmětem výzkumu ¹⁹. Z doposud získaných poznatků však lze vyvodit, že důležitou roli bude mít napětí, frekvence a vzdálenost elektrody od kolektoru. Zároveň, stejně jako v předchozím případě, se musí brát v potaz vlastnosti zpracovávaných materiálů a okolní podmínky ²⁰. He a kol. provedly detailní studii, kde se zabývali dopadem koncentrace roztoku, napětím, rychlostí sběru vláken a vzdáleností mezi elektrodou a kolektorem na jejich orientaci a průměry ²¹. Ze získaných výsledků vyplývá, že tloušťka vláken je nejvíce ovlivněna koncentrací roztoku. Díky vyšší viskozitě roztoku se se zvyšující se koncentrací zvyšuje i průměr nanovláken. Vliv ostatních zmiňovaných parametrů je minimální. Jinak je tomu u výroby orientovaných vláken. Pro dosažení orientované nanovláknenné příze je nejdůležitější její vysoká rychlost sběru. Významně přispívají i vzdálenost kolektor-elektroda a vložené napětí. S rostoucí vzdáleností elektrody od kolektoru se orientační faktor vláken zvyšuje, v jistém bodu dosáhne maxima a s dalším zvyšováním vzdálenosti začíná opět klesat. Rostoucí napětí u ACE snižuje orientaci vláken, což je opak toho, co bylo popsáno pro DCE ²².



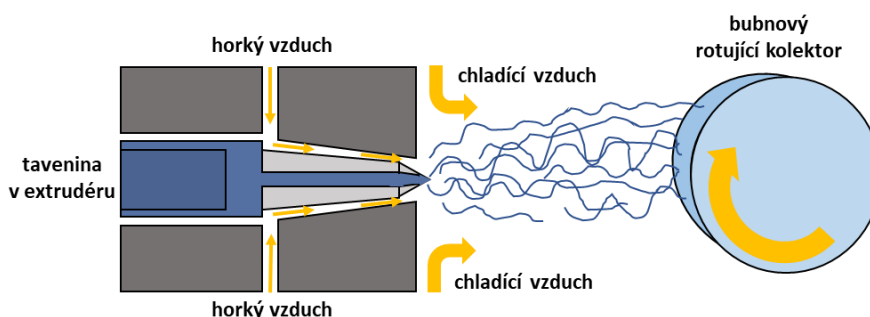
Obrázek 3 Schéma zařízení pro elektrostatische zvlákňování využívající střídavý proud.

3.1.3.3. Zvlákňování z taveniny polymeru

Zvlákňování z taveniny polymeru pomocí proudu vzduchu (meltblown, MB) se řadí mezi tzv. tkací metody za účasti plynu (gas-assisted spinning techniques). Není při ní využíváno napětí, a proto je vhodná pro materiály s nízkou dielektrickou konstantou a/nebo elektrickou vodivostí. Zároveň se jedná o vysoce efektivní výrobní metodu, která našla své uplatnění i v komerční výrobě nanovláken ⁵.

Princip spočívá v protlačování roztavených polymerů skrz speciální cívku s otvory. Vznikají tak tenké pramínky taveniny, které jsou vystaveny proudu horkého vzduchu. Pomocí něj jsou nesené ke kolektoru. Při překonávání této vzdálenosti se stružky taveniny postupně ochlazují a protahují. Na kolektoru se pak sbírají do velmi nadýchané, vatě podobné struktury ².

Rychlost průchodu taveniny přes cívku, tavicí teplota, teplota cívky, typ cívky, teplota a tlak vzduchu, rychlost proudění a vzdálenost mezi cívkou a kolektorem jsou nejdůležitější parametry, které se promítanou od tloušťky vláken ²³. Původní MB technologie produkovala vlákna s průměrem v rozmezí 2 až 5 μm a dlouho se nedařilo dosáhnout nanometrových rozměrů. Ačkoli tedy byla mnohem produktivnější než ES, nenacházela mimo laboratoře žádné uplatnění. Postupným vývojem se podařilo MB zdokonalit natolik, že vlákna pokořila submikrometrovou hranici, stále jejich průměry však patří k nejvyšším ^{24, 25}. To sebou nese dva důležité aspekty. Jednak je jejich plocha povrchu o něco menší, než je u vláken vyrobených ES. Na druhou stranu, jak bude dále popsáno v této práci, mají tato vlákna vyšší mechanickou odolnost, což je velkou výhodou pro jejich použití v HPLC.



Obrázek 4 Schéma zařízení pro zvlákňování z taveniny polymeru – meltblown.

3.1.4. Materiály

Polymery, uhlík, kovy a jejich oxidy patří mezi nejčastější výchozí materiály pro výrobu nanovláken. Tím však jejich výčet zdaleka nekončí. Všechny výše uvedené lze dále modifikovat během nebo po výrobním procesu přidáním různých organických a anorganických sloučenin, jejich spojováním v různém poměru za vzniku kompozitů, nebo připojením protilátek či enzymů k jejich povrchu. Prostřednictvím těchto úprav získávají materiály požadované vlastnosti, jenž je činí vhodnými pro zamýšlené užití.

3.1.4.1. Polymery a biopolymery

Zpravidla je dáána přednost syntetickým polymerům před biopolymery, z důvodu snadné dostupnosti široké škály využitelných materiálů. Zároveň, díky jejich přesně definovaným fyzikálním a chemickým vlastnostem, vykazují předvídatelné chování během výroby. Tím u prekurzorů jako je např. polyamid 6 (PA 6), polyviniliden difluorid (PVDF), polyethylen (PE), anebo polypropylen (PP) lze snáze odvodit parametry vznikajících nanovláken ²⁶.

Naproti tomu biopolymery, zahrnující polysacharidy (např. celulóza, chitin, chitosan, dextróza), deoxyribonukleové kyseliny a proteiny (např. kolagen, želatina, hedvábí), jsou pro zvlákňování velkou výzvou. Jednotlivé šarže prekurzorů se od sebe liší molekulovou hmotností, stupněm deacetylace, čistotou, krystalinitou a distribucí nabitých skupin, což se projeví sníženou uniformitou vzniklých vláken. I přesto, zejména díky své biokompatibilitě, biodegradabilitě, obnovitelnosti a ekologické udržitelnosti, jsou v řadě odvětví nezastupitelnými ²⁷.

3.1.4.2. Keramika a kovy

Keramická nanovlákná jsou velmi tvrdým a inertním materiálem s výhodnými mechanickými a tepelnými vlastnostmi. Ve vědecké literatuře byla popsána řada způsobů jejich výroby, z nichž se metodou volby stalo sol-gel elektrostatické zvlákňování. Při něm jsou nejprve kovové soli a alkoxidy převedeny do roztoku. Pak jsou pro zlepšení reologických vlastností přidány polymery typu polyvinylalkoholu (PVA), polyvinylpyrrolidonu (PVP), polyakrylonitrilu (PAN), polymethylmethakrylátu (PMMA) nebo kyseliny polyakrylové (PAA). Ty také dělají proces následného elektrostatického zvlákňování více kontrolovatelný a předvídatelný. Poté, co jsou vyrobená vlákna shromážděna na kolektoru, podstoupí proces kalcinace při vysoké teplotě. Při kalcinaci

dochází k odstranění přidaného polymeru a anorganická část vláken se mění na keramiku. Volbou parametrů při elektrostatickém zvlákňování spolu s délkou a/nebo teplotou kalcinace je ovlivňována morfologie a průměr vláken²⁸. Výsledkem sol-gel elektrostatického zvlákňování jsou porézní nanovláknenné materiály s velkým povrchem, vhodné pro využití v katalýze, environmentální analýze a energetice²⁹.

Kovová nanovláknna jsou vyráběna především z mědi, kobaltu, železa, nebo niklu, a na popularitě získala především díky svým magnetickým a elektrickým vlastnostem. Jako taková našla uplatnění v řadě elektronických, optických a mechanických zařízení, v katalýze, nebo supravodičích. Stejně jako keramická vlákna, je kovová příze vyráběna nejčastěji pomocí sol-gel elektrostatického zvlákňování³⁰.

3.1.4.3. Uhlík

Další typ nanovláken, který se setkává s rostoucím zájmem, je vyráběn z uhlíku. Za tímto účelem se využívá buď tepelné depozice chemických par (thermal chemical vapor deposition growth) nebo elektrostatické zvlákňování následované tepelným ošetřením vláken. První zmíněná metoda využívá železo, kobalt, nikl, chrom nebo vanad ke katalytické přeměně uhlíku na karbid kovu. Zároveň se využívá molybden v kombinaci s methanem, ethanem nebo ethynem, jako zdrojů uhlíku. Při teplotě několika set stupňů Celsia se uhlovodíky rozpouští v kovových částech karbidu a precipitují na jeho povrchu. Tak se vrstvu po vrstvě tvoří nanovláknenné struktury³¹.

Výroba pomocí elektrostatického zvlákňování vychází z polymerů s uhlíkatým řetězcem, velmi často jde o PAN, PVA, PVDF či polyimid (PI). Prostřednictvím procesu karbonizace je pak zvlákněný materiál převeden na uhlíková nanovláknna³².

Stejně jako pro ostatní materiály, tak i pro tato vlákna platí, že parametry výrobního procesu ovlivňují jejich morfologii, chemické a fyzikální vlastnosti³¹. Navíc uhlíková nanovláknna jsou více než kterákoli jiná předmětem povrchových modifikací a funkcionalizací. Díky jejich pevnosti, nízké hustotě, vodivosti a chemické stabilitě jsou také často přidávána jako příměs k jiným materiálům za vzniku kompozitů. Tato variabilita z nich pak dělá slibný materiál pro aplikace jak v průmyslu³³, tak v biomedicině³⁴. Nejčastěji se však s nimi setkáme v podobě elektrochemických senzorů a baterií³⁵.

Atomy uhlíku mohou být uspořádány různým způsobem a vytvářet tak jeho další formy, např. grafen, diamant, fullereny aj. Právě grafen, tedy planární jednovrstvené uspořádání sp^2 hybridizovaných atomů uhlíku, našel také uplatnění při výrobě

nanovláken³⁶. Jedná se však pouze o aditivum, které se přidává do roztoku prekurzoru před vlastní výrobou, za účelem modifikace vlastností nanovláken³⁷.

3.1.5. Využití

Díky pestré nabídce zvláknitelných materiálů a jedinečnosti jejich vlastností mají nanovláknata široké uplatnění.

3.1.5.1. Textilní průmysl

V současné době lidé věnují stále větší pozornost kvalitě svého života, a proto i oblečení, jakožto každodenní nezbytnost, nabývá na významu. Cílem dnešního textilního průmyslu je tedy vyrobit tkaniny zajišťující vysoký komfort v průběhu celého dne, za každého počasí a při různých aktivitách. Nanovláknenné materiály jsou slibným prostředkem, jak tohoto cíle dosáhnout. Polymery, jako PAN, PVA, PVDF nebo polytetrafluorethylen (PTFE), účinně propouštějí vlhkost a vzduch z oblečení a současně brání jejich přístupu z vnějšího prostředí³⁸. Mezi další výhody těchto materiálů patří pevnost, lehkost, flexibilita a poměrně nízké výrobní náklady². Pro speciální oblasti využití mohou být nanovláknenným textiliím propůjčeny i další vlastnosti jako je chemická, tepelná, nebo biologická ochrana.

Možnosti vystávající z vlastností vláken se submikronovými rozměry výrazně posouvají hranice textilního inženýrství. Předpokládá se, že nanovláknata budou použita pro výrobu tzv. chytrých tkanin, které se budou mezi jiným přizpůsobovat měnícím se okolním podmínkám nebo monitorovat životní funkce. Tím pojem „komfortní oblečení“ nabude nového významu³⁸.

3.1.5.2. Energetické hospodářství

Nanovláknata vyrobená z uhlíku, kovů a jejich oxidů, jsou žádanými materiály pro výrobu, přeměnu a uchovávání energie. Jejich rozsáhlý povrch vzhledem k objemu podporuje pohyb elektronů a/nebo ukládání iontů. Tím nanovláknenné elektrody výrazně zvyšují efektivitu solárních panelů, dobíjecích baterií, superkapacitorů a palivových článků³⁹. Malé rozměry těchto elektrod současně přispívají ke zlepšení flexibility a přenosnosti zařízení, do kterých jsou zabudovávány⁶.

3.1.5.3. Chemie a životní prostředí

Řada procesů v průmyslu i každodenním životě je spojena s filtrací. Odstraňování škodlivin jako je prach, pyl, plísně, těžké kovy nebo toxické organické molekuly ze vzduchu a vody, je nezbytné pro ochranu lidského zdraví, přírody nebo pouze pro umožnění průmyslové výroby. Hlavními kritérii účinné filtrace je jednotný průtok a dostatečný kontakt s povrchem filtru. Porézní struktura nanovlákných filtrů daná náhodným uspořádáním a propletením vláken při výrobě, usnadňuje přenos hmoty. Tím napomáhá uniformnímu toku filtrované látky, protože ta při svém průchodu skrz filtr nemusí překonávat výrazný odpor. Zároveň díky velkému povrchu dochází k řadě interakcí mezi polutanty a filtrem a bylo prokázáno, že filtry z nanomateriálů zachytí mnohem více částic a škodlivin než filtry běžné⁶. Navíc jsou vlákna díky svým nanorozměrům citlivá i pro velmi malé částice a jsou tak schopná zadržet polutanty s velikostí menší než 300 nm⁴⁰. Použití PVA, PAN, PVP, polystyrenu (PS) a dalších polymerů ve filtračních systémech tedy výrazně zvýší filtrační účinnost⁴¹.

Současně může modifikovatelnost nanovlákných materiálů posunout filtrační proces na další úroveň. Nanovlákné filtry mohou být například uzpůsobeny pro selektivní záchyt pouze některých látek nebo disponovat samodetoxikačními vlastnostmi a tím rozkládat škodliviny přímo v průběhu filtrace³⁷. Detoxikační proces je zpravidla založen na katalýze iniciované UV zářením a byl popsán pro Zr-MOFs nanovlákná (metal organic frameworks enriched by zirkonium, Zr-MOFs)⁴² a pro nanovlákná obohacená nanočásticemi⁴³. Tato skutečnost pak koliduje s dalším využitím nanovláken jako katalyzátorů pro obnovu vzácných kovů⁴⁴.

3.1.5.4. Biomedicína

Kromě převažujícího technického využití našla nanovlákná své místo i v biomedicínských aplikacích, konkrétně v tkáňovém inženýrství a v systémech pro cílenou distribuci léčiv. Pro tato odvětví jsou nejdůležitějšími parametry biokompatibilita a degradabilita nanovlákných matic³. Ačkoli jsou tyto vlastnosti charakteristické spíše pro biopolymery, stále častěji se využívá i polymerů syntetických. Mezi nimi lze jmenovat poly-ε-kaprolakton (PCL), kyselinu polymlečnou (PLA), jejich kopolymer (PLCL) nebo kopolymer kyseliny mléčné a glykolové (PLGA). Z těchto polymerů jsou pak pro tkáňové inženýrství vyráběny 2D nebo 3D nanovlákné předlohy s přesně definovanými rozměry, orientací a velikostí pórů. Na jejich povrch se vážou růstové faktory, enzymy, hormony

a protilátky důležité pro uchycení buněk, jejich proliferaci a migraci za účelem obnovy tkáně ²⁷. Existují studie popisující aplikaci těchto nanovláknenných rastrů z různých polymerů pro regeneraci nervové ⁴⁵, srdeční ⁴⁶, žilní ⁴⁷, kostní ⁴⁸ a svalové tkáně ⁴⁹ a také pro hojení ran ⁵⁰.

Cílené dodání léčiva do místa jeho požadovaného účinku je založeno na podobných mechanismech. Nanovláknenný nosič je speciálně vytvořen tak, aby upravoval a kontroloval uvolňování aktivní substance ²⁶. To je zajištěno difúzí léčiva, která může být doplněna postupnou degradací polymeru ⁵¹. Nejčastěji jsou tyto nosiče využívány pro antibiotika ⁵², protinádorová léčiva ⁵³ a léky na bázi biomolekul ⁵⁴.

3.1.6. Využití v analytické chemii

Stejně jako v ostatních odvětvích, vývoj v rámci analytické chemie se řídí touhou dosahovat stále přesnějších výsledků v co nejkratším čase. I v této oblasti jsou nanovláknna velmi cenným nástrojem, jak toho dosáhnout. Opět se zde uplatní jejich velký povrch a řada chemických a morfologických modifikací. Nanovláknna v analytické chemii představují řešení pro zajištění četné interakce s analyty a jejich povrchem a také pro rychlejší přenos signálu. Tyto výhody jsou pak uplatněny v následujících zařízeních a procesech ⁵⁵.

3.1.6.1. Detekční systémy

Kombinace již zmíněných charakteristik umožňuje modifikovat povrch nanovláken vysokou koncentrací chromogenních látek, fluoroforů, chemiluminiscenčních reagens a kovů. To zvyšuje citlivost a selektivitu optických metod zahrnujících kolorimetrii, fluorescenční a chemiluminiscenční analýzu a také Ramanovu spektroskopii ⁵⁶.

Zejména polymery vyrobené pomocí elektrostatického zvlákňování byly studovány jako chytré povrchy pro ambientní ionizační techniky v hmotnostní spektrometrii. Pro DESI (desorption electrospray ionization, desorpční ionizace elektrosprejem) nebo SALDI (surface-assisted laser desorption/ionization, laserová desorpce/ionizace za účasti substrátu) to znamená méně maticových efektů, jednoduchou a rychlou desorpci iontů a vysokou sorpční kapacitu pro vzorek. Pro tyto účely byly již se slibnými úspěchy použity PLA, PVDF, PAN a PA ⁵⁷.

3.1.6.2. Senzory

Obecná definice senzoru jej popisuje jako zařízení zaznamenávající změny v tlaku, teplotě, pH, vlhkosti, elektrickém nebo magnetickém poli, chemickém složení nebo světla ve vnějším prostředí. Odpověď senzoru na tyto proměnné může být interpretována v podobě optických, akustických, mechanických, kalorimetrických, elektrochemických nebo elektrických veličin a pak dána do vztahu s koncentrací analyzované látky ⁵⁸. Pro snímání změn je důležité rozhraní, které je schopné danou změnu zaznamenat a tento záznam postoupit dál ⁵⁹. Zde opět hraje důležitou roli velký povrch nanomateriálů, který změnu určité veličiny může zaznamenávat s vysokou citlivostí. Zároveň tenkost nanovlákných vrstev umožňuje rychlý přenos této informace. Postupem času se tak uhlík, polymery a oxidy kovů v podobě nanovlákných tkanin staly základem citlivých a vysoce stabilních senzorů s krátkým časem odpovědi ⁴⁴.

Můžeme je najít v chemických senzorech odpovídajících na chemické změny v plynných nebo kapalných vzorcích, a biosenzorech kontrolujících vnitřní prostředí organismu pro analytické účely. Chemické sensory a biosensory představují zpravidla elektrochemická zařízení, ve kterých nanovlákněná část tvoří elektrodu. Elektrolytická reakce na povrchu elektrody produkuje měřitelný proud, napětí, nebo způsobuje změny vodivosti media ⁵⁸. Jako příklady chemických senzorů využívajících nanovlákněná mohou být amoniakální a dusíková čidla vyrobená z polymerů ⁶⁰, oxidů kovů ⁶¹ a jejich různé povrchové modifikace ⁶². Dále sem patří grafenové senzory ⁶³ a kompozitní materiály ⁶⁴. Hodnoty dopaminu, glukózy, kyseliny močové nebo peroxidu vodíku jsou sledovány pomocí biosenzorů obsahujících elektrody ze zvlákněných polymerů ⁶⁵, biopolymerů ⁶⁶, uhlíku ⁶⁷, kovů a jejich oxidů ⁵⁸. Pro detekci makromolekul v biologických tekutinách se pak využívají specifické senzory s imobilizovanými enzymy na povrchu nanovlákněných elektrod ⁵⁸.

3.1.6.3. Chromatografické separace

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography, HPLC), plynová chromatografie (gas chromatography, GC) a tenkovrstvá chromatografie (thin-layer chromatography, TLC) pokrývají většinu kvalitativních a kvantitativních analýz v oblasti analytické chemie. Částečně má na tom podíl velký výběr stacionárních fází, který umožňuje využití těchto technik pro většinu nízkomolekulárních a vysokomolekulárních látek ⁵⁶. Díky své vysoké sorpční kapacitě a variabilitě svých modifikací by se nanovlákněné sorbenty mohly uplatnit i při chromatografických

separacích. Zatím se je podařilo úspěšně použít v TLC, avšak jako sorpční materiály pro HPLC ani GC ještě nebyly popsány. Chigome ve své práci rozvíjí domněnku, že proniknutí nanovláken do této vědní oblasti brání jejich nízká mechanická stabilita ⁵⁵. Doposud nebyla vyrobena žádná nanovláknina, která by vydržela tak vysoké tlaky, potažmo teploty, kterých je v těchto separačních technikách užíváno.

Nanovláknina vyrobená elektrostatickým zvlákňováním jako sorbent pro TLC (konkrétně pro ultra-tenkovrstvou chromatografii, UTLC) byla poprvé představena Olesikem v roce 2009 ⁶⁸. V této studii byly steroidní sloučeniny rozděleny pomocí polyakrylonitrilu v kratším čase a s vyšší extrakční účinností než na komerční stacionární fázi. Problémem se však ukázala reprodukovatelnost měření, kterou se Olesik et al. snaží vyřešit v další práci pomocí orientovaných nanovláken ⁶⁹. Orientovaný PAN poskytoval nejen opakovatelnější výsledky, ale ve srovnání s neorientovaným, dosáhl i lepší separační účinnosti. Nanovláknina pak byla využita pro TLC ještě v několika studiích, ale jejich využití je zatím předmětem výzkumu ⁷⁰.

3.1.6.4. Úprava vzorku

Nanovláknina od nedávna také představují inovativní materiál pro SPE a membránovou separaci. Jejich hlavními předpoklady pro tyto účely je zvýšení sorpční kapacity a selektivity. Vysoký poměr plochy povrchu k objemu vláken také přispívá k trendu miniaturizace těchto technik, protože i při snížení množství sorbentu je zachována dostatečná sorpční kapacita ⁵⁵.

Membrány jsou popisovány jako selektivní bariéry mezi dvěma fázemi. Nanovláknenné membrány slouží pro elektrodialytickou separaci anorganických iontů ⁷¹, hemodialýzu pacientů s renální insuficiencí ⁷², obnovu kovů nebo čištění odpadních vod ^{71, 73}. Mechanismus těchto dějů spočívá ve schopnosti nanovláken vyměňovat ionty, které se dosáhne prostřednictvím povrchové úpravy ⁵⁵.

V SPE je hledání nových sorpčních materiálů nikdy nekončící příběh. Sorbenty hrají totiž v SPE klíčovou úlohu a od jejich kvality a správného výběru se odvíjí míra přečištění vzorku a extrakční účinnost ⁷⁴. Pro výhody zmíněné již v předchozích kapitolách, si nanovláknina našla své příznivce i v oblasti extrakčních technik. Byla testována ve formě extrakčních kolonek, disků i pipetovacích špiček ⁷⁵. Během těchto experimentů nanovláknina potvrdila extrakční účinnost srovnatelnou s komerčními sorbenty ať už v analýze potravin ⁷⁶, biologických ⁷⁷ nebo environmentálních vzorků ⁷⁸. Vývoj

nanovlákných sorbentů v extrakčních technikách se ubírá směrem k vyšší selektivitě, kdy prostřednictvím vhodných povrchových úprav se daří připravovat sorbenty pro extrakci pouze omezeného typu analytů, a také k automatizovaným extrakcím. Tím, že vláknité sorbenty zajišťují uniformní průtok vzorku s minimálním zpětným tlakem, se dostaly do hledáčku vědeckých skupin zabývajících se on-line spojením úpravy vzorku se separačními metodami ⁷⁹.

3.2. Extrakce na tuhou fázi

3.2.1. Úvod

Extrakční techniky jsou nejčastěji používanými metodami úpravy vzorků před analýzou. Původně nejpoužívanější extrakce z kapaliny do kapaliny (liquid-liquid extraction, LLE) je v posledních letech nahrazována extrakcí na tuhou fázi (solid-phase extraction, SPE), která oproti LLE nabízí řadu výhod. Mezi nimi lze jmenovat nižší spotřebu organických rozpouštědel, vyšší extrakční účinnost, vyšší čistotu finálního extraktu, a rychlejší a méně pracné provedení, které souvisí s možností automatizovatelnosti extrakčního procesu. K oblibě SPE také napomohla variabilita uspořádání a široká nabídka sorbentů, jež tuto metodu činí mnohem všestrannější a využitelnou pro extrakci většiny analytů přítomných v kapalných matricích. Může se jednat o čisté extrakty, environmentální vzorky i biologické tekutiny. Přečištění vzorku, ke kterému během extrakčního procesu dochází je zpravidla dostatečně efektivní i pro takto složité komplexní matrice⁸⁰.

Hlavním úkolem extrakce na tuhou fázi je tedy izolovat hledanou sloučeninu v kapalném vzorku s tím, že získaný extrakt musí být dostatečně čistý na to, aby mohl být podroben další analýze. Vzhledem k tomu, že se často extrahuje celá směs látek, bývá touto analýzou některá separační metoda umožňující zároveň určit množství a identitu analytů. SPE je tak zpravidla následována HPLC, GC nebo kapilární elektroforézou (capillary electrophoresis, CE). Neseparační průtokové metody mají své uplatnění v analýze selektivně extrahovaných látek.

Ačkoli byla SPE známá již dříve, k jejímu intenzivnímu rozvoji došlo až mezi léty 1960 až 1980⁸⁰. Neustálé zdokonalování této metody pokračuje i dnes. Ve snaze následovat trendy v oblasti úpravy vzorků, jsou představovány jak nové sorpční materiály, tak vlastní uspořádání, které by měly zajistit rychlejší, selektivnější a citlivější analýzu s minimální spotřebou vzorku a organických rozpouštědel⁸¹. I přes veškeré inovace se obecný princip SPE nemění. Kapalným vzorek je nanesený na tuhý sorbent. Přes něj prochází buď samovolně, nebo za použití kladného či záporného tlakového gradientu. Zachycené složky vzorku jsou následně vymyty elučním činidlem, které poruší jejich vzájemnou interakci s povrchem. V závislosti na použitém módu může docházet buď k selektivní extrakci, selektivnímu promytí, nebo selektivní eluci. Během selektivní extrakce je na sorbentu zadržována vybraná část vzorku – analyt nebo interference – která je pak vymyta vhodným elučním činidlem. Zachycení požadované složky je v tomto případě ovlivněno

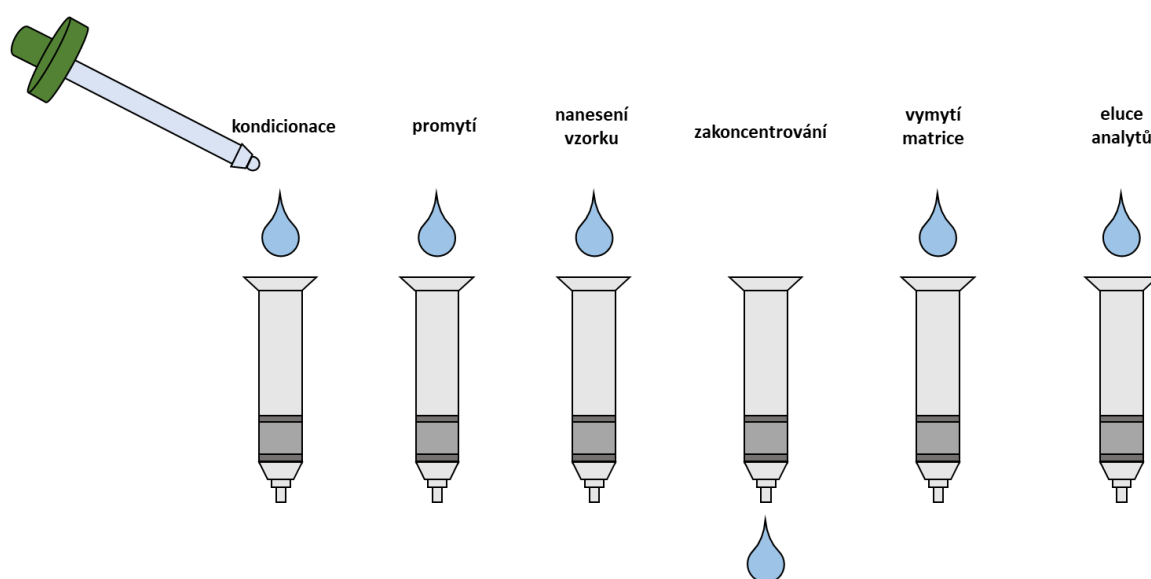
výběrem sorbentu. Jestliže se však na sorbent neselektivně naváže interference i hledaný analyt a jejich oddělení je závislé na výběru elučního činidla, mluvíme pak buď o selektivním promytí, kde eluční činidlo selektivně vymyje pouze nežádoucí interference, nebo o selektivní eluci, kdy je naopak vhodným eluentem vymyt hledaný analyt ⁸².

V závislosti na druhu sorbentu, se během extrakce látky uplatňují van der Waalovy síly, vodíkové můstky, π - π interakce, interakce dipól-dipól, nebo elektrostatické interakce. Stejně tak jednotlivé kroky extrakčního procesu se liší u konkrétních SPE uspořádání. Tato specifika jsou detailněji popsána v následujících kapitolách. V nich jsou SPE přístupy rozděleny na tradiční a moderní, ačkoli toto rozdělení není dokonalé. Řada přístupů se prolíná a to co bylo dříve moderní, by se dnes dalo označit již za tradiční. Pod označením „tradiční“ jsou v této práci shrnuty SPE sorbenty a metody v laboratořích nejčastěji používané a ověřené. Naopak kapitola „Moderní trendy v SPE“ pak pojednává o SPE přístupech, které jsou stále předmětem výzkumu, jsou využitelné pouze v laboratořích se specifickým zaměřením, nebo představují inovaci metod popsaných v kapitole „Tradiční SPE.“

3.2.2. Tradiční SPE

Tradiční SPE představuje jednoduchou a robustní úpravu vzorku před jeho vlastní analýzou. Všechny parametry ovlivňující její efektivitu jsou velmi dobře popsány a jejich vhodnou volbou lze získat maximální extrakční účinnost pro širokou škálu analytů. Extrakční proces u tradičních postupů se obvykle skládá z pěti kroků ⁸¹. Nejprve je sorbent kondicionován organickým rozpouštědlem, jehož druh závisí na použitém sorbentu. Pro reverzní fázi se používají polární organická rozpouštědla mísitelná s vodou, pak následuje voda nebo pufr, aby zbytky organického rozpouštědla na sorbentu nesnižovaly záchyt analytů. Sorbenty fungující v módu normálních fází se kondicionují organickým rozpouštědlem shodným s rozpouštědlem vzorku. Podobně je tomu v iontově výměnné SPE, pokud jsou analyty rozpuštěny v nepolárním rozpouštědle. Před nanesením látek v rozpouštědlech polárních jsou iontové měniče kondicionovány ve vodě mísitelným organickým rozpouštědlem. Kondicionací sorbentu jsou jednak odstraněny nečistoty z jeho výroby, které by pak při následné analýze mohly interferovat, a dále při ní dochází k rozvinutí uhlíkatých řetězců sorbentu. Tím je zajištěn rovnoměrný průtok vzorku a patřičný povrch pro interakce s analytem.

Po kondicionaci následuje nanášení vzorku v rozpouštědle o vhodném pH, iontové síle a obsahu organické složky. Objem nanášeného vzorku se odvíjí od množství sorbentu. Pro retenci požadovaných látek je třeba zajistit optimální a konstantní průtokovou rychlost umožňující dostatečnou míru a délku kontaktu látek se sorbentem. Sloučeniny s nízkou afinitou k povrchu jsou vymyty v následujícím kroku. Rozpouštědlo pro tento účel musí být zvoleno tak, aby nevymylo látky, jež mají na sorbentu zůstat. Jestliže jsou na sorbentu zadržovány nechtěné interference, extrakce zde končí. Pokud to jsou však námi hledané analyty, jejich interakce s povrchem je následně přerušena v dalším kroku. Takto vymyté sloučeniny pak mohou podstoupit analýzu ⁸². V následujících kapitolách jsou popsány nejčastější sorbenty a formy SPE.



Obrázek 5 Jednotlivé kroky v procesu extrakce na tuhou fázi.

3.2.3. Sorbenty

3.2.3.1. Materiály na bázi silikagelu

Silikagelové sorbenty se v analýze těší velké oblíbenosti. Jejich všestrannost, vysoká extrakční účinnost a mechanická odolnost z nich dělá výhodné materiály i pro extrakci na tuhou fázi. Povrch silikagelu ať už ve formě monolitu nebo částic, je velmi heterogenní, nesoucí různé typy silanolových skupin. Ty jsou velkou výhodou i nevýhodou těchto sorbentů. Silanolové skupiny jakožto centra reaktivity jsou využívány pro chemické modifikace ⁸². Kromě samotného silikagelu se tak pro záchyt polárních analytů může využít kyano-, amino-, nebo diolových skupin navázaných na jeho povrchu. Naopak připojením

uhlíkatých řetězců získáme sorbenty pro extrakci nepolárních látek. Pro izolace kyselin a zásad z vodných roztoků, které fungují na principu iontové výměny, se pak využívají silikagely modifikované sulfonylovými kyselinami nebo terciárními aminy nesoucími příslušný povrchový náboj ⁸⁰.

Při chemických úpravách povrchu se zpravidla nepokryjí všechny silanolové skupiny, které jsou pak zdrojem tzv. sekundárních interakcí. Ty mohou mít za následek jednak vyšší stabilizaci zachycených analytů prostřednictvím vodíkových můstků, anebo nežádoucí záchyt polárních interferencí při extrakci nepolárních sloučenin ⁸². Zároveň jsou příčinou chemické nestability silikagelu v roztocích o pH nižším než 2 a vyšším než 8 ⁸³.

3.2.3.2. Polymerní sorbenty

Polymerní sorbenty byly vyvíjeny za účelem překonat limitace silikagelu. Znamenaly průlom zejména v oblasti chemické stability, kdy prokázali odolnost v celé škále pH (1-14) ⁸¹. Zpočátku bylo jejich hlavní nevýhodou omezené množství komerčně dostupných sorbentů a nízká extrakční účinnost pro polární analyty. To se však v průběhu let změnilo a dnes jsou polymerní sorbenty rovnocenné se sorbenty silikagelovými. Mezi nejčastěji používané materiály patří ko-polymery styrenu a divinylbenzenu a jejich modifikace, které se stejně jako silikagel dají použít pro extrakce založené na polárních, nepolárních a elektrostatických interakcích. Nesetkáváme se u nich s interakcemi sekundárními, což vede ke snadnější optimalizaci extrakčního procesu ⁸⁰.

3.2.3.3. Materiály založené na uhlíku

Jedná se o nespecifické, neporézní sorbenty se zhruba desetinásobně menším specifickým povrchem ve srovnání s předchozími dvěma typy. Chemie povrchu je poměrně složitá a při extrakci analytů se uplatňuje více mechanismů retence. Popisována je iontová výměna díky přítomnosti pozitivně nabitých skupin a adsorpce založená na nepolárních interakcích. Tyto sorbenty se tak mohou uplatnit v analýze kyselých, zásaditých i neutrálních látek ⁸⁰. Zpočátku, kdy byly sorbenty tvořeny pouze grafitickým uhlíkem, byla problémem příliš excesivní retence, kdy analyty nebylo možné vymýt běžně používanými organickými rozpouštědly. Imobilizací uhlíku na povrch silikagelového nosiče byl však tento problém vyřešen a vzniklé sorbenty tak mohly těžit z výhod obou materiálů ⁸⁴.

3.2.4. Uspořádání

3.2.4.1. Extrakční kolonky

Skleněné nebo plastové duté válečky se sorbentem uzavřené mezi dvěma fritami z polyethylenu nebo nerezové oceli – to je původní a stále nejpoužívanější formát pro SPE označovaný jako extrakční kolonky. Jsou dostupné ve velikostech pro objemy vzorku mezi 1 a 50 ml, stejně tak široká škála dostupných sorbentů vyhovuje většině aplikací. Dosažení optimální extrakční účinnosti je podmíněno pomalejšími průtokovými rychlostmi. Proto jsou kolonky používány zejména pro menší objemy vzorků ⁸⁰.



Obrázek 6 Ilustrace různých velikostí komerčních SPE kolonek.

Zdroj: <https://in.vwr.com/store/product/8940350/solid-phase-extraction-cartridges-hyperseptm-c18> [Internet, 19.9.2021].

3.2.4.2. Disky

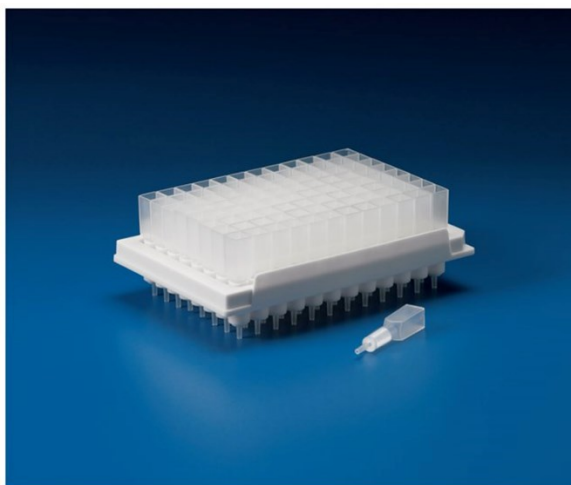
Disky jsou tvořeny buď skleněnou nebo teflonovou membránou, na níž jsou imobilizovány částice sorbentu o průměru až pětkrát menším než jsou používány pro kolonky, nebo jsou tyto částice umístěny mezi dva filtry ze skleněných vláken ⁷⁴. Díky malé tloušťce disku tak nanášený vzorek překonává menší vzdálenost, a současně je v těsném kontaktu s povrchem částic. Lepší přenos hmoty ve srovnání s kolonkami tak umožňuje využití vyšších průtokových rychlostí při dosažení stejné extrakční účinnosti. Proto jsou vhodným řešením pro extrakce velkých objemů ⁸⁰.



Obrázek 7 Příklad komerčních disků pro SPE. Zdroj: <https://www.fishersci.se/shop/products/bakerbond-speedisk-sax-quaternary-amine-extraction-disk/15527694> [Internet, 19.9.2021].

3.2.4.3. Mikrotitrační destičky

Tento model SPE byl poprvé představen v roce 1996 jako reakce na stále rostoucí poptávku po automatizovatelných extrakčních technikách. Každá z 96, 384 nebo 1536 jamek na destičce představuje samostatnou extrakční kolonku vyplněnou 3 až 200 mg sorbentu. Jestliže objem a množství sorbentu je dané a neměnné, jedná se o fixní destičky. Pokud lze však měnit v závislosti na potřebách operátora, mluvíme o flexibilních destičkách, které jsou v praxi mnohem oblíbenější. Smyslem celého uspořádání je simultánní analýza několika desítek vzorků, zajišťující opakovatelnější a přesnější výsledky a rychlejší analýzu s minimální rizikem zanesení chyby ⁷⁴.



Obrázek 8 Příklad komerční destičky s 96 jamkami pro SPE.

Zdroj: <https://preview.fishersci.fi/shop/products/hypersep-hypercarb-spe-96-well-plates/10009002?tab=alternates> [Internet, 19.9.2021].

3.2.5. Moderní trendy v SPE

Ve srovnání s tradiční SPE má moderní extrakční proces zajistit izolaci co největšího množství různých analytů v rámci jedné analýzy, snížit čas a náročnost úpravy vzorků, a poskytovat výsledky s vyšší přesností a precizností ⁷⁴. Následující kapitola představuje stručný přehled těch nejpopulárnějších trendů v oblasti extrakce na tuhou fázi.

3.2.5.1. Imunosorbenty

Na principu vysoce specifické interakce mezi protilátkou a antigenem byly vyvinuty sorbenty pro selektivní záchyt strukturně příbuzných látek. Tato selektivita je imunosorbentům (IS) propůjčena skrz protilátky navázané na jejich povrchu. Protilátky mohou být monoklonální, polyklonální, nebo se jedná pouze o jejich vazebné fragmenty.

Jsou syntetizovány na míru příslušné aplikaci a kovalentně vázány na nosič⁸⁵. Tím bývá buď agarosový gel nebo pro on-line spojení s další analytickou technikou se pro vyšší mechanickou a chemickou odolnost využívá silikagel⁷⁴. Selektivita IS je spojena i s jejich vysokou citlivostí. Proto je lze využít pro extrakce analytů v nízkých koncentracích a tím snížit i spotřebu vzorku. Častějšímu laboratornímu využití IS zatím brání jejich náročnost přípravy a s tím spojená vyšší cena komerčních produktů^{80,86}.

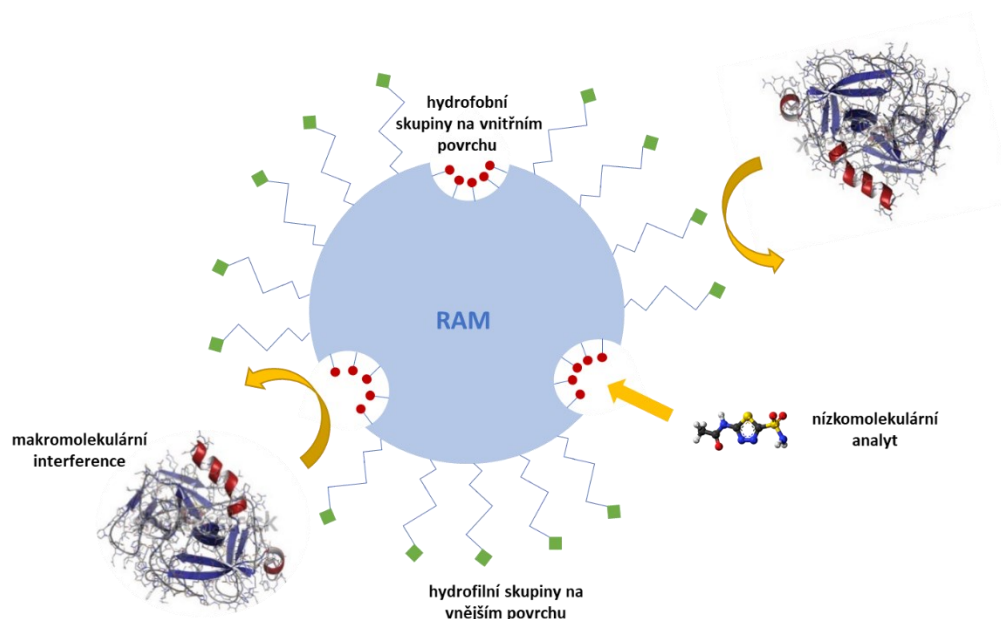
3.2.5.2. Molekulárně vtištěné polymery

Dalším vysoce selektivním sorbentem jsou molekulárně vtištěné polymery (molecularly imprinted polymers, MIP). Jejich selektivita je založena na přítomnosti kavit, které svým tvarem a velikostí a funkčními skupinami odpovídají templátové molekule – analytu, pro kterou byl daný sorbent vytvořen. V těchto kavitách jsou pak analyty zadržovány pomocí polárních, nepolárních či elektrostatických interakcí v závislosti na jejich struktuře. MIP vznikají zesíťováním polymerů za přítomnosti templátové molekuly, která je shodná nebo strukturně příbuzná extrahovanému analytu. Poté je polymer rozdrcen na částice s úzkou velikostní distribucí a použitý templát je vymyt. Takto připravený sorbent je plněn do extrakčních kolonek jak pro off-line tak pro on-line verzi SPE⁸⁰. MIP jsou označovány jako syntetické protilátky, protože vykazují stejnou míru selektivity. Zároveň jsou však mechanicky a chemicky odolnější než IS. Tento fakt spolu s nižší cenou je činí uživatelsky zajímavější⁷⁴.

3.2.5.3. Materiály s omezeným přístupem

Materiály s omezeným přístupem (restricted access materials, RAM) jsou známy již od roku 1986, významný rozvoj však zaznamenaly až v posledních letech⁸⁷. Často jsou kombinovány s MIP nebo IS, za vzniku sorbentů selektivně vychytávajících analyty z biologických matric. Hlavní předností RAM je totiž schopnost odstraňování makromolekul z biologických matric za současné retence nízkomolekulárních látek⁸¹. Tyto sorbenty jsou tvořeny porézním materiálem (polymery, silikagel), přičemž velikost pórů je zvolena menší než interference. Tento síťový efekt je zpravidla podpořen hydrofilními skupinami na povrchu působícími na makromolekuly repulzními silami. Analyty jsou pak zadržovány uvnitř pórů na základě vazebných interakcí s povrchem⁷⁴. RAM byly navrženy především pro on-line extrakce, kdy jsou schopny výrazně zjednodušit úpravu vzorků

v laboratořích zpracovávajících biologický materiál. Jejich využití v off-line módu je ojedinelé.



Obrázek 9 Grafické znázornění mechanismu extrakce za využití materiálů s omezeným přístupem.

3.2.5.4. MOFs

Metal-organic frameworks (MOFs) jsou porézní materiály tvořené ionty kovu nebo kovovými klastry, které jsou spojeny organickými polymery pomocí koordinačních vazeb. Nejčastěji jsou syntetizovány solvotermální reakcí za specifické teploty a tlaku⁸⁸. Nastavení těchto podmínek a typ kovového iontu, typ polymeru a jejich vzájemný poměr určují základní vlastnosti výsledného MOF a sice porozitu, velikost pórů, jejich povrch a tvar. Většina MOFs disponují tepelnou, chemickou a mechanickou stabilitou, nicméně svou popularitu v analytické chemii si získaly díky specifickému povrchu o ploše až 7000 m². g⁻¹ a velké nabídce materiálů, jejich kombinací a modifikací⁸⁹. Na základě těchto vlastností mají velký potenciál stát se novými sorbenty pro SPE. Jako takové byly poprvé popsány v roce 2006⁹⁰ a výzkum tohoto směru nadále pokračuje. Objevují se aplikace MOFs nejen pro klasické kolonové uspořádání SPE ale i pro disky či pro miniaturizovaný formát. Záchyt analytů při extrakci je založen na π - π interakcích, vodíkových můstcích a hydrofilních/hydrofobních interakcích. Zároveň do retenčního mechanismu vstupuje i velikost a tvar pórů v materiálu, které zvyšují selektivitu extrakčního procesu oproti klasickým materiálům⁸⁸.

3.2.5.5. Nanomateriály

Důvodem, proč jsou nanomateriály s oblibou používány jako sorbenty pro SPE, je jejich schopnost naplnit všechna očekávání, které jsou na moderní úpravu vzorku kladena. Do analýzy vnášejí vysokou míru selektivity a citlivosti. Jejich malé rozměry napomáhají miniaturizaci technik, chemická a mechanická odolnost zajišťují všestranné použití⁹¹. K tomu napomáhá i řada dostupných výchozích sloučenin. Podle nich se nanomateriály dělí na ty založené na polymerech⁹², křemíku⁹³, uhlíku⁹⁴, kovech a jejich oxidech⁹⁵. Jejich různými kombinacemi a povrchovými úpravami se možná aplikace ještě více rozšiřuje a výsledkem je jejich použití v různých odvětvích pro široké spektrum analytů od léčiv, přes biomolekuly a kovy, až po environmentální polutanty⁹⁶.

Nanomateriály mohou nabývat různých tvarů. Nejširší skupinu v tomto ohledu tvoří materiály založené na uhlíku⁹³. Fullereny, uhlíkové nanotrubičky a uhlíková nanovlákná patří mezi nejčastěji zmiňované ve vědeckých publikacích. Molekuly tvořené z pěti či šesti uhlíkatých cyklů pospojovaných do tvaru koule či elipsoidu nesou název fullereny. Jsou chemicky velmi stabilní, ale jejich nízká agregační schopnost jim zamezuje vytvářet velké vrstvy sorbentu. Proto našly uplatnění zejména v miniaturizované podobě SPE. Uhlíkové nanotrubičky jsou nejčastěji používanými nanomateriály v moderních extrakčních technikách, a to zejména díky jejich velkému povrchu a vysoké adsorpční účinnosti. Jedná se o drobné trubicové útvary, které vznikly srolováním jedné (single-wall carbon nanotubes) nebo více vrstev (multi-wall carbon nanotubes) planárního sp^2 grafitu. Uhlíková nanovlákná, tedy pevná vlákna s délkou několika mikrometrů a nanometrovým průměrem, rovněž disponují velkou adsorpční kapacitou. Díky ní se staly oblíbenou příměsí jiných sorpčních materiálů a tak spíše než s čistými uhlíkovými nanovláknami se setkáme s kompozitními materiály, do nichž jsou přidávány pro modifikaci retenčního mechanismus sorbentu⁹⁷.

Sorbenty vyrobené z kovů (stříbro, platina, zlato) nebo kovových oxidů (oxid železitý, titaničitý, hlinitý, zirkoničitý, manganatý a ceričitý) bývají zpravidla ve formě částic. Předností těchto kovových nanočástic je kromě velké sorpční kapacity a snadné modifikovatelnosti jejich chemická aktivita, která lze využít pro vyšší selektivitu extrakce⁹³. Některé z materiálů mohou disponovat i magnetickými vlastnostmi. Takové pak nacházejí uplatnění v magnetické extrakci na tuhou fázi blíže popsané v kapitole 3.2.5.8.⁹⁷.

Polymerní nanomateriály mohou stejně jako uhlíkové nabývat více podob. Lze se setkat s již známými vlákny, částicemi či dendrimery. Jejich výhodou je široké spektrum využitelných výchozích materiálů, mechanická a chemická odolnost a modifikovatelnost, díky níž lze snadno připravit sorbenty „na míru“ dané aplikaci ⁹¹. Sorbenty z organických a anorganických polymerů se používají i jako nosiče funkčních skupin i celých molekul pro vysoce selektivní extrakce ⁹⁸.

Křemík se uplatňuje nejen jako silikagel, významnou roli začíná hrát i jeho provedení v nanorozměrech. Nanomateriály založené na křemíku mají většinou podobu částic a často bývá jejich povrch chemicky modifikován různými funkčními skupinami. Uplatnění našly nejen v klasické ale i miniaturizované podobě SPE ⁹³.

3.2.5.6. Miniaturizace

Extrakční techniky ve zmenšeném formátu dokonale splňují požadavky moderní analytické chemie. V první řadě klesá spotřeba vzorku a organických rozpouštědel, čímž se snižují nejen náklady, ale i ekologický dopad. Dále se výrazně zkracuje doba analýzy. Na to mají vliv především malé rozměry a jednoduchost vybavení a s tím spojená jednoduchá obsluha, snadná automatizovatelnost a možnost propojení s dalšími analytickými kroky. Potřebná selektivita, citlivost a reprodukovatelnost těchto metod se vyvíjí v souladu s jejich vzrůstající oblibou a komerční dostupností komponent ⁹⁹.

První pokusy o miniaturizaci pocházejí z devadesátých let minulého století, kdy byl poprvé navržen koncept mikroextrakce na tuhou fázi (solid-phase microextraction, SPME). Snahou jeho autorů Pawliszyna a Arthura bylo překlenout nevýhody tradiční SPE. V SPME je často vhodný polymerní sorbent nanosený na křemenné vlákno, které je ponořeno do roztoku vzorku, nebo v případě headspace metody je vlákno ponecháno v prostoru nad vzorkem. V obou případech dochází k adsorpci analytů na jeho povrch. Kritickými proměnnými, ovlivňujícími extrakční účinnost, jsou rozdělovací koeficient mezi sorbentem a vzorkem, tloušťka vrstvy sorbentu, doba extrakce, teplota a délka vlákna. Po skončení adsorpce následuje desorpce za zvýšené teploty nebo pomocí vhodného rozpouštědla, a distribuce vzorku do GC nebo HPLC ¹⁰⁰.

Postupem času se z SPME oddělily další příbuzné techniky. Lze mezi nimi jmenovat dynamickou extrakci na tuhou fázi (solid-phase dynamic extraction, SPDE) nebo mikroextrakce na tuhou fázi za využití porézní membrány (porous membrane-protected SPME, μ SPE). Při SPDE je sorbentem potažen vnitřek jehly, která je pak spojená buď

s injekční stříkačkou nebo je přímo součástí autosampleru. Aktivní aspirace prostřednictvím podtlaku zvyšuje kontakt analytu se sorbentem, což urychluje extrakci a zvyšuje její účinnost. μ SPE se s výhodou využívá pro komplexní matrice, kdy by hrozilo ucpání běžné SPE kolonky. Sorpční materiál je zde totiž chráněn porézní polypropylenovou membránou, která umožňuje vstup k sorbentu pouze nízkomolekulárním látkám⁹⁹.

Na SPME navazuje disperzní mikro-extrakce na tuhou fázi (dispersive solid-phase microextraction, DSPME), která byla představena v roce 2003. Později se pak stala součástí patentovaného postupu úpravy vzorku QuEChERS. Principem je přidání tuhého sorbentu k roztoku vzorku. Díky disperzi sorpčních částic se zvyšuje kontakt mezi jejich povrchem a analytem. Po ukončení extrakce je vzorek centrifugován a ze sedimentovaného sorbentu je eluován zachycený analyt. Jako sorbenty se uplatní materiály běžné pro SPE¹⁰¹.

Jak již z názvu metody vyplývá, extrakce na tuhou fázi pomocí míchadla (stir-bar sorptive extraction, SBSE), využívá magnetických míchadel potažených nepolární polymerní fází. Extrakce analytů pak probíhá na základě hydrofobních interakcí během míchání roztoku vzorku, kam bylo míchadlo vloženo. Ve výjimečných případech lze extrakci provádět i headspace metodou, kdy je míchadlo drženo v uzávěru vialky pomocí kovového plíšku. Po ukončení extrakce se míchadlo opláchne vodou a nechá vyschnout. K uvolnění analytů dochází buď tepelnou desorpcí nebo elucí rozpouštědlem¹⁰².

Poslední opravdu inovativní formát miniaturizované SPE byl představen v roce 2004 pod názvem mikroextrakce pomocí baleného tuhého sorbentu (microextraction by packed sorbent, MEPS) a velmi brzy se od laboratorního uspořádání přešlo ke komerční výrobě. MEPS technika využívá opět klasické SPE sorbenty naplněné v tzv. barelu. Ten je z jedné strany připojen na injekční stříkačku o objemu 100 až 250 μ l a z druhé strany na jehlu. Pomocí jehly je vzorek aspirován do barelu se sorbentem, kde dochází k adsorpci analytů na jeho povrch. Při eluci se barel vymění na čistou stříkačku a nasátím elučního činidla se vymyjí zachycené látky. Na trhu jsou k dostání různé typy MEPS zařízení vhodné jak pro extrakce ruční, automatické, nebo spojené s další analytickou technikou¹⁰³.

3.2.5.7. Extrakční špičky

Extrakční špičky navazují na snahu automatizovat extrakce. Zjednodušeně lze popsat jako zmenšený model SPE kolonky. Tuhý sorbent je umístěn uvnitř pipetovací špičky a držen na místě pomocí filtru. Miniaturní formát snižuje nejen množství spotřebovaného vzorku a rozpouštědel, ale zároveň také výrazně zkracuje čas extrakce.

To vše s extrakční účinností korespondující s provedením SPE v běžné velikosti. Malá velikost však může být i nevýhodou, a to zejména při zpracovávání velmi komplexních matric (biologické vzorky), které mohou snadno zanést úzké ústí špičky ⁷⁴.

K oblíbenosti extrakčních špiček přispívá i jejich variabilita. Kromě komerčně dostupných, sorbentem již předplněných variant si lze špičky připravit i v laboratoři. Naplněním prázdných pipetovacích špiček vhodným sorbentem nebo jejich kombinací tak může vzniknout extrakční jednotka s vysokou specifitou k určitému analytu. Při tomto postupu je však nutné dbát na dobrou techniku plnění, aby byla zaručena opakovatelnost výsledků ¹⁰⁴.

3.2.5.8. Magnetická SPE

Magnetická extrakce na tuhou fázi (magnetic solid-phase extraction, MSPE) byla poprvé použita v roce 1999 a je zajímavou alternativou k disperzní mikroextrakci na tuhou fázi ¹⁰⁵. Využívá částicových sorbentů s magnetickými vlastnostmi potažených sorbentem. Ve svém principu se neliší od klasické DSPME. Sorbent je přidán ke vzorku, po extrahování analytů na jeho povrch je sorbent z roztoku odstraněn pomocí magnetického pole a analyty jsou pak vymyty po přidání vhodného organického činidla. Pak může být vzorek rovnou analyzován nebo před vlastním analytickým stanovením proběhne ještě zakoncentrování vzorku. Rozdílná je pouze část, kdy dochází k oddělení sorbentu s navázanými analyty z roztoku vzorku. Při DSPME se využívá centrifugace, u MSPE magnetické vlastnosti sorbentu, který tak může být odstraněn působením vnějšího magnetického pole ¹⁰⁶.

Pro tuto aplikaci se postupně zkoušejí nové a nové sorpční materiály. Základem často bývají kovové nanočástice buď samotné, nebo s modifikovaným povrchem. Velmi oblíbené jsou také již zmíněné uhlíkové nanotrubičky, MOF, MIP nebo samotný grafen ¹⁰⁷.

3.2.5.9. On-line extrakce

U této pokročilé extrakční techniky se jedná o spojení úpravy vzorku s následnou analytickou koncovkou, velmi často separační, pro určení totožnosti a/nebo koncentrace analytu ⁸. Důležitou součástí instrumentace je vhodné rozhraní – komponenta, která umožňuje směřovat průtoky mobilních fází a elučních činidel přes SPE kolonky nebo extrakční disky do dalších částí systému. Obecně přináší automatizované propojení více analytických technik za sebou řadu výhod. Kromě zmiňovaného urychlení a usnadnění

práce, zabraňuje též kontaminaci vzorku a kontaminaci prostředí, snižuje ztráty analytů a zvyšuje přesnost a preciznost prováděných měření ¹⁰⁸.

Nejčastěji bývá SPE on-line spojována se systémy HPLC nebo UHPLC, jakožto nejpoužívanějšími analytickými instrumenty. Toto uspořádání je detailněji popsáno z chromatografického úhlu pohledu v kapitole 3.3.3.

SPE-GC zařízení nebývají tak častá vzhledem k inkompatibilitě mobilních fází, kdy pro extrakční krok bývá zpravidla využívána kapalina, která musí být před vstupem do kolonového prostoru odpařena. K tomuto kroku se využívají tzv. retention gaps. Velkou výhodou v SPE-GC analýzách bývá využití extrakčních technik umožňující headspace adsorpci a následnou termální desorpci zachycených látek ¹⁰⁹.

Ani on-line spojení SPE s CE není příliš obvyklé. Bývá totiž problematické z hlediska velkého objemu, který je získán po průchodu extrakční kolonkou. Pro následnou elektroforézu musí být oddělena a do kapiláry vpuštěna pouze jeho část. Pokud již má tedy být CE přímo spojena s extrakčním krokem, je výhodnější in-line nebo at-line uspořádání. Všechny tři způsoby však odstraňují dva hlavní nedostatky CE a sice nízkou citlivost a problematickou analýzu komplexních matic ¹¹⁰.

Z dalších metod, se kterými lze SPE spojit, lze jmenovat hmotnostní spektrometrii ¹¹¹ nebo sekvenční injekční chromatografii ¹¹². Kromě separačních technik mohou být extrakce spojovány i s voltametrií ¹¹³, atomovou absorpční spektrometrií ¹¹⁴, nebo jsou součástí systémů pro průtokovou analýzu ¹¹⁵.

3.3. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

3.3.1. Úvod

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography, HPLC) je analytická metoda, která je používána v nespočtu laboratoří po celém světě a je metodou volby pro řadu kvalitativních a kvantitativních analýz. Tento status se jí podařilo získat zejména díky (a) téměř univerzálnímu použití, (b) vysoké přesnosti měření, (c) velké nabídce přístrojů, kolon a dalšího příslušenství podporujících její univerzálnost ¹¹⁶.

Objev kapalinové chromatografie se datuje do začátku minulého století. Její tehdejší uspořádání sestávalo pouze ze skleněného válce – kolony – vyplněného jemně práškováným materiálem (např. křídou). Vzorek se manuálně nanášel na svrchní část sorbentu a pouze na základě gravitační síly postupně protékal válcem. Při tomto průchodu se jednotlivé složky vzorku pohybovaly rozdílnou rychlostí, což zapříčinilo jejich vzájemné oddělení. Původně se takto analyzovaly barevné vzorky, identifikace jednotlivých frakcí mohla být tedy provedena vizuálně, díky jejich odlišnému zbarvení. Po odebrání příslušné frakce a odpaření rozpouštědla byl analyt připraven ke kvantitativní analýze. Celý tento proces byl tedy velmi časově náročný a pracný ¹¹⁶.

Dalším vývojovým stupněm bylo v roce 1940 představení papírové chromatografie, ve které je místo kolony používán pruh papíru. Jeden jeho konec je ponořen do rozpouštědla, které postupným vztlínáním separuje složky vzorků nanesených původně nad jeho hladinu. Nahrazením papíru za silikagelem pokrytou desku vznikla tenkovrstvá chromatografie. Obě tyto techniky nabízely oproti původnímu kolonovému uspořádání snazší operativu, možnost separovat více vzorků současně a jednodušší detekci látek založenou na barevných reakcích analytů po nanesení příslušného činidla na chromatografickou desku ¹¹⁶.

Svoji nejznámější podobu získala kapalinová chromatografie na konci 60. let minulého století, kdy se objevila HPLC. Technika, jež v současnosti zvládne separace desítek látek v řádech minut ¹¹⁷ a lze použít jak pro makromolekuly tak nízkomolekulární látky, je na rozdíl od svých předchůdkyň plně automatizovaná. Tato skutečnost společně s pečlivou optimalizací jejích jednotlivých částí od dávkovače vzorků po detektor zajišťuje velmi přesné výsledky, na které se spoléhá farmaceutický průmysl, anti-dopingové laboratoře, forenzní vědy, lékařství a mnohé další instituce. Ač by se tedy mohlo zdát, že

HPLC již dosáhla svého vrcholu, opak je pravdou. Stále se objevují nové trendy a směry, kterými se tato metoda může ubírat. Ty nejintenzivněji studované a využívané jsou popsány v následující kapitole.

3.3.2. Moderní trendy v HPLC

HPLC je rychlá, plně automatická, robustní a přesná separační analytická metoda, vhodná pro široké množství látek, které v rámci jedné analýzy mohou být zároveň identifikovány a kvantifikovány. Ani přes tyto výhody však nedokáže vzdorovat tlaku pokroku v analytických metodách. Stejně jako i řada jiných technik se tedy stala předmětem vývoje, jež ji má posunout směrem k ještě rychlejšímu, snazšímu, přesnějšímu a citlivějšímu stanovení. Během éry HPLC byly zákonitosti a parametry ovlivňující chromatografický proces již velmi dobře popsány. Tyto znalosti teď slouží k cíleným inovacím týkajících se jak instrumentace a příslušenství, tak chromatografické techniky jako takové.

3.3.2.1. Monolitické kolony

Kolony vyplněné monolitickými sorbenty dosahují oproti částicovým téměř stejně účinné separace za kratší dobu a při nižších tlacích. Jsou tvořeny jedním kusem materiálu, v jehož struktuře se vyskytují dva typy pórů. Velké makropóry zajišťují konvektivní tok mobilní fáze a středně velké mezopóry zajišťují dostatečně velký povrch pro optimální záchyt analytů. Komerčně dostupné jsou polymerní monolity a monolitické sorbenty na bázi silikagelu. Povrchy obou materiálů mohou být modifikované různými funkčními skupinami pro dosažení variability retenčních mechanismů¹¹⁸. Monolitické kolony se pak stejně jako částicové dají využít pro separaci v systému reverzních fází (reversed phase, RP), v systému normálních fází (normal phase, NP), hydrofilní interakční chromatografii (hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC), iontovou výměnu (ion exchange, IE), nebo jako nosiče ligandů pro afinitní chromatografii¹¹⁹.

Výchozími materiály pro výrobu polymerních monolitických sorbentů jsou často kombinace styrenu a divinylbenzenu, alkylmethakryláty, akrylamidy nebo kov obsahující sloučeniny navázané na organickém polymeru (metal-organic frameworks, MOFs)¹²⁰. Radikálovou polymerací iniciovanou termálně nebo fotochemicky a za přídavku vhodného porogenu, vznikají pak dané porézní struktury¹¹⁸. Příprava silikagelových monolitů je náročnější a probíhá na základě hydrolýzy a sol-gel separace tetramethoxysilanu (TMOS), tetraethoxysilanu nebo hybridní kombinace TMOS a methyltrimethoxysilanu (MTMS), kdy

se odděluje silikagelová fáze od fáze vodné. Porozity je následně dosaženo působením amoniaku za zvýšené teploty ¹²⁰. Chemická a mechanická odolnost monolitů odpovídá polymerním, respektive silikagelovým částicovým sorbentům ¹¹⁸.

Kromě kapalinové chromatografie se s monolitickými sorbenty můžeme setkat v GC, kapilární elektrochromatografii (CEC), superkritické fluidní chromatografii (SFC) ¹²⁰ a i v některých extrakčních technikách ¹²¹.

3.3.2.2. Kolony s povrchově porézními částicemi

Povrchově porézní (core-shell) částice byly poprvé představeny v roce 2006 a představují kompromis, jak zvýšit separační účinnost chromatografické separace bez nutnosti UHPLC instrumentace (viz kapitola 3.3.2.3.). Ve srovnání s běžně využívanými plně porézními částicemi zajišťují lepší přenos hmoty, což ve výsledku znamená stejně účinnou analýzu za nižších zpětných tlaků ¹²². Povrchově porézní částice tedy lze použít s běžným HPLC systémem, jehož efektivita je pak srovnatelná s UHPLC ¹²³.

Toto výhodné chromatografické chování je umožněno díky struktuře kombinující dvě části. První z nich je silikagelové, méně častěji hliníkové, zlaté, uhlíkové nebo polymerní jádro. Druhá je tvořena několika vrstvami křemíku s definovanou porozitou. Dohromady tyto části dávají sférické 1,3 až 5 μm velké částice s úzkou velikostní distribucí. To, že je porézní pouze část objemu částice, vede k tomu, že molekuly analytu nepronikají tak hluboko do struktury stacionární fáze, jako je tomu u plně porézních částic. Tím je výrazně redukována difúze separovaných zón a tedy i rozšiřování píků. Kombinace s rovnoměrnější distribucí velikostí zlepšuje přenos hmoty, a tak sekundárně vede k urychlení analýzy a snížení spotřeby rozpouštědel ^{118, 122}.

Využití povrchově porézních částic v kapalinové chromatografii je stejné s těmi plně porézními. Byly popsány separace biologických makromolekul ¹²⁴ i nízkomolekulárních analytů v potravinových ¹²⁵, environmentálních ¹²⁶ i biologických vzorcích ¹²⁷.

3.3.2.3. Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Charakteristikou ultra-vysokoúčinné kapalinové chromatografie (ultra-high performance liquid chromatography, UHPLC) jsou částice s rozměry do 2 μm (plně porézní) nebo do 3 μm (povrchově porézní), naplněné v kolonách užších a kratších, než je běžné pro HPLC. Tím, na základě teorií chromatografické separace, je dosaženo efektivnější a rychlejší analýzy. Zmenšení částicového průměru však neodmyslitelně

souvisí s nárůstem zpětného tlaku, který musel být vyřešen patřičnou instrumentací. Tak byly vyvinuty přístroje pracující v rozmezí 100 až 150 MPa a od HPLC se oddělila UHPLC metoda, která se postupně stává metodou volby v řadě analytických laboratoří. Na rozdíl od HPLC je totiž rychlejší, selektivnější a poskytuje přesnější výsledky za současné nižší spotřeby rozpouštědel a vzorku ¹¹⁸.

Aby mohl být plně využit potenciál UHPLC, musí instrumentace splňovat několik kritérií. Použité pumpy musí být dostatečně robustní, aby zajišťovali stabilní a rovnoměrný průtok i při tlacích nad 100 MPa. Pomocí úzkých kapilár nebo nastavením zpožděného nástřiku se snižuje dopad zpoždění gradientu, které kvůli krátkým metodám v UHPLC může výrazně ovlivnit selektivitu. Rychlejší separace také klade jisté nároky na detektory. Z hlediska statistiky je pro spolehlivou kvantifikaci doporučováno dosáhnout alespoň 12 - 15 bodů na pík. Proto detektory spojené s UHPLC musí sbírat data rychlostí minimálně 10 Hz. Navíc veškeré spojení a kapiláry v chromatografickém systému, případně průtokové cely detektoru, musí být dostatečně odolné vůči vysokým tlakům ¹¹⁸.

Ačkoli je UHPLC stejně jako HPLC velmi univerzální metoda, velkou výhodou představuje zejména pro laboratoře, kde je třeba analyzovat velké množství analytů ve vzorku. Konkrétně to mohou být forenzní a toxikologické analýzy ¹²⁸, farmakokinetické ¹²⁹ a metabolické studie ¹³⁰.

3.3.2.4. Miniaturizace

Snaha o menší, účinnější a výkonnější zařízení udává vývojový trend v elektronice už od poloviny minulého století a úspěchy zde dosažené pomocí zmenšování a integrace jednotlivých zařízení do jedné platformy posléze vyústily v nespočet možností i pro vědu a technologie, analytickou chemii nevyjímaje. Výsledkem miniaturizace v tomto oboru jsou mikrofluidní a nanofluidní analytické systémy. Podle definice se jedná o zařízení, která mají alespoň jeden rozměr menší nebo roven 100 μm , respektive 100 nm. V současnosti mají podobu čipů se soustavou drobných kanálků nebo podobných útvarů, zajišťujících průtok kapalin, a nejčastěji se používají pro elektroforetické nebo chromatografické separace, případně se jedná o koncepty tzv. Lab-on-a-Chip (LoC) a mikro-total analytical system (μTAS), které spojují několik analytických kroků při zachování miniaturních rozměrů celého zařízení ¹¹⁸.

Miniaturizací separačních analytických systémů se (a) snižuje spotřeba vzorku a použitých rozpouštědel, (b) zkracuje čas analýzy, (c) zvyšuje flexibilita

a automatizovatelnost analytického procesu. Analýza vzorků je pak rychlejší a citlivější, méně náročná na obsluhu a šetrnější k životnímu prostředí. Velkou výhodou jsou malé rozměry zařízení, umožňující jejich přenosnost a tím i možnost analyzovat vzorky přímo po jejich odběru ¹¹⁸.

Na rozdíl od mikroelektronických, se v případě mikro-/nanofluidních analyzátorů nejedná pouze o zmenšené verze klasické instrumentace. Konkrétně, při vývoji miniaturizovaných chromatografických systémů, se muselo vzít v potaz několik následujících aspektů. Kapaliny se totiž při velikostech používaných objemů chovají jinak. Turbulentní tok se mění v laminární, a tak se kapaliny mísí pouze na základě difúze. Zároveň se snižováním objemů vzrůstá význam kapilárních sil a povrchového napětí. Pumpy překonávají velký tlak daný částicemi s rozměry menšími než 1 μm a zároveň musí zajistit přesný a stálý průtok v řádech nanolitřů za minutu. Dávkování nanolitrových objemů vzorku je zajištěno nanolitrovou dávkovací smyčkou nebo musí být nadávkovaný objem redukován vhodným splitem. Pokud je k detekci analytu využit UV/VIS detektor, je vhodné použít detekční celu ve tvaru U nebo Z, aby byla zachována patřičná citlivost, jež má tendenci klesat se snižujícím se objemem protékajících kapalin. Dále je třeba pracovat se změnami fyzikálních vlastností kapalin, daných rovněž nízkými průtokovými objemy ¹¹⁸.

Současné komerčně dostupné mikro-/nanofluidní analyzátoři zpravidla sestávají z pump spojených s čipem přes vhodné rozhraní. Na čipu může probíhat buď jen separace nebo může být doplněna i o krok úpravy vzorku či derivatizaci. Následuje rozhraní spojující čip s detektorem. Všechny části jsou již uzpůsobeny všem specifikům, která miniaturizace obnáší. Lze tak dosáhnout rychlé a přesné analýzy v oblasti malých molekul, biofarmak i nukleotidů ¹¹⁸.

3.3.2.5. Multidimenzionální chromatografie

Separace analytů za použití více kolon (dimenzí), je další vývojový směr HPLC, který dosahuje výrazně lepší separační účinnosti, zejména pro reálné vzorky, kde se očekává velký počet analytů ¹³¹. Tato metoda našla uplatnění v analýze polymerů, farmaceutik ¹³², biologických molekul ¹³³ a rostlinných látek ¹³⁴, vzorků ze životního prostředí ¹³⁵ a petrochemického průmyslu ¹³¹.

Ačkoli multidimenzionální chromatografie může být teoreticky založena na spojení řady chromatografických kolon, nejčastěji se setkáme s dvoudimenzionální kapalinovou chromatografií (2D-LC). Jak již vyplývá z názvu, jde o spojení separace na dvou kolonách,

kteře se liší svými selektivitami. Toto spojení lze provést off-line, kdy je vzorek po první analýze sbírán a znovu dávkován na kolonu s jinou stacionární fází, nebo on-line. V on-line režimu se pak rozlišují dva módy – komprehenzivní (comprehensive) a frakční (heart-cutting) ¹¹⁸.

Frakční mód spočívá ve sběru určitých částí efluentu z první dimenze, které jsou dále analyzovány v dimenzi druhé. Ta má zajistit dostatečnou selektivitu pro látky, jež během první dimenze nebyly dostatečně rozděleny. Požadované frakce jsou sbírány sběračem frakcí a následně dávkovány na další kolonu, nebo je pro tento účel využito vícecestný přepínací ventil, který změnou toku přesměruje požadovanou část efluentu z první dimenze do dimenze následující. Komprehenzivní mód využívá stejnou instrumentaci s tím, že do další dimenze je přesměrován celý objem vzorku ¹³¹.

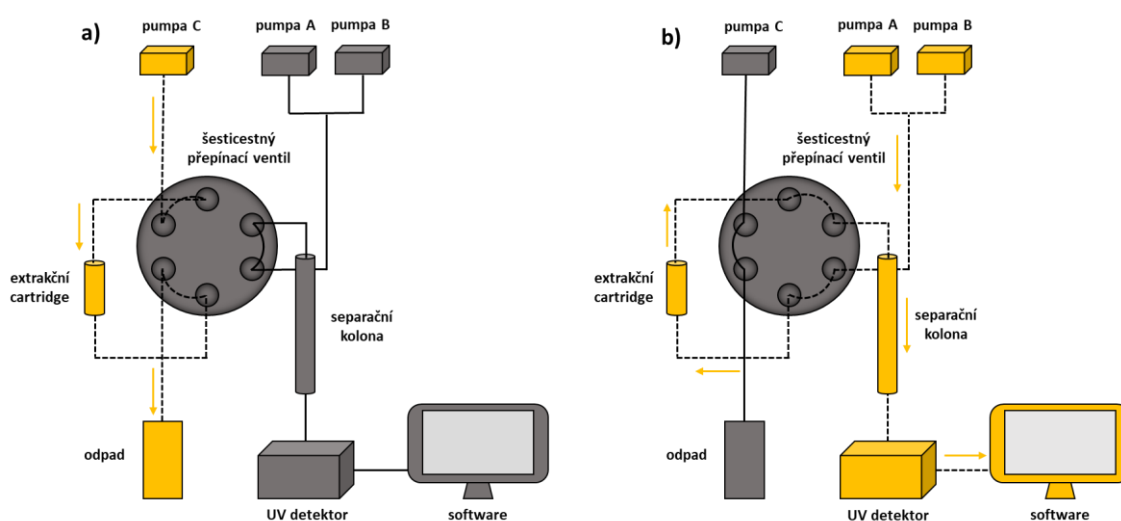
Při vývoji metody je třeba nejen optimalizovat separační podmínky pro každou dimenzi, ale i docílit, aby tyto podmínky byly vzájemně kompatibilní, a to zejména tehdy, využívá-li se on-line spojení jednotlivých dimenzí. Při vývoji metody pro 2D-LC je klíčové aby (a) kolony v jednotlivých dimenzích měli odlišnou selektivitu (maximalizace ortogonality), (b) metoda v druhé dimenzi musí být co nejrychlejší, čímž umožní optimální dávkování vzorku z předchozí dimenze, (c) rozpouštědla použitá v první dimenzi musí být kompatibilní i s tou druhou, (d) objem sběrače frakcí odpovídal objemu sbíraného vzorku, (e) posloupnost jednotlivých kroků analýzy byla správně načasovaná. Náročnost vývoje metody je jednou z překážek bránících širšímu využití multidimenzionální chromatografie i přes její bezesporu vyšší účinnost ve srovnání s klasickou jednodimenzionální HPLC ^{118, 131}.

3.3.3. On-line spojení HPLC s SPE

Vhodně zvolená a účinná úprava vzorku je základem úspěšné analýzy. Zpravidla se však jedná o časově nejnáročnější krok celého procesu, který tak nejde příliš dohromady se stále rychlejšími analyzátory. Proto ke klasickým metodám úpravy vzorku prováděnými manuálně mimo analytický systém, tedy off-line, přibývají postupně at-line varianty prováděné v automatickém přístroji a on-line postupy, kdy je úprava vzorku přímo spojena s následujícím krokem analýzy ¹³⁶. Uspořádání metody vždy závisí na konkrétní metodě, laboratorním vybavení, zkušenostech personálu, požadovaných výstupech a počtu zpracovávaných vzorků. Úpravy vzorků prováděné off-line jsou dobré pro malé množství vzorku a stejně jako at-line metody jsou jednoduché a flexibilní z hlediska

optimalizace. Pro analýzy velké série vzorků jsou pak vhodné at-line nebo nejlépe on-line úpravy. Speciálně u nich je však třeba počítat s náročnější optimalizací¹³⁷. Kromě úspory času přinášejí on-line úpravy vzorku i další výhody. Při analýze toxických vzorků je omezen jejich kontakt s personálem, lze analyzovat těžké analyty bez velkých ztrát a snížením kroků analýzy se redukuje spotřeba vzorku, zvyšuje citlivost a přesnost výsledků¹³⁷.

Spojení SPE-HPLC patří mezi nejrozšířenější on-line techniky. Podílí se na tom zejména jeho všestrannost, komerční dostupnost produktů, robustnost a flexibilita. Instrumentální uspořádání tvoří chromatografický systém, vybavený systémem pump zvlášť pro chromatografickou a zvlášť pro extrakční kolonu. SPE kolonka je zapojena do systému nejčastěji přes vícecestný ventil, který změnou své pozice přeměňuje toky mobilních fází¹³⁷. Po nástřiku vzorku je ventil v poloze A a kolonka je promývána mobilní fází takového složení, aby byly odstraněny nechtěné interference. Po přepnutí ventilu do polohy B dochází k eluci zachycených analytů eluční mobilní fází do chromatografické kolony a jejich následné separaci. Přenos zachycených látek z SPE kolonky může probíhat buď ve straight-flush nebo back-flush módu. Protože většina analytů je zachycena na začátku kolonky, back-flush mód zajišťuje efektivnější eluci, menší difúzi zakoncentrovaných zón a tím také předchází rozšiřování píků¹³⁸. Extrakční kolonky jsou zpravidla o rozměrech 10 až 20 mm x 1 až 4,6 mm a jsou plněny polymerními nebo silikagelovými sorbenty s povrchovými úpravami pro RP, NP, IE, RAM, MIP nebo IS extrakce. Pro zvýšení selektivity a přečištění vzorku je možné i zapojení několika různých kolonek za sebou¹³⁷.



Obrázek 10 Průběh a) on-line extrakce a b) následné separace v HPLC systému s přepínacím ventilem pro přesměrování průtoku mobilních fází.

Jak již bylo zmíněno, on-line techniky jsou náročnější na optimalizaci metody, protože se musí jednotlivé parametry nastavit tak, aby byly kompatibilní i s následnou analýzou. Stejně je tomu tak i u SPE-LC. Každopádně poté je systém plně automatický a čas, věnovaný optimalizaci se vrátí v podobě rychlé analýzy vyžadující minimální zásahy operátora. Při nastavování podmínek extrakce hrají důležitou roli dávkovaný objem vzorku, složení a objem promývací mobilní fáze daný dobou extrakce a průtokovou rychlostí, a složení eluční mobilní fáze ¹³⁷.

Při on-line extrakci je na chromatografickou kolonu dávkován celý extrakt. Tím je zajištěna vysoká citlivost, zároveň však může snadno dojít k překročení separační kapacity chromatografické kolony. Množství dávkovaného vzorku se tedy volí s ohledem na koncentraci analytu. Složení promývací mobilní fáze a její objem daný dobou extrakce a průtokovou rychlostí, musí zajistit dokonalé přečištění vzorku a zároveň předejít nechtěnému vymývání analytů. Jejich eluce je pak při on-line extrakci zajišťována pomocí mobilní fáze, jejíž složky se posléze použijí zároveň i pro separaci na chromatografické koloně. Proto je třeba zajistit její kompatibilitu s oběma stacionárními fázemi a vhodnou eluční sílu, aby nedocházelo k rozšiřování píků ¹³⁷.

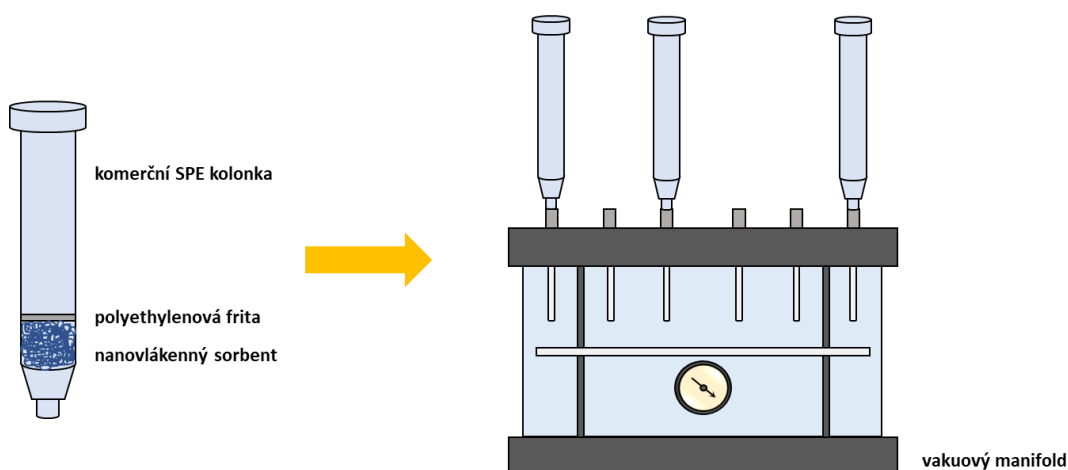
Automatizované spojení SPE a LC bylo použito již pro různé typy analýz zahrnujících potraviny, fosilní paliva, zemědělské vzorky, půdu, sedimenty, odpadní vody, rostlinný a biologický materiál ¹³⁹. U velmi komplexních matric může být problémem nedostatečné oddělení analytu od matrice vedoucí ke snížení citlivosti a/nebo ucpání analytického systému ¹³⁷. Řešením je buď přidání některé z off-line metod úpravy vzorku před vlastním nástřikem nebo již zmíněné spojení více kolonek za sebou jak popsal Boos et. al., který spojil RAM s MIP pro identifikaci tramadolu a paracetamolu v lidské plazmě ¹⁴⁰.

Ačkoli se SPE-LC považuje za moderní analytický přístup, samotné toto spojení se nevyhnulo další modernizaci a vývoji. Kromě neustálého vylepšování instrumentace se tyto změny týkají i SPE sorbentů. V současnosti pro tyto účely roste obliba materiálů založených na uhlíku ¹³⁷, nanomateriálech ⁷⁹ nebo monolitických sorbentech ¹³⁸. Ty rozšiřují aplikační portfolio této metody a dělají ji tak uživatelsky ještě atraktivnější.

3.4. Nanovláknenné extrakční sorbenty ve spojení s chromatografickou analýzou

Jak již nastínily kapitoly 3.1.6.4. a 3.2.5.3. nanovláknena se stávají stále častěji skloňovaným sorbentem v extrakčních metodách. Velmi populárním a velmi studovaným odvětvím je dnes jejich off-line a on-line spojení s kapalinovou chromatografií. Potenciál nanovláken jakožto extrakčních sorbentů je opět založen na jejich velkém specifickém povrchu, který umožňuje četné interakce s analytem. Výsledkem je vysoká adsorpční kapacita a prekoncentrační faktor. Různorodost polymerních materiálů a jejich relativně snadná strukturní modifikovatelnost vede k širokému spektru sorbentů využitelných v řadě extrakčních metod ¹⁴¹. I přes velmi slibné výsledky, jsou však zatím nanovláknenné sorbenty předmětem výzkumu a nelze se s nimi setkat v rutinních laboratořích.

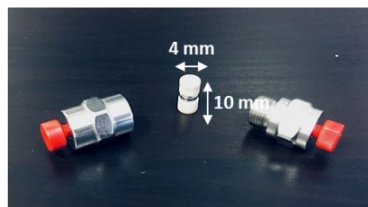
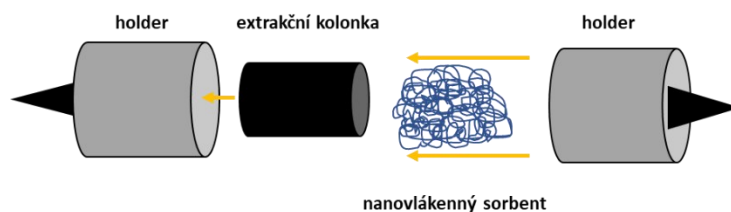
Většina doposud publikovaných prací o využití nanovláknenných polymerů se týká klasické off-line SPE nebo jejich miniaturizovaných formátů ^{8, 142}. Postup extrakce je obdobný jako u komerčních sorbentů jen extrakční jednotky bývají připravovány přímo v laboratořích sbalením vybraného nanovláknena do disků, kolonek, pipetovacích špiček či injekčních stříkaček. Pro tato uspořádání jsou výhodná vlákna vyrobená DCE. Ta nabízejí velkou sorpční plochu, díky níž i tenká vrstva vláken dokáže izolovat velké množství analytů. Pro rovnoměrný průtok bez výrazného zpětného tlaku je důležitá porozita materiálu (velikost mezivláknenných prostorů). Ta lze snadno ovlivnit vhodnou volbou viskozity roztoku, velikostí vloženého napětí a rychlosti sběru materiálu ¹⁴³. Navíc je elektrostatické zvlákňování nejuniverzálnější výrobní metoda, kterou lze zvláknit řada polymerů, vytvořit kompozitní materiály, nebo jejich povrchové modifikace ⁵⁶. Nanovláknenné polymerní sorbenty byly využity pro extrakci látek z environmentálních vzorků ⁷⁵, biologických vzorků ⁷⁷ a vzorků potravin ¹⁴⁴.



Obrázek 11 Off-line extrakce za využití ručně plněných kolonek nanovlákným sorbentem.

Díky všeobecnému analytickému trendu se však i v případě nanovláken pomalu přesouvá pozornost k extrakcím vzorků, které jsou on-line spojeny se separační metodou, nejčastěji v podobě HPLC nebo UHPLC systému. Zatím není toto spojení úplně bezchybné a vyžaduje delší fázi optimalizace extrakčního kroku, než je tomu u komerčních SPE kolonek. Výsledkem je však poměrně elegantní úprava vzorku, která oproti off-line uspořádání je rychlejší, spotřebovává méně rozpouštědel a poskytuje přesnější a opakovatelnější výsledky ¹⁴⁵.

Systém pro on-line spojení SPE s kapalinovou chromatografií byl popsán v kapitole 3.3.3. V případě extrakce na nanovlákněch zůstává uspořádání stejné. Izolace analytů probíhá v extrakční kolonce, která je místo komerčního sorbentu vyplněna zvoleným typem nanovlákného polymeru. Nejčastěji se používají kolonky z nerezové oceli nebo z PEEKu s rozměry 10 x 4.6 mm. Plnění nanovláknem probíhá ručně, kdy do vyprázdněné extrakční kolonky je napěchován nanovlákný materiál. Správnost naplnění kolonky je důležitým faktorem výrazně ovlivňujícím účinnost extrakce a také funkčnost celého systému. Kolonka musí být zcela vyplněna, aby byl minimalizován mrtvý objem. Zároveň však nesmí být přeplněna. Při velké náplni kolonek vzrůstá zpětný tlak, který může vést k podtékání kolonek a překročení tlakových limitů. Navíc extrakční účinnost sice vzrůstá s rostoucí náložkou nanovláken, ale jen do určitého bodu, od kterého už dosahuje plató fáze. Tento vztah byl popsán v práci Hákové a kol.¹⁴². Článek se také věnuje opakovatelnosti plnění. Ta může být dosažena hlídáním náložky vláken. Pro dosažení přesných a opakovatelných výsledků je tedy nutné věnovat přípravě kolonek dostatečnou pozornost a důležitou roli sehraje i zkušenost operátora.

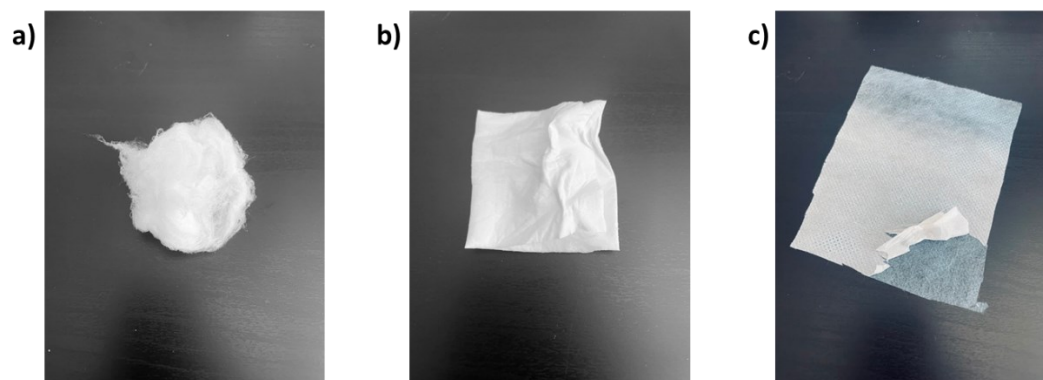


Obrázek 12 Plnění kolonky pro on-line extrakce nanovláknenným sorbentem.

Nejlepší způsob, jak dosáhnout spolehlivých výsledků s nanovláknennými sorbenty je však využít jejich prokázané znovupoužitelnosti. Bylo popsáno, že ani po 700 analýzách neztratila nanovláknena extrakční účinnost a nevykazovala výrazné makroskopické ani mikroskopické změny ¹⁴². Stejně odolné jsou i pro analýzu biologických vzorků s bílkovinnou maticí, kdy PCL bylo použito pro více než 300 analýz kravského mléka a lidského séra ¹⁴⁶. Opět nebyly pozorovány změny v extrakční účinnosti, symetrii píků nebo struktury materiálu.

Velký vliv na plnění kolonek a tím i na extrakční účinnost má výroba nanovláknenného sorbentu. Existují studie zabývající se srovnáním sorbentů připravených pomocí DCE, ACE, MB a kombinace MB s DCE ^{147, 148}. Je třeba vzít v potaz konkrétní polymer a výrobní parametry použité pro jeho zvláknění, ale obecně se vlákna vyrobená DCE jeví jako nejméně vhodná pro on-line extrakce. Materiály z DCE mají formát málo porézního „sheetu“ (2D struktura), který zároveň není ani příliš mechanicky odolný. Vlivem vysokého zpětného tlaku v chromatografickém systému pak dochází k jeho deformaci v kolonce. Vznikají mrtvé objemy ovlivňující rovnoměrný průtok mobilní fáze a výrazně se tak snižuje efektivita extrakce. Ta se projevuje nejen sníženou extrakční účinností, ale i zhoršenou symetrií píků a neopakovatelností výsledků. ACE díky větším průměrům vláken je na tom s mechanickou odolností o něco lépe, ale pro SPE v on-line spojení s HPLC/UHPLC se nejlépe osvědčila meltblown technologie. Výstupem je materiál 3D struktury, který se snadno plní do kolonek, a díky širšímu průměru vláken je dostatečně odolný vůči vysokému tlaku. Extrakční kolonka zůstává rovnoměrně vyplněna po celou dobu extrakce a mobilní fáze unášející analyty může sorbentem rovnoměrně protékat skrz

velké mezivláknenné prostory (póry). Podobné vlastnosti má kompozitní materiál složený z mikro- a nanovláken stejného polymeru ¹⁴⁷.



Obrázek 13 Vlákna vyrobená pomocí technologie a) meltblown, b) elektrostatičkého zvláknění využívající střídavý proud, c) elektrostatičkého zvláknění využívající stejnosměrný proud.

Dalším parametrem sorbentu, který také ovlivní extrakci, je kromě výroby i typ použitého polymeru. V mém článku ¹⁴⁹ je provedena přehledová studie o extrakčních účinnostech osmi polymerů pro osm různých analytů. Mimo jiné z výsledků vyplývá, že nanovláknenné polymery jsou vhodné zejména pro lipofilnější analyty ($\log P > 2$), což potvrzují i výsledky studie na insekticidech, kde hydrofilnější analyty byly extrahovány hůře než ty lipofilní ⁷⁹. Dalším závěrem je, že polymery vykazují jistou selektivitu. Jinými slovy, různé polymery jsou různě účinné pro různé analyty. Tato selektivita může být ovlivněna coatingem sorbentu ¹⁵⁰, příměsí iontoměničů ¹⁴⁸, či jiných látek. Specifické extrakce pak může být dosaženo kombinací nanovláken s MIP.

Jak již bylo zmíněno v kapitole 3.3.3., on-line SPE je náročnější na optimalizaci, kompatibilitu a synchronizaci extrakčního a separačního kroku. Stejně tak tomu je i při využití nanovláknenných sorbentů. Článek Hákové a kol. ⁷⁹ pojednává o vlivu délky extrakčního kroku, typu mobilní fáze a rychlosti jejího průtoku na nanovláknennou extrakci. Obecně je důležité extrakční krok nastavit tak, že je odstraněna matrice vzorku a zároveň je maximální množství analytu zadrženo na sorbentu. Nastavené podmínky (zejména složení mobilní fáze) pak musí být kompatibilní s podmínkami v separačním kroku.

V oblasti nanovláknenných sorbentů jak pro off-line tak on-line extrakce bylo dosaženo za poslední desetiletí velkých pokroků. Byla potvrzena linearita, přesnost a opakovatelnost měření pro koncentrační hladiny v řádech jednotek až stovek mikrogramů. Ve srovnáních dosahovaly nanovláknenné sorbenty podobné extrakční účinnosti jako ty komerční ^{75, 151, 152}. Většina významných prací tohoto směru je přehledně

shrnutí v review Hákové a kol. ¹⁴¹. Lze pozorovat postupný vývoj od jednoduchých materiálů po jejich směsi a povrchové modifikace. V současnosti jsou velmi populární kompozitní materiály ⁷⁵, kombinace nanovláken s nanočásticemi ¹⁵³, uhlíková nanovlákná a nanovlákná použitá jako nosiče pro MIP ¹⁵⁴. Experimentuje se v oblasti různých druhů výrob nanovláknenných materiálů a následně se sleduje vliv na extrakční účinnost. Je zřejmé, že se zdaleka nejedná o vyčerpané téma a existuje řada možností a směrů, kterými se nanovlákná mohou ubírat. V závislosti na současných trendech v analytické chemii se dají předpokládat pokroky v selektivitě, miniaturizaci a ekologické udržitelnosti nanovláknenných extrakcí.

Tato práce vychází, navazuje a doplňuje získané poznatky o využití nanovláknenných sorbentů v SPE pro úpravu vzorků před chromatografickou analýzou. Mezi nejvíce studované polymery patřily polyamid 6, poly-ε-kaprolakton a jejich modifikace.

4. KOMENTÁŘ K EXPERIMENTÁLNÍM PRACÍM

4.1. Testing of nylon 6 nanofibers with different surface densities as sorbents for solid phase extraction and their selectivity comparison with commercial sorbent

V první práci byla polyamidová nanovlákna testována jako sorbent pro off-line SPE za využití extrakčních kolonek. Cílem bylo především seznámení se s extrakčními vlastnostmi nanovláken a faktory ovlivňujícími extrakční proces a extrakční účinnost. Nanovláknový sorbent byl připraven z nylonu 6 pomocí bezjehlového elektrospinningu, konkrétně technologií Nanospider™. Různým nastavením podmínek výroby byly získány materiály lišící se povrchovou hustotou – typ A 5,04 g. m⁻², typ B 3,90 g. m⁻² a typ C 0,75 g. m⁻². Ty byly manuálně naplněny do prázdných SPE kolonek a překryty polypropylenovou fritou. Takto připravené nanovláknové kolonky se lišily svým rozměrem, navázkou použitých vláken a způsobem plnění.



Obrázek 14 Manuálně plněné kolonky nanovláknovým sorbentem využívané pro off-line extrakce.

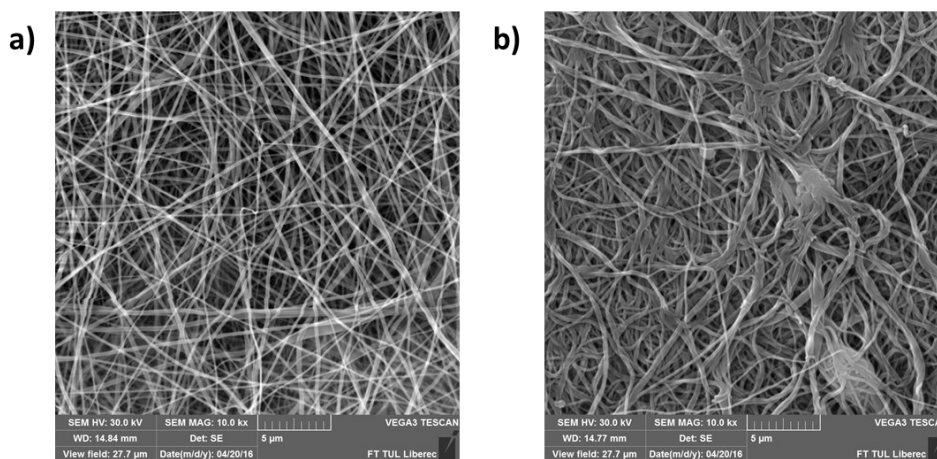
Vliv těchto proměnných byl v rámci experimentu sledován. Na základě těchto pozorování lze říci, že (a) rozměry kolonky pro extrakci stejného objemu vzorku nehrají roli, (b) způsob plnění kolonky výrazně ovlivňuje zpětný tlak, konvektivitu průtoku a tím i extrakční účinnost, (c) vyšší povrchová hustota a navážka vláken zlepšují extrakční účinnost za současného zvýšení zpětného tlaku, (d) zároveň hustota zvláknění má vyšší vliv na extrakci než množství sorbentu v cartridge.

Nanovláknový sorbent byl použit pro extrakci analytů ze skupiny parabenů, steroidních sloučenin, flavonoidů a pesticidů. Extrakční proces byl prováděn na SPE manifoldu a zahrnoval kondicionaci, promytí, nanesení vzorku, vymytí matrice a eluci analytů jako při konvenční SPE. Obsah extrahovaných analytů byl následně stanoven HPLC s UV detekcí. Na základě extrakční účinnosti, která byla stanovena jako procentuální

poměr plochy píků standardu bez extrakce a po extrakci, byl hodnocen vliv vlastností látek na jejich retenci. Konkrétně se sledovala lipofilita, pH, charakteristické strukturní rysy a molekulová hmotnost. Z těchto pokusů bylo zjištěno, že (a) extrakční účinnost roste s rostoucí lipofilitou látek, (b) pH roztoku výrazně neovlivňuje extrakční účinnost, (c) nylon 6 zadržuje lépe látky s fenolickou skupinou, (d) molekulová hmotnost látek pravděpodobně nehraje při retenci významnou roli.

Všechny extrakce byly prováděny třikrát pro zhodnocení opakovatelnosti (intra-day precision). Všech 25 testovaných látek bylo izolováno na třech různých cartridgích s relativní směrodatnou odchylkou (RSD) v rozmezí 0,58% až 11,87%. Steroidní sloučeniny pak byly navíc měřeny ve třech po sobě jdoucích dnech pro stanovení mezilehlé přesnosti (inter-day precision), jež nabývala hodnot 3,86% až 9,79%.

Dalším důležitým bodem bylo hodnocení stability nanovláčenného sorbentu. V průběhu celého experimentu byly používány stále stejné kolonky, aniž by byly pozorovány makroskopické změny nebo pokles extrakční účinnosti. Nylonová nanovláčka vydržela použití běžných organických rozpouštědel jako je acetonitril, methanol a dimethylsulfoxid, pH 3,5; 5 a 7. Po skončení studie byla vlákna sledována pod elektronovým mikroskopem. Z obrázku 15 je patrné bobtnání vláken, které však nevedlo ke změnám ve výtěžnosti analytů nebo jakémukoli negativnímu ovlivnění extrakčního procesu.



Obrázek 15 Snímky nanovláčenného sorbentu PA6 pořízené elektronovým mikroskopem a) před extrakcemi na začátku experimentu, b) po extrakcích na konci experimentu.

Všechny zkoušené skupiny látek byly extrahovány i pomocí komerčního Oasis HLB sorbentu. Kombinace chemicky stabilních polymerů s vyváženými hydrofilně-lipofilními vlastnostmi je vhodná pro většinu laboratorních aplikací. To se projevilo i v našich

experimentech, kdy pro většinu analytů byla dosažena 90% až 105% výtěžnost. Jedinou výjimku tvořily pesticidy permethrin a hydroxypyren, jež byly extrahovány s 64% a 71% účinností. Příčinou je pravděpodobně jejich vysoká lipofilita, díky které se je buď nepodařilo účinně eluovat, nebo byla překročena jejich rozpustnost v promývací fázi. Oasis HLB kolony jsou navrženy pouze na jedno použití, což se s rostoucím tlakem na snižování nákladů a udržitelnost i v rámci vědy jeví jako stále větší nevýhoda.

Tabulka 3 Přehled extrakční účinnosti nanovlákných kolonek a komerční kolony Oasis HLB vyjádřené jako výtěžnost analytů v %.

| | Analyt | Typ A | Typ B | Typ C | Oasis HLB |
|--------------------------|------------------------------|--------------|--------------|--------------|------------------|
| <i>Parabeny</i> | methylparaben | 50 | 17 | 34 | 109 |
| | ethylparaben | 73 | 26 | 46 | 106 |
| | propylparaben | 94 | 30 | 64 | 99 |
| | butylparaben | 100 | 36 | 76 | 92 |
| <i>Flavonoidy</i> | rutin | 91 | 32 | 113 | 110 |
| | naringin | 79 | 30 | 109 | 113 |
| | naringenin | 100 | 38 | 95 | 109 |
| | hesperidin | 136 | 35 | 114 | 99 |
| | hesperetin | 99 | 40 | 92 | 79 |
| | kempferol | 93 | 31 | 111 | 103 |
| | luteolin | 103 | 31 | 123 | 106 |
| | quercetin | 135 | 41 | 120 | 104 |
| <i>Steroidní hormony</i> | triamcinolon | 24 | 16 | 48 | 117 |
| | hydrokortizon | 32 | 18 | 51 | 117 |
| | triamcinolon-acetonid | 60 | 22 | 38 | 101 |
| | hydrokortizon-acetát | 65 | 24 | 40 | 97 |
| | estradiol | 78 | 33 | 96 | 110 |
| | testosteron | 70 | 25 | 45 | 90 |
| | ethinylestradiol | 86 | 36 | 101 | 113 |
| | estradiol | 74 | 32 | 89 | 99 |
| | progesteron | 100 | 36 | 60 | 108 |
| <i>Pesticidy</i> | fenoxy carb | 58 | 28 | 85 | 85 |
| | trans-permethrin | 36 | 27 | 76 | 48 |
| | cis-permethrin | 36 | 28 | 81 | 48 |
| | hydroxypyren | 72 | 29 | 86 | 66 |

Tato studie nám poskytla základní představu o tom, jaké jsou benefity a limitace SPE pomocí nylonových nanovláken. Nylon 6 se ukázal jako mechanicky i chemicky stabilní a opakovaně použitelný sorbent vykazující známky selektivity pro určité skupiny látek. Získané poznatky o plnění cartridgí a celkovém chování nanovlákného sorbentu poskytly základ dalších studií. Zároveň nás tento projekt přivedl k myšlence přejít na on-line SPE. Základní premisou bylo dosáhnout rychlejší analýzy s vyšší citlivostí a lepší

opakovatelností. Navíc se jednalo o inovativní přístup lépe následující současné analytické trendy. V roce 2018 pak byla práce vydána časopisem Talanta ¹⁵⁵.

4.2. Poly- ϵ -caprolactone nanofibrous polymers: a simple alternative to restricted access media for extraction of small molecules from biological matrixes

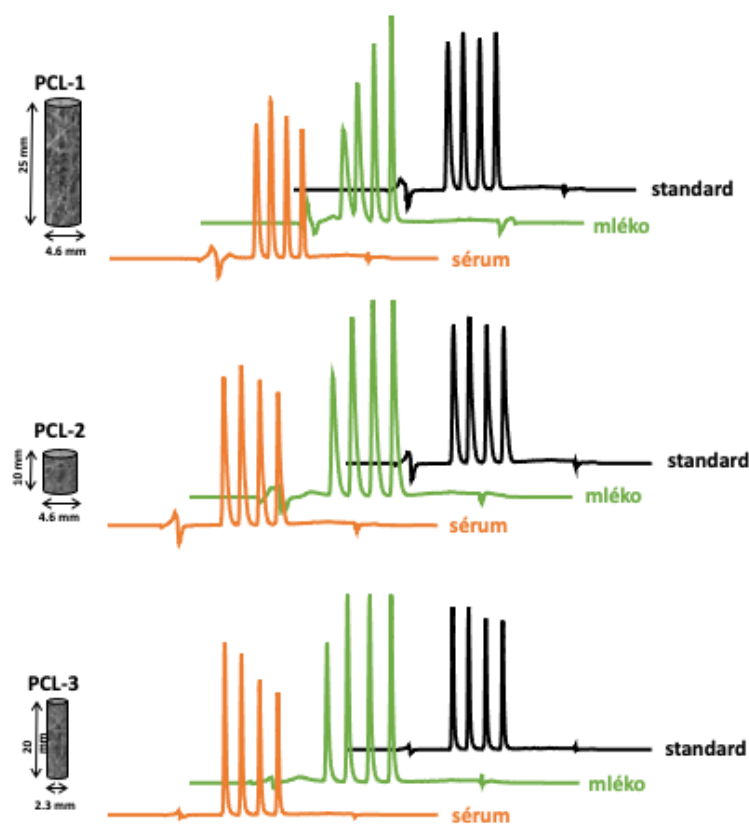
Ze získaných poznatků pro on-line spojení nanovláknenné extrakce s kapalinovou chromatografií poskytovaly testované nanovláknenné polymery slibné výsledky pro izolaci analytů z roztoku standardů nebo environmentálních vzorků¹⁴⁵. Začala se tedy nabízet otázka, jak by se nanovláknena osvědčila pro vzorky biologické. Ty často představují složité matrice, kde obsah zejména vysokomolekulárních látek (lipidy, proteiny) znesnadňuje stanovení analytu. Často tedy musí biologické matrice procházet náročnou, několikakrokovou úpravou, aby tyto interferující látky byly odstraněny. Jedno z řešení, jak manipulaci s biologickými vzorky usnadnit a urychlit, je využití materiálů (médií) s omezeným přístupem, které byly popsány v kapitole 3.2.5.3. Jejich unikátní struktura umožňuje přímý nástřik biologických matic do chromatografického systému, izolaci analytů, jejich separaci a identifikaci s minimálním zásahem operátora. Pokud by se prokázalo, že nanovláknena mohou fungovat podobným způsobem, překlenuly by se některé nevýhody klasických RAM jako je úzké portfolio, náročná výroba, vysoká cena a horší chemická stabilita silikagelových sorbentů⁸⁷.

Schopnost extrahovat nízkomolekulární analyty z biologických matic byla zkoušena pro kompozitní materiál kombinující vlákna PCL připravené MB a DCE. Tento kompozit pro nás představoval revoluci v on-line extrakcích. Jeho 3D struktura zajišťuje rovnoměrnější a opakovatelnější plnění cartridge než doposud používané 2D materiály. Jemná vlákna z DCE jsou podpírána silnějšími meltblownovými a sorbent tak lépe odolává vysokým tlakům při analýze. 3D struktura sorbentu byla také základním předpokladem, na kterém byla vystavěna naše domněnka o podobnosti nanovláken s RAM. Předpokládali jsme, že prostory mezi vlákny jsou dostatečně velké pro odstranění balastních makromolekul na základě síťového efektu. Zároveň jejich úzký průměr neumožňuje makromolekulám dostatek styčných ploch, na které by se případně mohly adsorbovat prostřednictvím hydrofobních nebo hydrofilních interakcí.

Hlavním cílem této studie tedy bylo ověřit naši domněnku a otestovat kompozitní materiál tvořený mikro- a nanovláknny z PCL pro extrakce analytů ze dvou biologických matic. Jako modelové analyty byly pro studii vybrány methyl-, ethyl-, propyl- a butylparaben. Ty byly přidány do matrice kravského mléka a lyofilizovaného lidského

séra po jeho rekonstituci. Obě matrice obsahují mezi jiným i vysoký obsah proteinů, pro jejichž odstranění jsou RAM primárně konstruovány. Pro ověření účinnosti nanovláken a schopnosti tyto makromolekuly odstranit byl použit roztok hovězího sérového albuminu (BSA). Ten byl dávkován na nanovláknou vyplněnou extrakční kolonku, zapojenou v chromatografu bez analytické kolony. Záznam z UV spektrofotometru, který byl přímo spojen s kolonkou, prokázal vymytí většiny proteinů během 1 minuty. Výsledky byly srovnatelné s komerční RAM kolonkou ADS RP-C18, která se využívá pro přímou analýzu biologických vzorků.

Na základě těchto výsledků se pokračovalo s on-line extrakcemi matricových vzorků, které před analýzou prošly jen minimální úpravou spočívající v centrifugaci. Pro extrakci byly testovány tři různé rozměry extrakčních kolonek značených jako PCL 1 (4,6 x 25 mm), PCL 2 (4,6 x 10 mm) a PCL 3 (2,3 x 20 mm). Hodnotila se extrakční účinnost jako výtěžnost jednotlivých analytů ve srovnání s jejich směsným standardem v 50% methanolu. Dále se sledoval tvar píků, přítomnost interferencí v chromatogramu, linearita, opakovatelnost nástřihu, zpětný tlak během extrakce a obecně manipulace s kolonkami.



Obrázek 16 Chromatogramy spikovaného séra a mléka ve srovnání se standardním roztokem parabenů pro jednotlivé extrakční kolonky. Pořadí píků: methylparaben, ethylparaben, propylparaben, butylparaben.

Ze získaných výsledků vyplývá, že kompozitní PCL materiál může být použit jako levnější varianta materiálů s omezeným přístupem pro extrakci nízkomolekulárních analytů z matric bohatých na bílkoviny. U mléka byla extrakce na PCL 1 a PCL 3 místy ovlivněna interferencemi, které se nepodařilo dokonale odstranit. Projevilo se to ve vyšší extrakční účinnosti, zhoršeném tvaru píků a u PCL 3 i nárůstem zpětného tlaku, signalizujícím možné zanesení extrakční kolonky. U séra žádný z těchto fenoménů pozorován nebyl. Z testovaných rozměrů kolonek se tedy jako ideální jeví PCL 2 (10 x 4,6 mm), který zajišťuje extrakční účinnost v rozmezí 90 – 100%, vhodný průtok mobilní fáze bez výrazného zpětného tlaku a podporuje dostatečné přečištění vzorku od proteinů, respektive dalších makromolekul. Náplně jednotlivých kolonek, nebyly vyměněny po celou dobu experimentu. Na každé tedy bylo provedeno kolem 300 extrakcí, aniž by došlo ke změnám v extrakční účinnosti, symetrii píků, nebo makroskopické či mikroskopické struktury sorbentu. Práce byla přijata do časopisu *Analytical Chemistry* ¹⁴⁶.

4.3. The role of pKa, log P of analytes, and protein matrix in solid-phase extraction using native and coated nanofibrous and microfibrinous polymers prepared via meltblowing and combined meltblowing/electrospinning technologies

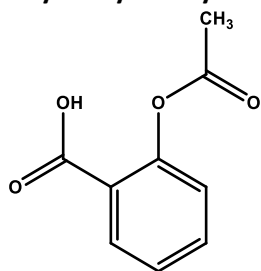
Představování nových typů nanovlákných polymerů pro on-line či off-line extrakce na nanovlákných materiálech se stává stále častějším námětem vědeckých publikací. Podrobnější zmínka o vlastním extrakčním mechanismu a faktorech, které jej ovlivňují, však zatím chybí. Stejně tak jsme nenarazili na podrobnější screening nanovlákných materiálů popisujících jejich extrakční účinnost pro různé analyty. Obojí by výrazně přispělo k vývoji a optimalizaci nanovlákné SPE.

Cílem této práce bylo tedy definovat extrakční mechanismus nanovlákné extrakce a sledovat jeho ovlivnění matricí vzorku a fyzikálně-chemickými vlastnostmi analytů. Pro tyto účely byly vybrány nanovlákné polymery kyselina polymléčná, kyselina poly-3-hydroxymáselná, polyethylen, polypropylen, poly- ϵ -kaprolakton a poly- ϵ -kaprolakton potažený taninem, dopaminem a kombinací dopaminu s heparinem. Sorbenty byly připraveny buď MB nebo kombinací DCE s MB. Hlavní sledovanou proměnou byl u nich kontaktní úhel popisující lipofilitu daných materiálů.

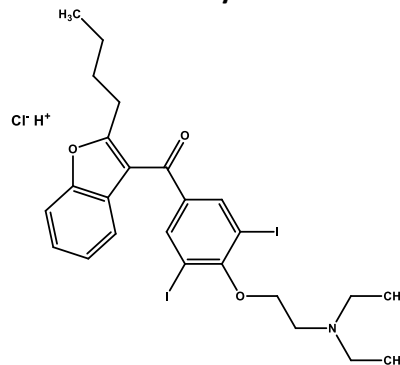
V on-line spojení extrakční kolony s chromatografickým systémem bylo na těchto polymerech izolováno osm analytů. Ty byly vybrány tak, aby pokrývali co nejširší rozsah pKa a log P pro stanovení vlivu těchto hodnot na extrakci. Ten byl odvozen ze změn v extrakční účinnosti látek. Pro studii sledující vliv log P byl jako extrakční mobilní fáze použit 5% methanol. Aby se projevil náboj analytů a tím vliv jejich pKa na extrakci, bylo pH této mobilní fáze upraveno na hodnoty 2, 7,5 a 9. Výtěžnost analytů byla vztažena k roztoku standardu, který neprodělal extrakci.

Tabulka 4 Přehled vybraných analytů, jejich struktur a hodnot pKa a log P.

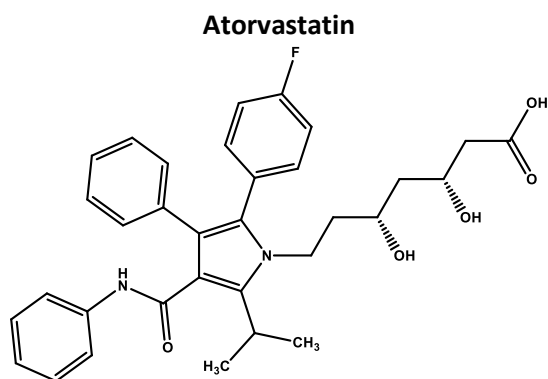
Acetylsalicylová kyselina



Amiodaron-hydrochlorid

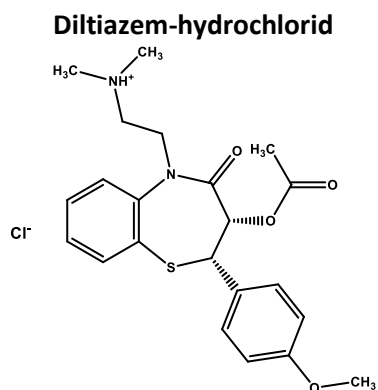


pKa 3.41
log P 1.238

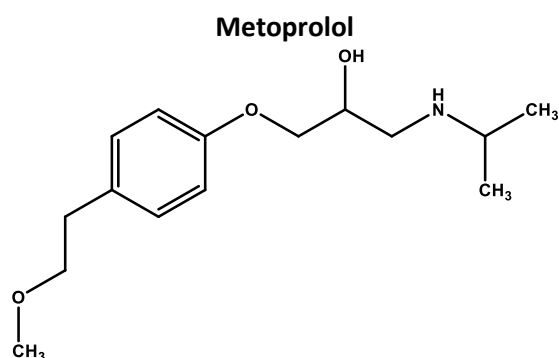


pKa 4.31
log P 5.387

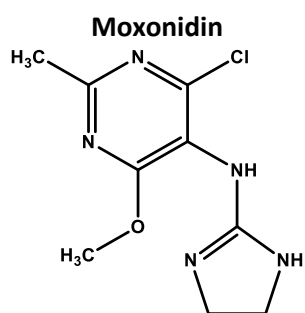
pKa 9.08
log P 7.635



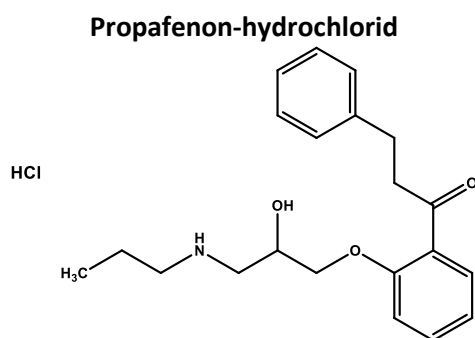
pKa 8.18
log P 2.727



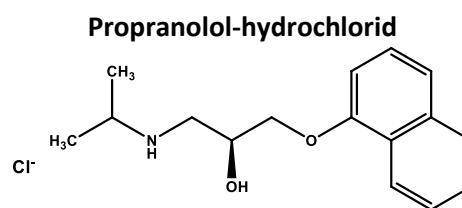
pKa 9.67
log P 1.759



pKa 7.26
log P 1.539



pKa 9.72
log P 3.537



pKa 9.67
log P 2.584

Kromě methanolickeho roztoku standardů, byly tyto látky extrahovány z roztoku BSA a lidského séra. Zde byla výtěžnost analytů vztažena k výsledkům, kdy byla pro extrakci matric použita komerční RAM kolona.

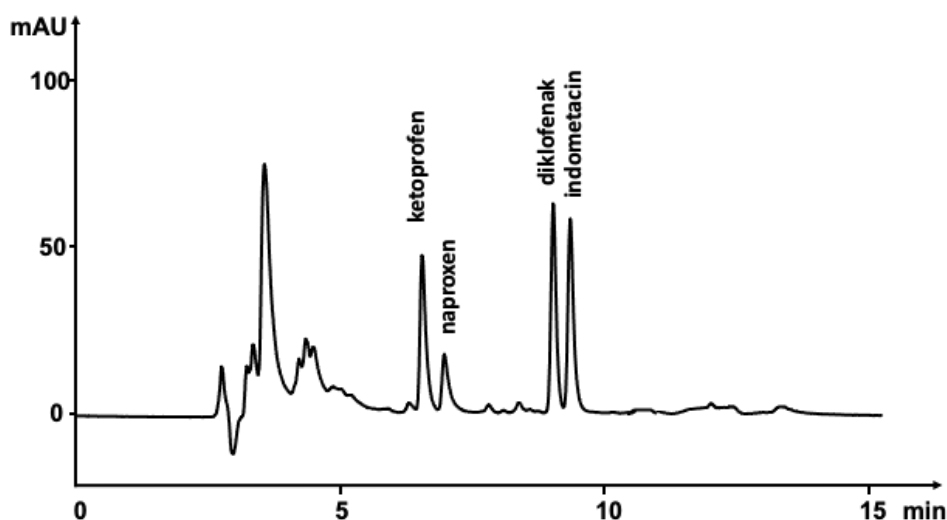
Na základě výsledků této studie se testované vlákenné polymery jeví jako vhodné extrakční sorbenty pro analyty, jejichž $\log P > 2$. Látky s nižšími hodnotami $\log P$ vykazovaly během experimentu pouze nízkou a často neopakovatelnou retenci na sorbentu. Nebyl prokázán významný vliv náboje silné kyseliny v zásaditém pH nebo slabé kyseliny v kyselém pH na základě jejich hodnot pK_a . Z tohoto důvodu lze předpokládat, že extrakce analytů probíhá především na základě adsorpčního mechanismu, kde hlavní roli hraje lipofilita látek a sorbentu. Všechny sorbenty prokázaly, že jsou schopny odstranit proteiny z biologických matric s účinností srovnatelnou s komerčním RAM. Každý ze sorbentů byl použit zhruba pro 70 analýz, během nichž nebyly zaznamenány žádné změny extrakční účinnosti nebo struktury materiálu. Práce byla publikována v roce 2021 v časopise *Talanta* ¹⁴⁹.

4.4. Polycaprolactone composite micro/nanofibrous material as an alternative to restricted access media for direct extraction and separation of non-steroidal anti-inflammatory drugs from human serum using column-switching chromatography

Úkolem této práce bylo využít doposud získané poznatky o nanovlákněných sorbentech v praxi. Výsledkem byla metoda pro on-line extrakci nesteroidních antiflogistik ze vzorků lidského séra. Jako nanovlákněný sorbent byl použit kompozitní PCL, který se v publikaci uvedené v kapitole 4.2. osvědčil pro extrakce analytů z bílkovinných matic¹⁴⁶. Sorbent byl naplněn do PEEKové extrakční kolonky s rozměry 10 x 4.6 mm, jejíž výběr vyplýval z téže práce. Extrahovanými analyty byly naproxen (NAP), ketoprofen (KET), diklofenak (DCF) a indometacin (IND), které byly spikovány do roztoku lidského séra. To bylo připraveno z lyofilizátu dle pokynů výrobce a následně desetkrát naředěno.

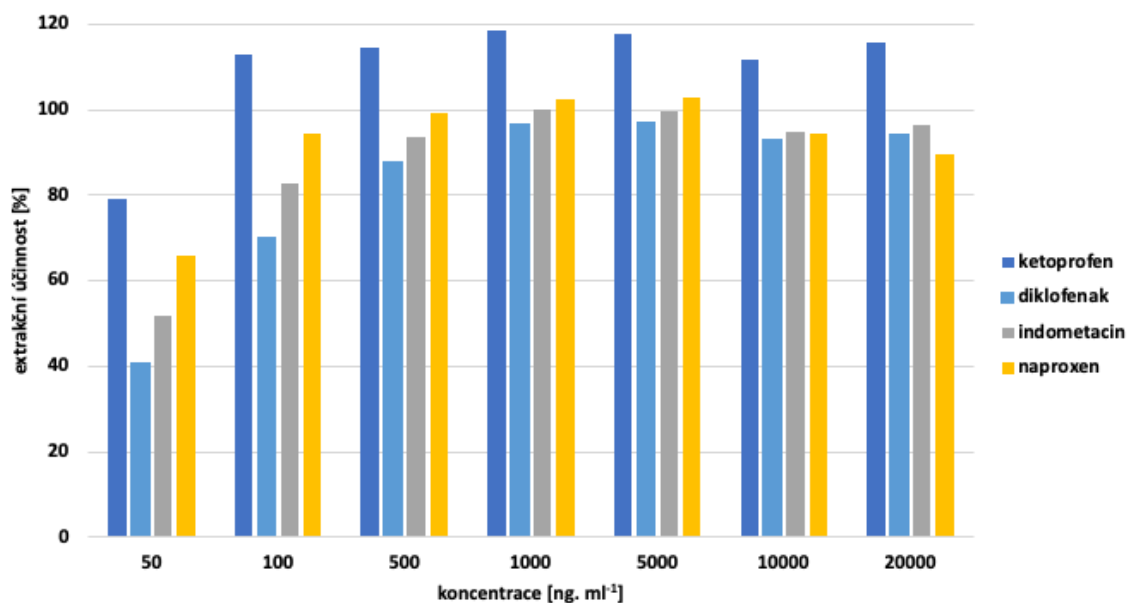
Jako optimální extrakční podmínky pro dávkovaný objem 100 μ l se ukázalo použití 10% acetonitrilu (ACN) v 0,085% kyselině fosforečné po dobu 1,5 minuty a průtokové rychlosti 1 ml. min^{-1} . Tímto bylo zajištěno dostatečné přečištění matrice od makromolekulárních interferencí (proteinů) a zároveň nedocházelo k výraznému vymývání analytů ze sorbentu. V případě objemu dávkovaného vzorku $\leq 50 \mu\text{l}$ může být délka promývací fáze při zachování průtokové rychlosti zkrácena na 1 minutu. Naopak při navýšení nástřiku nad 100 μ l by se musela extrakce prodloužit na 2 minuty, aby byl vzorek dokonale přečištěn od proteinové matrice. Při takto dlouhé extrakci však již docházelo k příliš velkým ztrátám zachycených analytů. Důvodem pro testování různých dávkovaných objemů byla za prvé snaha o nalezení limitů extrakční kolonky a za druhé dosažení vyšší citlivosti pro reálné vzorky séra, kde se analyty nacházely ve velmi nízkých koncentracích.

Pro navazující separační krok byla testována pentafluorofenylová a amidová kolona, přičemž amidické skupiny se nakonec ukázaly pro separaci vybraných NSAID jako výhodnější. Jako mobilní fáze byla použita směs ACN a 0,085% kyseliny fosforečné, jejichž poměry se v průběhu separace gradientově měnily. Analyty byly separovány během 10,5 minut a pak následovala re-ekvilibrace kolony v délce 3 minut. I s extrakcí trvala celá analýza 15 minut.



Obrázek 17 Chromatogram spikovaného séra po on-line extrakci modelových analytů ze skupiny nesteroidních antiflogistik.

Po optimalizaci analytické metody se ověřovala extrakční účinnost kompozitního PCL pro analyty v biologické matrici. Výtěžnost analytů, získaná extrakcí 50, 100, 500, 1 000, 5 000, 10 000 a 20 000 ng. ml⁻¹ analytů v séru byla srovnána s výtěžností analytů přítomných ve stejných koncentracích v roztoku rozpouštědla. Z obrázku 18 vyplývá pravděpodobná koeluce interferencí s píkem ketoprofenu (výtěžnost nad 100 %) a pokles citlivosti metody pro koncentrace < 500 ng. ml⁻¹ (výtěžnost pod 80 %). V ostatních případech výtěžnost analytů ze séra byla vyšší než 80%, což jsme považovali za uspokojivý výsledek.

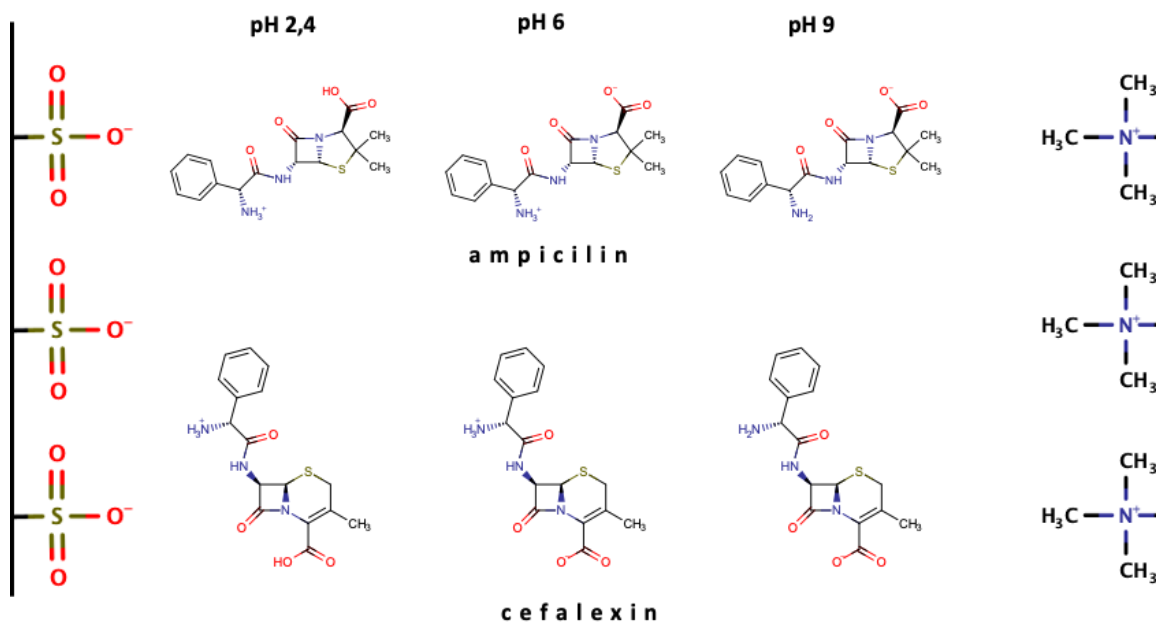


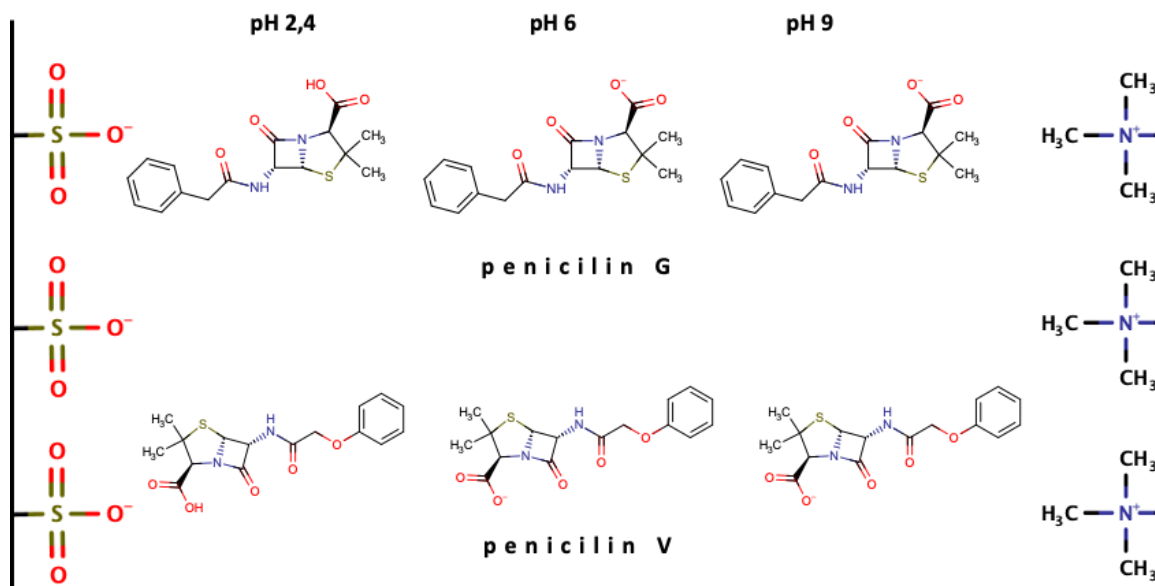
Obrázek 18 Grafické znázornění extrakční účinnosti kompozitního mikro/nano PCL pro různé koncentrace stanovovaných nesteroidních antiflogistik v lidském séru.

Tato vyvinutá metoda byla validována podle ICH Q2 R1 a byl proveden test způsobilosti chromatografického systému podle stejného doporučení. Následně pak byla použita pro stanovení diklofenaku z reálného vzorku séra získaného ve spolupráci s Fakultní nemocnicí Hradec Králové. V něm se podařilo identifikovat pík diklofenaku na základě retenčního času a UV spektra. Pomocí plochy píku pak byla provedena kvantifikace diklofenaku v krvi pacienta. Článek byl přijat k publikaci v časopise Nanomaterials v roce 2021 ¹⁵⁶.

4.5. Native nanofibers prepared using alternating-current electrospinning and their counterparts modified with quarternary salts applied for on-line extraction of β -lactam antibiotics

Dalším zajímavým směrem a zároveň i logickým navázáním na předchozí studie je modifikace povrchu nanovláken. Modifikovaná nanovlákna mohou být pak využívána pro citlivější a selektivnější extrakce analytů^{157, 158}. Snaha o změnu vlastností vláken za účelem extrakce hydrofilních analytů byla popsána v kapitole 4.3. V této studii byla připravena a popsána vlákna, která na svém povrchu nesla kladně nebo záporně nabitě funkční skupiny. Ty měly zajistit extrakci značně hydrofilních β -laktamových antibiotik, která by namísto klasického adsorpčního mechanismu probíhala jako iontová výměna. Původní polyamidová vlákna (PA 6) byla obohacena silným anexam v podobě tetramethylammonium-chloridu (TMAC) a katexem – sulfobetainem (SB). Tyto látky měly za úkol poskytnout potřebné protiionty pro ampicilin, cefalexin, penicilin G a penicilin V. U nich se předpokládal kladný nebo záporný náboj v závislosti na zvoleném pH extrakční mobilní fáze.





Obrázek 19 Rozložení nábojů ve struktuře β-laktamových antibiotik při pH 2,4, 6 a 9 a jejich možné interakce s nanovláknennými sorbenty obohacenými sulfobetainem a tetramethylammonium-chloridem. Zdroj sloučenin: <https://chemicalize.com/app/calculation/> [Internet, 27.6.2021].

Jako první se se řešila otázka vlivu obsahu solí na extrakční účinnost. TMAC byl přidán do vláken v 3% a 5% (w/w) koncentraci, SB pak tvořil buď 3%, 5%, anebo 7% hmotnosti polyamidových vláken. Další navyšování jejich koncentrací nebylo možné, jelikož by došlo k negativnímu ovlivnění zvláknovacího procesu. Ukázalo se však, že vyšší přídavek solí není třeba. Nejlepší extrakční účinnosti totiž dosahovaly sorbenty se 3% TMAC a 5% SB.

Tyto výsledky byly srovnány s nemodifikovaným sorbentem. Přídavek TMAC se nejvíce projevil při extrakci penicilinu G a penicilinu V, kdy se v prvním případě zvýšila extrakční účinnost o 459% a ve druhém o 342%. SB zlepšil výtěžnost i pro ampicilin a cefalexin, kde u předchozího sorbentu zůstávaly hodnoty výtěžnosti velmi podobné nemodifikovanému PA 6. 5% SB je však extrahoval skoro dvakrát účinněji (200% pro ampicilin a 179% pro cefalexin). Extrakční účinnost penicilinu G se pak pohybovala okolo 343% a pro penicilin V dosáhla hodnoty 252%. Kromě vyšší výtěžnosti lze z výsledků vyčíst i jistou selektivitu vláken pro odlišné analyty.

V předchozím případě extrakce analytů probíhala při pH 2,4 a pravděpodobně se zde uplatnil adsorpční mechanismus. Pozorované zlepšení extrakční účinnosti lze odůvodnit zvýšenou hydrofilitou vláken po přidavku solí. Vliv hydrofility vláken na extrakci byl podrobněji popsán zde ¹⁴⁹. Pro ověření možnosti izolace analytů prostřednictvím iontových interakcí mezi nimi a sorbentem, byla extrakce antibiotik provedena při třech

různých pH. Extrakční mobilní fáze byla upravena na hodnoty 6 a 9. Předpokládalo se, že kladně nabitý 3% TMAC bude všechny analyty extrahovat účinněji při $\text{pH} \geq 6$, protože ponesou záporný náboj. Na 5% SB by pak měly být lépe zadržovány pomocí negativně nabitě sulfonové skupiny ampicilin a cefalexin nesoucí kladný náboj při $\text{pH} \leq 6$. Bohužel výsledky tento předpoklad nepotvrdily. Na obou sorbentech bylo dosaženo nejvyšší extrakční účinnosti všech analytů při původně zvoleném $\text{pH} 2,4$.

Dosažené výsledky s PA 6 a 3% TMAC a 5% SB byly srovnány s komerčním C 18 sorbentem. Ten se pro tuto aplikaci ukázal jako nejlepší volba. Srovnatelných výsledků bylo dosaženo pouze na 3% TMAC pro penicilin G a penicilin V.

Dalším aspektem, který byl v této studii sledován, byla technologie přípravy vláken a její vliv na proces on-line extrakce. Nanovlákněné sorbenty byly připraveny pomocí ACE. Tento typ elektrostatického zvlákňování vytváří nanovlákná s větším průměrem a mezivlákněnými prostory, než je tomu u klasického DCE. I přes to však vlákna neměla dostatečnou mechanickou odolnost vůči vysokému zpětnému tlaku v chromatografickém systému. Pro dosažení opakovatelných výsledků tedy musel být kladen velký důraz na techniku plnění. Při nedostatečně vyplněné extrakční kolonce se vlákna hroutila a mobilní fáze tak nemohly rovnoměrně protékat skrz jejich strukturu. Docházelo tak k obtékání sorbentu a nedokonalé extrakci. Pokud naopak byla kolonka přeplněná, projevilo se to vysokým zpětným tlakem a opět nerovnoměrným průtokem mobilní fáze.

Vzhledem k nedostatečnému množství výsledků a nedokonalé charakterizaci použitých vláken tato práce nebyla nikdy publikována. Rozhodla jsem se ji však uvést v této disertační práci, protože z mého pohledu přináší některé zajímavé poznatky, ze kterých jsem čerpala při vypracovávání jiných studií. Vyplývá z ní, že pro on-line extrakce na nanovlákněch je důležitá mechanická odolnost sorbentu a nejlepším způsobem, jak jí dosáhnout, je kombinovat nanovlákná s mikrovlákně (viz. kapitola 4.2.). Potvrdila nám také, že selektivita nanovláken může být ovlivněna příměsí jiných látek do polymeru. Výrobní proces je však část, kterou je nutné v tomto případě ještě zdokonalit.

6. SHRNUTÍ

Předkládaná disertační práce shrnuje moji vědeckou práci za uplynulé čtyři roky postgraduálního studia. Během něj jsem se zabývala využitím nanovláken jako moderních sorpčních materiálů pro extrakce na tuhou fázi on-line spojené s vysoko-účinnou kapalinovou chromatografií. Můj výzkum navazoval na výsledky, získané během vypracovávání mé diplomové práce, kdy jsem testovala nanovláčenné sorbenty pro extrakce v off-line uspořádání.

Naplnění nanovláčenných materiálů do extrakčních kolonek a jejich spojení přes šesticestný selekční ventil s analytickou kolonou v chromatografickém systému vedlo k automatizaci extrakčního procesu. Ten pak oproti původním off-line metodám byl rychlejší a poskytoval přesnější a opakovatelnější výsledky. Předtím však byla třeba optimalizace přípravy extrakčních kolonek, jejich rozměrů, doby extrakce, rychlosti průtoku a složení extrakčních mobilních fází. Vzniklý on-line systém byl pak základem všech popsanych experimentů.

Hlavním cílem mého výzkumu bylo rozšířit znalosti o nanovláčenných polymerech a jejich možnostech využití v extrakčních metodách. Začala jsem s testováním poly- ϵ -kaprolaktonu pro izolaci analytů z biologických matric. Výsledky studie prokázaly schopnost tohoto polymeru odstraňovat proteiny a řadu dalších makromolekulárních interferencí po přímém nástřiku minimálně upravených biologických vzorků. Následně byla tato vlastnost sledována a potvrzena i u jiných polymerů, které byly používány v dalších studiích.

Pro usnadnění vývoje a optimalizaci dalších metod pro on-line stanovení analytů, jsem provedla srovnání extrakční účinnosti osmi nanovláčenných polymerů pro osm různých analytů. Potvrdilo se, že v interakcích mezi sorbentem a analytem převažuje adsorpční mechanismus. Sledování vlivu matrice a fyzikálně-chemických vlastností analytů přispělo k lepšímu pochopení nanovláčenné extrakce.

Zkušenosti z předchozích experimentů jsem využila pro vytvoření extrakční metody nesteroidních antiflogistik z lidského séra. Jako sorbent byl pro tyto účely vybrán kompozitní poly- ϵ -kaprolakton, který díky svému mikro-/nanovláčennému uspořádání měl nejen vysokou extrakční účinnost, ale i vhodné strukturální vlastnosti napomáhající k odstraňování proteinů. Během extrakčního kroku na něm byly izolovány naproxen, ketoprofen, indometacin a diklofenak, které byly v dalším kroku, po přepnutí selekčního

ventilu, separovány na analytické koloně a detekovány pomocí UV detektoru. Vyvinutá analytická metoda pak byla úspěšně aplikována na reálný vzorek lidského séra obsahující diklofenak. Tím se použití nanovláken zase o něco více přiblížilo jejich potenciálnímu využití v rutinní analýze.

Během svého výzkumu jsem se zabývala i vlivem různých typů výroby nanovláken na jejich extrakční účinnost a vhodnost on-line spojení s vysokotlakým chromatografickým systémem. Z tohoto hlediska se jako nejvhodnější doposud jeví meltblown technologie, případně její kombinace s elektrostatickým zvlákňováním. Vyšší průměr vláken, kterého se u těchto technik dosahuje, sice vede k menší povrchové ploše, ale možné snižování extrakční účinnosti je kompenzováno rovnoměrným průtokem mobilní fáze, tedy dostatečným kontaktem analytů se sorbentem. Výsledkem jsou pak rovnoměrně vyplněné extrakční kolonky, s nízkým zpětným tlakem, na kterých je dosahováno opakovatelných výsledků.

Za účelem změny vlastností nanovláknenných sorbentů a dosažení vyšší selektivity jsem pro extrakce testovala i vlákna s příměsí různých sloučenin. Polyfenolické sloučeniny dopamin, tanin a kombinace dopaminu s hesperidinem snížily lipofilitu původního poly- ϵ -kaprolaktonu. Ve srovnání s ním pak vlákna potažená dopaminem a dopaminem s heparinem dosahovala lepší extrakční účinnosti pro hydrofilní látky. Pro extrakci β -laktamových antibiotik byla připravena polyamidová vlákna obohacená o tetramethylammonium-chlorid a sulfobetain. Tím se opět snížila lipofilita, a navíc byly do vláken vneseny pozitivně či negativně nabitě aminoskupiny. Tyto faktory pak vedly ke ovlivnění extrakční účinnosti penicilinu V a penicilinu G ve srovnání s neobohacenými vlákny. V obou případech modifikace nanovláken bylo dosaženo změn jejich fyzikálně-chemických vlastností. Přestože tím selektivita extrakce nebyla vždy ovlivněna příliš výrazně, představují modifikovaná nanovláknena nový slibný směr výzkumu.

Nanovláknenné sorbenty mají potenciál být moderními extrakčními materiály pro úpravu vzorků v chromatografické analýze. Nikdy pravděpodobně nedosáhnou univerzálnosti komerčních sorbentů, ale jejich silnou stránkou mohou být právě selektivní až specifické extrakce a schopnost selektivní exkluze bílkovinné matrice. Se stále rostoucím tlakem na ekologii i ve vědecké sféře mohou najít uplatnění biodegradabilní polymery nebo polymery, které vydrží několik desítek analýz a biologické vzorky mohou být analyzovány o něco snáz a rychleji. To vše je však zatím předmětem výzkumu, jenž byl stručně nastíněn v této práci.

7. REFERENCE

1. Ward, G., Nanofibres: media at the nanoscale. *Filtration & Separation* **2005**, *42* (7), 22-24.
2. Wan, Y.; Ko K. F., Introduction to Nanofiber Materials. Cambridge University Press: Cambridge, United Kingdom, **2014**.
3. Sirc, J.; Hobzova, R.; Kostina, N.; Munzarova, M.; Juklickova, M.; Lhotka, M.; Kubinova, S.; Zajicova, A.; Michalek, J., Morphological Characterization of Nanofibers: Methods and Application in Practice. *Journal of Nanomaterials* **2012**, *2012*.
4. Partheniadis, I.; Nikolakakis, I.; Laidmae, I.; Heinamaki, J., A Mini-Review: Needleless Electrospinning of Nanofibers for Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Processes* **2020**, *8* (6).
5. Luo, C. J.; Stoyanov, S. D.; Stride, E.; Pelan, E.; Edirisinghe, M., Electrospinning versus fibre production methods: from specifics to technological convergence. *Chemical Society Reviews* **2012**, *41* (13), 4708-4735.
6. Xue, J. J.; Wu, T.; Dai, Y. Q.; Xia, Y. N., Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications. *Chemical Reviews* **2019**, *119* (8), 5298-5415.
7. Zhou, F. L.; Gong, R. H.; Porat, I., Needle and Needleless Electrospinning for Nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science* **2010**, *115* (5), 2591-2598.
8. Chigome, S.; Darko, G.; Torto, N., Electrospun nanofibers as sorbent material for solid phase extraction. *Analyst* **2011**, *136* (14), 2879-2889.
9. Agarwal, S.; Greiner, A.; Wendorff, J. H., Functional materials by electrospinning of polymers. *Progress in Polymer Science* **2013**, *38* (6), 963-991.
10. Zheng, Y. S.; Liu, X. K.; Zeng, Y. C., Electrospun nanofibers from a multihole spinneret with uniform electric field. *Journal of Applied Polymer Science* **2013**, *130* (5), 3221-3228.
11. Wei, L.; Liu, C. K.; Mao, X.; Dong, J.; Fan, W.; Zhi, C.; Qin, X. H.; Sun, R. J., Multiple-Jet Needleless Electrospinning Approach via a Linear Flume Spinneret. *Polymers* **2019**, *11* (12).
12. Yu, M.; Dong, R. H.; Yan, X.; Yu, G. F.; You, M. H.; Ning, X.; Long, Y. Z., Recent Advances in Needleless Electrospinning of Ultrathin Fibers: From Academia to Industrial Production. *Macromolecular Materials and Engineering* **2017**, *302* (7).
13. Jirsak O., s. F., Lukas D., Kotek V., Martinova L., Chaloupek J., Method of nanofibers production from a polymer solution using electrostatic spinning and device for carrying out th emethod. United States Patent **2009**.
14. Jirsak, O.; Sysel, P.; Sanetnik, F.; Hruza, J.; Chaloupek, J., Polyamic Acid Nanofibers Produced by Needleless Electrospinning. *Journal of Nanomaterials* **2010**, *2010*.
15. Thenmozhi, S.; Dharmaraj, N.; Kadirvelu, K.; Kim, H. Y., Electrospun nanofibers: New generation materials for advanced applications. *Materials Science and Engineering B - Advanced Functional Solid-State Materials* **2017**, *217*, 36-48.
16. Valtera, J.; Kalous, T.; Pokorny, P.; Batka, O.; Bilek, M.; Chvojka, J.; Mikes, P.; Kostakova, E. K.; Zabka, P.; Ornstova, J.; Beran, J.; Stanishevsky, A.; Lukas, D., Fabrication of dual-functional composite yarns with a nanofibrous envelope using high throughput AC needleless and collectorless electrospinning. *Scientific Reports* **2019**, *9*.
17. Farkas, B.; Balogh, A.; Cselko, R.; Molnar, K.; Farkas, A.; Borbas, E.; Marosi, G.; Nagy, Z. K., Corona alternating current electrospinning: A combined approach for increasing the productivity of electrospinning. *International Journal of Pharmaceutics* **2019**, *561*, 219-227.
18. Pokorny, P.; Kostakova, E.; Sanetnik, F.; Mikes, P.; Chvojka, J.; Kalous, T.; Bilek, M.; Pejchar, K.; Valtera, J.; Lukas, D., Effective AC needleless and collectorless electrospinning for yarn production. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2014**, *16* (48), 26816-26822.

19. Balogh, A.; Cselko, R.; Demuth, B.; Verreck, G.; Mensch, J.; Marosi, G.; Nagy, Z. K., Alternating current electrospinning for preparation of fibrous drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics* **2015**, *495* (1), 75-80.
20. Maheshwari, S.; Chang, H. C., Assembly of Multi-Stranded Nanofiber Threads through AC Electrospinning. *Advanced Materials* **2009**, *21* (3), 349-354.
21. He, H. J.; Wang, Y. M.; Farkas, B.; Nagy, Z. K.; Molnar, K., Analysis and prediction of the diameter and orientation of AC electrospun nanofibers by response surface methodology. *Materials and Design* **2020**, *194*.
22. Hosseini, N. S.; Simon, B.; Messaoud, T.; Khenoussi, N.; Schacher, L.; Adolphe, D., Quantitative approaches of nanofibers organization for biomedical patterned nanofibrous scaffold by image analysis. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **2018**, *106* (11), 2963-2972.
23. Drabek, J.; Zatloukal, M., Meltblown technology for production of polymeric microfibers/nanofibers: A review. *Physics of Fluids* **2019**, *31* (9).
24. Uppal, R.; Bhat, G.; Eash, C.; Akato, K., Meltblown Nanofiber Media for Enhanced Quality Factor. *Fibers and Polymers* **2013**, *14* (4), 660-668.
25. Ellison, C. J.; Phatak, A.; Giles, D. W.; Macosko, C. W.; Bates, F. S., Melt blown nanofibers: Fiber diameter distributions and onset of fiber breakup. *Polymer* **2007**, *48* (11), 3306-3316.
26. Kriegel, C.; Arrechi, A.; Kit, K.; McClements, D. J.; Weiss, J., Fabrication, functionalization, and application of electrospun biopolymer nanofibers. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2008**, *48* (8), 775-797.
27. Schiffman, J. D.; Schauer, C. L., A review: Electrospinning of biopolymer nanofibers and their applications. *Polymer Reviews* **2008**, *48* (2), 317-352.
28. Dai, Y. Q.; Liu, W. Y.; Formo, E.; Sun, Y. M.; Xia, Y. N., Ceramic nanofibers fabricated by electrospinning and their applications in catalysis, environmental science, and energy technology. *Polymers for Advanced Technologies* **2011**, *22* (3), 326-338.
29. Wu, H.; Pan, W.; Lin, D. D.; Li, H. P., Electrospinning of ceramic nanofibers: Fabrication, assembly and applications. *Journal of Advanced Ceramics* **2012**, *1* (1), 2-23.
30. Barakat, N. A. M.; Kim, B.; Kim, H. Y., Production of Smooth and Pure Nickel Metal Nanofibers by the Electrospinning Technique: Nanofibers Possess Splendid Magnetic Properties. *Journal of Physical Chemistry C* **2009**, *113* (2), 531-536.
31. Feng, L. C.; Xie, N.; Zhong, J., Carbon Nanofibers and Their Composites: A Review of Synthesizing, Properties and Applications. *Materials* **2014**, *7* (5), 3919-3945.
32. Inagaki, M.; Yang, Y.; Kang, F. Y., Carbon Nanofibers Prepared via Electrospinning. *Advanced Materials* **2012**, *24* (19), 2547-2566.
33. Lee, J. S.; Kwon, O. S.; Park, S. J.; Park, E. Y.; You, S. A.; Yoon, H.; Jang, J., Fabrication of Ultrafine Metal-Oxide-Decorated Carbon Nanofibers for DMMP Sensor Application. *ACS Nano* **2011**, *5* (10), 7992-8001.
34. Tran, P. A.; Zhang, L. J.; Webster, T. J., Carbon nanofibers and carbon nanotubes in regenerative medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2009**, *61* (12), 1097-1114.
35. Klein, K. L.; Melechko, A. V.; McKnight, T. E.; Retterer, S. T.; Rack, P. D.; Fowlkes, J. D.; Joy, D. C.; Simpson, M. L., Surface characterization and functionalization of carbon nanofibers. *Journal of Applied Physics* **2008**, *103* (6).
36. Liao, C. Z.; Li, Y. C.; Tjong, S. C., Graphene Nanomaterials: Synthesis, Biocompatibility, and Cytotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences* **2018**, *19* (11).
37. Zhou, Z. P.; Wu, X. F., Graphene-beaded carbon nanofibers for use in supercapacitor electrodes: Synthesis and electrochemical characterization. *Journal of Power Sources* **2013**, *222*, 410-416.
38. Yilmaz, N. D., Smart textiles - Wearable Nanotechnology. John Wiley and sons, Inc: USA, **2018**.
39. Li, X. L.; Zhi, L. J., Graphene hybridization for energy storage applications. *Chemical Society Reviews* **2018**, *47* (9), 3189-3216.

40. Wang, C. Y.; Wu, S. Y.; Jian, M. Q.; Xie, J. R.; Xu, L. P.; Yang, X. D.; Zheng, Q. S.; Zhang, Y. Y., Silk nanofibers as high efficient and lightweight air filter. *Nano Research* **2016**, *9* (9), 2590-2597.
41. Liu, C.; Hsu, P. C.; Lee, H. W.; Ye, M.; Zheng, G. Y.; Liu, N. A.; Li, W. Y.; Cui, Y., Transparent air filter for high-efficiency PM2.5 capture. *Nature Communications* **2015**, *6*.
42. Liang, H. X.; Yao, A. N.; Jiao, X. L.; Li, C.; Chen, D. R., Fast and Sustained Degradation of Chemical Warfare Agent Simulants Using Flexible Self-Supported Metal-Organic Framework Filters. *Acs Appl Mater Inter* **2018**, *10* (24), 20396-20403.
43. Ramakrishna, S.; Fujihara, K.; Teo, W. E.; Yong, T.; Ma, Z. W.; Ramaseshan, R., Electrospun nanofibers: solving global issues. *Materials Today* **2006**, *9* (3), 40-50.
44. Sahay, R.; Kumar, P. S.; Sridhar, R.; Sundaramurthy, J.; Venugopal, J.; Mhaisalkar, S. G.; Ramakrishna, S., Electrospun composite nanofibers and their multifaceted applications. *Journal of Materials Chemistry* **2012**, *22* (26), 12953-12971.
45. Angius, D.; Wang, H.; Spinner, R. J.; Gutierrez-Cotto, Y.; Yaszemski, M. J.; Windebank, A. J., A systematic review of animal models used to study nerve regeneration in tissue-engineered scaffolds. *Biomaterials* **2012**, *33* (32), 8034-8039.
46. Zhao, G. X.; Zhang, X. H.; Lu, T. J.; Xu, F., Recent Advances in Electrospun Nanofibrous Scaffolds for Cardiac Tissue Engineering. *Adv Funct Mater* **2015**, *25* (36), 5726-5738.
47. Zhang, Y.; Li, X. S.; Guex, A. G.; Liu, S. S.; Muller, E.; Malini, R. I.; Zhao, H. J.; Rottmar, M.; Maniura-Weber, K.; Rossi, R. M.; Spano, F., A compliant and biomimetic three-layered vascular graft for small blood vessels. *Biofabrication* **2017**, *9* (2).
48. Erben, J.; Pilarova, K.; Sanetnik, F.; Chvojka, J.; Jencova, V.; Blazkova, L.; Havlicek, J.; Novak, O.; Mikes, P.; Prosecka, E.; Lukas, D.; Kostakova, E. K., The combination of meltblown and electrospinning for bone tissue engineering. *Materials Letters* **2015**, *143*, 172-176.
49. Wang, L.; Wu, Y. B.; Guo, B. L.; Ma, P. X., Nanofiber Yarn/Hydrogel Core-Shell Scaffolds Mimicking Native Skeletal Muscle Tissue for Guiding 3D Myoblast Alignment, Elongation, and Differentiation. *Acs Nano* **2015**, *9* (9), 9167-9179.
50. Ma, B.; Xie, J. W.; Jiang, J.; Wu, J., Sandwich-type fiber scaffolds with square arrayed microwells and nanostructured cues as microskin grafts for skin regeneration. *Biomaterials* **2014**, *35* (2), 630-641.
51. Sill, T. J.; von Recum, H. A., Electro spinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* **2008**, *29* (13), 1989-2006.
52. Bolgen, N.; Vargel, I.; Korkusuz, P.; Menceloglu, Y. Z.; Piskin, E., In vivo performance of antibiotic embedded electrospun PCL membranes for prevention of abdominal adhesions. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials* **2007**, *81B* (2), 530-543.
53. Xu, X. L.; Chen, X. S.; Xu, X. Y.; Lu, T. C.; Wang, X.; Yang, L. X.; Jing, X. B., BCNU-loaded PEG-PLLA ultrafine fibers and their in vitro antitumor activity against glioma C6 cells. *Journal of Controlled Release* **2006**, *114* (3), 307-316.
54. Jiang, H. L.; Hu, Y. Q.; Zhao, P. C.; Li, Y.; Zhu, K. J., Modulation of protein release from biodegradable core-shell structured fibers prepared by coaxial electrospinning. *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials* **2006**, *79B* (1), 50-57.
55. Chigome, S.; Torto, N., A review of opportunities for electrospun nanofibers in analytical chemistry. *Analytica Chimica Acta* **2011**, *706* (1), 25-36.
56. B. Zhang, H. L., Y. Liu, Y. Teng, Application trends of nanofibers in analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry* **2020**, *131*.
57. Lai, P. H.; Chen, P. C.; Liao, Y. W.; Liu, J. T.; Chen, C. C.; Lin, C. H., Comparison of gampi paper and nanofibers to chromatography paper used in paper spray-mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* **2015**, *375*, 14-17.
58. Mondal, K.; Sharma, A., Recent advances in electrospun metal-oxide nanofiber based interfaces for electrochemical biosensing. *RSC Advances* **2016**, *6* (97), 94595-94616.

59. Han, W. H.; Wang, Y. Z.; Su, J. M.; Xin, X.; Guo, Y. D.; Long, Y. Z.; Ramakrishna, S., Fabrication of nanofibrous sensors by electrospinning. *Science China-Technological Sciences* **2019**, *62* (6), 886-894.
60. Sutar, D. S.; Padma, N.; Aswal, D. K.; Deshpande, S. K.; Gupta, S. K.; Yakhmi, J. V., Preparation of nanofibrous polyaniline films and their application as ammonia gas sensor. *Sensors and Actuators B-Chemical* **2007**, *128* (1), 286-292.
61. George, G.; Anandhan, S., Synthesis and characterisation of nickel oxide nanofibre webs with alcohol sensing characteristics. *Rsc Advances* **2014**, *4* (107), 62009-62020.
62. Feng, C. H.; Jiang, Z. W.; Chen, B.; Cheng, P. F.; Wang, Y. L.; Huang, C. Z., Aluminum-doped NiO nanofibers as chemical sensors for selective and sensitive methanol detection. *Analytical Methods* **2019**, *11* (5), 575-581.
63. Park, H. J.; Kim, W. J.; Lee, H. K.; Lee, D. S.; Shin, J. H.; Jun, Y.; Yun, Y. J., Highly flexible, mechanically stable, and sensitive NO₂ gas sensors based on reduced graphene oxide nanofibrous mesh fabric for flexible electronics. *Sensors and Actuators B - Chemical* **2018**, *257*, 846-852.
64. Chen, S.; Sun, G., High Sensitivity Ammonia Sensor Using a Hierarchical Polyaniline/Poly(ethylene-co-glycidyl methacrylate) Nanofibrous Composite Membrane. *ACS Applied Materials and Interfaces* **2013**, *5* (14), 6473-6477.
65. Scampicchio, M.; Arecchi, A.; Bianco, A.; Bulbarello, A.; Bertarelli, C.; Mannino, S., Nylon Nanofibrous Biosensors for Glucose Determination. *Electroanalysis* **2010**, *22* (10), 1056-1060.
66. Ding, F. Y.; Deng, H. B.; Du, Y. M.; Shi, X. W.; Wang, Q., Emerging chitin and chitosan nanofibrous materials for biomedical applications. *Nanoscale* **2014**, *6* (16), 9477-9493.
67. Wang, J.; Lin, Y. H., Functionalized carbon nanotubes and nanofibers for biosensing applications. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2008**, *27* (7), 619-626.
68. Clark, J. E.; Olesik, S. V., Technique for Ultrathin Layer Chromatography Using an Electrospun, Nanofibrous Stationary Phase. *Analytical Chemistry* **2009**, *81* (10), 4121-4129.
69. Beilke, M. C.; Zewe, J. W.; Clark, J. E.; Olesik, S. V., Aligned electrospun nanofibers for ultra-thin layer chromatography. *Analytica Chimica Acta* **2013**, *761*, 201-208.
70. Moheman, A.; Alam, M. S.; Mohammad, A., Recent trends in electrospinning of polymer nanofibers and their applications in ultra thin layer chromatography. *Advances in Colloid and Interface Science* **2016**, *229*, 1-24.
71. Chakrabarty, T.; Kumar, M.; Rajesh, K. P.; Shahi, V. K.; Natarajan, T. S., Nano-fibrous sulfonated poly(ether ether ketone) membrane for selective electro-transport of ions. *Separation and Purification Technology* **2010**, *75* (2), 174-182.
72. Lee, K. H.; Kim, D. J.; Min, B. G.; Lee, S. H., Polymeric nanofiber web-based artificial renal microfluidic chip. *Biomedical Microdevices* **2007**, *9* (4), 435-442.
73. Wang, H. X.; Ding, H.; Lee, B.; Wang, X. G.; Lin, T., Polypyrrole-coated electrospun nanofibre recovery of Au(III) from aqueous membranes for solution. *Journal of Membrane Science* **2007**, *303* (1-2), 119-125.
74. Plotka-Wasyłka, J.; Szczepanska, N.; de la Guardia, M.; Namiesnik, J., Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2016**, *77*, 23-43.
75. Qi, D. J.; Kang, X. J.; Chen, L. Q.; Zhang, Y. Y.; Wei, H. M.; Gu, Z. Z., Electrospun polymer nanofibers as a solid-phase extraction sorbent for the determination of trace pollutants in environmental water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008**, *390* (3), 929-938.
76. Weng, R.; Sun, L. S.; Jiang, L. P.; Li, N.; Ruan, G. H.; Li, J. P.; Du, F. Y., Electrospun Graphene Oxide-Doped Nanofiber-Based Solid Phase Extraction Followed by High-Performance Liquid Chromatography for the Determination of Tetracycline Antibiotic Residues in Food Samples. *Food Analytical Methods* **2019**, *12* (7), 1594-1603.
77. Kang, X. J.; Pan, C.; Xu, Q.; Yao, Y. F.; Wang, Y.; Qi, D. J.; Gu, Z. Z., The investigation of electrospun polymer nanofibers as a solid-phase extraction sorbent for the

- determination of trazodone in human plasma. *Analytica Chimica Acta* **2007**, *587* (1), 75-81.
78. Maddah, B.; Javadi, S. S.; Mirzaei, A.; Rahimi-Nasrabadi, M., Application of Electrospun Polystyrene Nanofibers as Solid Phase Extraction Sorbent for the Preconcentration of Diazinon and Fenitrothion in Environmental Waters. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2015**, *38* (2), 208-214.
 79. Hakova, M.; Havlikova, L. C.; Chvojka, J.; Svec, F.; Solich, P.; Satinsky, D., Nanofiber polymers as novel sorbents for on-line solid phase extraction in chromatographic system: A comparison with monolithic reversed phase C18 sorbent. *Analytica Chimica Acta* **2018**, *1018*, 26-34.
 80. Zwir-Ferenc, A.; Biziuk, M., Solid phase extraction technique - Trends, opportunities and applications. *Polish Journal of Environmental Studies* **2006**, *15* (5), 677-690.
 81. Buszewski, B.; Szultka, M., Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2012**, *42* (3), 198-213.
 82. Sigma-Aldrich, Guide to solid phase extraction. Supelco, S.-A., Ed. USA, **1998**.
 83. Lucie Nováková, M. D., Moderní HPLC separace v teorii a praxi, 1. díl. Europrint a.s.: Praha, **2013**; 300-301.
 84. Hennion, M. C., Graphitized carbons for solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* **2000**, *885* (1-2), 73-95.
 85. Delaunay-Bertoncini, N.; Hennion, M. C., Immunoaffinity solid-phase extraction for pharmaceutical and biomedical trace-analysis-coupling with HPLC and CE-perspectives. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2004**, *34* (4), 717-736.
 86. Pichon, V.; Combes, A., Selective tools for the solid-phase extraction of Ochratoxin A from various complex samples: immunosorbents, oligosorbents, and molecularly imprinted polymers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2016**, *408* (25), 6983-6999.
 87. Yang, S. H.; Fan, H.; Classon, R. J.; Schug, K. A., Restricted access media as a streamlined approach toward on-line sample preparation: Recent advancements and applications. *Journal of Separation Science* **2013**, *36* (17), 2922-2938.
 88. Hashemi, B.; Zohrabi, P.; Raza, N.; Kim, K. H., Metal-organic frameworks as advanced sorbents for the extraction and determination of pollutants from environmental, biological, and food media. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2017**, *97*, 65-82.
 89. Gutierrez-Serpa, A.; Pacheco-Fernandez, I.; Pasan, J.; Pino, V., Metal-Organic Frameworks as Key Materials for Solid-Phase Microextraction Devices-A Review. *Separations* **2019**, *6* (4).
 90. Zhou, Y. Y.; Yan, X. P.; Kim, K. N.; Wang, S. W.; Liu, M. G., Exploration of coordination polymer as sorbent for flow injection solid-phase extraction on-line coupled with high-performance liquid chromatography for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental materials. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1116* (1-2), 172-178.
 91. Azzouz, A.; Kailasa, S. K.; Lee, S. S.; Rascon, A. J.; Ballesteros, E.; Zhang, M.; Kim, K. H., Review of nanomaterials as sorbents in solid-phase extraction for environmental samples. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2018**, *108*, 347-369.
 92. Bagheri, H.; Saraji, M., Conductive polymers as new media for solid-phase extraction: Isolation of chlorophenols from water sample. *Journal of Chromatography A* **2003**, *986* (1), 111-119.
 93. Tian, J. Y.; Xu, J. Q.; Zhu, F.; Lu, T. B.; Su, C. Y.; Ouyang, G. F., Application of nanomaterials in sample preparation. *Journal of Chromatography A* **2013**, *1300*, 2-16.
 94. Valcarcel, M.; Cardenas, S.; Simonet, B. M.; Moliner-Martinez, Y.; Lucena, R., Carbon nanostructures as sorbent materials in analytical processes. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2008**, *27* (1), 34-43.
 95. Hua, M.; Zhang, S. J.; Pan, B. C.; Zhang, W. M.; Lv, L.; Zhang, Q. X., Heavy metal removal from water/wastewater by nanosized metal oxides: A review. *Journal of Hazardous Materials* **2012**, *211*, 317-331.

96. Xu, L. N.; Qi, X. Y.; Li, X. J.; Bai, Y.; Liu, H. W., Recent advances in applications of nanomaterials for sample preparation. *Talanta* **2016**, *146*, 714-726.
97. Wen, Y. Y.; Chen, L.; Li, J. H.; Liu, D. Y.; Chen, L. X., Recent advances in solid-phase sorbents for sample preparation prior to chromatographic analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2014**, *59*, 26-41.
98. Ahmadi, M.; Elmongy, H.; Madrakian, T.; Abdel-Rehim, M., Nanomaterials as sorbents for sample preparation in bioanalysis: A review. *Analytica Chimica Acta* **2017**, *958*, 1-21.
99. Plotka-Wasyłka, J.; Szczepanska, N.; de la Guardia, M.; Namiesnik, J., Miniaturized solid-phase extraction techniques. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2015**, *73*, 19-38.
100. Lord, H.; Pawliszyn, J., Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A* **2000**, *885* (1-2), 153-193.
101. Ghorbani, M.; Aghamohammadhassan, M.; Chamsaz, M.; Akhlaghi, H.; Pedramrad, T., Dispersive solid phase microextraction. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry* **2019**, *118*, 793-809.
102. Nogueira, J. M. F., Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques. *Analytica Chimica Acta* **2012**, *757*, 1-10.
103. Moein, M. M.; Abdel-Rehim, A.; Abdel-Rehim, M., Microextraction by packed sorbent (MEPS). *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2015**, *67*, 34-44.
104. Vlckova, H.; Pilarova, V.; Novak, O.; Solich, P.; Novakova, L., Micro-SPE in pipette tips as a tool for analysis of small-molecule drugs in serum. *Bioanalysis* **2017**, *9* (11), 887-901.
105. Safarikova, M.; Safarik, I., Magnetic solid-phase extraction. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **1999**, *194* (1-3), 108-112.
106. Maya, F.; Cabello, C. P.; Frizzarin, R. M.; Estela, J. M.; Palomino, G. T.; Cerda, V., Magnetic solid-phase extraction using metal-organic frameworks (MOFs) and their derived carbons. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2017**, *90*, 142-152.
107. Capriotti, A. L.; Cavaliere, C.; La Barbera, G.; Montone, C. M.; Piovesana, S.; Lagana, A., Recent Applications of Magnetic Solid-phase Extraction for Sample Preparation. *Chromatographia* **2019**, *82* (8), 1251-1274.
108. Chen, L. G.; Wang, H.; Zeng, Q. L.; Xu, Y.; Sun, L.; Xu, H. Y.; Ding, L., On-line Coupling of Solid-Phase Extraction to Liquid Chromatography-A Review. *Journal of Chromatographic Science* **2009**, *47* (8), 614-623.
109. Enoch, P.; Putzler, A.; Rinne, D.; Schluter, J., Automated solid-phase extraction on-line coupled to gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **1998**, *822* (1), 75-82.
110. Puig, P.; Borrull, F.; Calull, M.; Aguilar, C., Recent advances in coupling solid-phase extraction and capillary electrophoresis (SPE-CE). *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2007**, *26* (7), 664-678.
111. Singer, H.; Jaus, S.; Hanke, I.; Luck, A.; Hollender, J.; Alder, A. C., Determination of biocides and pesticides by on-line solid phase extraction coupled with mass spectrometry and their behaviour in wastewater and surface water. *Environmental Pollution* **2010**, *158* (10), 3054-3064.
112. Batista, A. D.; Chochołous, P.; Satinsky, D.; Solich, P.; Rocha, F. R. P., On-line hyphenation of solid-phase extraction to chromatographic separation of sulfonamides with fused-core columns in sequential injection chromatography. *Talanta* **2015**, *133*, 142-149.
113. Wang, Y.; Wang, L.; Tian, T.; Hu, X. Y.; Yang, C.; Xu, Q., Automated solid-phase extraction hyphenated to voltammetry for the determination of quercetin using magnetic nanoparticles and sequential injection lab-on-valve approach. *Analyst* **2012**, *137* (10), 2400-2405.
114. Barbosa, A. F.; Segatelli, M. G.; Pereira, A. C.; Santos, A. D.; Kubota, L. T.; Luccas, P. O.; Tarley, C. R. T., Solid-phase extraction system for Pb (II) ions enrichment based on multiwall carbon nanotubes coupled on-line to flame atomic absorption spectrometry. *Talanta* **2007**, *71* (4), 1512-1519.

115. Salinas-Vargas, M. E.; Canizares-Macias, M. P., On-line solid-phase extraction using a C-18 minicolumn coupled to a flow injection system for determination of caffeine in green and roasted coffee beans. *Food Chemistry* **2014**, *147*, 182-188.
116. Lloyd R. Snyder, J. J. K., John W. Dolan, Introduction to modern Liquid Chromatography. 3rd ed.; John Wiley and Sons, Inc.: USA, **2010**.
117. Halasz, I.; Endele, R.; Asshauer, J., Ultimate Limits in High-Pressure Liquid-Chromatography. *Journal of Chromatography* **1975**, *112*, 37-60.
118. Salvatore Fanali, P. R. H., Colin F. Poole, Marja-Lisa Riekkola, Liquid Chromatography - Fundamentals and Instrumentation. 2nd ed.; Elsevier Inc.: Netherlands, UK, USA, **2017**.
119. Jandera, P., Advances in the development of organic polymer monolithic columns and their applications in food analysis - A review. *Journal of Chromatography A* **2013**, *1313*, 37-53.
120. Zajickova, Z.; Spanik, I., Applications of monolithic columns in gas chromatography and supercritical fluid chromatography. *Journal of Separation Science* **2019**, *42* (5), 999-1011.
121. Namera, A.; Nakamoto, A.; Saito, T.; Miyazaki, S., Monolith as a new sample preparation material: Recent devices and applications. *Journal of Separation Science* **2011**, *34* (8), 901-924.
122. Gonzalez-Ruiz, V.; Olives, A. I.; Martin, M. A., Core-shell particles lead the way to renewing high-performance liquid chromatography. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2015**, *64*, 17-28.
123. Badman, E. R.; Beardsley, R. L.; Liang, Z. M.; Bansal, S., Accelerating high quality bioanalytical LC/MS/MS assays using fused-core columns. *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2010**, *878* (25), 2307-2313.
124. Qu, Q. S.; Si, Y.; Xuan, H.; Zhang, K. H.; Chen, X. M.; Ding, Y.; Feng, S. J.; Yu, H. Q.; Abdullah, M. A.; Alamry, K. A., Dendritic core-shell silica spheres with large pore size for separation of biomolecules. *Journal of Chromatography A* **2018**, *1540*, 31-37.
125. Mao, J. F.; Lei, S. R.; Yang, X. F.; Xiao, D., Quantification of ochratoxin A in red wines by conventional HPLC-FLD using a column packed with core-shell particles. *Food Control* **2013**, *32* (2), 505-511.
126. Vinci, G.; Antonelli, M. L.; Preti, R., Rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in rainwater by liquid-liquid microextraction and LC with core-shell particles column and fluorescence detection. *Journal of Separation Science* **2013**, *36* (3), 461-468.
127. Hayes, R.; Ahmed, A.; Edge, T.; Zhang, H. F., Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **2014**, *1357*, 36-52.
128. Mannocchi, G.; Di Trana, A.; Tini, A.; Zaami, S.; Gottardi, M.; Pichini, S.; Busardo, F. P., Development and validation of fast UHPLC-MS/MS screening method for 87 NPS and 32 other drugs of abuse in hair and nails: application to real cases. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2020**, *412* (21), 5125-5145.
129. Paul, D.; Allakonda, L.; Satheeshkumar, N., A validated UHPLC-QTOF-MS method for quantification of metformin and teneligliptin in rat plasma: Application to pharmacokinetic interaction study. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2017**, *143*, 1-8.
130. Nzoughe, J. K.; Bocca, C.; Simard, G.; Prunier-Mirebeau, D.; de la Barca, J. M. C.; Bonneau, D.; Procaccio, V.; Prunier, F.; Lenaers, G.; Reynier, P., A Nontargeted UHPLC-HRMS Metabolomics Pipeline for Metabolite Identification: Application to Cardiac Remote Ischemic Preconditioning. *Analytical Chemistry* **2017**, *89* (3), 2138-2146.
131. Steven A. Cohen, M. R. S., Multidimensional liquid chromatography - theory and applications in industrial chemistry and the life sciences. John Wiley and sons, Inc.: USA, **2008**.

132. Iguiniz, M.; Heinisch, S., Two-dimensional liquid chromatography in pharmaceutical analysis. Instrumental aspects, trends and applications. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2017**, *145*, 482-503.
133. Vanhoenacker, G.; Vandenheede, I.; David, F.; Sandra, P.; Sandra, K., Comprehensive two-dimensional liquid chromatography of therapeutic monoclonal antibody digests. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2015**, *407* (1), 355-366.
134. Pol, J.; Hohnova, B.; Hyotylainen, T., Characterisation of Stevia Rebaudiana by comprehensive two-dimensional liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1150* (1-2), 85-92.
135. Brandao, P. F.; Duarte, A. C.; Duarte, R., Comprehensive multidimensional liquid chromatography for advancing environmental and natural products research. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry* **2019**, *116*, 186-197.
136. Hyotylainen, T.; Riekkola, M. L., Approaches for on-line coupling of extraction and chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2004**, *378* (8), 1962-1981.
137. Hyotylainen, T., Principles, developments and applications of on-line coupling of extraction with chromatography. *Journal of Chromatography A* **2007**, *1153* (1-2), 14-28.
138. Masini, J. C.; Svec, F., Porous monoliths for on-line sample preparation: A review. *Analytica Chimica Acta* **2017**, *964*, 24-44.
139. Rogeberg, M.; Malerod, H.; Roberg-Larsen, H.; Aass, C.; Wilson, S. R., On-line solid phase extraction-liquid chromatography, with emphasis on modern bioanalysis and miniaturized systems. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2014**, *87*, 120-129.
140. Boos, K. S.; Fleischer, C. T., Multidimensional on-line solid-phase extraction (SPE) using restricted access materials (RAM) in combination with molecular imprinted polymers (MIP). *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **2001**, *371* (1), 16-20.
141. Hakova, M.; Havlikova, L. C.; Solich, P.; Svec, F.; Satinsky, D., Electrospun nanofiber polymers as extraction phases in analytical chemistry - The advances of the last decade. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2019**, *110*, 81-96.
142. Hakova, M.; Havlikova, L. C.; Chvojka, J.; Solich, P.; Satinskya, 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* **2018**, *178*, 141-146.
143. Chigome, S.; Torto, N., Electrospun nanofiber-based solid-phase extraction. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2012**, *38*, 21-31.
144. Arabsorkhi, B.; Sereshti, H., Determination of tetracycline and cefotaxime residues in honey by micro solid phase extraction based on electrospun nanofibers coupled with HPLC. *Microchemical Journal* **2018**, *140*, 241-247.
145. Hakova, M.; Havlikova, L. C.; Svec, F.; Solich, P.; Satinsky, D., Nanofibers as advanced sorbents for on-line solid phase extraction in liquid chromatography: A tutorial. *Analytica Chimica Acta* **2020**, *1121*, 83-96.
146. Raabova, H.; Hakova, M.; Havlikova, L. C.; Erben, J.; Chvojka, J.; Solich, P.; Svec, F.; Satinsky, D., Poly-epsilon-caprolactone Nanofibrous Polymers: A Simple Alternative to Restricted Access Media for Extraction of Small Molecules from Biological Matrixes. *Analytical Chemistry* **2020**, *92* (10), 6801-6805.
147. Hakova, M.; Havlikova, L. C.; Chvojka, J.; Erben, J.; Solich, P.; Svec, F.; Satinsky, D., A comparison study of nanofiber, microfiber, and new composite nano/microfiber polymers used as sorbents for on-line solid phase extraction in chromatography system. *Analytica Chimica Acta* **2018**, *1023*, 44-52.
148. Raabová, H.; Erben, J.; Chvojka, J.; Solich, P.; Švec, F.; Šatinský, D., Native nanofibers prepared using alternating-current electrospinning and their counterparts modified with quarternary salts applied for on-line extraction of β - lactam antibiotics. Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové **2021**.

149. Raabová, H.; Erben, J.; Chvojka, J.; Solich, P.; Švec, F.; Šatínský, D., The role of pKa, log P of analytes, and protein matrix in solid-phase extraction using native and coated nanofibrous and microfibrinous polymers prepared via meltblowing and combined meltblowing/electrospinning technologies. *Talanta* **2021**, 232 (122470).
150. Hakova, M.; Havlikova, L. C.; Chvojka, J.; Erben, J.; Solich, P.; Svec, F.; Satinsky, D., Polycaprolactone nanofibers functionalized with a dopamine coating for on-line solid phase extraction of bisphenols, betablockers, nonsteroidal drugs, and phenolic acids. *Microchimica Acta* **2019**, 186 (11).
151. Xu, Q.; Wu, S. Y.; Wang, M.; Yin, X. Y.; Wen, Z. Y.; Ge, W. N.; Gu, Z. Z., Electrospun Nylon6 Nanofibrous Membrane as SPE Adsorbent for the Enrichment and Determination of Three Estrogens in Environmental Water Samples. *Chromatographia* **2010**, 71 (5-6), 487-492.
152. Chen, L. Q.; Kang, X. J.; Sun, J.; Deng, J. J.; Gu, Z. Z.; Lu, Z. H., Application of nanofiber-packed SPE for determination of salivary-free cortisol using fluorescence precolumn derivatization and HPLC detection. *Journal of Separation Science* **2010**, 33 (15), 2369-2375.
153. Bagheri, H.; Khanipour, P.; Asgari, S., Magnetic field assisted mu-solid phase extraction of anti-inflammatory and loop diuretic drugs by modified polybutylene terephthalate nanofibers. *Analytica Chimica Acta* **2016**, 934, 88-97.
154. Yoshimatsu, K.; Ye, L.; Lindberg, J.; Chronakis, I. S., Selective molecular adsorption using electrospun nanofiber affinity membranes. *Biosensors & Bioelectronics* **2008**, 23 (7), 1208-1215.
155. Háková, M.; Raabová, H.; Havlíková, L. C.; Chocholouš, P.; Chvojka, J.; Šatínský, D., Testing of nylon 6 nanofibers with different surface densities as sorbents for solid phase extraction and their selectivity comparison with commercial sorbent. *Talanta* **2018**, 181, 326-332.
156. Raabová, H.; Havlíková, L. C.; Erben, J.; Chvojka, J.; Švec, F.; Šatínský, D., Polycaprolactone composite micro/nanofibrous material as an alternative to restricted access media for direct extraction and separation of non-steroidal anti-inflammatory drugs from hu-man serum using column-switching chromatography. *Nanomaterials* **2021** (submitted and accepted).
157. Cao, J. K.; Li, R. X.; Liang, S. H.; Li, J.; Xu, Q.; Wang, C. M., Simultaneous extraction of four plant growth regulators residues in vegetable samples using solid phase extraction based on thiol-functionalized nanofibers mat. *Food Chemistry* **2020**, 310.
158. Cao, J. K.; Liang, S. H.; Zhang, H.; Xu, Q.; Ji, W. L., Sodium 4-styrenesulfonate functionalized nanofibers mat as 96-well plate solid-phase extraction adsorbent for quantitative determination of multiple beta-agonists residues in pork samples. *Food Chemistry* **2021**, 335.

8. DALŠÍ VÝSTUPY KANDIDÁTA

8.1. Seznam publikovaných prací

1. Háková, M.; Raabová, H.; Havlíková, L. C.; Chocholouš, P.; Chvojka, J.; Šatínský, D., **Testing of nylon 6 nanofibers with different surface densities as sorbents for solid phase extraction and their selectivity comparison with commercial sorbent.** Talanta 2018, 181, 326-332 (IF 2018: 4,916 – Q1).

Podíl autorky: experimentální práce (optimalizace postupů, vývoj metody SPE, vývoj metody HPLC), zpracování dat.

2. Raabová, H.; Háková, M.; Chocholoušová Havlíková, L.; Erben, J.; Chvojka, J.; Solich, P.; Švec, F.; Šatínský, D., **Poly-epsilon-caprolactone Nanofibrous Polymers: A Simple Alternative to Restricted Access Media for Extraction of Small Molecules from Biological Matrixes.** Analytical Chemistry 2020, 92 (10), 6801-6805 (IF 2020: 6.986 – Q1).

Podíl autorky: rešerše literatury, experimentální práce (optimalizace postupů, vývoj on-line SPE metod, vývoj HPLC metod), zpracování dat, příprava a sepsání publikace.

3. Raabová, H.; Erben, J.; Chvojka, J.; Solich, P.; Švec, F.; Šatínský, D., **The role of pKa, log P of analytes, and protein matrix in solid-phase extraction using native and coated nanofibrous and microfibrinous polymers prepared via meltblowing and combined meltblowing/electrospinning technologies.** Talanta 2021, 232, 1-11 (IF 2021: 5,339 – Q1).

Podíl autorky: rešerše literatury, experimentální práce (optimalizace postupů, vývoj on-line SPE metod, vývoj HPLC metod), zpracování dat, příprava a sepsání publikace.

4. Raabová, H.; Chocholoušová Havlíková, L.; Erben, J.; Chvojka, J.; Švec, F.; Šatínský, D., **Polycaprolactone nanofibers as an alternative sorbent to restricted access media: A case study for direct extraction and separation of non-steroidal anti-inflammatory drugs from human serum using column-switching chromatography.** Nanomaterials (ve fázi zpracování revizí „minor revisions“).

Podíl autorky: rešerše literatury, experimentální práce (optimalizace postupů, vývoj on-line SPE metod, vývoj HPLC metod, práce s biologickým materiálem), zpracování dat, příprava a sepsání publikace.

8.2. Prezentace výsledků

10. postgraduální a 8. postdoktorandská konference, ústní prezentace, Hradec Králové (leden 2021)

16th International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Separation Technology, ústní prezentace, Gent – Belgie (leden 2020)

48th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, posterová prezentace, Miláno – Itálie (červen 2019)

9. postgraduální a 7. postdoktorandská konference, ústní prezentace, Hradec Králové (leden 2019)

32nd International Symposium of Chromatography, posterová prezentace, Cannes-Mandelieu – Francie (září 2018)

18th Interdisciplinary Meeting of Young Life Scientist, posterová prezentace, Milovy (květen 2018)

8. postgraduální a 6. postdoktorandská konference, ústní prezentace, Hradec Králové (leden 2018)

24. Studentská vědecká konference, ústní prezentace, Hradec Králové (březen 2016)

8.3. Stáže a projekty

Stáž na Technické univerzitě Liberec, Katedra netkaných materiálů a nanomateriálů,
výzkumná skupina Ing. Jiřího Chvojky, Liberec (září 2019)

Stáž na Universität Basel, Department Chemie, výzkumná skupina prof. Petera C. Hausera, Basilej – Švýcarsko (únor 2019 – červen 2019)

CASSS Frantisek Svec Fellowship for Innovative Studies

Solid phase extraction using novel immunospecific nanofibrous sorbent for direct recovery of biopharmaceuticals from biological matrix (2021) (zrušeno kvůli COVID-19)

Fulbrightovo stipendium 2020

1. náhradník (*zrušeno kvůli COVID-19*)

Grantová agentura České republiky, student spoluřešitel projektu No. 20-19297S

Nanofibrous polymers with restricted access materials functionality for the on-line chromatographic extraction of complex samples (2020 – 2023)

Grantová agentura Univerzity Karlovy, spoluřešitel projektu No. 1 134 119

On-line extraction techniques in liquid chromatography using modern extraction sorbents (2019 – 2021)

Grantová agentura Univerzity Karlovy, hlavní řešitel projektu No. 766 218

The nanofibrous polymers as "restricted access" materials for the on-line extraction of biological samples (2018 – 2021)

Grantová agentura České republiky, student spoluřešitel projektu No. 17-08738S

Nanofibrous polymers as perspective sorbents for the on-line extraction in chromatographic systems (2017 – 2019)

**The European Social Fund (ESF) and the European Regional Development Fund (ERDF),
student spoluřešitel projektu No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/ 0000465**
Specialized Team for Advanced Research on Separation Science (2017 – 2022)

9. PŘÍLOHY