

**UNIVERZITA KARLOVA**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra analytické chemie**



**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**EXTRAKCE NA NANOVLÁKENNÝCH SORBENTECH  
PRO STANOVENÍ VYBRANÝCH LÉČIV A  
KONTAMINANTŮ POMOCÍ KAPALINOVÉ  
CHROMATOGRFIE**

Vedoucí diplomové práce: PharmDr. Ivona Lhotská, Ph.D.

**HRADEC KRÁLOVÉ, 2023**

**Jana Nastoupilová**

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně (pod vedením 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

Jana Nastoupilová

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala paní PharmDr. Ivoňě Lhotské, Ph.D. za čas, který mi věnovala při vedení této diplomové práce. Jsem jí vděčná nejen za trpělivost, ochotu a přátelský přístup, ale i za poskytnutí velmi cenných odborných rad.

Dále bych ráda poděkovala Technické univerzitě v Liberci za poskytnutí nanovláknenných sorbentů a za finanční podporu Grantové agentury ČR (projekt GAČR 20-19297S).

## **Abstrakt**

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Jana Nastoupilová

Školitelka: PharmDr. Ivona Lhotská, Ph.D.

Název diplomové práce: Extrakce na nanovlákných sorbentech pro stanovení vybraných léčiv a kontaminantů pomocí kapalinové chromatografie

Tato diplomová práce se zaměřuje na optimalizaci nového způsobu extrakce na tuhé fázi (SPE) s využitím nanovlákných polymerů plněných do centrifugačních filtrů pro stanovení kontaminantů (bisfenolů) a léčiv. Tento typ provedení extrakce si klade za cíl navýšení počtu najednou provedených analýz. Jako sorbent pro optimalizaci nové techniky byl zvolen kompozitní polymer nPCL/μPCL (nano a mikro vláken polykaprolaktonu), který jevil slibné vlastnosti již v předchozích pracích. Cílem práce bylo optimalizovat podmínky extrakce a validovat metodu.

Technikou provedení byla zvolena mikroextrakce, při níž docházelo k plnění centrifugačních filtrů nanovláknem ve formě vyseknutých disků. Jako hnací síla průchodu vzorku a činidel skrz nanovláknem se využila odstředivá síla centrifugy. Následná analýza proběhla pomocí UHPLC (chromatografická kolona YMC-Triart C18 ExRS, rozměry 100x4,6 mm, velikost částic 3 μm) a detekce DAD detektorem (při 210 a 220 nm). Při optimalizaci se určoval počet disků z nanovláken ve filtru, množství činidla potřebného k aktivaci, kondicionaci a eluci, rychlost a doba otáčení centrifugy. Probíhala extrakce kontaminantů (bisfenolů) z říční vody a léčiv z lyofilizovaného séra a z moči.

Výsledkem práce je úspěšně validována HPLC metoda pro stanovení bisfenolů ve vodě po extrakci na PCL nanovláknem v centrifugačních filtrech. Výsledky preciznosti o odchylkách 3 – 4,5 % pro šest extrakcí potvrzují vysokou míru opakovatelnosti. Dále lze z výsledků usoudit, že sorbent je selektivní spíše pro lipofilnější analyty s logP vyšším než 3.

## **Abstract**

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Jana Nastoupilová

Supervisor: PharmDr. Ivona Lhotská, Ph.D.

Title of diploma thesis: Solid phase extraction using nanofibrous sorbents prior to liquid chromatography for determination of drugs and contaminants

The diploma thesis is focused on the optimization of a new type of solid-phase extraction (SPE) using nanofibrous sorbents filled in centrifugal filters for the determination of contaminants (bisphenols) and drugs. The aim is to increase the quantity of parallel analyses. The composite polymer nPCL/ $\mu$ PCL (nano and microfibers of polycaprolactone) was chosen as the tested sorbent because of its promising results in previous works. The aim of the diploma thesis was optimization of conditions for extraction and validation of the method.

The method of choice was microextraction, when discs from nanofibrous sorbent were cut and then filled in centrifugal filters. A centrifuge was used for passing liquid through the sorbent. Analysis was carried out by UHPLC (chromatography column YMC-Triart C18 ExRS, size 100x4.6 mm, particle size 3  $\mu$ m) and detection was performed by DAD detector (210 and 220 nm). During the optimization, number of nanofibrous discs filled in centrifugal filters, volume of reagents used for activation, conditioning, and elution, and speed and time of centrifugation were selected. Extraction was tested of contaminants (bisphenols) from river water and drugs from lyophilized serum and urine. The outcome of this diploma thesis is a validated HPLC method for the determination of bisphenols in water after extraction on PCL nanofibrous discs filled in centrifugal filters. Precision for six extractions with deviations of 3 – 4.5 % confirmed a high rate of the method repeatability. According to our results, it can be concluded that the sorbent is selective rather for more lipophilic analytes with logP higher than 3.

# Obsah

1	Úvod .....	9
2	Cíl a popis práce .....	10
3	Teoretická část .....	11
3.1	Nanovláknenné polymery .....	11
3.1.1	Electrospinning (elektrostatické zvlákňování) .....	12
3.1.2	Meltblown .....	13
3.1.3	Kombinace metod elektrostatického zvlákňování a meltblown .....	14
3.2	Extrakce na tuhé fázi .....	15
3.3	Možnosti použití nanovláknenných sorbentů pro extrakci .....	16
3.4	Sledované analyty – bisfenoly, vybraná léčiva .....	19
4	Experimentální část .....	23
4.1	Přístrojové vybavení, pomůcky a materiál .....	23
4.2	Použité standardy, chemikálie a vzorky .....	23
	Standardy – bisfenoly (BP) .....	23
	Standardy – léčiva .....	24
	Chemikálie .....	24
	Vzorky .....	24
4.3	Příprava roztoků .....	24
4.3.1	Příprava roztoků standardů bisfenolů .....	24
4.3.2	Příprava roztoků standardů léčiv .....	25
4.4	Příprava spin filtru .....	25
4.5	Chromatografické podmínky a jejich optimalizace .....	26
4.5.1	Optimalizace pro bisfenoly .....	26
4.5.2	Optimalizace pro léčiva .....	28
4.6	Optimalizace extrakce .....	29
4.6.1	Optimalizace pro bisfenoly ve vodném vzorku .....	29
4.6.2	Optimalizace pro léčiva v biologickém materiálu .....	36
4.7	Shrnutí optimalizovaných chromatografických a extrakčních podmínek .....	40
4.7.1	Optimální chromatografické podmínky .....	40
4.7.2	Optimální extrakční podmínky .....	41
4.8	Validace – bisfenoly v řece .....	43
4.8.1	Podmínky .....	43
4.8.2	Test způsobilosti systému (SST) .....	44
4.8.3	Linearita .....	45

4.8.4	Preciznost (precision).....	49
4.8.5	Přesnost (accuracy).....	49
4.8.6	Limit detekce a kvantifikace.....	50
4.9	Rozšíření experimentální části – léčiva v biologických vzorcích .....	50
4.9.1	Preciznost a přesnost pro léčiva v moči .....	50
5	Závěr.....	52
6	Seznam použité literatury .....	53
7	Seznam tabulek.....	56
8	Seznam obrázků .....	56

## Seznam zkratek

BP	bisfenol
DAD	detektor diodového pole
ECD	elektrochemický detektor
FLD	fluorescenční detektor
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
kys.	kyselina
LČ	léčiva
LOD	limit detekce
logP	rozdělovací koeficient oktanol/voda
LOQ	limit kvantifikace
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
nPCL/ $\mu$ PCL	nano a mikrovlákná polykaprolaktonu
PCL	polykaprolakton
pKa	disociační konstanta
RPM	otáčky za minutu
RSD	relativní směrodatná odchylka
SEM	skenovací elektronový mikroskop
SPE	extrakce na tuhou fázi
SST	test způsobilosti systému
STAND	standard
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie



# 1 Úvod

V současnosti se vývoj analytických metod ubírá směrem miniaturizace, automatizace postupů, omezování organických činidel a dále se zabývá vznikem nových citlivých metod. Na poli analytické chemie zaznamenávají velký rozmach nanovláknenné polymery, které se jeví jako slibné extrakční sorbenty. V pracích, jež se tomuto tématu věnují, se testuje především jejich stabilita, selektivita, možnost opakovatelného použití, co největší univerzalita a v neposlední řadě finanční náročnost [1].

Nánovláknenné sorbenty lze připravit metodou elektrostatického zvlákňování a meltblown nebo se dají oba postupy zkombinovat. Mezi výhody nanovláken patří univerzálnost a možnost použití v různých extrakčních formátech. Tato práce se zabývá testováním paralelní extrakce v plněných centrifugačních filtrech, která by umožnila navýšení počtu najednou zpracovaných analýz. Pokračuje se tak ve výzkumu nanovláknenných sorbentů na katedře analytické chemie na Farmaceutické fakultě Univerzity Karlovy.

## 2 Cíl a popis práce

Cílem práce je vyvinout extrakční metodu založenou na centrifugaci, při níž je nanovláknový sorbent ve formě disků vložen do centrifugačního filtru. Jedná se o pilotní studii k využití polykaprolaktonových nanovláken v centrifugačních filtrech pro případné komerční využití hromadně vyráběných filtrů pro rutinní laboratoře.

V rámci testování bude optimalizováno množství sorbentu, jeho kondicionace, objem vzorku, množství činidla potřebného k eluci analytů ze sorbentu, počet otáček a čas potřebný při centrifugaci vzorku.

V průběhu práce budou sledovány a porovnávány parametry výtěžnosti a opakovatelnosti procesu, preciznosti, přesnosti. Popíše se retence modelových analytů, vybraných bisfenolů a léčiv, a extrakční účinnost z říční vody a biologických vzorků. Pro analýzu vzorků budou vyvinuty metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

Na závěr budou metody validovány, bude stanoven limit detekce a kvantifikace, přesnost a preciznost metody.

## 3 Teoretická část

### 3.1 Nanovláknenné polymery

Nanovláknena jsou charakterizována především svojí tloušťkou menší než 1  $\mu\text{m}$  a délkou, která bývá zpravidla o dva i více řádů vyšší. Kvůli větší stabilitě se tak nevyskytují samostatně, ale dochází k organizaci do větších struktur v podobě lineárních forem (nitě, příze), plošného uspořádání (vrstvy) nebo objemnějších struktur (vaty) [2].

Zdrojem pro výrobu nanovláken mohou být přirozeně se vyskytující materiály například dřevo, houby, schránky koryšů – biopolymery na bázi chitosanu, celulózy, nebo naopak syntetické polymery. Mezi výhody přírodních materiálů patří biokompatibilita a nízká toxicita, která nezatěžuje životní prostředí. Na druhou stranu nejsou tato vlákna tak odolná jako syntetická [1, 3]. Ta se mohou vyrábět například z polymeru polystyrenu, polyamidu, polyakrylonitrilu, polyetherimidu nebo polykaprolaktonu [1]. Výhodou posledního zmíněného, využitého i v této práci, je vlastnost biodegradability neboli biologické odbouratelnosti [2, 4].

V posledních letech lze zaznamenat hojnější zkoumání a testování nanovláken v mnoha oblastech. A ne jinak tomu je i v analytické chemii. Slibné se jeví jejich využití jako nových sorbentů pro extrakci na tuhé fázi (SPE). Ve studiích, které se tomuto tématu věnují, se testují vlastnosti vláken jako je stabilita, selektivita, možnost opakovaného použití, co největší univerzalita a v neposlední řadě finanční náročnost [1].

Důvodem, proč mají nanovláknenné polymery nejen v oblasti analytické chemie takový potenciál, je velký výčet výhodných vlastností. Jejich velká plocha povrchu díky malému průměru vláken zajišťuje vysokou sorpční kapacitu, což nám umožňuje použít malý objem vzorku i rozpouštědel [5]. Oproti klasickým komerčním SPE sorbentům, které lze použít jen jednou, vše nasvědčuje tomu, že sorbenty z nanovláknenných polymerů budou využitelné pro větší počet analýz [3, 5].

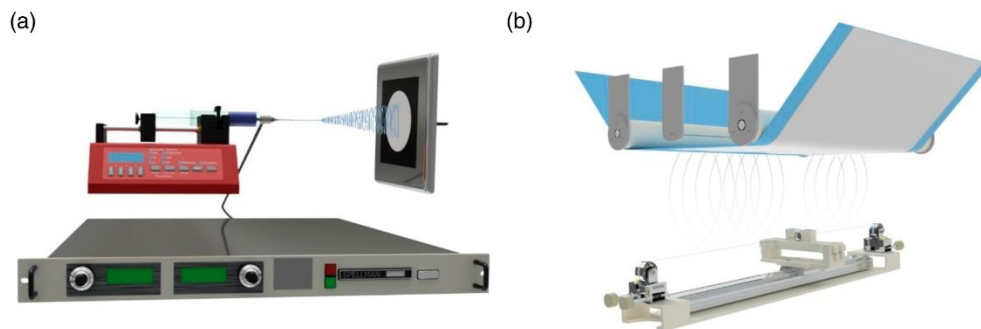
Jednotlivé typy sorbentů se od sebe liší různorodými mechanickými vlastnostmi a díky tomu tak máme na výběr z velkého množství materiálů vhodných pro rozličné typy analýz. Například odolnost vůči zvýšené teplotě splňují vlákna polyeterimidu, která tak lze využít v GC analýze pro tepelnou desorpci. Velkému tlaku například odolávají

kompozitní vlákna polykaprolaktonu a polyvinylidendifluoridu, naopak vlákna z polystyrenu nikoliv a vylučuje je to tak z použití při on-line extrakci SPE-HPLC [1]. Další parametr, který může hrát roli při výběru typu sorbentu, je jeho stabilita v organických rozpouštědlech. Třeba vlákna připravená z polyamidu 6 nebo polystyrenu jsou stabilní v methanolu, acetonitrilu i vodě, kdežto polykaprolakton není stabilní v acetonitrilu již při teplotě přesahující 35 °C [6]. Před začátkem vlastní analýzy je tedy dobré vzít v potaz vlastnosti materiálu a podmínek, kterým budou vystaveny. Metoda zvlákňování polymeru významně ovlivňuje výsledné mechanické vlastnosti a vzhled nanovláknenného materiálu.

### **3.1.1 Electrospinning (elektrostatické zvlákňování)**

Jedním ze způsobů, jak lze nanovlákna připravit, je mechanismus elektrostatického zvlákňování neboli electrospinning. Princip spočívá v tom, že se roztok nebo tavenina z polymerů nastříkává tryskou na kolektor, na němž se zachytávají vytvořená velmi jemná vlákna. Děje se tak ve velmi silném elektrickém poli, které je hnací silou celého procesu [1]. Jako kolektor může sloužit bublen nebo válec pokrytý nosičem, kterým může být například textilie a papír. Z nich jsou vlákna před použitím sejmuta a teprve poté dále použita [3]. Jako kolektor může být také drát z nerezové oceli, který lze poté rovnou použít v mikroextrakci na tuhou fázi.

Roztok nebo tavenina polymeru může být rozstříkována skrz jehlu/trysku nebo při takzvaném „needleless“ electropinningu se samovolně tvoří mnoho trysek přímo z hladiny roztoku polymeru. Mezi těmito dvěma základními metodami elektrostatického zvlákňování je největší rozdíl v množství vyprodukovaného materiálu. Při použití jehly/trysky dochází ke snížení vyprodukovaného množství. Tento typ výroby se spíše využívá pro laboratorní účely při zkoumání nových typů polymerů jako sorbentů. Naopak typ bez jehly bývá používán spíše pro komerční účely [1].



Obrázek 1: Srovnání přípravy nanovláken elektrostatičným zvlákňováním s a) jehlou a b) bez jehly [7]

### 3.1.2 Meltblown

Oproti elektrostatičkému zvlákňování jsou pomocí metody meltblown produkována spíše širší vlákna o průměru 1 – 5  $\mu\text{m}$ . U této metody dochází k protlačení taveniny polymeru pomocí horkého vzduchu přes extrudér a k následnému zachytávání ještě částečně roztavených vláken na kolektoru [3, 8]. Vlastnosti vzniklého materiálu závisí na konstrukčních parametrech výrobního zařízení, polymerní taveniny a proudícího vzduchu [2]. Mezi výhody takového sorbentu patří vyšší porozita a mechanická odolnost oproti vláknům vyrobeným pomocí elektrostatičkého zvlákňování. Na druhou stranu takhle vyrobená vlákna mají nižší specifický povrch [3].

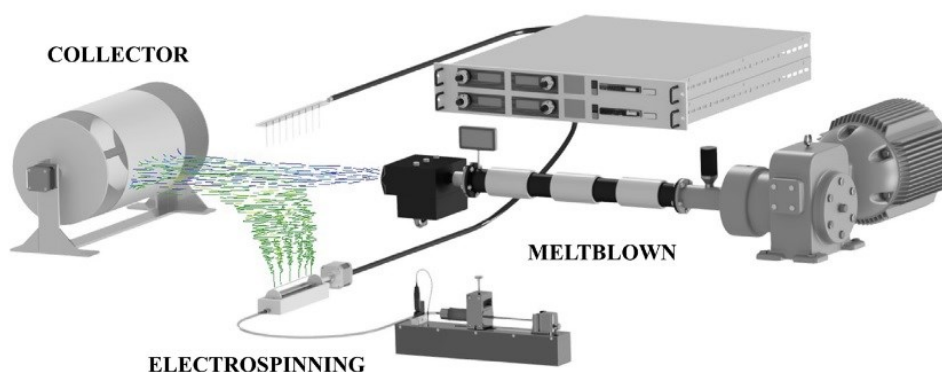


Obrázek 2: Srovnání sorbentu připraveného metodou elektrostatičkého zvlákňování (vlevo) a meltblown (vpravo)

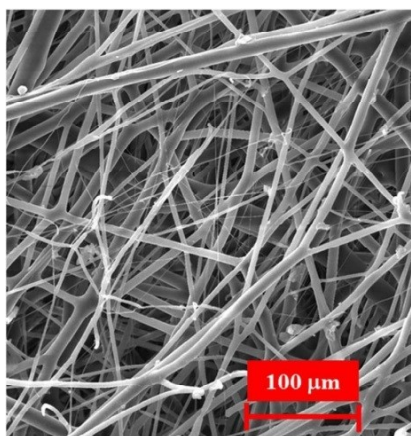
### 3.1.3 Kombinace metod elektrostatického zvlákňování a meltblown

Kombinací výše zmíněných typů výroby získáme sorbent obsahující směs mikro a nanovláken. Mikrovlákna vyrobená metodou meltblown poskytují oporu nanovláknům připraveným pomocí elektrostatického zvlákňování, která by jinak byla náchylnější ke zhroucení. Naopak mikrovlákna by sama o sobě měla nižší specifický povrch, který je nepřímo úměrný průměru [3]. Vznikne tedy stabilní sorbent, který si zachovává dostatečně velkou plochu potřebnou k extrakci látek. Svým vzhledem může připomínat strukturu bavlněných vláken [5]. Z předchozího zkoumání vyšlo najevo, že tyto typy kompozitního polymeru mají dobrou extrakční účinnost, jsou odolné a dobře se s nimi manipuluje, a proto byl vybrán kompozit polykaprolaktonu (nPCL/ $\mu$ PCL) pro další testování v této práci [5].

Na obrázku č. 3 je zachyceno spojení obou metod výroby dohromady a na obrázku č. 4 lze vidět zobrazená nano a mikrovlákna skenovacím elektronovým mikroskopem (SEM).



Obrázek 3: Kombinace metod elektrostatického zvlákňování a meltblown [1]



Obrázek 4: nPCL/ $\mu$ PCL vlákna pod SEM mikroskopem [9]

## 3.2 Extrakce na tuhé fázi

Extrakce na tuhé fázi (SPE) funguje na principu rozdělování složek mezi tuhou a kapalnou fází. Důležité je, aby měly analyty větší afinitu k sorbentu (tuhé fázi) než k matrici vzorku (kapalné fázi), aby tak mohlo docházet k jejich zadržování. Děje se tomu tak mechanismem adsorpce nebo retence. Poté dochází k desorpci nebo eluci analytů ze sorbentu pomocí činidla, ke kterému mají látky ještě vyšší afinitu. Jednotlivé kroky, které je potřeba dodržet při extrakci SPE, by se daly popsat následovně:

- 1) aktivace sorbentu organickým rozpouštědlem
- 2) odstranění organického rozpouštědla a kondicionace rozpouštědlem s podobnými vlastnostmi jako matrice vzorku
- 3) nadávkování vzorku – dojde k zadržení analytů na sorbentu
- 4) promývací krok – odstranění interferujících sloučenin rozpouštědlem, které nevyvazuje již navázané analyty
- 5) eluce analytů

Hnací silou průchodu rozpouštědel a vzorku skrz sorbent může být tlak způsobený gravitací, přetlak pomocí přístroje nebo jednoduché stříkačky, podtlak vyvolaný vakuem, odstředivá síla v centrifuze nebo průtok při on-line zapojení do HPLC [10].

Výše zmíněné kroky mohou probíhat v různých formátech SPE. Sorbent lze naplnit do kolonky, do špičky pipety, použít ve formě disku nebo membrán nebo může extrakce probíhat na míchadle [11, 12, 13].

V této práci byly využity nanovláknenné disky z kompozitního polymeru nPCL/ $\mu$ PCL umístěné do centrifugačních filtrů (spin filter) v mikrozkušavách Eppendorf. Po nadávkování činidel a vzorku se zkumavky vložily do centrifugy, kde pomocí odstředivé síly došlo k průchodu kapalné složky skrz sorbent. Podle typu centrifugy je tak možno paralelně zpracovávat najednou až 96 extrakcí. Na obrázku č. 5 lze vidět spin filtry v mikrozkušavkách umístěné v centrifuze.

Mezi důvody zvolení takového typu uspořádání SPE patří jednodušší plnění kolonek, protože jsou disky kompaktnější a lépe se s nimi manipuluje. Dále vzorek prochází přes celou plochu najednou a je tak dobře zajištěn kontakt s nanovláknem. Minimalizuje se ucpávání, srážení nebo obtékání sorbentu po stěnách. Měření s disky je opakovatelné

a probíhá rychle. Velkou výhodou je současné zpracování velkého množství vzorků, které by se dalo využít i v rutinních laboratořích.



Obrázek 5: Spin filtry připravené na extrakci SPE v mikrozumavkách Eppendorf v centrifuze

### 3.3 Možnosti použití nanovláknenných sorbentů pro extrakci

V následující tabulce je uveden přehled prací, kde byly nanovláknenné sorbenty v minulosti využity pro extrakci. Lze se v ní dočíst, jaké typy polymerů byly využity nebo jaký formát SPE byl zvolen a jaké vzorky mohou být tímto způsobem testovány. Většina sorbentů ve zmíněných člancích byla vyrobena metodou elektrostatického zvlákňování. Takto připravená vlákna jsou spíše jemnější v tenké vrstvě, proto dochází k jejich plnění do kolonek nebo mikrošpiček pipet. Naopak robustnější vlákna zvládnou náročnější manipulaci a lze z nich tak vysekat disky nebo probíhá adsorpce přímo na volně míchaném sorbentu ve vzorku.

Množství sorbentu se upravuje vzhledem k provedení SPE, v tabulce č. 1 nalezneme příklady od 5 mg materiálu nadávkovaného ve špičce pipety nebo v kolonce až po větší množství 200 mg v kolonce připraveného metodou meltblown. Spotřeba materiálu se tak může lišit dle formátu SPE.



Tabulka 1: Různé možnosti použití nanovláknenných sorbentů

Typ nanovláknenného polymeru	Typ výroby nanovláken	Typ extrakce, formát SPE	Testované analyty	Typ vzorku	Analytická metoda	Odkaz
<b>PmAP/N6/GO</b> (poly m-aminofenol/nylon6/grafen oxid)	electrospinning (s jehlou)	mikroextrakce tenkým filmem membrána 2,5 cm průměr	estery kyseliny ftalové	voda a mléko z dětských lahví	GC-MS	[12]
<b>nPCL, μPE, nPA6, nPS, nPID, nPAN, nPCL/μPCL, nPVDF/μPCL, nPVDF,</b> (polykaprolakton, polyethylen, polyamid, polystyren, polyimid, polyakrylonitril, kompozitní vlákna polykaprolaktonu a polyvinylidenfluoridu)	electrospinning (nanovláknena), meltblown (mikrovláknena)	3D tištěná klec pro magnetické míchadlo a nanovláknena 52 mg	bisfenoly	říční a jezerní voda	HPLC-DAD	[13]
<b>PA 6</b> (polyamid 6)	electrospinning (bez jehly)	on-line SPE naplněná kolonka, 40 mg	bisfenol A	říční voda	UHPLC-FLD	[14]
<b>SNW1@PAN</b> (polyakrylonitril s inkorporovanými kovalentními organickými rámci)	electrospinning	mikroextrakce ve špičkách pipet 12,5 mg	sulfonamidy	maso	HPLC-DAD	[15]
<b>PS</b> (polystyren)	electrospinning (s jehlou)	extrakce v plněných injekčních stříkačkách 62 mg	hypnosedativa	lidská moč	HPLC-DAD	[16]
<b>PS-PEC</b> (polystyren-polymerní crown ether)	electrospinning (s jehlou)	extrakce v plněných kolonkách 5 mg	β-agonisté	vepřové maso	UHPLC-MS/MS	[17]
<b>PU/PANI</b> (polyuretanová vlákna pokrytá polyanilinem)	electrospinning (s jehlou)	mikroextrakce na čipu 15 mg	opiodní alkaloidy	lidská moč	UV detekce	[18]

<b>PAN/MIL-53(Fe)</b> (polyakrylonitril s inkorporovanými organokovovými sítěmi)	electrospinning	mikroextrakce ve špičkách pipet 5 mg	benzodiazepiny	odpadní voda, lidská moč, plasma	HPLC-DAD	[19]
<b>PAN, PA6, nPVDF/μPCL, nPCL/μPCL, nPCL/μPCL</b> <b>pokryté polydopaminem,</b> (polyakrylonitril, polyamid, kompozitní vlákna polyvinylidenfluoridu a polykaprolaktonu)	electrospinning	on-line SPE	resveratrol	víno	UHPLC-DAD, FLD	[20]
<b>PVA/CA/Au</b> (kombinace polyvinylalkoholu s kyselinou citronovou a nanočásticemi zlata)	electrospinning (s jehlou)	adsorpce na nanovláknový sorbent volně míchaný ve vzorku 3x3 cm, 5 mg	Pb <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup>	rýže, voda, kosmetika	plamenová atomová absorpční spektroskopie	[21]
<b>Ppy</b> (komerční polystyrenová nanovlákná potažena polypyrrolem polymerizací in situ)	electrospinning	extrakce v plněných kolonkách 5 mg	vitamíny ze skupiny B	lidská moč	HPLC-UV	[22]
<b>PP</b> (polypropylen z lékařských roušek)	meltblown	extrakce v plněných kolonkách 200 mg	fipronil a jeho metabolity	voda	GC-ECD	[23]

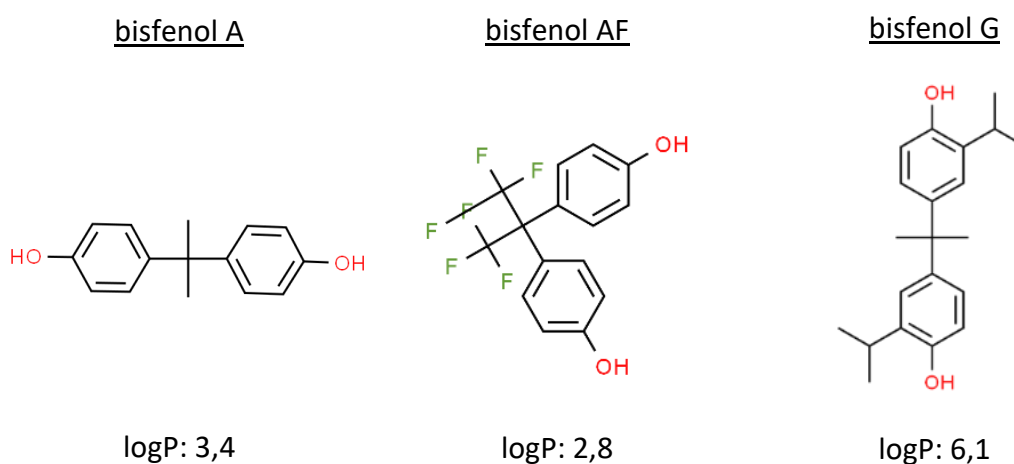
### 3.4 Sledované analyty – bisfenoly, vybraná léčiva

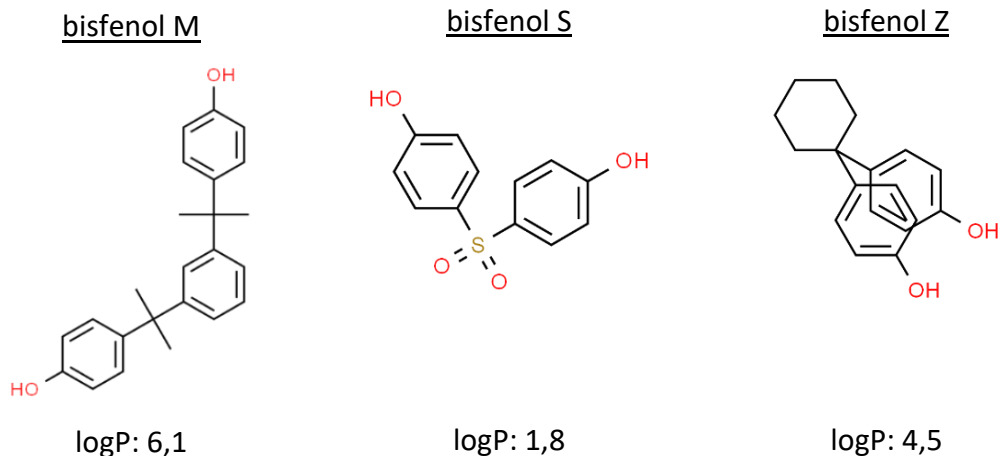
První sledovanou skupinou analytů jsou bisfenoly. Řadí se mezi endokrinní disruptory, což je označení pro exogenní látky, které inhibují funkce hormonů v lidském těle a napodobují jejich přirozený účinek. Vliv bisfenolů na lidský organismus lze popsat jako cytotoxický, genotoxický, neurotoxický a reprodukčně toxický [24].

Běžně se vyskytují a následně uvolňují z polykarbonátových plastů sloužících například k výrobě opakovaně použitelného plastového nádobí a lahví na nápoje, sportovních potřeb, CD a DVD [25]. Bisfenoly se dále mohou vyskytovat i v úctenkách vyrobených z termocitlivého papíru, v bankovkách nebo ve výrobcích z recyklovaného papíru. Z těchto výrobků se tak mohou dostávat do životního prostředí a narušovat ho [24, 26]. Z toho důvodu je důležité hladinu těchto kontaminantů sledovat, protože se mohou dostat až do vodního ekosystému, odkud mohou dále narušovat potravní řetězec [24]. V rámci této práce tak bylo zahrnuto testování bisfenolů v říční vodě.

Vzhledem k jejich nežádoucím účinkům stanovila Evropská komise limit, který nesmí být u jídla, jež se dostane do kontaktu s plasty, překročen. Konkrétně se jedná o 0,05 mg/kg pro bisfenol A a tato hranice se pečlivě kontroluje [27].

Tabulka 2: Struktury modelových analytů – bisfenoly [28] [29]



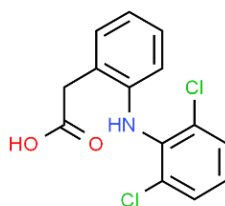


V průběhu optimalizace byly dále testovány dvě skupiny léčiv, ale bylo zjištěno, že PCL vlákna jsou vhodnější pro látky lipofilnější povahy, a proto byla vybrána skupina modelových léčiv s logP vyšším než 3, k nimž budou mít nanovlákná vyšší afinitu a retenci. Podrobily se zkoumání při extrakci z biologické matrice, a to ze séra a moči, kde se po podání do lidského organismu vyskytují. Léčiva se navzájem odlišují i svými disociačními konstantami (pKa), aby se mohl prozkoumat jejich vliv na retenci, když budou ionizovány. Zároveň s tím probíhalo testování změny pH prostředí při extrakci a eluci.

Zastoupena jsou léčiva ze skupiny nesteroidních antiflogistik (diklofenak, flurbiprofen), steroidních hormonů (estradiol) a antimykotik (klotrimazol), aby byl poskytnut vzhled pro různorodé látky a jejich vliv na chování sorbentu. Pod tímto textem si lze přečíst krátkou charakteristiku o každém z nich.

#### 3.4.1.1 Diklofenak

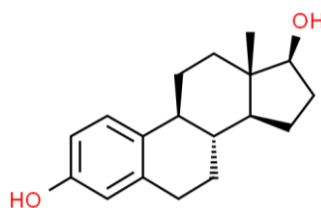
- ze skupiny nesteroidních antiflogistik
- logP: 4,51 [29]
- pKa: 4,15 [29]
- mechanismus účinku: inhibice biosyntézy eikosanoidů (prostaglandinů, prostacyklinu, tromboxanu) pomocí inhibice cyklooxygenázy



Obrázek 6: Vzorec diklofenaku [28]

### 3.4.1.2 Estradiol

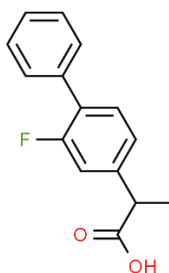
- ze skupiny steroidních hormonů
- logP: 4,01 [29]
- pKa: 10,46 [29]
- mechanismus účinku: vazbou na intracelulární receptory dochází k ovlivnění transkripce



Obrázek 7: Vzorec estradiolu [28]

### 3.4.1.3 Flurbiprofen

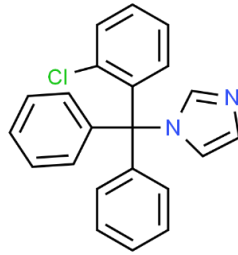
- ze skupiny nesteroidních antiflogistik
- logP: 4,11 [28]
- pKa: 4,22 [29]
- mechanismus účinku: inhibice biosyntézy eikosanoidů (prostaglandinů, prostacyklinu, tromboxanu) pomocí inhibice cyklooxygenázy



Obrázek 8: Vzorec flurbiprofenu [28]

#### 3.4.1.4 Klotrimazol

- ze skupiny antimykotik
- logP: 5,44 [28]
- pKa: 4,10 [29]
- mechanismus účinku: inhibice syntézy ergosterolu enzymatickou bloádou



Obrázek 9: Vzorec klotrimazolu [28]

## 4 Experimentální část

### 4.1 Přístrojové vybavení, pomůcky a materiál

Ultravysokoučinný kapalinový chromatograf: UHPLC Shimadzu Nexera X3 s DAD detektorem

Software na vyhodnocování výsledků: LabSolution

Centrifuga: MPW-260R

Analytické váhy: Sartorius

Chromatografická kolona: YMC-Triart C18 ExRS, rozměry 100x4,6 mm, velikost částic 3  $\mu\text{m}$

Extrakční sorbent: kompozitní polymer nPCL/ $\mu$ PCL, nanovlákná připravená elektrostatickým zvlákňováním a mikrovlákná metodou meltblown (Technická univerzita v Liberci)

Centrifugační filtry: Microfiltration Spin Filters – Ciro Manufacturing Corporation

Mikrozkumavky Eppendorf

Běžné laboratorní sklo

### 4.2 Použité standardy, chemikálie a vzorky

#### Standardy – bisfenoly (BP)

Bisfenol A: čistota  $\geq 99$  % Sigma – Aldrich s.r.o.

Bisfenol AF: čistota  $\geq 99$  % Sigma – Aldrich s.r.o.

Bisfenol G: čistota  $\geq 98$  % Sigma – Aldrich s.r.o.

Bisfenol M: čistota  $\geq 99$  % Sigma – Aldrich s.r.o.

Bisfenol S: čistota  $\geq 98$  % Sigma – Aldrich s.r.o.

Bisfenol Z: čistota  $\geq 99$  % Sigma – Aldrich s.r.o.

## **Standardy – léčiva**

Diklofenak: čistota  $\geq 98,5$  % (HPLC) Sigma – Aldrich s.r.o.

Estradiol: čistota  $\geq 98$  % (HPLC) Sigma – Aldrich s.r.o.

Flurbiprofen: Sigma – Aldrich s.r.o.

Klotrimazol: Sigma – Aldrich s.r.o.

## **Chemikálie**

Voda: připravena pomocí Milli-Q systému

Methanol: třída čistoty pro HPLC

Acetonitril: třída čistoty pro HPLC

Kyselina mravenčí:  $\geq 95$  % Sigma – Aldrich s.r.o.

## **Vzorky**

Voda z řeky Labe v Hradci Králové (odběr 9. 6. 2022)

Lyofilizované sérum LYONORM HUM N Erba Lachema s.r.o.

Lidská moč

## **4.3 Příprava roztoků**

### **4.3.1 Příprava roztoků standardů bisfenolů**

Rozpuštěním 1 mg standardů v 1 ml MeOH byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci 1000 mg/l. Dále došlo k nachystání směsného zásobního roztoku o koncentraci 100 mg/l, z každé vialky od všech bisfenolů byl odebrán potřebný objem, který byl následně doplněn methanolem. Tento směsný roztok sloužil k jednodušší přípravě dalších roztoků o menší koncentraci. Následně bylo vše uloženo do mrazáku a v případě potřeby došlo k jejich dalšímu zředění. Pracovní roztok o koncentraci 10 mg/l byl použit při optimalizaci podmínek a při validaci extrakce bisfenolů.



### 4.3.2 Příprava roztoků standardů léčiv

Příprava zásobních roztoků s léčivou probíhala obdobným způsobem jako s bisfenoly. Byly připraveny zásobní vialky s roztokem léčiv v MeOH o koncentraci 1000 mg/l, z kterých byl nachystán směsný zásobní roztok o koncentraci 100 mg/l. Použitý pracovní roztok byl o koncentraci 10 mg/l.

### 4.4 Příprava spin filtru

Před samotnou extrakcí bylo důležité připravit si do centrifugačních filtrů nanovlákněné disky. Ty byly vysekávány pomocí korkovrtu z kompozitního polymeru nPCL/ $\mu$ PCL vláken (viz obrázek č. 10). Výsledný průměr disku byl cca 7 mm.



Obrázek 10: Pomůcky potřebné pro přípravu spin filtru

V dalším kroku se umístil vyseknutý disk (v případě testování s BP až tři disky) do spin filtru. Jednalo se konkrétně o komerční polypropylenové mikrofiltry Ciro o průměru 7 mm a objemu 850  $\mu$ l. Kvůli minimalizaci kontaktu s materiálem byla použita pinzeta pro lepší manipulaci a pro dodatečné umístění a přilehnutí disku do spin filtru posloužila skleněná tyčinka. Vše bylo důležité dělat s co největší opatrností, aby se nepoškodila vlákna. Dále došlo k vložení spin filtru do mikrozukmavky Eppendorf, jak je možné vidět na další fotografii (obrázek č. 11).



Obrázek 11: Spin filtr naplněný disky z nanovláken a mikrozkuhavka Eppendorf

Do přichystaných filtrů s nanovláknou se napipetovaly roztoky a přešlo se k vlastnímu testování. Před posledním krokem extrakce, elucí cílových analytů ze sorbentu, se vyměnila mikrozkuhavka Eppendorf za novou, do které byl sbírán eluát.

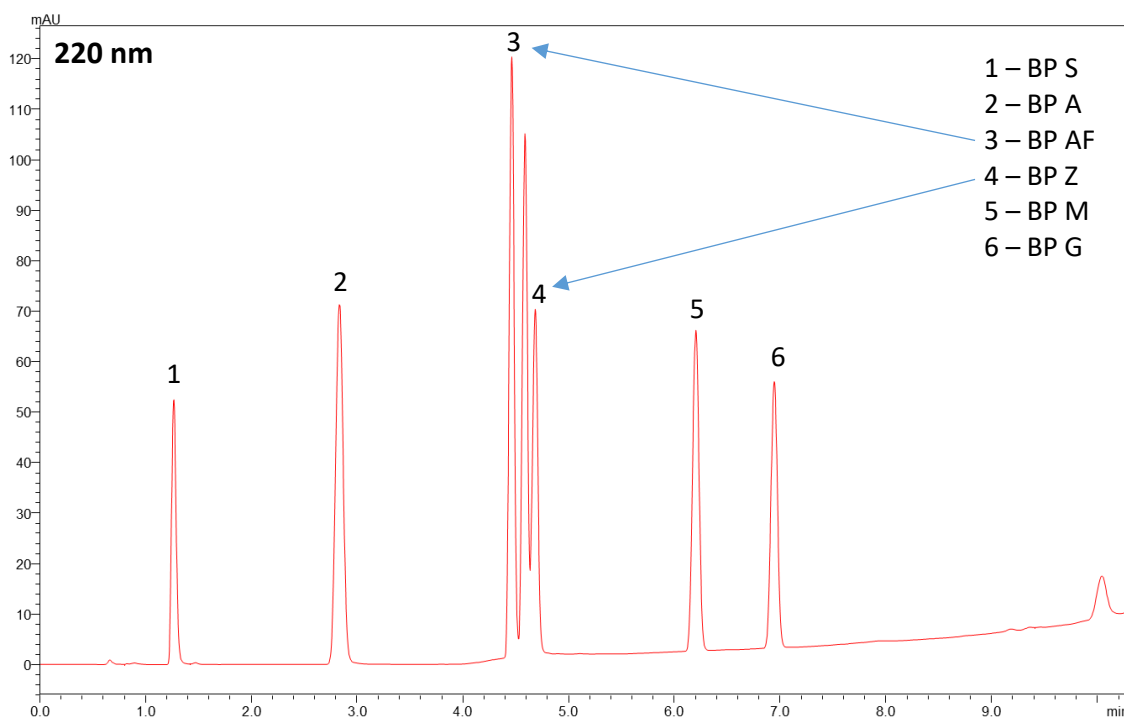
## 4.5 Chromatografické podmínky a jejich optimalizace

### 4.5.1 Optimalizace pro bisfenoly

Pro separaci bisfenolů byla použita univerzální stacionární fáze C18 (kolona YMC-Triart C18 ExRS rozměry 100x4,6 mm, velikost částic 3  $\mu\text{m}$ ), aby bylo možné metodu opakovat za využití těch nejjednodušších podmínek. Mobilní fázi tvořil MeOH (organická část) a voda.

Největší změna podmínek probíhala při optimalizaci gradientové eluce. Snaha byla o co nejkratší analýzu, ale aby došlo k rozdělení píků až na základní linii.

V prvních pokusech podíl organické složky rostl lineárně, ale některé píky nebyly dostatečně rozdělené, především bisfenoly AF a Z, jak je vidět níže v grafu (obrázek č. 12).



Obrázek 12: Chromatogram s obtížně oddělitelnými BP AF a BP Z

Proto byl gradient v některých vymezených úsecích po krátkou dobu držen ve stejném poměru k vodné fázi a teprve poté zase došlo k opětovnému vzestupu podílu acetonitrilu, jak je vidět níže v tabulce č. 3. Na obrázku č. 20 je záznam bisfenolů, které jsou již rozseparované na základní linii, za optimálních podmínek.

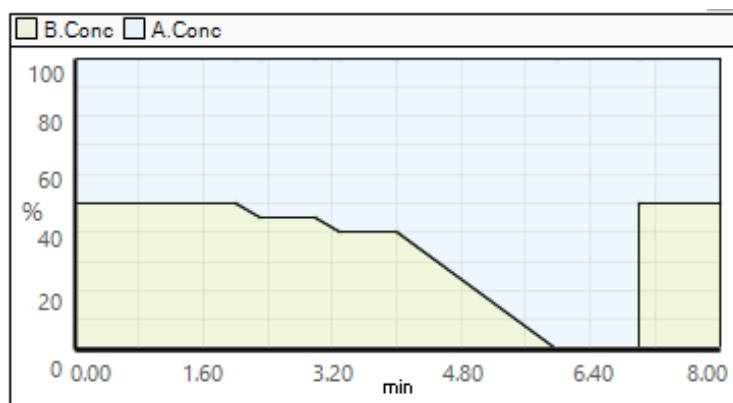
Výsledné podmínky gradientu vypadají následovně:

Tabulka 3: Výsledné podmínky gradientu při testování BP

	% organické fáze (acetonitril)	% vodné fáze
<b>do 2. min</b>	50	50
<b>2 – 2,5 min</b>	50 → 55	50 → 45
<b>2,5 – 3 min</b>	55	45
<b>3 – 3,5 min</b>	55 → 60	45 → 40
<b>3,5 – 4 min</b>	60	40
<b>4 – 6 min</b>	60 → 100	40 → 0
<b>6 – 7 min</b>	100	0
<b>7 – 8 min</b>	50	50

Od čtvrté minuty dochází k nárůstu koncentrace acetonitrilu až na 100 %, aby byla kolona dostatečně promyta. Následně se v sedmé minutě poměr fází upraví na výchozí (50:50), aby byly připraveny podmínky pro další měření, které začalo ihned po skončení předcházejícího.

Pro lepší představu výsledných gradientových podmínek je zde přiložen snímek z obrazovky z programu LabSolution (obrázek č. 13).



Obrázek 13: Grafické znázornění výsledných podmínek gradientu  
modrá = organická fáze (acetonitril), zelená = vodná fáze

#### 4.5.2 Optimalizace pro léčiva

Narozdíl od chromatografických podmínek při testování bisfenolů došlo u léčiv k okyselení mobilní fáze kvůli jejich kyselé povaze. Za tímto účelem se použila 0,1% kyselina mravenčí o pH 2,5. Důvodem byla snaha zachovat látky v neionizovaném stavu, aby se dostatečně zadržovaly na koloně.

Dále došlo k upravení a zjednodušení gradientu, jak je vidět v tabulce č. 4.

Tabulka 4: Výsledné podmínky gradientu při testování léčiv

	% organické fáze (acetonitril)	% vodné fáze (0,1 % kys. mravenčí)
<b>0 min</b>	60	40
<b>0 – 3,5 min</b>	60 → 100	40 → 0
<b>3,51 – 4,51 min</b>	60	40

## 4.6 Optimalizace extrakce

### 4.6.1 Optimalizace pro bisfenoly ve vodném vzorku

Prvotní testování se standardy bisfenolů probíhalo ve vodě. Všechny testy byly provedeny ve třech opakováních, dvakrát nadávkovány do UHPLC a výsledné hodnoty zprůměrovány. Optimalizoval se počet disků ve spin filtru, množství činidla potřebného k aktivaci, kondicionaci a eluci, počet otáček a čas potřebný při centrifugaci vzorku.

#### 4.6.1.1 Volba sorbentu

Pro testování byl vybrán kompozitní polymer nPCL/ $\mu$ PCL, protože vykazoval nejvyšší retenci organických látek oproti jiným polymerům [5]. Příprava probíhala kombinací metod elektrostatického zvlákňování a meltblown a díky tomu vznikla dostatečně silná vrstva cca 2 mm, se kterou se dobře manipulovalo a daly se z ní vysekávat disky.

#### 4.6.1.2 Počet vrstev disků

Jedním z prvních kroků bylo tedy určit, kolik vrstev disků bude mít nejvyšší výtěžnost a zároveň tak zadrží největší množství sledovaných BP.

Měření probíhalo s jednou, dvěma a třemi vrstvami. Plát nanovláken neměl všude stejnou šířku, ale byla snaha vždy vysekát disky z co nejvíce podobně tlusté nebo tenké vrstvy. Při výsledné validaci už došlo k pečlivému vážení, aby se zaručila opakovatelnost extrakce. Použily se tři disky, které vážily od 45,880 do 49,056 mg.

U testování se ponechaly stejné kroky jako u klasického provedení SPE. Nejdříve se aktivoval sorbent organickým rozpouštědlem, dále proběhla kondicionace vodou, protože poté se nadávkoval vodný vzorek. Volný objem při zaplnění spin filtru třemi disky činil 600  $\mu$ l. Stejné množství vzorku bylo dávkováno a i stejný objem MeOH byl použit při eluci. Organickým činidlem byl zvolen již zmíněný MeOH, protože z předchozího zkoumání vyšlo najevo, že PCL není stabilní v acetonitrilu [6]. Následně se mohlo přejít k samotnému testování. Postup dávkování a podmínky v tabulce č. 6 se dodržely u všech vrstev stejně:

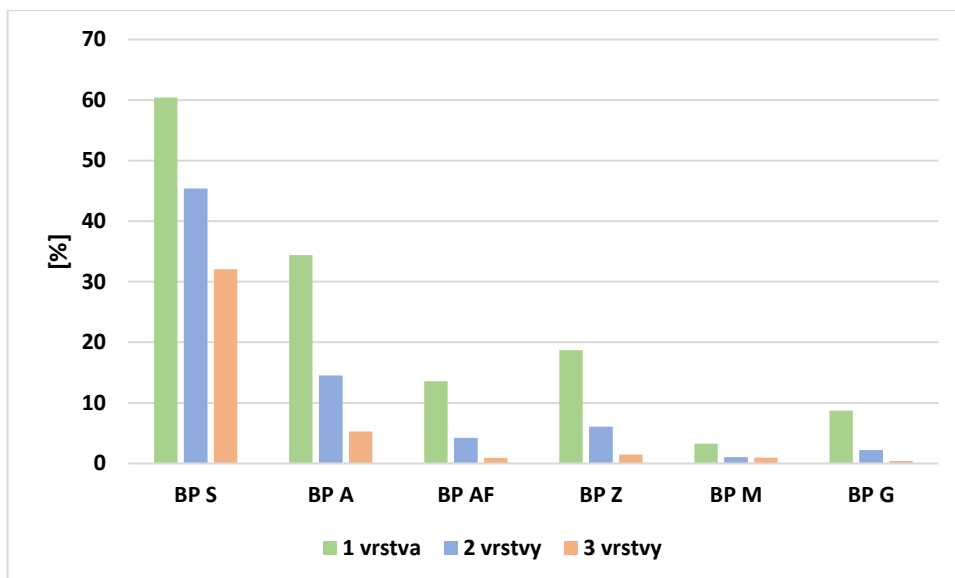
Tabulka 5: Postup a podmínky při optimalizaci počtu vrstev

	<b>objem chemikálií</b>	<b>čas, rychlost otáčení</b>
<b>aktivace</b>	200 µl MeOH	3 min, 7000 RPM
<b>kondicionace</b>	200 µl H <sub>2</sub> O	3 min, 7000 RPM
<b>vzorek</b>	600 µl STAND 10 mg/l v H <sub>2</sub> O	5 min, 7000 RPM
<b>eluce</b>	600 µl MeOH	5 min, 7000 RPM

Po nadávkování vzorku se z mikrozkuhavky Eppendorf odebraly vzorky pro zhodnocení množství nezachycených analytů. Dále byl měřen odběr po finální eluci MeOH. V tabulce č. 6 lze vidět srovnání výtěžností extrakce jednotlivých bisfenolů se standardem. V grafu pod tabulkou (obrázek č. 14) jsou znázorněny ztráty jednotlivých BP, které se nezachytily na sorbentu. Výsledek je uveden v procentech a vyhodnocuje srovnání se standardy. Jako optimální počet disků byly zvoleny tři disky.

Tabulka 6: Výtěžnost vyhodnocená při optimalizaci počtu vrstev

<b><u>VÝTĚŽNOST [%]</u></b>			
	<b>1 vrstva</b>	<b>2 vrstvy</b>	<b>3 vrstvy</b>
<b>BP S</b>	53,84	66,55	79,20
<b>BP A</b>	78,38	93,51	100,61
<b>BP AF</b>	97,70	98,70	99,54
<b>BP Z</b>	92,88	98,36	100,71
<b>BP M</b>	118,28	113,00	110,26
<b>BP G</b>	105,04	105,10	104,43



Obrázek 14: Kolik % jednotlivých BP se nezachytilo při optimalizaci počtu vrstev disků

#### 4.6.1.3 Promytí a kondicionace sorbentu

Dále probíhalo měření, které mělo určit podmínky u aktivace a kondicionace materiálu. Snaha byla extrakci co nejvíce zjednodušit a snížit počet provedených kroků na minimum, ale zároveň ověřit důležitost promytí sorbentu před nadávkováním vzorku z hlediska její účinnosti.

Porovnání bylo vyhodnoceno u dvou vrstev vláken a doba otáčení i počet otáček byly shodné s podmínkami popsány v tabulce nad tímto textem (tabulka č. 5). Testováno bylo přímé dávkování vzorku, promytí pouze MeOH a kondicionace ve dvou krocích MeOH a poté vodou (tabulka č. 7).

Tabulka 7: Podmínky pro optimalizaci aktivace a kondicionace materiálu

<b>2 vrstvy</b>			
	<b>1. měření</b>	<b>2. měření</b>	<b>3. měření</b>
<b>aktivace</b>	200 µl MeOH	200 µl MeOH	-
<b>kondicionace</b>	200 µl H <sub>2</sub> O	-	-
<b>nadávkování vzorku</b>	600 µl	600 µl	600 µl

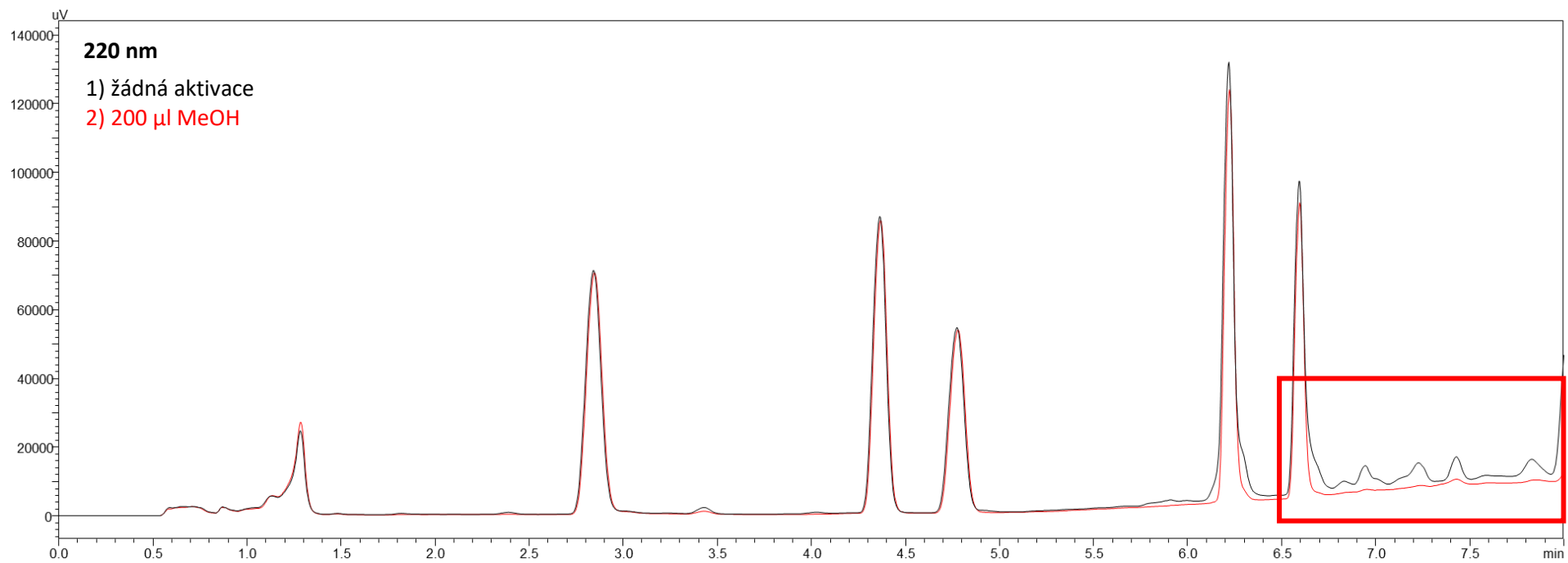
## Vyhodnocené výsledky:

Tabulka 8: Výtěžnost vyhodnocená při optimalizaci aktivace a kondicionace sorbentu

<b>VÝTĚŽNOST [%]</b>			
	<b>1. měření</b>	<b>2. měření</b>	<b>3. měření</b>
<b>BP S</b>	66,55	64,94	76,54
<b>BP A</b>	93,51	96,92	94,36
<b>BP AF</b>	98,70	102,17	91,74
<b>BP Z</b>	98,36	101,95	92,59
<b>BP M</b>	113,00	133,37	104,84
<b>BP G</b>	105,10	124,81	97,06

Výtěžnosti získané za třech různých podmínek vycházely podobně. Jediným rozdílem byly zachycené nečistoty na záznamu u sorbentu bez aktivace i kondicionace, jak je vidět níže na grafu (obrázek č. 15 – změny vyznačeny červeným obdélníkem). Ponechal se proto alespoň krok promytí pomocí 200  $\mu$ l MeOH před samotným nadávkováním vzorku, aby se minimalizoval rušivý šum. Nečistoty pravděpodobně zůstaly v sorbentu z jeho výroby.





Obrázek 15: Graf srovnání sorbentu bez aktivace a s aktivací pomocí MeOH, zvýrazněno místo s největšími změnami

#### 4.6.1.4 Rychlost a doba otáčení

Dále se zkoumal parametr rychlosti otáčení. Snaha byla zajistit co nejrychlejší proces, ale zároveň zachovat dostatečný kontakt vzorku se sorbentem. Testovali se rychlosti 2000 RPM, 4000 RPM, 6000 RPM a 8000 PRM. V tabulce č. 9 jsou vypočítané výtěžnosti jednotlivých bisfenolů vzhledem ke svým standardům a v tabulce č. 10 jsou odpovídající relativní směrodatné odchylky pěti extrakcí (RSD).

Tabulka 9: Výtěžnost vyhodnocená při optimalizaci rychlosti otáčení

<b>VÝTĚŽNOST [%]</b>				
	<b>2000 RPM</b>	<b>4000 RPM</b>	<b>6000 RPM</b>	<b>8000 RPM</b>
<b>BP S</b>	106,7	106,8	96,9	110,8
<b>BP A</b>	102,5	105,3	104,5	104,4
<b>BP AF</b>	99,2	100,7	102,9	99,4
<b>BP Z</b>	100,6	96,8	101,2	101,1
<b>BP M</b>	138,5	156,5	137,1	165,6
<b>BP G</b>	142,4	156,9	140,6	165,6

Tabulka 10: Hodnoty RSD pro výsledky výtěžnosti při optimalizaci rychlosti otáčení

<b>RSD [%]</b>				
	<b>2000 RPM</b>	<b>4000 RPM</b>	<b>6000 RPM</b>	<b>8000 RPM</b>
<b>BP S</b>	5,2	3,6	7,1	2,8
<b>BP A</b>	1,4	1,4	1,2	0,9
<b>BP AF</b>	1,4	1,4	1,2	1,1
<b>BP Z</b>	1,4	7,1	6,7	1,2
<b>BP M</b>	4,8	1,5	4,4	2,1
<b>BP G</b>	2,3	1,6	3,6	2,9

Současně s výběrem rychlosti otáčení probíhala i volba délky času. Nejdříve byl zvolen stejný čas 2 min pro všechny rychlosti. U rychlostí 2000 RPM a 4000 RPM neprošel celý objem činidla skrz sorbent, proto u nich došlo k navýšení času na 4 minuty. Doba měření vypadala tedy následovně:

Tabulka 11: Optimalizace času pro centrifugaci

2000 RPM	4000 RPM	6000 RPM	8000 RPM
4 min	4 min	2 min	2 min

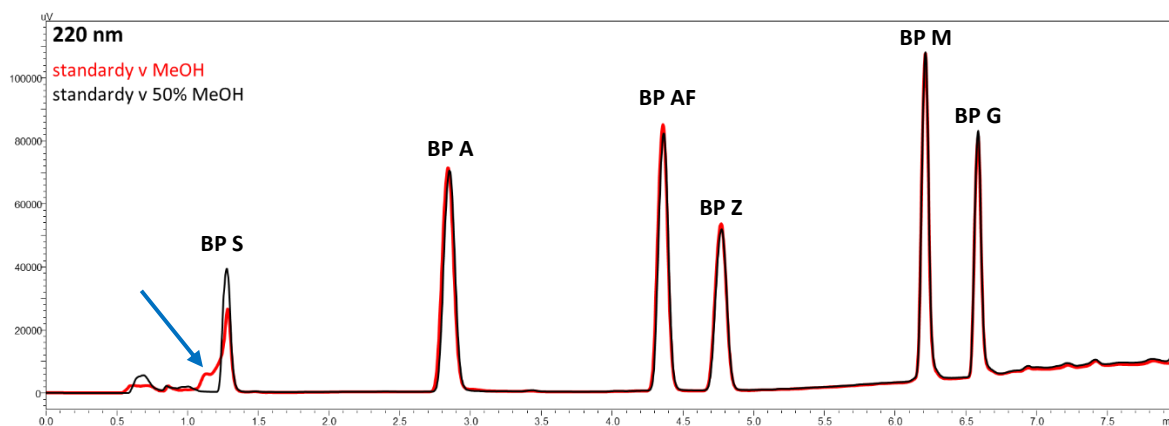
Z výše zmíněných výsledků vyšlo najevo, že hodnoty výtěžností jsou pro všechny rychlosti velmi podobné. Dále se zjistilo, že při prodlouženém průchodu vzorku skrz sorbent nedojde ke zvýšení výtěžnosti. Jako optimální rychlost otáčení se tedy zvolilo 6000 RPM za 2 minuty.

#### 4.6.1.5 Eluce

V posledním kroku optimalizace došlo k výběru vhodného elučního činidla a jeho množství. Cílem bylo použít co nejmenší objem a vzorek tak zakoncentrovat.

Jako činidlo se zvolil MeOH kvůli nestabilitě sorbentu z PCL vláken v prostředí acetonitrilu. Konkrétně se testoval objem činidla 600  $\mu$ l, 300  $\mu$ l a 150  $\mu$ l a jeho ředění 50:50 s vodou. V případě přímého nastříknutí metanolického eluátu docházelo ke zhoršení tvaru prvního píku bisfenolu S (znázorněno modrou šipkou na obrázku č. 16), čemuž se dalo předejít přidáním kroku naředění elučního činidla v poměru 50:50 s vodou. Tímto by se však extrakce navýšila o další úkon, proto se od ředění upustilo.

Při použití objemu 150  $\mu$ l MeOH už nedocházelo oproti ostatním ke kompletní eluci bisfenolů, proto byl zvolen objem 300  $\mu$ l a došlo tedy ke dvojnásobnému zakoncentrování vzorku.



Obrázek 16: Graf znázorňující frontování píku bisfenolu S

## 4.6.2 Optimalizace pro léčiva v biologickém materiálu

První skupina léčiv: dexamethason, hydrochlorothiazid, kyselina acetylsalicylová, penicilin G, propafenon

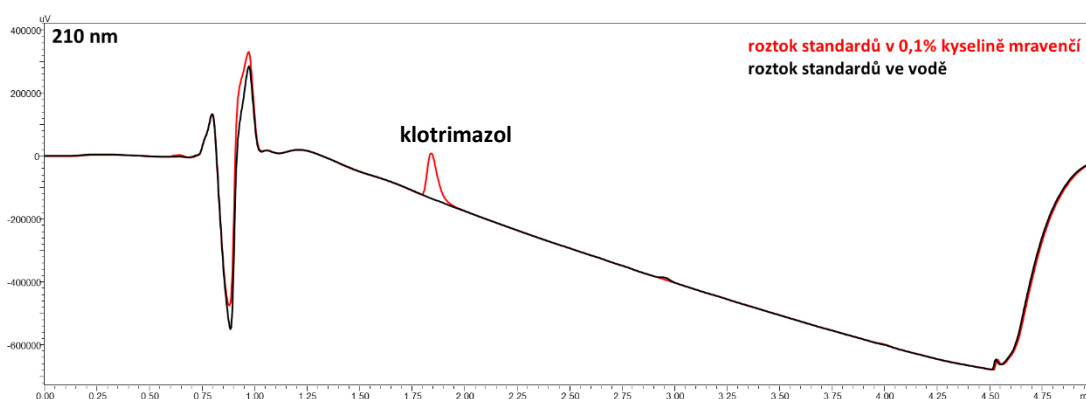
Léčiva z první skupiny se ve velkém množství nezachytávala na nanovláčkách, měla malou výtěžnost a nestejnorodé výsledky, tudíž byla z dalšího hodnocení vyřazena. Spojovala je vlastnost nízkého logP (menší než 3), proto pro další prozkoumání byla vybrána skupina léčivých látek s vyšším logP.

(poznámka: Rozdělovací koeficient oktanol/voda (logP) vyjadřuje vlastnost látky, jestli bude upřednostňovat spíše hydrofilní nebo lipofilní prostředí. Čím vyšší je logP, tím více upřednostňuje lipofilní prostředí [30].)

Druhá skupina léčiv: diklofenak, estradiol, flurbiprofen, klotrimazol

Pro prvotní měření s léčivy byly nejdříve ponechány stejné podmínky jako u bisfenolů a standardy byly naředěny ve vodě. Později se extrakce aplikovala na biologické vzorky (lyofilizované sérum a moč). Byly tedy ponechány tři vrstvy nanovláčkových disků, jejich aktivace pomocí 200  $\mu$ l MeOH, objem vzorku 600  $\mu$ l a eluce pomocí činidla o objemu 300  $\mu$ l.

Vzhledem ke kyselému charakteru některých léčiv se testovalo okyselení prostředí, v němž se nacházela léčiva při extrakci nebo eluci a sledovalo se, jaký vliv má změna na samotnou extrakci a eluci analytů. Bohužel to znamenalo horší výsledky pro klotrimazol, který se na sorbentu nezadržoval při dávkování v okyseleném roztoku (lze vidět na obrázku č. 17).



Obrázek 17: Testování okyselení prostředí – klotrimazol se nezadržoval na sorbentu

Došlo ke změně mobilní vodné fáze v UHPLC (0,1% kyselina mravenčí ve vodě). V tabulce č. 12 jsou vidět konkrétní podmínky pro testování s druhou sadou léčiv:

Tabulka 12: Podmínky pro testování druhé skupiny léčiv

<b>aktivace</b>	200 µl MeOH
<b>vzorek</b>	600 µl
<b>eluce</b>	600 µl MeOH
<b>počet otáček</b>	6000 RPM
<b>čas jednoho cyklu</b>	1 min (aktivace, kondicionace) 2 min (vzorek, promytí, eluce)

Po vyhodnocení výsledků vyšlo najevo, že výtěžnost pro klotrimazol byla v průměru 87 %, pro estradiol 92 %, pro flurbiprofen 76 % a pro diklofenak 77 %. Proměřeny byly také roztoky po nanesení na sorbent a spočítalo se, kolik analytu se nezachytilo. Konkrétně klotrimazol a estradiol nebyly detekovány vůbec, diklofenak jen kolem 10 % a flurbiprofen kolem 16 %.

Extrakce byly provedeny se čtyřmi vzorky, které byly nadávkovány dvakrát do UHPLC a z nich byl následně vypočítán průměr.

Pro další hodnocení se tedy vybrala pouze léčiva ze skupiny dvě, protože léčiva z první skupiny se kvůli nízkému logP nezachytávala na sorbentu.

#### 4.6.2.1 Optimalizace extrakce séra

Lyofilizované sérum Lyonorm Hum N se rekonstituovalo v 5 ml vody. Pro další hodnocení se použilo spikované sérum léčivy na koncentraci 10 mg/l, které se připravilo smísením 500 µl směšného standardního roztoku (c=100 mg/l) a 5 ml rekonstituovaného séra.

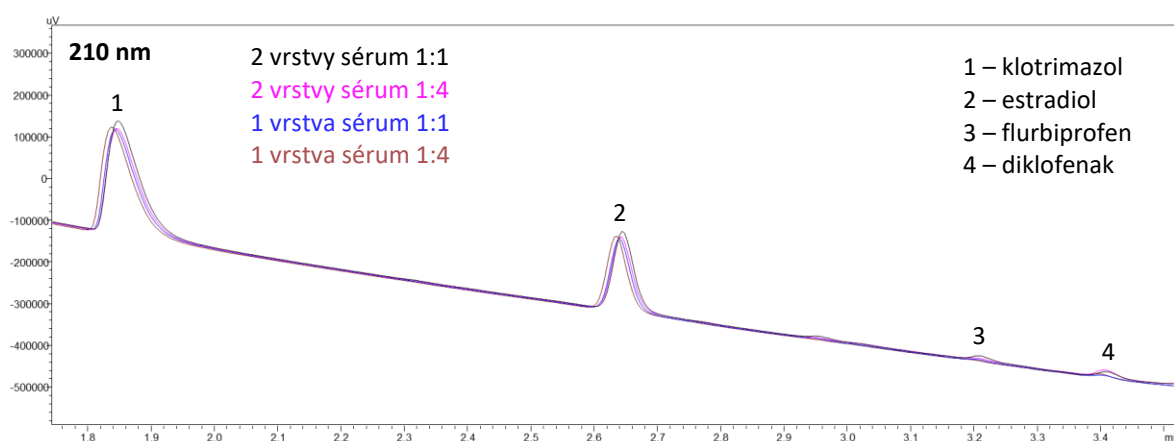
Při prvotním nástřiku vzorku, který obsahoval mix léčiv a séra, se zjistilo, že téměř žádný objem neprochází skrz nanovlákná a filtr se ucpával.

Proto byly podmínky následně upravovány. Extrakce probíhala s menším počtem nanovlákných disků, s menším objemem vzorku, došlo k většímu naředění séra a k promytí nanovláken před elucí.

Standardně byly používány pro měření tři vrstvy disků z nanovláken, ale i opticky bylo patrné, že kvůli vysoké vrstvě sorbentu vzorek neprojde skrz a není tak možné odebrat eluát na měření. Proto se zmenšil počet vrstev až na jednu, aby mohl vzorek projít lépe skrz nanovlákná. Dále byl vzorek nanesen v objemu 200 µl místo 600 µl a sérum bylo ředěno 1:1 a

1:4 s vodou. Přidal se i krok promytí před elucí pomocí 200  $\mu\text{l}$  vody. Úměrně k objemu vzorku byl zmenšen objem elučního činidla z 600  $\mu\text{l}$  MeOH na 200  $\mu\text{l}$  MeOH. Bohužel ani tyto kroky nezvýšily výtěžnost všech léčiv, jak je vidět v grafu pod tímto textem (obrázek č. 18).

Bylo zjištěno, že typ vláken PCL není pro tyto podmínky a extrakci séra vyhovující. V případném dalším rozšíření práce by bylo možné se zaměřit na změnu velikosti průměru vláken nebo smáčivosti, čímž by procházející vzorek neměl takový odpor, nebo na celkově jiném chemickém složení materiálu.



Obrázek 18: Změna podmínek pro zvýšení výtěžnosti léčiv u optimalizace extrakce séra

#### 4.6.2.2 Optimalizace extrakce moči

Další testovanou maticí byla moč. Pro měření se připravil spike moči 10 mg/l, který vznikl smísením 100  $\mu$ l směsného standardního roztoku ( $c=100$  mg/l) a 900  $\mu$ l moči. Pro zaručení průchodu vzorku skrz nanovlákná se zmenšil počet disků jen na jednu vrstvu, byl zachován menší objem vzorku a elučního činidla a přidán promývací krok pro odstranění interferencí z moči. Na rozdíl od testování s bisfenoly se tedy u léčiv použila pouhá třetina sorbentu, vzorku se standardy a třetina činidla k eluci.

Poté se optimalizovalo množství vody na promytí sorbentu. Porovnávány byly objemy 100  $\mu$ l a 200  $\mu$ l vody, které byly nadávkovány po vzorku se standardy v moči. Z výsledků výtěžnosti v porovnání se standardy se spočítal průměr. V tabulce č. 13 jsou výsledky:

Tabulka 13: Optimalizace objemu vody na promytí sorbentu

<b>VÝTĚŽNOST [%]</b>		
	<b>100 <math>\mu</math>l H<sub>2</sub>O</b>	<b>200 <math>\mu</math>l H<sub>2</sub>O</b>
<b>KLOTRIMAZOL</b>	83,09	82,40
<b>ESTRADIOL</b>	93,11	91,81
<b>FLURBIPROFEN</b>	59,96	56,37
<b>DIKLOFENAK</b>	73,24	68,43

Výsledky výtěžnosti pro oba objemy vycházely podobně. Ani u jednoho nedošlo ke zvýšení výtěžnosti v porovnání s tím druhým a pozadí na chromatogramu bylo totožné, proto byl zvolen menší objem. V tabulce č. 14 jsou rozepsány optimalizované podmínky:

Tabulka 14: Optimalizované podmínky pro testování léčiv v moči

<b>aktivace</b>	200 $\mu$ l MeOH
<b>kondicionace</b>	200 $\mu$ H <sub>2</sub> O
<b>vzorek</b>	200 $\mu$ l STAND 10 mg/l v moči
<b>promytí</b>	100 $\mu$ l H <sub>2</sub> O
<b>eluce</b>	200 $\mu$ l MeOH

## 4.7 Shrnutí optimalizovaných chromatografických a extrakčních podmínek

### 4.7.1 Optimální chromatografické podmínky

Chromatograf:	UHPLC Shimadzu Nexera X3
Detektor:	DAD spektrofotometr (BP 220 nm, LČ 210 nm)
Kolona:	YMC-Triart C18 ExRS, rozměry 100x4,6 mm, velikost částic 3 µm
Velikost nástřiku:	10 µl
Typ eluce:	gradientová BP – podrobně viz tabulka č. 3 LČ – podrobně viz tabulka č. 4
Mobilní fáze:	BP: acetonitril, voda LČ: acetonitril, 0,1% roztok kyseliny mravenčí
Celkový čas analýzy:	BP: 8,00 min LČ: 4,51 min
Teplota:	Laboratorní
Vyhodnocení:	Chromatografický software LabSolution



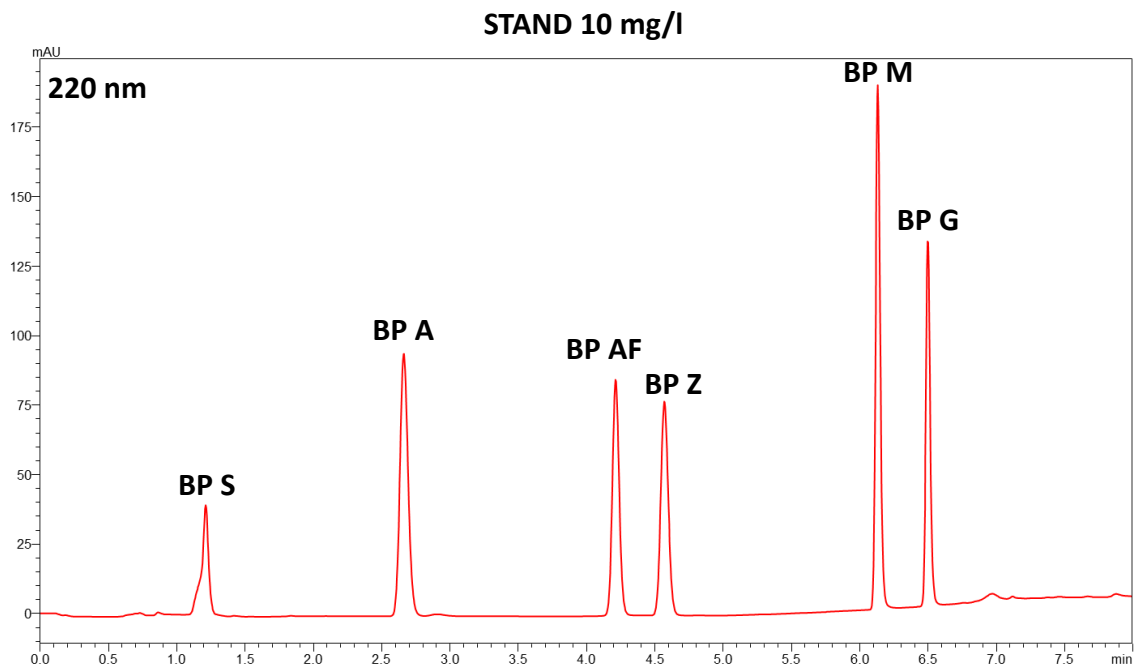
## 4.7.2 Optimální extrakční podmínky

### 4.7.2.1 Bisfenoly

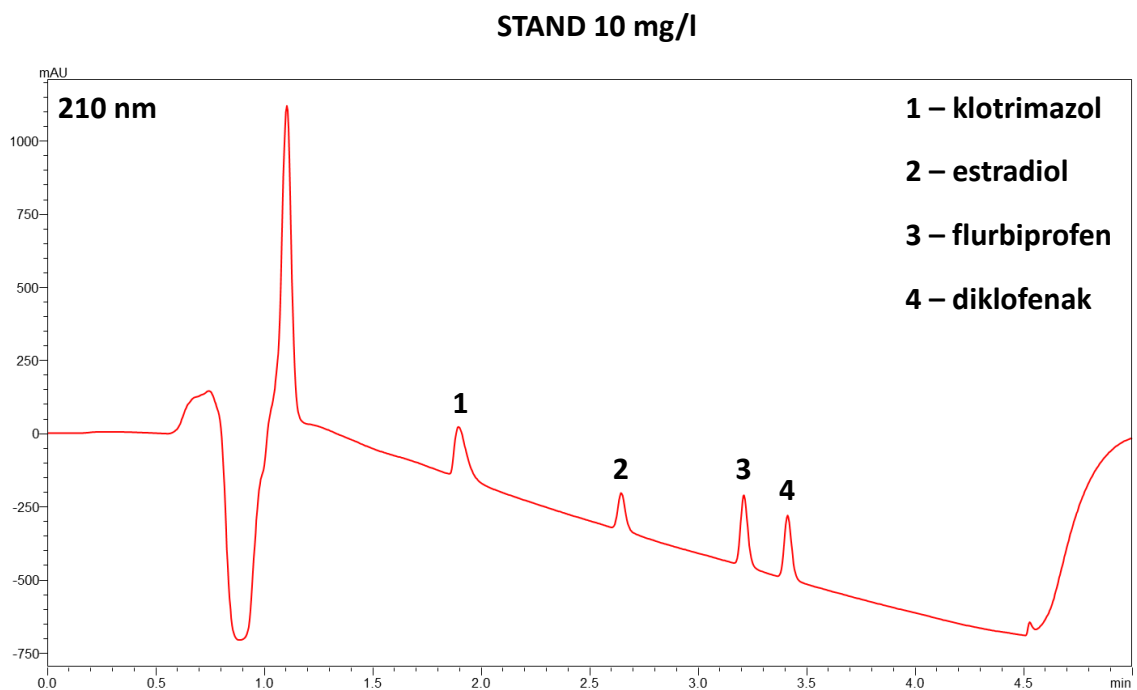
Počet disků:	3
Aktivace:	200 $\mu$ l MeOH
Objem vzorku:	600 $\mu$ l
Eluce:	300 $\mu$ l MeOH
Rychlost otáčení:	6000 RPM
Délka otáčení jednoho cyklu:	2 min

### 4.7.2.2 Léčiva

Počet disků:	1
Aktivace:	200 $\mu$ l MeOH
Kondicionace:	100 $\mu$ l H <sub>2</sub> O
Objem vzorku:	200 $\mu$ l
Promytí:	100 $\mu$ l H <sub>2</sub> O
Eluce:	200 $\mu$ l MeOH
Rychlost otáčení:	6000 RPM
Délka otáčení jednoho cyklu:	1 min (aktivace, kondicionace) 2 min (nanesení vzorku, promytí, eluce)



Obrázek 19: Záznam separace bisfenolů za optimálních podmínek



Obrázek 20: Záznam separace léčiv za optimálních podmínek

## 4.8 Validace – bisfenoly v řece

### 4.8.1 Podmínky

Postup analýzy pro následující validaci byl vždy stejný dle optimalizovaných podmínek.

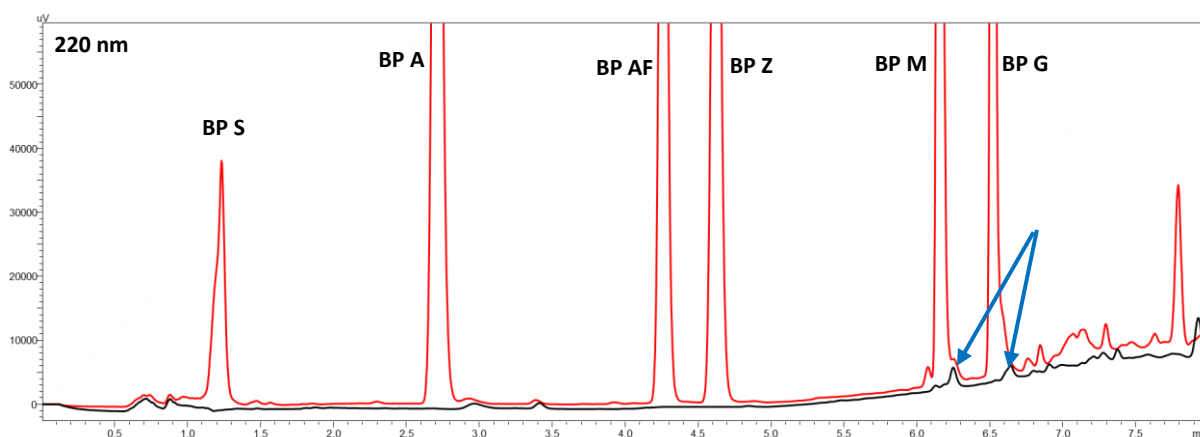
Pro extrakci byl použit kompozitní polymer nPCL/ $\mu$ PCL, z něhož byly vysekány tři disky. Disky byly zváženy na laboratorních vahách, aby jejich hmotnost byla co nejvíce konzistentní. Výsledek se pohyboval v rozmezí 45 – 50 mg u disků, jejichž eluát sloužil pro výpočet přesnosti, preciznosti a u dílčích výpočtů u testu způsobilosti systému (SST).

Při proměřování říční vody došlo k zjištění, že konečné hodnoty ploch píků u BP M a BP G ovlivňují nečistoty koelující v jejich retenčním čase (jejich hodnoty uvedeny v tabulce č. 15). U všech následujících hodnot pro tyto bisfenoly byly vždy plochy nečistot odečteny.

Tabulka 15: Nečistoty u BP M a BP G

nečistota	průměry průměrů ploch
u BP M	13753,75
u BP G	7072,75

Na záznamu chromatogramu (obrázek č. 21) jsou tyto nečistoty patrné (označeny modrými šipkami).



Obrázek 21: Záznam – blank řeky Labe a spike řeky, jsou viditelné nečistoty u BP M a BP G

## 4.8.2 Test způsobilosti systému (SST)

Test způsobilosti systému je soubor podmínek, při jejichž splnění platí dříve provedená validace metody [31]. Pro SST byly vyhodnoceny výsledky ze šesti měření standardu. Níže v tabulce č. 16 jsou uvedeny všechny hodnocené veličiny.

Nechybí zde  $t_r$  neboli retenční čas jednotlivých bisfenolů, ani RSD ploch, což nám ukazuje opakovatelnost nástřiku. Dále je zde uvedena hodnota pro šířku píku v polovině jeho výšky a hodnota pro kapacitu separace. Tato hodnota nám udává účinnost separace a lze ji vypočítat dle následující rovnice:

$$n_p = 1 + \frac{t_g}{4 \times w_h}$$

$t_g$  udává čas, po který běžel gradient, což je v tomto případě 7 minut a  $w_h$  je šířka v polovině píku.  $A_s$  neboli faktor symetrie udává symetrii daného píku, jestli daný pík nemá tendenci například chvostovat [32]. Obvyklým rozmezím vypočítaných hodnot je 0,8 – 1,5, čemuž odpovídají i naměřené výsledky. Výpočet lze provést z následující rovnice:

$$A_s = w_{0,05}/2d$$

$w_{0,05}$  odpovídá šířce píku ve dvacetině jeho výšky a  $d$  je vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku ve 20tině výšky [32]. Poslední hodnotou uvedenou v tabulce č. 16 je  $R_s$  jinak také rozlišení, což udává míru separace dvou píků. Aby byly dva píky rozděleny na základní linii, postačuje hodnota  $R_s$  1,5, což odpovídá všem naměřeným hodnotám [32].

Tabulka 16: Test způsobilosti chromatografického systému

analyzované standardy	$t_r$ [min]	RSD ploch [%]	$w_h$ [min]	$n_p$	$A_s$	$R_s$
BP S	1,25	0,46	0,053	34,33	0,895	-
BP A	2,78	0,09	0,070	26,00	1,099	13,88
BP AF	4,31	0,16	0,056	32,07	1,086	13,74
BP Z	4,70	0,54	0,066	27,52	1,074	3,59
BP M	6,18	0,21	0,039	46,45	1,138	15,87
BP G	6,55	0,26	0,037	48,95	1,144	5,25

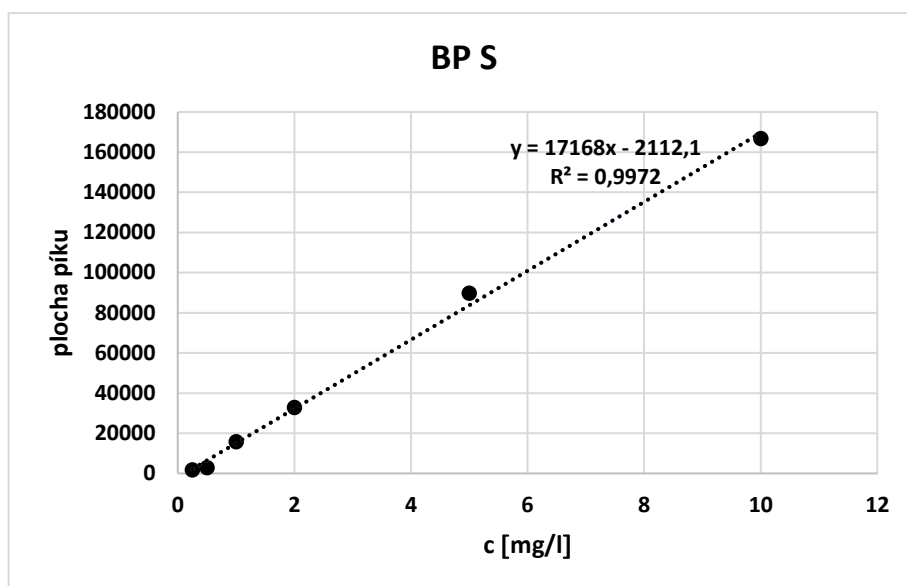
### 4.8.3 Linearita

Linearita vyjadřuje schopnost metody poskytovat výsledky přímo úměrné obsahu analytu v určitém rozsahu [31]. Pro stanovení linearity byly připraveny kalibrační roztoky smísením zásobního směsného roztoku ( $c=100$  mg/l) a vzorku řeky Labe. Koncentrační hladiny byly 0,25 mg/l, 0,5 mg/l, 1 mg/l, 2 mg/l, 5 mg/l, 10 mg/l, 15 mg/l, 20 mg/l a 25 mg/l. Na každé z nich byly provedeny dva nástřiky extraktu, z nichž se vypočítal průměr. Následně se vybralo podle lineárního rozsahu k vyhodnocení 6-8 bodů z přímky. Celkově u všech hladin standardů vychází linearita  $\geq 0,99$ . K výpočtu byla použita metoda lineární regrese.

Tabulka 17: Příprava roztoků pro stanovení linearity

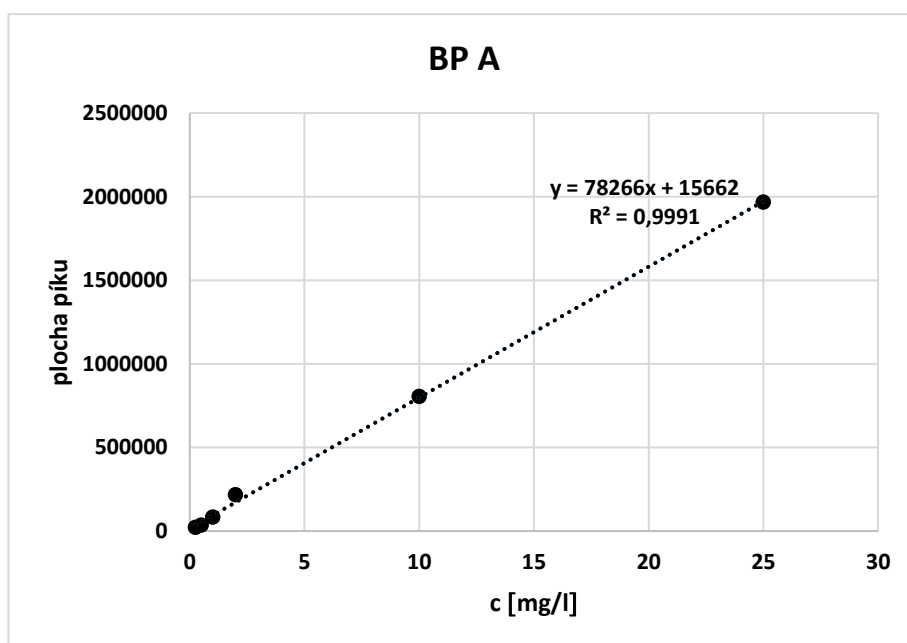
Koncentrační hladina [mg/l]	Zásobní směsný roztok ( $c=100$ mg/l) [ $\mu$ l]	Řeka Labe [ $\mu$ l]
0,25	2,5	997,5
0,5	5	995
1	10	990
2	20	980
5	50	950
10	100	900
15	150	850
20	200	800
25	250	750

BP S	
c [mg/l]	plocha píku
0,25	1719,0
0,5	2735,5
1	15761,5
2	32734,0
5	89634,0
10	166634,4



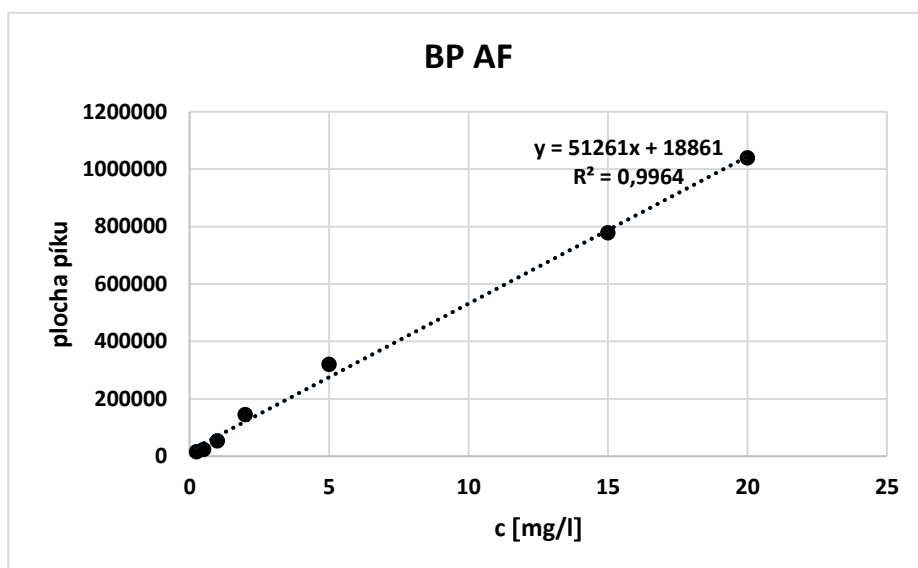
Obrázek 22: Stanovená linearita pro bisfenol S

BP A	
c [mg/l]	plocha píku
0,25	21542,5
0,5	34181,5
1	82517,5
2	216054,5
10	805581,3
25	1966918,0



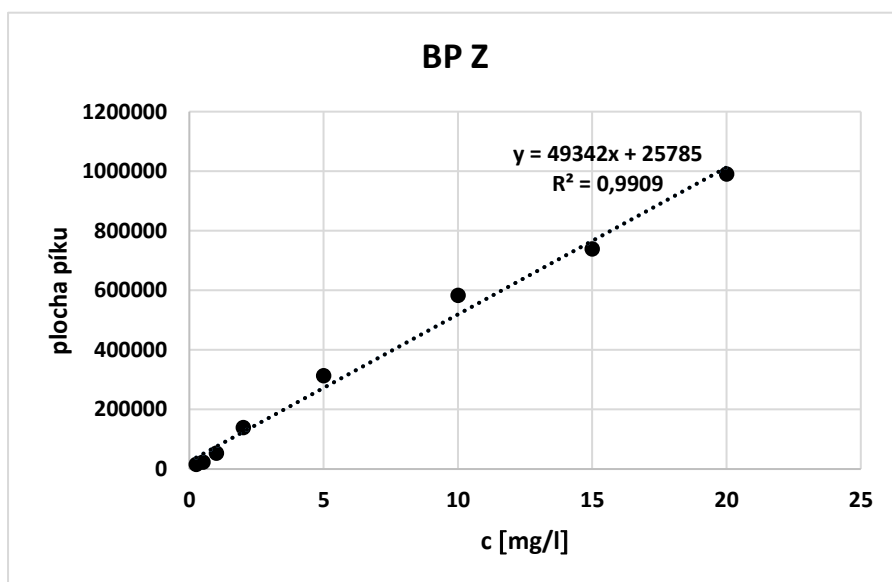
Obrázek 23: Stanovená linearita pro bisfenol A

BP AF	
c [mg/l]	plocha píku
0,25	15397,5
0,5	23079,0
1	53659,0
2	145143,5
5	319910,5
15	778366,0
20	1039127,0



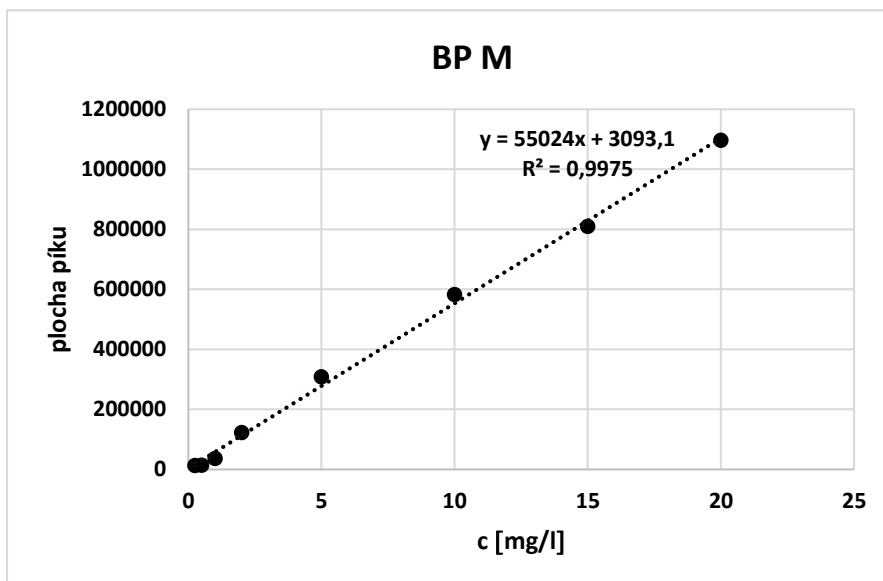
Obrázek 24: Stanovená linearita pro bisfenol AF

BP Z	
c [mg/l]	plocha píku
0,25	15347,5
0,5	23389,5
1	53311,5
2	139651,0
5	313485,5
10	582818,3
15	739500,0
20	990930,5



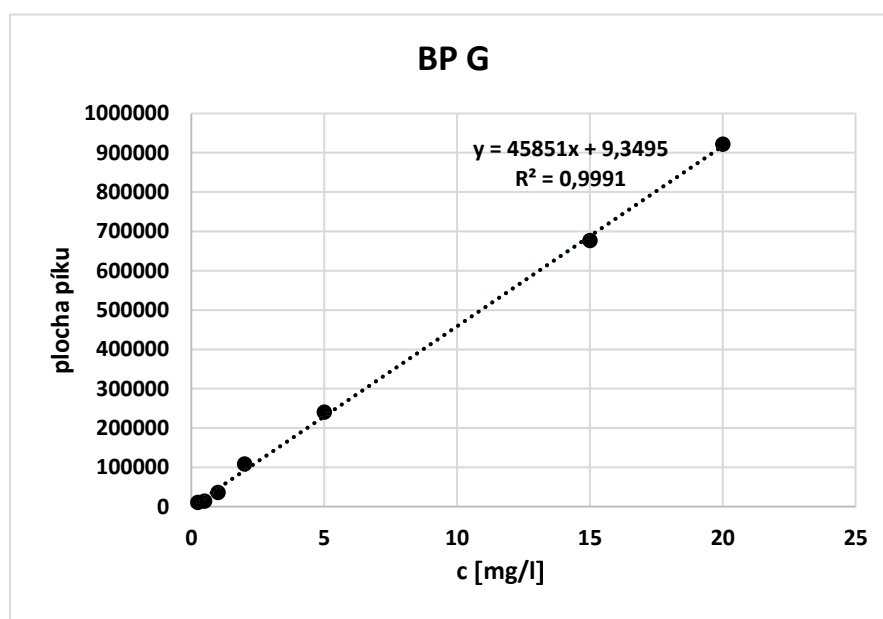
Obrázek 25: Stanovená linearita pro bisfenol Z

BP M	
c [mg/l]	plocha píku
0,25	13235,3
0,5	13711,3
1	36659,3
2	122267,8
5	307888,8
10	582818,3
15	809270,3
20	1096408,0



Obrázek 26: Stanovená linearita pro bisfenol M

BP G	
c [mg/l]	plocha píku
0,25	10319,8
0,5	13578,8
1	35727,8
2	107699,3
5	240334,3
15	676562,8
20	921834,3



Obrázek 27: Stanovená linearita pro bisfenol G



#### 4.8.4 Preciznost (precision)

Vyjadřuje míru shody mezi jednotlivými výsledky metody opakované s homogenním vzorkem [31].

Pro zhodnocení míry preciznosti bylo provedeno měření se stejnými podmínkami pro osm vzorků (včetně jejich úpravy) na stejné koncentrační hladině ( $c=10$  mg/l) a poté se vypočítal průměr dvou opakovaných nástřiků. Posléze se z těchto průměrů spočítala průměrná plocha pro všechny bisfenoly, z níž byla určena směrodatná a relativní směrodatná odchylka. Výsledky se pohybují mezi 3 – 4,5 %.

Tabulka 18: Preciznost dané metody

	<b>průměr ploch pod píkem</b>	<b>SD</b>	<b>RSD [%]</b>
<b>BP S</b>	166634,4375	7354,1	4,41
<b>BP A</b>	805581,3125	31219,8	3,88
<b>BP AF</b>	615722,1875	23027,2	3,74
<b>BP Z</b>	582818,3125	22342,3	3,83
<b>BP M</b>	858921,6875	26776,8	3,12
<b>BP G</b>	608816,9375	18873,4	3,10

#### 4.8.5 Přesnost (accuracy)

Vyjadřuje odchylku výsledku od správné hodnoty [31].

Nejvíce polární látkou z hodnocených bisfenolů je BP S, který tak vykazoval nejmenší míru retence na nanovlákněch. Výťažnost pro ostatní BP se pohybovala okolo 100 % a RSD < 4,5 %.

Tabulka 19: Přesnost dané metody

	<b>výtěžnost [%]</b>	<b>SD</b>	<b>RSD [%]</b>
<b>BP S</b>	57,72	2,55	4,41
<b>BP A</b>	101,43	3,93	3,88
<b>BP AF</b>	103,24	3,86	3,74
<b>BP Z</b>	98,00	3,76	3,83
<b>BP M</b>	96,69	3,01	3,12
<b>BP G</b>	103,63	3,26	3,14

#### 4.8.6 Limit detekce a kvantifikace

LOD neboli limit detekce vyjadřuje nejnižší detekovatelnou koncentraci analytu [31, 33]. LOQ neboli limit kvantifikace je nejnižší koncentrace analytu stanovitelná s dostatečnou precizností a přesností [31]. Pro potřeby výpočtu LOD se stanovila hodnota LOQ jako koncentrace 0,25 mg/l. Tato hodnota je nejnižší koncentrací v lineárním rozsahu a dá se tedy kvantifikovat.

LOD je koncentrace poskytující pík s výškou o poměru signálu k šumu  $S/N = 3$  a LOQ  $S/N = 10$ . Z tohoto vztahu lze vyvodit, že LOD je 3,33x menší než LOQ. Poměr  $S/N$  vyjadřuje poměr signálu k šumu.

Obě veličiny vyjadřují citlivost dané metody.

Výpočet byl proveden z rovnice:

$$LOD = \frac{LOQ}{3,33}$$

Tabulka 20: Limit detekce a kvantifikace

LOQ [mg/l]	LOD [mg/l]
0,25	0,08

### 4.9 Rozšíření experimentální části – léčiva v biologických vzorcích

Pro rozšíření experimentální části diplomové práce a testování selektivity PCL nanovláken byla metoda ještě zopakována se dvěma skupinami léčiv a také byla vyzkoušena jejich možnost extrakce z biologické matrice. Konkrétně se zkoumaly v prostředí rekonstituovaného lyofilizovaného séra a moči.

Z důvodu ucpávání disků sérem se v tomto případě nepovedlo metodu zoptimalizovat. Nicméně byla validována pro extrakci analytů z moči.

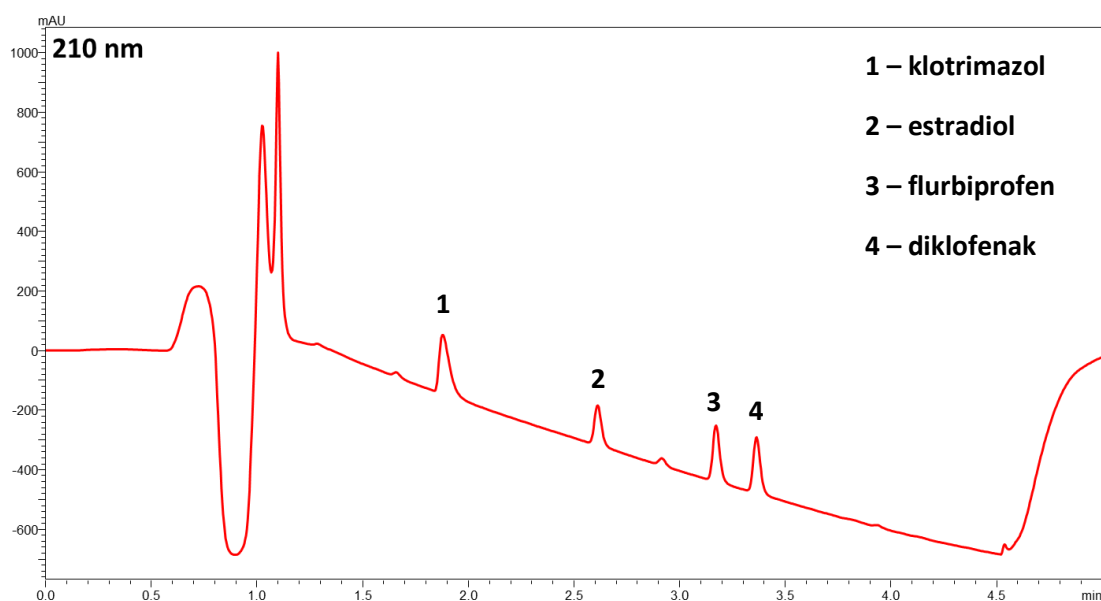
#### 4.9.1 Preciznost a přesnost pro léčiva v moči

Pro ověření reprodukovatelnosti bylo provedeno měření s osmi vzorky standardů léčiv v moči, které byly dvakrát nadávkovány do UHPLC. Z výchozích hodnot se počítal průměr a dále preciznost a přesnost.

Tabulka 21: Validace extrakce léčiv z moči

	výtěžnost [%]	SD	RSD [%]
<b>KLOTRIMAZOL</b>	88,13	4,14	4,70
<b>ESTRADIOL</b>	92,61	3,28	3,54
<b>FLURBIPROFEN</b>	75,57	5,75	7,61
<b>DIKLOFENAK</b>	81,16	6,09	7,50

Výtěžnost se u léčiv pohybovala v rozmezí mezi 75,6 – 92,6 % s precizností RSD < 8 %. Na obrázku č. 28 je záznam léčiv po extrakci z moči.



Obrázek 28: Záznam analytů (léčiv) po extrakci z moči

## 5 Závěr

V experimentální části diplomové práce byla vytvořena a validována HPLC metoda pro stanovení bisfenolů ve vodě po extrakci na PCL nanovlákních v centrifugačních (spin) filtrech. Tato metoda byla optimalizována i pro další analyty v komplexnějším vzorku, a to konkrétně pro léčiva v moči. Snaha byla o co nejjednodušší a časově nejméně náročné kroky v rámci přípravy, protože se předpokládá, že by tato metoda extrakce mohla být dále používána v praxi. I proto se testovaly modelové analyty a zvolila se univerzální kolona.

V rámci práce byly zoptimalizovány podmínky pro extrakci jako je množství použitého sorbentu, množství činidla potřebného k aktivaci, kondicionaci a eluci materiálu, počet otáček a čas potřebný při centrifugaci vzorku. Došlo k popsání retence analytů na sorbentu a účinnosti extrakce analytů v říční vodě a biologickém prostředí. Všechny vytyčené cíle z úvodu práce se tedy povedlo naplnit.

Tato metoda slouží jako pilotní studie k využití PCL nanovláken ve spinfiltru. Hlavním výstupem práce je validovaná reprodukovatelnost extrakce. Rozšířit by se mohla zkoumáním jiných typů nanovlákněných polymerů jako sorbentu nebo ověřením selektivity pro další analyty. Podle slibných výsledků lze říci, že by tento materiál (kompozitní polymer nPCL/ $\mu$ PCL vláken) byl vhodný pro komerční využití. V tom případě by se doporučilo optimalizování výroby vláken, aby byla zaručena homogenita sorbentu pro opakovatelné vysekávání disků.

## 6 Seznam použité literatury

- [1] M. Háková, L. Havlíková Chocholoušová, P. Solich, F. Švec a D. Šatinský, „Electrospun nanofiber polymers as extraction phases in analytical chemistry – The advances of the last decade,“ *Trends in Analytical Chemistry*, sv. 110, pp. 81-96, 2019.
- [2] D. Petráš, D. S. K. Kimmer a P. Klusoň, „Bezpečná nanovlákná,“ *Chemické listy*, sv. 103, pp. 1009-1016, 2009.
- [3] HÁKOVÁ, M. *Využití nanovláknenných sorbentů pro on-line extrakce v kapalinové chromatografii*. Hradec Králové, 2020. Dizertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Katedra analytické chemie.
- [4] A. Azari, A. Golchin, M. Mahmoodinia Maymand, F. Mansouri a A. Ardeshirylajimi, „Electrospun Polycaprolactone Nanofibers: Current Research and Applications in Biomedical Application,“ *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, sv. 12, pp. 658-672, 2022.
- [5] M. Háková, L. Havlíková Chocholoušová, J. Chvojka, J. Erben, P. Solich, F. Švec a D. Šatinský, „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*, sv. 1023, pp. 44-52, 2018.
- [6] M. Háková, L. Chocholoušová Havlíková, J. Chvojka, F. Švec, P. Solich a D. Šatinský, „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*, sv. 1018, pp. 26-34, 2018.
- [7] R. Jirkovec, J. Erben, A. Samkova, J. Chaloupek a J. Chvojka, „The effect of the electrospinning setup on the surface energy of polycaprolactone nanofibre layers,“ *Journal of Industrial Textiles*, sv. 51 (5S), pp. 8517S-8527S, 2022.
- [8] J. Erben, K. Pilarova, F. Sanetrnik, J. Chvojka, V. Jencova, L. Blazkova, J. Havlicek, O. Novak, P. Mikes, E. Prosecka, D. Lukas a E. Kuzelova Kostakova, „The combination of meltblown and electrospinning for bone tissue engineering,“ *Materials Letters*, sv. 143, pp. 172-176, 2015.
- [9] H. Raabová, L. Chocholoušová Havlíková, J. Erben, J. Chvojka, F. Švec a D. Šatinský, „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,“ *Nanomaterials*, sv. 11, č. 2669, pp. 1-12, 2021.
- [10] L. A. Berrueta, B. Gallo a F. Vicente, „A Review of Solid Phase Extraction: Basic Principles and New Developments,“ *Gromatographia*, sv. 40, č. 7/8, pp. 474-483, 1995.
- [11] J. Płotka-Wasyłka, N. Szczepańska a M. de la Guardia, „Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media,“ *Trends in Analytical Chemistry*, sv. 77, pp. 23-43, 2016.

- [12] Z. Mehrani, H. Ebrahimzadeh a E. Moradi, „Poly m-aminophenol/ nylon 6/graphene oxide electrospun nanofiber as an efficient sorbent for thin film microextraction of phthalate esters in water and milk solutions preserved in baby bottle,“ *Journal of Chromatography A*, sv. 1600, pp. 87-94, 2019.
- [13] I. H. Šrámková, B. Horstkotte, J. Erben, J. Chvojka, F. Švec, P. Solich a D. Šatínský, „3D-Printed Magnetic Stirring Cages for Semidispersive Extraction of Bisphenols from Water Using Polymer Micro- and Nanofibers,“ *Analytical Chemistry*, sv. 92, pp. 3964-3971, 2020.
- [14] M. Háková, L. Chocholoušová Havlíková, J. Chvojka, P. Solich a D. Šatínský, „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*, sv. 178, pp. 141-146, 2018.
- [15] Z. Yan, B. Hu, Q. Li, S. P. J. Zhang a C. Wu, „Facile synthesis of covalent organic framework incorporated electrospun nanofiber and application to pipette tip solid phase extraction of sulfonamides in meat samples,“ *Journal of Chromatography A*, sv. 1584, pp. 33-41, 2019.
- [16] J. An, Z. Dong, W. Y. Y. Zhang, W. Kang a K. Lian, „Development of a simple nanofiber-based solid phase extraction procedure coupled with high performance liquid chromatography analysis for the quantification of eight sedative-hypnotic drugs in human urine samples,“ *Microchemical Journal*, sv. 168, č. 106475, pp. 1-9, 2021.
- [17] L. Chu, S. Zheng, B. Qu, S. Geng a X. Kang, „Detection of b-agonists in pork tissue with novel electrospun nanofibers-based solid-phase extraction followed ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry,“ *Food Chemistry*, sv. 227, pp. 315-321, 2017.
- [18] A. Farahani a H. Sereshti, „An integrated microfluidic device for solid-phase extraction and spectrophotometric detection of opium alkaloids in urine samples,“ *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, sv. 412, pp. 129-138, 2020.
- [19] S. Amini, H. Ebrahimzadeh, S. Seidi a N. Jalilian, „Polyacrylonitrile/MIL-53(Fe) electrospun nanofiber for pipette-tip micro solid phase extraction of nitrazepam and oxazepam followed by HPLC analysis,“ *Microchimica Acta*, sv. 187, č. 152, pp. 1-10, 2020.
- [20] M. Háková, L. Chocholoušová Havlíková, F. Švec, P. Solich, J. Erben, J. Chvojka a D. Šatínský, „Novel nanofibrous sorbents for the extraction and determination of resveratrol in wine,“ *Talanta*, sv. 206, č. 120181, pp. 1-7, 2020.
- [21] Z. Mehrani, Z. Karimpour a H. Ebrahimzadeh, „Using PVA/CA/Au NPs electrospun nanofibers as a green nanosorbent to preconcentrate and determine Pb<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> in rice samples, water sources and cosmetics,“ *New Journal of Chemistry*, sv. 44, pp. 15000-15009, 2020.
- [22] L. Xie, J. Huang, Q. Han, Y. Song, P. Liu a X. Kang, „Solid phase extraction with Polypyrrole nanofibers for simultaneously determination of three water-soluble vitamins in urine,“ *Journal of Chromatography A*, sv. 1589, pp. 30-38, 2019.
- [23] Q. Zhao, S.-W. Yue, Y.-L. Zhou a J.-J. Yang, „Determination of fipronil and its metabolites in environmental water samples by meltblown nonwoven fabric-based solid-phase extraction

combined with gas chromatography-electron capture detection," *Journal of Separation Science*, sv. 45, č. 14, pp. 2663-2674, 2022.

- [24] A. Kholová, I. Lhotská, J. Erben, J. Chvojka, F. Švec, P. Solich a D. Šatínský, „Comparing adsorption performance of microfibers and nanofibers with commercial molecularly imprinted polymers and restricted access media for extraction of bisphenols from milk coupled with liquid chromatography," *Talanta*, sv. 252, pp. 1-7, 2023.
- [25] „European Chemicals Agency," [Online]. Available: <https://echa.europa.eu/cs/hot-topics/bisphenols>. [Přístup získán 1. květen 2023].
- [26] D. Chen, K. Kannan, H. Tan, Z. Zheng, Y.-L. Feng, Y. Wu a M. Widelka, „Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity - A Review," *Environmental Science & Technology*, sv. 50, pp. 5438-5453, 2016.
- [27] E. Commission, „COMMISSION REGULATION (EU) 2018/213 of 12 February 2018 on the use of bisphenol A in varnishes and coatings intended to come into contact with food and amending Regulation (EU)," *Off. J. Eur. Union L41*, pp. 6-12, 2018.
- [28] „ChemSpider," [Online]. Available: <https://www.chemspider.com/>. [Přístup získán 13. duben 2023].
- [29] „PubChem," National Library of Medicine, [Online]. Available: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. [Přístup získán 13. duben 2023].
- [30] „DrugBank," [Online]. Available: <https://dev.drugbank.com/guides/terms/logp>. [Přístup získán 1. březen 2023].
- [31] P. Kastner, „Validace analytických metod, Farmaceutická analýza II, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy," [Online]. [Přístup získán 8. červenec 2022].
- [32] P. Kovaříková a J. Stariat, „HPLC - Historie a základní principy, Moodle Univerzity Karlovy," [Online]. [Přístup získán 22. leden 2022].
- [33] J. Klimeš, Kontrolně-analytické hodnocení léčiv lékopisnými metodami, Hradec Králové: Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2015.

## 7 Seznam tabulek

Tabulka 1: Různé možnosti použití nanovlákných sorbentů .....	17
Tabulka 2: Struktury modelových analytů – bisfenoly [28] [29] .....	19
Tabulka 3: Výsledné podmínky gradientu při testování BP .....	27
Tabulka 4: Výsledné podmínky gradientu při testování léčiv .....	28
Tabulka 5: Postup a podmínky při optimalizaci počtu vrstev .....	30
Tabulka 6: Výtěžnost vyhodnocená při optimalizaci počtu vrstev .....	30
Tabulka 7: Podmínky pro optimalizaci aktivace a kondicionace materiálu .....	31
Tabulka 8: Výtěžnost vyhodnocená při optimalizaci aktivace a kondicionace sorbentu .....	32
Tabulka 9: Výtěžnost vyhodnocená při optimalizaci rychlosti otáčení .....	34
Tabulka 10: Hodnoty RSD pro výsledky výtěžnosti při optimalizaci rychlosti otáčení .....	34
Tabulka 11: Optimalizace času pro centrifugaci .....	35
Tabulka 12: Podmínky pro testování druhé skupiny léčiv .....	37
Tabulka 13: Optimalizace objemu vody na promytí sorbentu .....	39
Tabulka 14: Optimalizované podmínky pro testování léčiv v moči .....	39
Tabulka 15: Nečistoty u BP M a BP G .....	43
Tabulka 16: Test způsobilosti chromatografického systému .....	44
Tabulka 17: Příprava roztoků pro stanovení linearity .....	45
Tabulka 18: Preciznost dané metody .....	49
Tabulka 19: Přesnost dané metody .....	49
Tabulka 20: Limit detekce a kvantifikace .....	50
Tabulka 21: Validace extrakce léčiv z moči .....	51

## 8 Seznam obrázků

Obrázek 1: Srovnání přípravy nanovláken elektrostatickým zvlákňováním s a) jehlou a b) bez jehly [7] .....	13
Obrázek 2: Srovnání sorbentu připraveného metodou elektrostatického zvlákňování (vlevo) a meltblown (vpravo) .....	13
Obrázek 3: Kombinace metod elektrostatického zvlákňování a meltblown [1] .....	14
Obrázek 4: nPCL/μPCL vlákna pod SEM mikroskopem [9] .....	14
Obrázek 5: Spin filtry připravené na extrakci SPE v mikrozkušavkách Eppendorf v centrifuze .....	16
Obrázek 6: Vzorec diklofenaku [28] .....	21
Obrázek 7: Vzorec estradiolu [28] .....	21
Obrázek 8: Vzorec flurbiprofenu [28] .....	21
Obrázek 9: Vzorec klotrimazolu [28] .....	22
Obrázek 10: Pomůcky potřebné pro přípravu spin filtru .....	25
Obrázek 11: Spin filtr naplněný disky z nanovláken a mikrozkušavka Eppendorf .....	26
Obrázek 12: Chromatogram s obtížně oddělitelnými BP AF a BP Z .....	27
Obrázek 13: Grafické znázornění výsledných podmínek gradientu .....	28
Obrázek 14: Kolik % jednotlivých BP se nezachytilo při optimalizaci počtu vrstev disků .....	31
Obrázek 15: Graf srovnání sorbentu bez aktivace a s aktivací pomocí MeOH .....	33
Obrázek 16: Graf znázorňující frontování píku bisfenolu S .....	35
Obrázek 17: Testování okyselení prostředí – klotrimazol se nezadržoval na sorbentu .....	36
Obrázek 18: Změna podmínek pro zvýšení výtěžnosti léčiv u optimalizace extrakce séra .....	38



Obrázek 19: Záznam separace bisfenolů za optimálních podmínek .....	42
Obrázek 20: Záznam separace léčiv za optimálních podmínek.....	42
Obrázek 21: Záznam – blank řeky Labe a spike řeky, jsou viditelné nečistoty u BP M a BP G .....	43
Obrázek 22: Stanovená linearita pro bisfenol S .....	46
Obrázek 23: Stanovená linearita pro bisfenol A.....	46
Obrázek 24: Stanovená linearita pro bisfenol AF .....	47
Obrázek 25: Stanovená linearita pro bisfenol Z .....	47
Obrázek 26: Stanovená linearita pro bisfenol M.....	48
Obrázek 27: Stanovená linearita pro bisfenol G.....	48
Obrázek 28: Záznam analytů (léčiv) po extrakci z moči .....	51