

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra farmaceutickej chémie a farmaceutickej analýzy



MODIFIKÁCIA SORBENTU PRE SPE

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Nikola Mrenková

Vedúci diplomovej práce: PharmDr. Lukáš Lochman, Ph.D.

Hradec Králové, 2023

„Prehlasujem, že táto diplomová práca je mojím pôvodným autorským dielom. Všetky literárne a iné zdroje, z ktorých som pri spracovávaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v texte riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu rovnakého alebo iného titulu.“

V Hradci Králové, 14.8.2023

.....

Nikola Mrenková

Na tomto mieste by som sa rada pod'akovala PharmDr. Lukášovi Lochmanovi, Ph.D., vedúcemu mojej diplomovej práce, za odborné vedenie, cenné rady a pripomienky, ktoré boli využité pri vypracovaní práce. Ďakujem za jeho trpezlivosť a čas, ktorý do mňa investoval.

Abstrakt

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutickej chémie a farmaceutickej analýzy

Kandidát: Nikola Mrenková

Školiteľ: PharmDr. Lukáš Lochman, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Modifikácia sorbentu pre SPE

Úprava vzorku patrí medzi najkritickejší bod v chromatografickej analýze vzoriek biologického materiálu, závisí na nej celkový úspech chromatografickej analýzy. Komplexný charakter biologických vzoriek a nízka koncentrácia cieľových analytov viedli k vývoju rôznych techník selektívnych úprav vzoriek. Pre svoju univerzálnosť a selektivitu je extrakcia na pevnej fáze (SPE) jednou z najrozšírejších metód.

Grafén pre svoje unikátne vlastnosti (veľký špecifický povrch, delokalizovaný systém π elektrónov, hydrofóbny charakter) sa stal jedným z vhodných kandidátov ako látka pre vývoj nového typu sorbentu pre SPE.

Diplomová práca bola zameraná na štúdium vlastností modifikovanej stacionárnej fáze pre SPE založenej na graféne. Konkrétne sa jednalo o naviazanie grafén-oxidových (GO) plátov na aminosilikagél prostredníctvom amidovej väzby medzi karboxylovými skupinami GO a aminoskupinami aminosilikagélu, s následnou hydrazínovou redukciou na redukovaný grafén-oxid (rGO). Pre štúdium vlastností pripraveného sorbentu boli vybrané modelové analyty s rozdielnymi fyzikálno-chemickými vlastnosťami, a to kyslý ibuprofen (IBU, pKa 5,3), neutrálny propylparaben (PrP, pKa 8,5) a zásaditý metoprolol (MET, pKa 9,7). Boli optimalizované podmienky pre retenciu a elúciu analytov s cieľom zaistiť vysokú výťažnosť. Získané výsledky boli porovnané s výťažnosťami extrakcie pri použití komerčne dostupného materiálu (aminosilikagél a modifikovaný silikagél C₁₈) za rovnakých podmienok.

Použitím upraveného aminosilikagél sorbentu rGO ako stacionárnej fázy pre SPE bol preukázaný jeho zmiešaný retenčný mechanizmus. Výsledky experimentov ukázali, že analyty boli pravdepodobne adsorbované veľkým špecifickým povrchom rGO, interagovali prostredníctvom $\pi - \pi$ interakcií, kation - π interakcií a

hydrofóbnemu efektu. Modifikovaný rGO sorbent tak poskytol sľubné výsledky pre ďalší vývoj materiálov založených na graféne.

Abstract

CHARLES UNIVERSITY

FACULTY OF PHARMACY IN HRADEC KRÁLOVÉ

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drugs Analysis

Candidate: Nikola Mrenková

Supervisor: PharmDr. Lukáš Lochman, Ph.D.

Title of thesis: Modification of sorbent for SPE

Sample preparation is one of the most critical points in the chromatographic analysis of biological samples. The success of the chromatographic analysis depends on it. The complex character of biological samples and the low concentrations of target analytes have led to the development of selective sample preparation techniques. Because of its universality and selectivity, solid-phase extraction (SPE) is one of the most widely used methods.

Graphene, due to its unique properties (large specific surface area, delocalized π electron system, hydrophobic character), has become a suitable candidate as a substance for the development of a new type of sorbent for SPE.

The submitted thesis was focused on the study of the properties of a modified stationary phase by graphene-based sorbent for SPE. Specifically, it involved the coupling of graphene oxide (GO) sheets to aminosilica gel via an amide bond between the carboxyl groups of GO and the amino groups of aminosilica and the reduction of GO by hydrazine to reduced graphene oxide (rGO). Model analytes with different physicochemical properties, namely acidic ibuprofen (IBU, pKa 5.3), neutral propylparaben (PrP, pKa 8.5), and basic metoprolol (MET, pKa 9.7), were selected for the study of the properties. The conditions for retention and elution of the analytes were optimized to maintain high recovery. The results were compared with extraction yields using commercially available material (aminosilica gel and C₁₈ modified silica gel) under the same conditions.

Using the aminosilica gel sorbent modified with rGO as a stationary phase for SPE, its mixed retention mechanism was demonstrated. The experimental results showed that the analytes were likely adsorbed by the large specific surface area of rGO, interacted through π - π interactions, cation - π interactions and hydrophobic effect.

Thus, the modified rGO sorbent provided promising results for further development of graphene-based materials.

OBSAH

1	ZOZNAM SKRATIEK	10
2	ÚVOD.....	12
3	TEORETICKÁ ČASŤ	14
3.1	Chromatografia a vysokoúčinná kvapalinová chromatografia	14
3.1.1	Typy separačných mechanizmov	16
3.1.2	Separčné módy v HPLC.....	17
3.1.3	Prístrojové vybavenie.....	18
3.1.4	Mobilná fáza HPLC	22
3.1.5	Stacionárna fáza – HPLC kolóny.....	23
3.1.6	Detektory.....	25
3.2	Extrakcia na tuhej fáze, SPE.....	28
3.2.1	SPE teória.....	30
3.3	Grafén	37
3.3.1	Syntéza GO	38
3.3.2	Redukcia GO na rGO.....	38
3.3.3	Adsorpcia organických zlúčenín na GO a rGO	39
3.3.4	Využitie materiálov na báze grafénu v SPE	40
4	CIEĽ PRÁCE	45
5	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	46
5.1	Chemikálie a materiál	46
5.1.1	Modelové analyty.....	46
5.1.2	Rozpúšťadlá	46
5.1.3	Ostatné chemikálie.....	46
5.2	Prístrojové vybavenie	47
5.2.1	Prístrojové vybavenie pre HPLC	47
5.2.2	Prístrojové vybavenie a pomôcky pre SPE.....	47
5.2.3	Ďalšie prístroje a pomôcky	47
5.3	Príprava roztokov	48
5.3.1	HPLC	48
5.3.2	SPE.....	48
5.4	Príprava sorbentu	49
5.5	Príprava SPE kolóniek	50
5.6	Prevedenie SPE metódy	50

5.7	Opakované použitie SPE kolóniek	52
5.8	HPLC analýza	52
5.9	Hodnotenie výsledkov, popis grafov	53
6	VÝSLEDKY A DISKUSIA	54
6.1	Príprava modifikovaného rGO sorbentu pre SPE	55
6.2	Napĺňanie SPE kolóniek rGO@sil sorbentom	57
6.3	Opakovateľnosť prípravy rGO@sil sorbentu pre SPE	57
6.4	Hodnotenie vplyvu experimentálnych podmienok na extrakčnú výťažnosť	58
6.4.1	Vplyv výberu elučného činidla na extrakčnú výťažnosť	58
6.4.2	Vplyv pH na retenčné vlastnosti sorbentu a extrakčnú výťažnosť analytu.....	61
6.5	Porovnanie rGO a komerčného materiálu	65
7	ZÁVER	69
8	ZOZNAM OBRÁZKOV	71
9	ZOZNAM TABULIEK	72
10	ZOZNAM GRAFOV	73
11	ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY	74

1 ZOZNAM SKRATIEK

ACN	acetonitril
DAD	detektor s fotodiódovým poľom
DCC	<i>N,N'</i> -dicyklohexylkarbodiimid
DMF	dimetylformamid
E	elúcia, vymytie analytu z kolónky
EDC	1-etyl-3-(3-dimetylamino)propylkarbodiimid
GO	grafén-oxid
GO@sil	aminosilikagél funkcionalizovaný grafén-oxidom
HILIC	chromatografia hydrofilných interakcií
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
IBU	ibuprofen
INJ	nanesenie vzorky na kolónku
MeOH	metanol
MeP	metylparaben
MET	metoprolol
MF	mobilná fáza
NF	normálna fáza
NH₂sil	aminosilikagél
NHS	<i>N</i> -hydroxysukcinimid
PrP	propylparaben
RF	reverzná fáza
rGO	redukovaný grafén-oxid
rGO@sil	aminosilikagél funkcionalizovaný redukovaným grafén-oxidom
SAX	silné anexy
SCX	silné katexy
SF	stacionárna fáza
SPE	extrakcia na pevnej fázi
TMS	trimetylsilán
TRIS	tris(hydroxymetyl)aminometán
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
UV	ultrafialová oblasť svetla

VIS	viditeľná oblasť svetla
W	premytie kolónky
WAX	slabé anexy
WCX	slabé katexy

2 ÚVOD

Biologické vzorky predstavujú komplexnú maticu, ktorá obsahuje veľké množstvo proteínov, lipidov, sacharidov a iných endogénnych látok. (1) Tieto látky ovplyvňujú separačné a ionizačné vlastnosti analytov. Okrem toho koncentrácia analytov je v porovnaní s koncentráciou interferujúcich látok veľmi nízka. (1) (2) Z tohto dôvodu je potrebná vhodná úprava biologického materiálu.. (2) (3)

Najnovšie trendy v príprave vzoriek zahŕňajúce miniaturizáciu, automatizáciu, on-line prepojenie s analytickými prístrojmi s cieľom znížiť spotrebu rozpúšťadiel a času práce. (2) (4) Používajú sa rôzne techniky úpravy vzoriek pred analýzou pomocou vysokoúčinnnej kvapalinovej chromatografie, ako napr. precipitácia, extrakcia kvapalina – kvapalina, extrakcia na tuhej fáze či rôzne mikroextrakčné techniky. (1) (4)

Extrakcia na tuhej fáze (SPE) je analytická metóda, ktorej základným princípom je prechod kvapalnej vzorky cez kolónku naplnenú sorbentom, ktorý na seba viaže analyty, zatiaľ čo balastné látky sú vymyté z kolónky. Adsorbované analyty sú následne z kolónky vymyté vhodným rozpúšťadlom. (5) Jedná sa o efektívny nástroj na purifikáciu analytov z rôznych druhov matic a umožňujúci prekoncentráciu analytov. (5) (6) Medzi výhody SPE patrí selektivita, vysoká výťažnosť a nízka spotreba organických rozpúšťadiel. (4) (5)

Výber vhodného sorbentu pre SPE je základným predpokladom pre úspešnú extrakciu. Najčastejšie sú využívané sorbenty, napr. na báze modifikovaného silikagélu (C_{18} , C_8) či na báze polymérov. Nevýhodou týchto sorbentov je malá selektivita, ako aj koextrakcia interferujúcich látok. S cieľom zlepšiť účinnosť extrakcie sú vyvíjane nové materiály, medzi ktoré patria okrem iných polyméry s molekulárnym odtlačkom, iónové kvapaliny, imunosorbenty alebo materiály na báze uhlíka. (7)

Využitie materiálov na báze uhlíka ako sorbentu v analytickej chémii sa začalo objavom fullerénu (C_{60}) (1985), pokračovalo uhlíkovými nanorúrkami (1991) a grafénom (2004). (7)

Popularita grafénu ako sorbentu pre SPE neustále narastá, vďaka svojim unikátnym vlastnostiam. (7) Týmito vlastnosťami sú veľký špecifický povrch, obojstranná polyaromatická kostra vytvárajúca delokalizovaný systém π elektrónov, hydrofóbny charakter a možnosť chemickej modifikácie jeho povrchu. (5) (6) (8)

Diplomová práca je zameraná na oblasť vývoja nových sorbentov pre SPE, konkrétne sa jedná o sorbent (aminosilikagél) modifikovaný grafénom. Sú vybrané tri modelové analyty (ibuprofen, propylparaben a metoprolol) pre štúdium vlastností pripraveného sorbentu. Výsledky výtlačností extrakcií modelových analytov na sorbente modifikovanom grafénom budú porovnané s referenčným komerčne dostupným materiálom (aminosilikagél, C₁₈ modifikovaný silikagél).

3 TEORETICKÁ ČASŤ

3.1 Chromatografia a vysokoučinná kvapalinová chromatografia

Termín chromatografia označuje skupinu niekoľkých techník, ktoré umožňujú separáciu rôznych zložiek zmesí. (9) Tieto metódy nachádzajú početné uplatnenie ako v rôznych oblastiach vedy, tak aj v priemyselnej oblasti. (10).

Spravidla, vo všetkých typoch chromatografie je vzorka analyzovanej látky rozpustená v mobilnej fáze (MF), ktorá je poháňaná cez stacionárnu fázu (SF). SF a MF sú navzájom nemiesiteľné. Podmienky sú zvolené tak, aby sa jednotlivé zložky zmesi distribuovali medzi MF a SF v rôznej miere. (10) Zložky zmesi, ktoré sú silno zadržované SF sa pohybujú len veľmi pomaly s tokom MF. Naopak, slabo zadržované zložky SF sa pohybujú rýchlo. Z dôvodu rozdielnej miery interakcií medzi SF a MF, ktorá je daná štruktúrou látky, a teda rôznymi fyzikálno-chemickými vlastnosťami sa jednotlivé zložky vzorky rozdelia do diskretných pásiem alebo zón, ktoré možno analyzovať kvalitatívne aj kvantitatívne. (9)

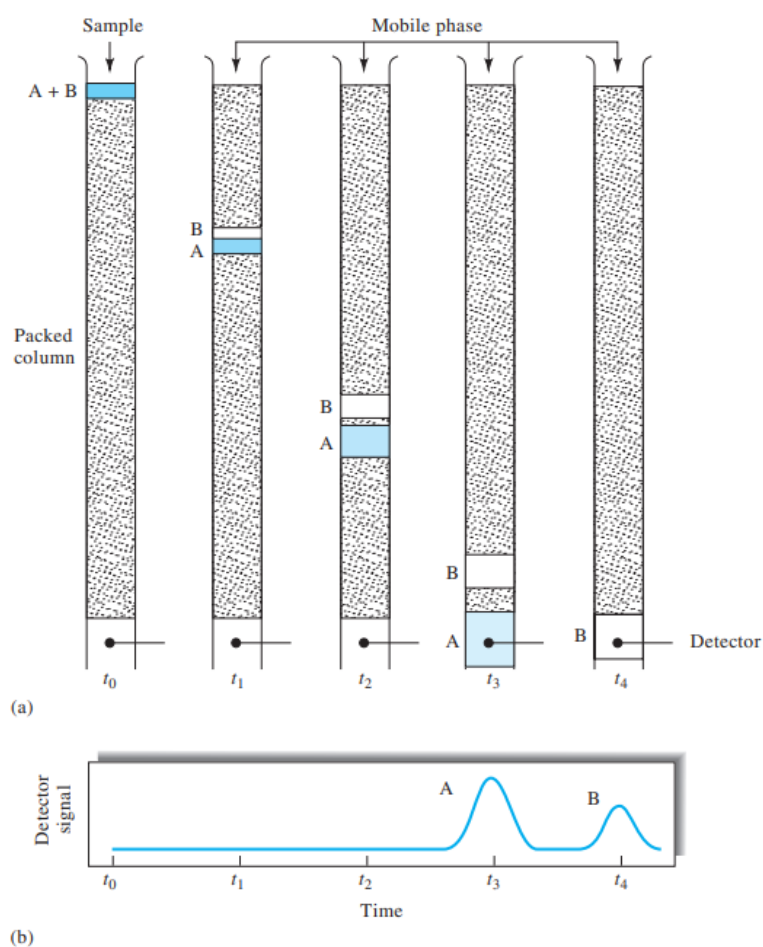
Na základe charakteru skupenstva MF rozlišujeme plynovú a kvapalinovú chromatografiu. (10) Sú známe aj iné typy, napr. superkritická kvapalinová chromatografiu (MF je superkritická kvapalina, t.j. zlúčenina vyskytujúca sa v stave nad jej kritickým tlakom a kritickou teplotou, v tomto stave má hustotu blízku kvapalinám a viskozitu podobnú plynom) či elektrochromatografia. (9) (11)

Vysokoučinná kvapalinová chromatografia (HPLC) patrí medzi najpoužívanejšie metódy separácie. (4) HPLC má tieto výhody: univerzálnosť, kombinácia výkonnej separácie s citlivou meracou schopnosťou (možnosť výberu detektoru podľa fyzikálno-chemických vlastností a množstva analytu), presnosť stanovenia, rýchlosť analýzy a automatizácia analýzy. (4) (9) (12)

V HPLC je vzorka v kvapalnom skupenstve o malom objeme nastrekovaná do prúdu MF. Ako MF prúdi, zložky vzorky sú separované a detegované rôznymi typmi detektorov (Obr. 1). (9) Pre detekciu sú využívané tieto vlastnosti analytu: UV-VIS absorpcia, fluorescencia, hmotnostná detekcia, atď. Úlohou detektora je prevádzať fyzikálne alebo chemické vlastnosti analytu alebo MF na elektrický signál, ktorý je priamo úmerný koncentrácií analytov v MF. Elektrický signál sa ďalej prevádza na grafický výstup, chromatogram. (10) Oddelené zložky zmesi eluované v rôznych časoch (retenčné časy, t_R) sa na chromatograme zobrazujú ako píky.

V prípade, že analyty neinteragujú so SF, nie sú na kolóne zadržované asú eluované v mŕtvom objeme (čase). (4) (10)

HPLC je metóda, ktorá slúži na kvalitatívnu aj kvantitatívnu analýzu. Retenčné časy sú za daných podmienok špecifické pre určité látky, a tak slúžia k identifikácii látok. Plochy pík sú funkciou koncentrácie stanovovaných látok, a tak slúžia ku kvantifikácii látok. (4) (11)



Obr. 1 Schematické znázornenie separačného procesu v chromatografii, v čase t_0 je vzorka zmesi látok A a B nastrekovaná na kolónu, v časoch t_1 a t_2 dochádza k separácii látok, v čase t_3 je látka A vymytá z kolóny ako prvá kvôli slabším interakciám so SF (na chromatograme ako pík A), v čase t_4 je vymytá z kolóny látka B ako druhá v poradí kvôli silnejším interakciám so SF (na chromatograme ako pík B) (prevzaté z (9))

3.1.1 Typy separačných mechanizmov

Separáčny proces v HPLC je založený na rovnováhe medzi molekulami prítomnými v MF a molekulami zadržanými SF. (10) Dochádza k niekoľkonásobnému ustáľovaniu dynamickej rovnováhy medzi zotrvaním látky v SF a v MF. Rozdelenie jednotlivých látok zo vzorky zmesi medzi dve nemiesiteľné fázy popisuje bezrozmerná veličina, rozdeľovací koeficient K :

$$K = \frac{A_s}{A_m}$$

kde K je rozdeľovací koeficient, A_s je koncentrácia látky v SF, A_m je koncentrácia látky v MF. (13)

Typy chromatografie v HPLC sú často klasifikované podľa separačného mechanizmu. Rozlišujeme: (9)

- 1.) **Rozdeľovacia chromatografia** – je založená na rozdielnej rozpustnosti separovaných látok v dvoch kvapalinách. Prvou kvapalinou je MF a druhá kvapalina je imobilizovaná na SF, napr. voda na povrchu oxidu kremičitého. (9) (10)
- 2.) **Adsorpčná chromatografia** – využíva sa schopnosť analytu adsorpcie na povrch SF. (10)
- 3.) **Iónovo-výmenná chromatografia** – využíva coulombické priťahovanie opačných nábojov. SF má na svojom povrchu chemické skupiny nesúce náboj, v MF sú prítomné opačne nabité ióny a elektrostatickými silami sú priťahované k SF. Separované látky sú eluované vytesnením alebo zmenou náboja vhodným elučným činidlom. (9) (10)
- 4.) **Vylučovacia chromatografia podľa veľkosti** – oddeľovanie zložiek zmesi prebieha na základe ich molekulovej veľkosti v roztoku, väčšie molekuly sú eluované ako prvé. Okrem separácie jednotlivých zložiek sa technika používa na zistenie charakteristík distribúcie molekulových hmotností polymérov. (9)

Ďalšími typmi sú napr. afinitná chromatografia alebo chirálna chromatografia. (9)

3.1.2 Separačné módy v HPLC

Podľa charakteru SF a MF sú rozlišované základné separačné módy. Medzi najčastejšie separačné metódy patrí separácia na reverznej fáze, chromatografia na normálnej fáze, iónovo-výmenná chromatografia. Existujú aj ďalšie separačné módy ako chromatografia hydrofilných interakcií, iónovo-párová chromatografia, chirálna chromatografia, a iné. (10)

Reverzná fáza (RF)

Separácia na RF je najbežnejším typom chromatografie používanej v praxi. (10) (12) Táto metóda je vhodná pre separáciu nepolárnych až nízko polárnych látok. Separácia prebieha na základe rozdielnej hydrofóbickej interakcie (najmä van der Waalsove sily) s povrchom SF. (12) Ako SF sa môže využívať, napr. silikagél s povrchom modifikovaným hydrofóbnymi funkčnými skupinami, najčastejšie C₁₈, C₈, fenyl alebo polymérne materiály. (4) MF tvorí zmes vodnej zložky a organickej zložky. Najčastejšie je vodná zložka tvorená tlmivým roztokom, čo umožňuje vhodnú úpravu pH, prípadne iónovej sily MF. Organická zložka je tvorená vhodným miešateľným polárnym organickým rozpúšťadlom, najčastejšie je využívaný metanol alebo acetonitril, zvyšuje elučnú silu MF. (4) (14)

Pri separáciách na RF platí, že retencia na kolóne stúpa so znižujúcou sa polaritou analytu a naopak (viac polárne analytu sú z kolóny rýchlejšie vymyté). (10) (11)

Iónovo-párová chromatografia je určitým typom separácie na RF, využíva sa pre analyty typu slabých kyselín a zásad. (4) Podstatou je cieleňá ionizácia analyzovanej látky upraveným pH MF. Zároveň sa v MF nachádza iónovo párové činidlo, teda látka s opačným nábojom ako ionizovaný analyt. (10) Používa sa sulfónová alebo perfluóroctová kyselina v prípade separácie zásad alebo kvartérne amíny, napr. tetrametyl-, tetrabutylamónium fosfát v prípade separácie kyselín. (3) Výsledkom je vznik iónovo neutrálneho páru, ktorý je možné oddeliť na základe hydrofóbných interakcií so SF. (10)

Normálna fáza (NF)

Najstarším typom je separácia na NF. Využíva polárnu SF a nepolárnu (nevodnú) MF na separáciu polárnych zlúčenín. Separácia prebieha na základe

polárnych interakcií (vodíkové mostíky, interakcia dipól – dipól). (4) Najbežnejšou SF je čistý silikagél, po prípade s modifikovaným povrchom, napr. kyanopropyl-oxid kremičitý, hydridový oxid kremičitý. MF pozostáva zo zmesi nepolárneho rozpúšťadla a mierne polárnejšieho rozpúšťadla („modifikátor“) na zvýšenie elučnej sily. (11) Ako nepolárne rozpúšťadlo sa vo veľkej miere využíva hexán, avšak kvôli obavám z toxicity ho postupne nahrádza izoheptán, *n*-heptán a cyklohexán. Vhodnými modifikátormi sú chloroform, etylacetát či dichlórmetán. (14)

Pri chromatografii na NF sa nepolárne zlúčeniny eluujú ako prvé a najviac polárne zlúčeniny ako posledné. (10) Jej uplatnenie v biomedicínskych oboroch je menej časté. (4)

Chromatografia hydrofilných interakcií (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC)

HILIC je alternatívnym separačným módom k separácií na NF. (15) Pri chromatografii na NF je MF tvorená nepolárnymi organickými rozpúšťadlami. (4) Vysoko polárne analyty sú silno zadržované na SF a nemusia byť eluované z kolóny. (10)

Pridanie určitého množstva vodnej zložky (5–40% tlmivého vodného roztoku) do organickej zložky MF (zvyčajne acetonitrilu) umožňuje separovať a eluovať vysoko polárne zlúčeniny, ktoré sú silno zadržované v režime NF (alebo slabo zadržované v režime RF). Existuje predpoklad, že pri týchto podmienkach sa vytvorí tenká vrstva vody na SF, do ktorej prechádzajú difúziou analyty rozpustené v MF. (15) Analyty sú eluované v poradí rastúcej hydrofility. (10) SF tvorí nemodifikovaný silikagél alebo modifikovaný polárnou funkčnou skupinou (napr. amino-, diol-, kyanoskupinou). (15)

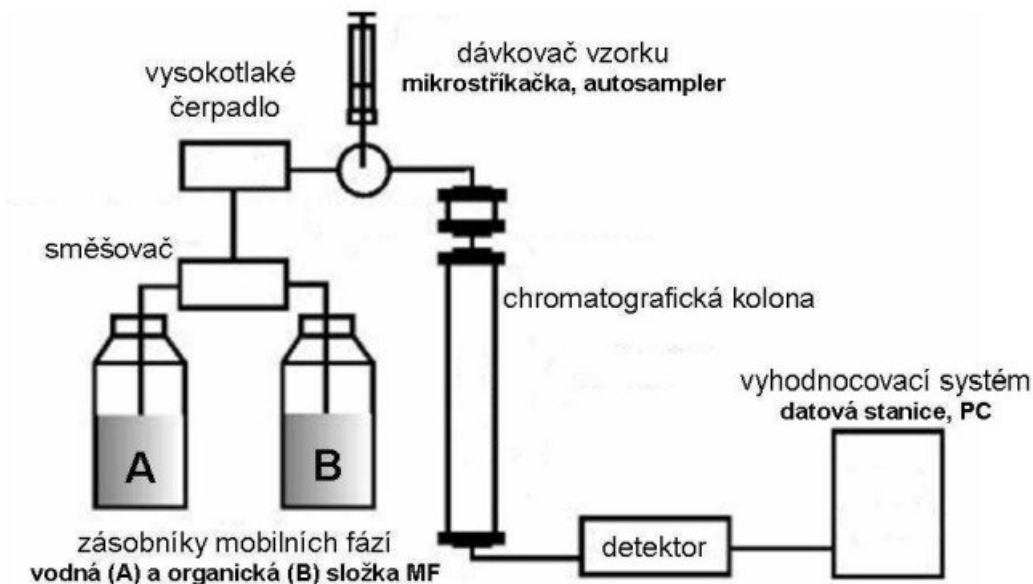
HILIC umožňuje separovať zlúčeniny s podobnými vlastnosťami a je vhodná na analýzu hydrofilných zlúčenín ako sú cukry, aminokyseliny, nukleotidy. (15)

3.1.3 Prístrojové vybavenie

HPLC využíva vysoký tlak (400 bar) na pretlačenie MF spolu s rozpusteným roztokom analytu cez kolónu naplnenú časticami s mikrónovými veľkosťami, ktoré tvoria SF. (16) Konštrukcia HPLC prístrojov sa líši od jedného výrobcu k druhému, ktoré sa líšia vzhľadom, ale čo sa týka základných funkčných parametrov dosahujú približne rovnaké hodnoty. Výnimku tvoria prístroje pre ultra-vysokú účinnú

kvapalinovú chromatografiu (UHPLC), ktoré sú prispôsobené práci pri vysokých tlakoch (1000–1300 bar). (3) UHPLC technika využíva menšie častice ($<2 \mu\text{m}$) a vyššie tlaky na dosiahnutie vyššej citlivosti, rozlíšenia a zrýchlenia analýzy. (16)

Základné komponenty kvapalinového chromatografu sú (Obr. 2) sú: 1.) zásobníky MF; 2.) čerpadlo (pumpa); 3.) injektor (dávkočič vzorky); 4.) kolóna umiestnená v termostatovanom kolónovom priestore; 5.) detektor; 6.) kontrolná jednotka pripojená k počítaču, na ktorom je nainštalovaný vhodný chromatografický software, ktorý umožňuje riadenie analýzy a vyhodnocovanie získaných dát. (9) K základným komponentom môžu byť pridané aj doplnkové súčasti v závislosti od účelu HPLC, napr. chladiaci systém pre autosampler, prepínanie kolóny pre spätný tok alebo usporiadanie kolónového priestoru pre použitie viacerých kolón, atď. (10) (13)



Obr. 2 Základný popis prístrojového vybavenia HPLC (prevzaté z (13))

1. Zásobníky MF

Zásobníkom MF je čistá inertná nádoba zo skla pre analýzu malých molekúl alebo plastu (polytetrafluóretylén, polypropylén, atď.) pre analýzu RNA a proteínov, opatrená uzáverom. Uzáver chráni MF pred prachom, znižuje odparovanie rozpúšťadla a poskytuje port pre teflonové hadičky, ktorými je MF čerpaná do systému. (16) Koniec prívodných hadičiek je umiestnený filter zvyčajne z nehrdzavejúcej ocele s veľkosťou pórov do $10 \mu\text{m}$, ktorý slúži na odstránenie mechanických častíc. (10)

Pre HPLC analýzu uskutočňovanú v izokratických podmienkach sa využíva jedno rozpúšťadlo alebo vopred zmiešaná zmes rozpúšťadiel, na čo je potrebný len jeden zásobník. V prípade gradientovej separácie (alebo izokratickej s použitím zmesi rozpúšťadiel) sa zmes rozpúšťadiel vytvára pomocou čerpadiel. V tomto prípade sú potrebné dva alebo viaceré zásobníky MF, ktoré sa zmiešavajú čerpacím systémom v rôznych pomeroch. (4) (10)

2. Degasser (odplynenie MF)

Plyny rozpustené v MF sťažujú kontinuálny prietok MF, skresľujú retenčný čas, spôsobujú kolísanie základnej línie a obvykle zvyšujú aj šum signálu detektoru. Z týchto dôvodov je potrebné odplynenie MF. (4) Odplynenie sa môže uskutočniť dvomi postupmi, a to pred samotnou analýzou alebo v priebehu analýzy (in-line, degasser). Predbežné odplynenie sa vykonáva prebublaním rozpúšťadiel inertným plynom (dusík, hélium) alebo pomocou ultrazvuku. (16)

Druhým typom odplynenia je in-line odplyňovač, tzv. degasser, ktorý býva zabudovaný do moderných HPLC systémov. (4) Princípom tohto zariadenia je prechod MF cez systém trubičiek umiestnenými vo vákuovej komore. Steny trubičiek sú tvorené membránami a majú selektívnu priepustnosť pre plyny. Pri prechode MF, plyny prechádzajú cez póry membrány vplyvom vákuu, a tak dochádza k ich odstráneniu z MF. (4) (16)

3. Vysokotlakové čerpadlo (pumpa)

Účelom pumpy je dodávať presný, reprodukovateľný, konštantný a bezpulzný tok MF do kolóny. (10) Väčšina analytických aplikácií využíva tlak v rozmedzí 150–200 bar, avšak pumpy sú konštruované tak, aby pracovali do tlaku 400 bar. (4)

Mnoho separácií sa môže uskutočniť izokraticky, avšak pre zložitejšie separácie je potrebná gradientová elúcia, tá sa uskutočňuje zmenou pomeru rozpúšťadiel riadenú počítačom v priebehu separácie. (11) Na vytvorenie gradientového toku sa používajú tri hlavné prístupy: 1.) kontrolované množstvá jednotlivých rozpúšťadiel sa odmerajú do zmiešavacej komory ešte pred dosiahnutím vysokotlakového čerpadla; 2.) proporčný ventil, ktorý je riadený mikroprocesorom, reguluje množstvo až štyroch rozpúšťadiel a zmes prechádza do vysokotlakového čerpadla; a 3.) viaceré vysokotlakové čerpadlá, ktoré sú riadené programovacím zariadením dodávajú jednotlivé rozpúšťadla, a tie sú

spolu zmiešané vo vysokotlakovej zmiešavacej komore za čerpadlom. Prístupy 1.) a 2.) sú známe ako nízkotlakové miešanie a prístup 3.) je vysokotlakové miešanie. (10)

4. Nástrek vzorku (injektor)

Úlohou injektora je nástrek malý, presne odmeraný objem (1–100 μ l) roztoku vzorku do MF. Nástrek sa musí vykonávať reprodukovateľne a presne. (16)

Vzorka môže byť nastrekovaná do systému buď manuálne alebo pomocou automatického dávkovača, autosamplera. V autosampleri sú vzorky umiestnené vo vialkách (1,5–2 ml) opatrených viečkom so septom. Vialky sa nachádzajú na presne označených pozíciách v zásobníku, čo umožňuje jednoduché ovládanie dávkovania pomocou chromatografického softwaru. (4) Práve automatické dávkovanie je preferované, pretože umožňuje prevádzanie sériových analýz bez prítomnosti operátora. (9) Základným prvkom automatických dávkovačov je dávkovacia slučka so šesťcestným otočným ventilom s dávkovacou slučkou s definovaným objemom. V plniacej fáze je ihlou nasávaná vzorka z vialky do dávkovacej slučky, zároveň MF preteká mimo túto slučku. Po otočení ventilu do nástrekovej pozície MF preteká slučkou a vzorka je unášaná prúdom MF na kolónu. Medzi nástrekmi jednotlivých vzoriek je potrebné premytie nasávacej ihly aj slučky vhodným rozpúšťadlom, tak aby bolo zamedzená kontaminácia vzorky predošlou vzorkou. (4) (16)

Vďaka autosampleru umožňujú moderné HPLC systémy analýzu veľkého množstva vzoriek (napr. 100), čo spôsobuje, že vzorky na posledných pozíciách ostávajú v zásobníku vzoriek pomerne dlhý čas. Autosampleri disponujú schopnosťou chladenia, čo zvyšuje stabilitu vzorky v čase a znižuje odparovanie prchavých rozpúšťadiel z vialiek s prepichnetým septom. (10)

5. Kolóna

Kolóna je časť HPLC uložená v termostatovanom kolónovom priestore, kde dochádza k separácii. HPLC kolóny sú vyrobené hlavne z nerezových rúrok z dôvodu vysokých tlakov v priebehu HPLC analýzy. Najčastejšie rozmery analytických kolón, ktoré sú komerčne dodávané: 50–300 mm dĺžka, 2–5 mm vnútorný priemer. (16) Niektoré analýzy využívajú kapilárne kolóny s priemerom do 100 μ m. (4)

HPLC prístroje sú vybavené kolónovým priestorom, ktorý je možné temperovať. Dochádza k regulácii teploty kolónového priestoru od okolitej teploty po 150 °C. (16)

Kolísanie teploty môže mať vplyv na retenčné časy a selektivitu analýzy. Platí, že nárast o 1°C vedie k zníženiu retenčného času o 2 % pri analýze v reverznej fázy. (4)

V niektorých prípadoch, napr. analýza biologického vzoriek sa využíva aj kratšia kolóna s dĺžkou 10–20 mm, predkolóna, ktorá sa nachádza pred samotnou kolónou. Jej úlohou je chrániť vlastnú kolónu, pretože zachytáva silno zadržované látky a nečistoty, predlžuje životnosť kolóny. (4) (11)

Podrobný popis kolón a materiálov pre SF uvedené v časti 3.1.5 práce.

6. Detektor

MF spolu s analytmi putuje z kolóny po separácii do detektoru, kde prebieha vlastná detekcia analyzovaných látok. (9)

Podrobný popis najčastejšie využívaných detektorov uvedený v časti 3.1.6 práce.

7. Kontrolná jednotka

Kontrolná jednotka ovláda ostatné komponenty HPLC a súčasne je pripojená na počítač, na ktorom je nainštalovaný chromatografický software. (10) Existujú rôzne druhy softwarov, avšak vo všeobecnosti umožňujú ovládanie analýzy a kontrolu HPLC systému a vyhodnotenie chromatogramov (kvalita, kvantita). (9) (16)

3.1.4 Mobilná fáza HPLC

MF je potrebné pred naliatím do zásobníkov prefiltrovať. Filtrácia je nutná najmä v prípade, keď vodná zložka obsahuje soli tlmivých roztokov (hlavne fosfátov), pretože hrozí riziko vzniku nerozpustných kryštálov. Využíva sa vakuové filtračné zariadenie s nylonovými filtrami s veľkosťou pórov 0,45 µm. (4) (9)

Podľa zloženia MF je rozlišovaná izokratická a gradientová analýza. V prípade izokratického módu je zloženie MF konštantné počas celej analýzy. Počas gradientovej analýzy sa zloženie MF mení s časom, tak aby dochádzalo k zvyšovaniu elučnej sily (navýšenie podielu menej polárneho rozpúšťadla a zníženie podielu polárneho rozpúšťadla – vody). Používa sa keď sa očakávajú veľké rozdiely v retenčnom čase zlúčenín v zmesi, a teda dochádza k skráteniu analýzy. (9)

Zloženie MF podľa typu separačného módu je popísané v časti 3.1.2 práce.

3.1.5 Stacionárna fáza – HPLC kolóny

Základnou súčasťou HPLC je analytická kolóna zabezpečujúca kontakt medzi SF a MF. (12)

Kolóna je naplnená sorbentom, pričom nepohyblivú SF môže vytvárať priamo povrch sorbentu alebo je tento povrch modifikovaný. Štandardná veľkosť častíc sorbentu sa pohybuje v rozmedzí 3,5–5 μm (existujú aj menšie), rovnomernosť častíc je dôležitým prvkom pre kvalitnú analýzu, a teda zaručuje efektivitu a opakovateľnosť analýzy. (12) (17)

Na základe charakteru sorbentu rozlišujeme dva typy kolón:

- Časticové (náplňové) kolónky – SF je tvorená pevnými časticami guľovitého tvaru pokrytými množstvom pórov. Póry na časticách zabezpečujú pomerne veľký povrch, na ktorom dochádza k separácií. Platí, že čím sú menšie častice, tým je povrchová plocha SF väčšia, a tým je separácia efektívnejšia. Na druhej strane, menšie častice zapríčiňujú vyššiu odporovú silu voči toku MF. (4)
- Monolitické kolónky – SF je vyrobená z jedného kusu monolitu, ktorý obsahuje typy pórov, makropóry s veľkosťou priemeru 2 μm vytvárajú sieť kanálikov naprieč monolitom, čo zabezpečuje transport MF a mesopóry s priemerom 10 nm vytvárajúce dostatočne veľký povrch pre vlastnú separáciu. Nachádzajú využitie pri separácií enantiomérov a komplexných biologických vzoriek. (4)

Materiály pre výrobu SF

Silikagél

Silikagél je látka amorfnej štruktúry so zložením $\text{SiO}_2 \times \text{H}_2\text{O}$, patrí medzi najčastejšie využívané materiály pre výrobu sorbentu. (4) Povrch silikagélu je pokrytý reaktívnymi silanolovými skupinami Si-OH, ktoré môžu pôsobiť ako aktívna fáza alebo sa častejšie využívajú na derivatizáciu (viď nižšie). (10)

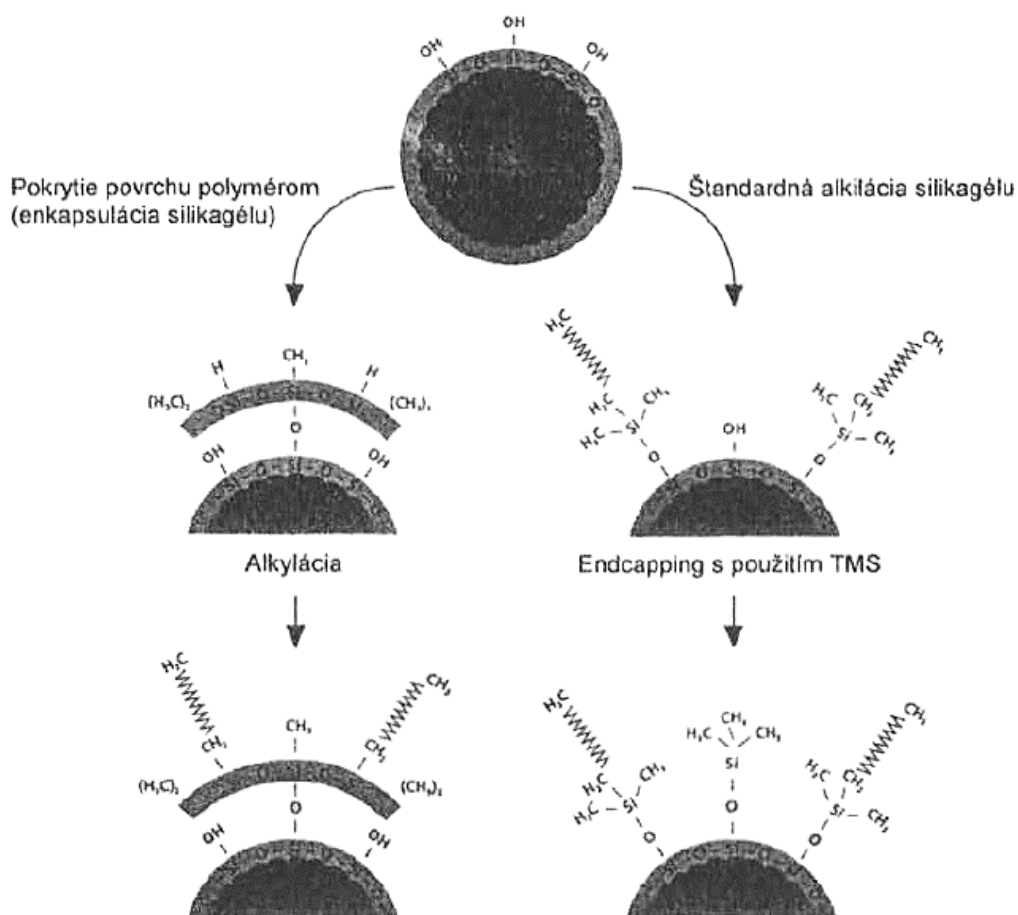
Vyniká najmä svojimi mechanickými vlastnosťami a taktiež stabilitou v prítomnosti organických rozpúšťadiel. (4) Na druhej strane, nevýhodou je jeho nízka stabilita pri teplotách nad 60°C a pri širšom rozmedzí pH. Silikagél je odolný voči pôsobeniu kyselín a zásad v rozsahu pH medzi 2 a 8. Z týchto dôvodov boli vyvinuté hybridné typy silikagélu, a to modifikáciou silanolových skupín. (4) (10)

Nemodifikovaný silikagél sa využíva ako SF pri separáciách na NF, ako polárny sorbent slabo kyslých vlastností. Silne zadržiava látky zásaditej povahy. (12)

Modifikovaný silikagél

Silanolové skupiny Si-OH na povrchu silikagélu môžu byť upravované rôznymi derivatizačnými reakciami. Tieto reakcie sa vykonávajú prostredníctvom rôznych činidiel v závislosti od požadovaného charakteru novo vzniknutej SF. (10)

Dochádza k náhrade Si-OH skupín najčastejšie nepolárnou alebo menej často polárnou skupinou. V závislosti od charakteru naviazanej skupiny sa výsledná SF označujú skratkami, napr. v prípade modifikáciou polárnou skupinou: oktylovou – C₈, oktadecylovou – C₁₈, fenylovou – Phe (využívajú sa v separačnom móde RF); alebo modifikáciou nepolárnou skupinou: kyano – CN, amino – NH₂ (využívajú sa v separačnom móde NF). (9) (12)



Obr. 3 Rôzne možnosti priestorovej ochrany povrchu silikagélu (prevzaté z (12))

Po naviazaní požadovanej skupiny na povrch sillikagélu ostáva až 50 % nezreagovaných Si-OH funkčných skupín. (10) Príčinou je sterické bránenie už naviazaných objemných skupín, ktoré zabraňujú modifikácií priľahlých Si-OH skupín. (4) Keďže ostávajúce Si-OH skupiny nemusia byť žiadúce, bolo vytvorených niekoľko postupov na blokovanie týchto skupín, reakcia je označovaná ako end-capping (Obr. 3). (10) Jedná sa o chemickú reakciu, pri ktorej reagujú voľné Si-OH skupiny s malými silánmi, napr. trimetylchlórsilán (TMS), dimetylchlórsilán. Táto reakcia znižuje počet voľných silanolových skupín o 20-30%. (4)

Ďalšími materiálmi pre výrobu sorbentov v SF môžu byť polyméry, oxidy kovov (ZrO_2 , Al_2O_3 , TiO_2) alebo SF založené na grafitizovanom uhlíku.

3.1.6 Detektory

Detektor je zariadenie nachádzajúce sa za kolónovým priestorom a deteguje MF spolu s eluovanými analytmi. Detekcia je založená na rozdielnych fyzikálnych a chemických vlastnostiach analyzovaných látok a MF. (10) Zmeny týchto vlastností detektor prevádza na elektrický signál, ten môže byť zosilnený a poskytuje údaje o koncentráciách, po prípade o identifikáciách analytu. (16)

Ideálny detektor by mal spĺňať viacero požiadaviek, ako je:

- vysoká citlivosť,
- reprodukovateľnosť,
- robustnosť,
- univerzálnosť,
- rýchla odozva,
- široký dynamický lineárny rozsah,
- poskytnúť kvalitatívne informácie o analytoch. (4)

V tejto podkapitole budú popísané dva najbežnejšie detektory využívajúce sa v praxi. UV-VIS detektor bol používaný v rámci experimentálnej časti tejto diplomovej práce.

Spektrofotometrický detektor, UV-VIS

Vďaka svojej relatívnej univerzálnosti, spoľahlivosti, jednoduchosti použitia a možnosti gradientovej analýzy je UV-VIS detektor najrozšírenejším a najčastejším

rutinne používaným detektorom v HPLC analýze. (13) Využíva schopnosť látok absorbovať žiarenie v ultrafialovej oblasti (UV, vlnová dĺžka 190–400 nm) a vo viditeľnej oblasti svetla (VIS, vlnová dĺžka 400–800 nm). (12) UV-VIS detektory sú ľahko aplikovateľné v kvantitatívnej analýze, ktorá je založená na Lambert-Beerovom zákone, pretože odozva detektoru je priamo úmerná koncentrácií analytu a dĺžke cely.

$$A = \varepsilon \cdot l \cdot c$$

kde A je absorbancia, ε predstavuje molárny absorpčný koeficient, l je hrúbka absorbujúcej vrstvy [cm], c je koncentrácia analytu [mol/l] (4)

Selektivita detektoru je daná schopnosťou látok absorbovať svetlo v UV-VIS oblasti, tzn. látkam obsahujúcim chromofor. Pri látkach neobsahujúcich chromofor je možná derivatizácia, teda chemická konverzia analytu na derivát s vhodnými spektrálnymi vlastnosťami. (12)

Ako zdroj žiarenia sa v UV oblasti využíva deuteriová lampa, vo VIS volfrámová. Rozlišujeme viacero typov usporiadania detektorov:

- Detektor s nemennou vlnovou dĺžkou – ako zdroj žiarenia využíva ortuťovú výbojku, meria vo vlnovej dĺžke 253,7 nm. (4)
- Detektor s premennou vlnovou dĺžkou – najčastejší typ, umožňuje výber vlnovej dĺžky monochromátorom, nastavuje sa na takú vlnovú dĺžku, kde dochádza k maximálnej absorpcii svetla analytom.. (4) (10)
- Detektor s fotodiódovým poľom (diode-array detector, DAD) – žiarenie dopadá na diódové pole, každá fotodióda je nastavená na určitú vlnovú dĺžku v použitom rozsahu, zaznamenáva tak celé absorpčné spektrum látky. Umožňuje identifikáciu látky (porovnáva sa spektrogram s knižnicou spektier) a hodnotí čistotu píku. (4)

Hmotnostný detektor

Jedná sa o analytickú techniku, kedy dochádza k ionizácii látky a následne k rozdeleniu podľa hmotnosti a náboja (m/z), výsledkom je hmotnostné spektrum. (12) Umožňuje tak separáciu aj identifikáciu analytov v jednom kroku. (16)

Prvým krokom detekcie je ionizácia molekúl analytu. Využívajú sa tri metódy ionizácie: 1.) ionizácia elektrosprejom; 2.) chemická ionizácia za atmosférického tlaku 3.) fotoionizácia za atmosférického tlaku. (16) Potom sú ióny privádzané do analyzátoru, kde prebieha ich separácia podľa m/z v magnetickom alebo vysokofrekvenčnom poli. Bežne využívané analyzátory sú kvadrupóly (jednoduchý – Q alebo trojitý – QqQ), iónové pasce a analyzátory doby letu. (4) Posledným krokom je vlastná detekcia iónov. (16)

Je to vysoko citlivá, selektívna metóda využívaná na kvantitatívnu aj kvalitatívnu analýzu. Široké uplatnenie nachádza pri analýze liečiv a ich metabolitov v biologickom materiálu, kde poskytuje detailné informácie o štruktúre. (4)

Medzi ďalšie typy detektorov patria napr. fluorimetrický, refraktrometrický, elektrochemický, rádiometrický detektor, detektor rozptylu svetla alebo nabitých častíc.

3.2 Extrakcia na tuhej fáze, SPE

SPE je technika slúžiaca predovšetkým na izoláciu analytu z kvapalných biologických matric. (9) Využitie nachádza ako v analýze liečiv a metabolitov v telesných tekutinách (plazma, moč, sliny), tak aj pri stanovovaní rezíduí pesticídov, priemyselných polutantov vo vzorkách vody a potravín. (12). (18)

Podstatou SPE metódy je selektívne naviazanie analytu zo vzorky na povrch pevnej fáze (sorbentu) na základe rôznych chemických vlastností, napr. polarita, náboja alebo veľkosti molekúl. (19) Využíva sa rozdielna schopnosť sorbentu zachytiť zložky roztoku na svojom povrchu, pričom dochádza k silnej adsorpcii analytu a slabej väzby s ostatnými zložkami zmesi. (12)

Sorbent sa nachádza v extrakčnej kolónke (vyrobenej zo skla alebo polpropylénu) uzatvorený medzi dvomi fritami. (19) Vo väčšine prípadov sa využívajú komerčné extrakčné kolónky na jedno použitie. (18)

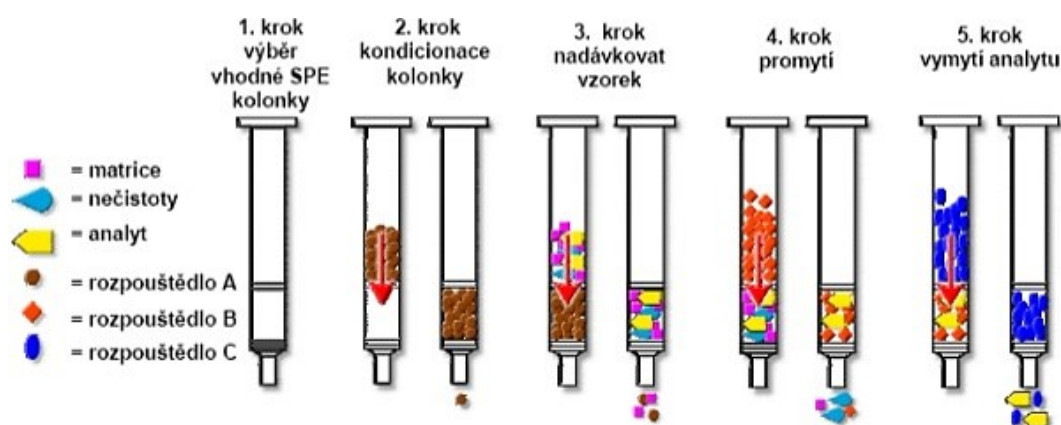
Proces extrakcie na pevnej fáze sa uskutočňuje v piatich krokoch znázornených na Obr. 4:

1. **Výber vhodnej SPE kolónky** – voľba sorbentu sa určuje na základe charakteru analytu, do úvahy sa berie počet funkčných skupín, ich polarita a acidobázické vlastnosti. Taktiež je nutné posúdiť možné interakcie medzi sorbentom a ostatnými zložkami matrice. (12) (18)
2. **Kondicionácia (solvatácia, zmáčanie sorbentu)** – dochádza k aktivácii funkčných skupín na modifikovaných silikagéloch, tak aby bol povrch schopný interakcie s analytom. Usporiadanie štruktúry pred aktiváciou je nepravidelné a mnohé štruktúry sú pevne spojené ako „klbká vlny“. To spôsobí, že veľa funkčných skupín je skrytých, a tak nemôžu nadviazať dobrý kontakt s analytom, tým nemôže dôjsť k retencii. Preto po aktivácii sa usporiadanie štruktúr zmení na usporiadané a kontaktná plocha s cieľom sa zväčší a analyt sa dobre udrží. Vhodným rozpúšťadlom na zmáčanie sorbentu je metanol, pričom sorbent nesmie vyschnúť pred nanosením vzorku. (12) Následne je nutné organické rozpúšťadlo vymyť vodou alebo vodným tlmivým roztokom z kolónky, pretože rozpúšťadlo môže interagovať s povrchom SF, a tým by mohli byť oslabené väzby medzi analytom a sorbentom. (18) (19)

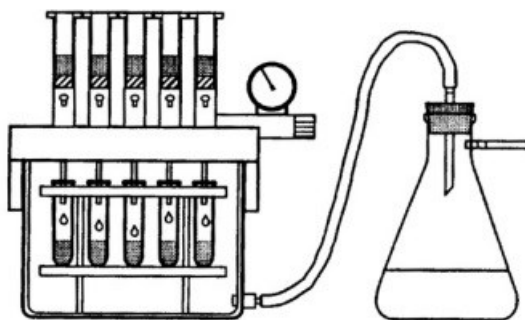
3. **Nanesenie vzorku** – aplikácia vzorky na extrakčnú kolónku prebieha pri kontrolovaných experimentálnych podmienkach. Prietok vzorky je zabezpečený buď podtlakom (využíva sa špeciálne zariadenie „manifold,“ vid’ Obr. 5), pretlakom (pôsobením piestu) alebo odstredivou silou (odstredivkou). V ideálnom prípade sa analyt zachytáva na sorbent, ostatná matrica preteká do odpadu. (12) (19)

4. **Premýtie kolónky** – využíva sa voda alebo tlmivý roztok, dochádza k odstráneniu zvyšných zložiek matrice, zatiaľ čo analyt je stále zadržaný na kolónke. (18) Tento krok slúži k zábrane znečistenia chromatografických kolón a prístrojov, znižuje interferenciu nečistôt s detekciou cieľových analytov. Toto zníženie interferencie sa nazýva aj zníženie matricového efektu. (12)

5. **Elúcia** – posledný krok SPE, kedy za použitia vhodného rozpúšťadla dochádza k desorpcii analytu naviazaného na sorbente. Získava sa extrakt, ktorý je buď priamo analyzovaný alebo ďalej upravovaný. (12)



Obr. 4 Postup extrakcie na pevnej fáze (prevzaté z (20))



Obr. 5 Manifold pripojený k zdroju vákua, umožňuje prevádzanie SPE viacerých vzoriek v jednom čase (prevzaté z (36))

Ďalšou úpravou vzorky, pred samotnou HPLC analýzou, sa myslí odparovanie vzorky pod prúdom dusíka s následnou rekonštitúciou vhodným rozpúšťadlom, najčastejšie MF. (19) Existujú dva dôvody tejto úpravy. Po prvé, roztok analytu je rozdielny od počiatocnej MF. Pri priamom nastreknutí vzorky tak môže dôjsť k interakcii s rozpúšťadlom, čo sa prejaví na tvare píku. Z tohto dôvodu je nutné odparenie pod prúdom dusíka s následnou rekonštitúciou MF. Druhou príčinou je nedostatočná citlivosť detektora na nízku koncentráciu analytu. Odparením a rekonštitúciou malým objemom rozpúšťadla alebo MF tak dôjde k zakoncentrovaniu analytu. (12) (18)

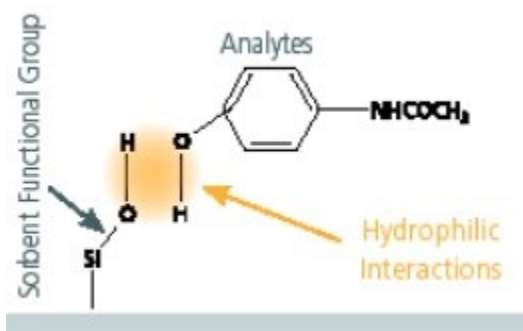
3.2.1 SPE teória

SPE sa riadi princípom kvapalinovej chromatografie, tzn. analogicky rozlišujeme niekoľko typov separačných módov, a teda aj sorbentov. (20) Výber vhodného typu sorbentu je kľúčový pre správnu úpravu vzorku pred vlastnou analýzou, zohľadňuje sa polarita, veľkosť a tvar molekúl, náboj analytu. (12)

Normálna fáza (NF)

Pri separácií na NF platí, že pevná fáza je polárnejšia ako fáza kvapalná. (12) Ako SF sa využívajú polárne sorbenty, napr. nemodifikovaný silikagél, polárne funkcionalizované viazané kremíky či florisil, alebo alumina. (19) Na retencii medzi polárnymi funkčnými skupinami analytu a polárnym povrchom sorbentu sa zúčastňujú hydrofilné interakcie ako vodíkové väzby, interakcie dipól – dipól,

$\pi - \pi$ interakcie (Obr. 6). (21) Tieto väzby sú prerušené použitím elučného činidla, ktorého polarita je vyššia ako polarita matrice vzorky. (18) (20)



Obr. 6 Hydrofilné väzby medzi polárnou skupinou analytu a polárnou funkčnou skupinou sorbentu (prevzaté z (21))

Silikagél

Základom všetkých sorbentov je polymérna sieť oxidu kremičitého tvoreného poréznymi, sférickými časticami. (18) Jedná sa o extrémne hydrofilný materiál, ktorý je nutný udržiavať v suchu a pracovať s bezvodými vzorkami. Využíva sa najmä na čistenie vzorky. (12)

Polárne modifikované silikagély (kyanopropyl-, amino-, diolskupinou)

Krátke alkylové reťazce zakončené polárnou skupinou dodávajú týmto kremíkovým sorbentom hydrofilnejšie vlastnosti. (20) Využívajú sa na adsorpciu a elúciu zlúčenín s podobnou štruktúrou (izomérov), čistenie vzoriek, môžu byť využité aj pri podmienkach obrátenej fázy, kedy sa využívajú hydrofóbne vlastnosti krátkych alkylov. (18)

Florisil

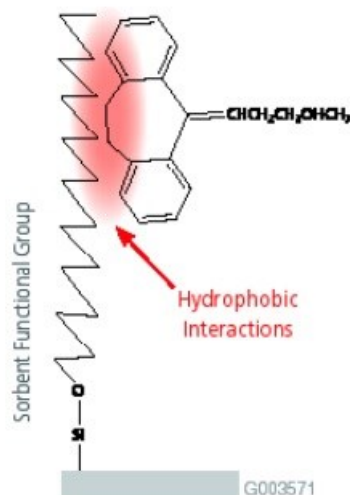
Kolónky naplnené kremičitanom magnézia sa zvyčajne používajú na čistenie vzoriek organických extraktov pri environmentálnych postupoch. Jedná sa o vysoko polárny materiál viažuci polárne zlúčeniny z nepolárnymi matric. (18)

Oxid hlinitý (Alumina)

Sú dostupné materiály z oxidu hlinitého s rozdielnym pH, a to kyslé (Alumina-A, pH 5), neutrálne (Alumina-N, pH 6,5) a zásadité (Alumina-B, pH 8,5). Požívajú sa ako na čistenie, tak aj na adsorpciu vzoriek. (18)

Reverzná fáza (RF)

Separácie na obrátenej fáze zahŕňajú polárnu MF a nepolárnu SF. Predmetom záujmu je nepolárny analyt, ktorý sa zadržiava na sorbente prostredníctvom hydrofóbnych väzieb, teda van der Waalsovych a disperzných síl (Obr. 7). V priebehu elúcie sú tieto väzby narúšané nepolárnym rozpúšťadlom. (20)



Obr. 7 Hydrofóbne väzby medzi analytom a funkčnou skupinou sorbentu (prevzaté z (21))

Nepolárne modifikované silikagély (alkylovou skupinou – C₈, C₁₈, fenylovou/arylovou skupinou)

Oktylové (C₈) a oktadecylové (C₁₈) alkylové reťazce môžu byť naviazané na silikagélovom sorbente monoméne alebo polymérne. Polymérne viazané materiály vedú k úplnejšiemu pokrytiu povrchu oxidu kremičitého, sú odolnejšie voči extrémnym hodnotám pH, a preto sú vhodnou voľbou pri environmentálnych analýzach. (18)

Modifikácia základného materiálu, silikagélu, prebieha chemickou reakciou s alkyldimetylmonochlór-silánmi alebo alkylmetyldichlór-silánmi s voľnými silanolovými skupinami. Takýmto spôsobom sa na povrch silikagélu viažu najčastejšie oktadecylové alebo oktylové uhlíkové reťazce alebo reťazce s menším počtom uhlíkov (metyl, etyl), alebo iné funkčné skupiny (fenylové, cyklohexyl). (12) (18)

Modifikované silikagély sa podľa chemicky naviazanej skupiny rozdeľujú do viacerých skupín: polárne a nepolárne sorbenty, ióno-výmenné kationické alebo anionické či kovalentne modifikovaný silikagél (Tabuľka 1). (12)

Podobne ako pri HPLC modifikovaných silikagélových sorbentov, tak aj pri SPE sobentov sa môžu voľné silanolové skupiny eliminovať pomocu trimetyl-, triizopropyl-, triizobutylchlórsilánu. Dochádza k tzv. sekundárnej silanizácií (vzniknuté sorbenty sa označujú ako endcapped silica), vďaka čomu sú tieto materiály stabilnejšie v kyslom alebo mierne zásaditom prostredí (pH 2 – 9). (9) (12)

Tabuľka 1 Polarita a chemická štruktúra modifikovaných silikagélov (prevzaté z (12))

Označenie sorbentu	Funkčná skupina	Silikagél s chemicky viazanou fázou
Nepolárne silikagély		
C18	Oktadecyl	$\equiv\text{Si}-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$
C8	Oktyl	$\equiv\text{Si}-\text{C}_8\text{H}_{17}$
C2	Etyl	$\equiv\text{Si}-\text{C}_2\text{H}_5$
C1	Metyl	$\equiv\text{Si}-\text{CH}_3$
CH	Cyklohexyl	$\equiv\text{Si}-\text{C}_6\text{H}_{12}$
PH	Fenyl	$\equiv\text{Si}-\text{C}_6\text{H}_5$
Polárne silikagély		
CN	Kyanopropyl	$\equiv\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN}$
2OH	Diol	$\equiv\text{Si}-(\text{CH}_2)_3\text{OCH}_2(\text{OH})\text{CH}_2(\text{OH})$
Si	Silikagél	$\equiv\text{Si}-\text{OH}$
Iónovymenné – kationické silikagély		
SCX	Benzén-sulfonylpropyl	$\equiv\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{SO}_3^-\text{H}^+$
PRS	Sulfonylpropyl	$\equiv\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-\text{H}^+$
CBA	Karboxymetyl	$\equiv\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-\text{H}^+$
Iónovymenné – anionické silikagély		
SAX	Trimetyl-aminopropyl	$\equiv\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-$
PSA	N-propyl-etyléndiamín	$\equiv\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2\text{Cl}^-$
DEA	Dietylamo-propyl	$\equiv\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}^+(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2\text{Cl}^-$
NH ₂	Aminopropyl	$\equiv\text{Si}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}_2$

Polyméry (kopolymér styren a divinylbenzén, kopolymér etylvinylbenzén a divinylbenzén, kopolymér akrylonitril a divinylbenzén)

Jedná sa o priestorovo zosieťované polyméry pripravované heterogénnou polymerizáciou v inertnom rozpúšťadle. Polymérne adsorpčné médiá sú používané na zadržiavanie hydrofóbných zlúčenín s hydrofilnými funkčnými skupinami, napr. aromatických látok. Fenoly sa ťažko zachytávajú na C₁₈ modifikovanom silikagéle, kvôli väčšej rozpustnosti vo vode. (12) Tieto kopolyméry sú stabilnou SF v širšom rozmedzí pH. V praxi sa využívajú na zachytenie nepolárnych až stredne

polárnych cieľových analytov zo vzoriek potravín, životného prostredia, či na zachytenie polutantov zo vzduchu. (18)

Uhlíkové sorbenty

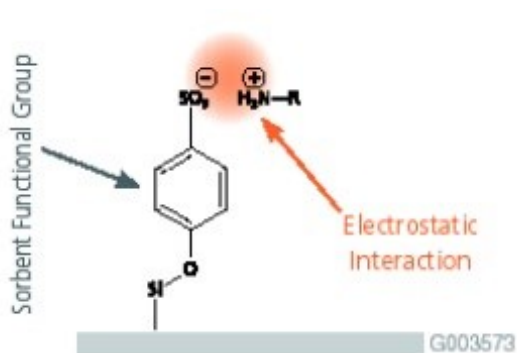
Jedná sa o skupinu nepolárnych sorbentov, ktorých matricu tvorí najmä uhlík (>90%), popol (<5%) a desiatiny % vodík. Analytom sú aromatické zlúčeniny, ktoré sa na povrchu uhlíka zachytávajú adsorpčnými disperznými silami, významné sú najmä $\pi - \pi$ interakcie. Medzi uhlíkové sorbenty patria aktívne uhlie, molekulové sitá, grafitizované sadze a pórovitý uhlík. (12)

ENVI-Carb

Patrí medzi uhlíkové adsorpčné média, jedná sa o grafitický, neporézny uhlík, ktorý je vysoko prítiažlivý pre organické látky. Využíva sa s obľubou na extrakciu polárnych (aromáty) analytov z vodných vzoriek. Využíva sa v prípade nevhodnosti využitia kremíkových sorbentov. (18)

Ióno-výmené sorbenty (Iónomeniče)

Slúžia na extrakciu kladne či záporne nabitých častíc z vodného, či organického roztoku. (12) Primárny retenčný mechanizmus spočíva v elektrostatickej prítiažlivosti nabitých funkčnej skupiny analytu a opačne nabitého povrchu sorbentu (Obr. 8).



Obr. 8 Elektrostatické väzby medzi nabitou funkčnou skupinou sorbentu a opačne nabitým analytom (prevzaté z (21))

Silu elektrostatických síl, tzn. aj retenciu zlúčeniny na sorbente ovplyvňuje pH, pri ktorom je ako extrahovaná látka, tak aj SF ionizovaná. (21) Na elúciu analytu sa využíva roztok s takou hodnotou pH, ktorá vedie k neutralizácii funkčnej skupiny alebo

SF. Neutralizáciou dochádza k narušeniu elektrostatických síl medzi funkčnou skupinou a SF, čo následne umožní vymytie extrahovanej látky. Alternatívou neutralizačného elučného činidla je vysoko nabitý roztok s rovnakým nábojom aký má funkčná skupina cieľovej zlúčeniny, v tomto prípade dochádza k vytlačeniu záujmovej látky. (18)

Medzi bežné aplikácie uplatnenia iónomeničov patrí stanovovanie zneužívaných látok a liečiv v biologických vzorkách, odstránenie mastných kyselín zo vzoriek, čistenie po syntetických reakciách, stanovenie herbicídov v pôde, či organických kyselín z moči. (9)

Pre extrakciu zásad (kladne nabitých funkčných skupín) sa využívajú katexy (záporne nabité iónomeniče) a pre extrakciu kyselín (záporne nabitých funkčných skupín) anexy (kladne nabité iónomeniče). (18) Úspešnosť extrakcie závisí na pH, sile protiónu a iónovej sile. Platí, že pri izolácii zásad by malo byť pH nastavené aspoň 2 jednotky pod pKa analyzovanej molekuly. Pri kyslých analytoch by malo byť pH nastavené aspoň 2 jednotky nad hodnotu pKa cieľovej molekuly. Kinetika výmenných procesov medzi analytom a SF je pri iónomeničoch pomalšia ako pri NF alebo RF. (21)

Anexy

Modifikovaný silikagél s chemicky naviazaným kladne nabitým modifikátorom, slúžia na separáciu aniónov (karboxylové kyseliny, sulfónové kyseliny, fosfáty). (18)

Využívajú sa:

- **Silné anexy (Strong Anion-eXchanger, SAX)** – silikagélový sorbent s naviazanou alifatickou kvartérnou aminoskupinou, ktorá je disociovaná v celom rozsahu pH, avšak stabilita silikagélu je zaručená len v rozmedzí 2–8. (18) Používa sa na izoláciu najmä slabých kyselín, pri silných kyselinách dochádza k vzniku silnej väzby medzi aniónom analytu a amóniovým kationom SF, čo sa môže využiť na odstránenie týchto silných aniónov zo vzorky. (22)
- **Slabé anexy (Weak Anion-eXchanger, WAX)** – silikagélový sorbent s naviazanou aminopropylskupinou (taktiež slúži ako NF), tento druh sorbentu je ionizovaný prostredníctvom zmeny pH. (18) Sú využívané na izoláciu silných aj slabých kyselín. (22)

Katexy

Modifikovaný silikagél s chemicky viazaným záporne nabitým modifikátorom, slúžia na separáciu kationov (primárne, sekundárne, terciárne, kvartérne amíny). (18)

Využívajú sa:

- **Silné katexy (Strong Cation-eXchanger, SCX)** – silikagelový sorbent s naviazanou sulfónovou, propylsulfónovou alebo benzénsulfónovou kyselinou, ktoré sú ionizované pri všetkých pH. (18) Dochádza k silným kationovým výmenám, sú využívané na extrakciu slabých aj silných zásad. (22)
- **Slabé katexy (Weak Cation-eXchanger, WCX)** – silikagelový sorbent s naviazanou alifatickou karboxylovou alebo fosfónovou skupinou. (18) Vhodné pre izoláciu silných kyselín. (22)

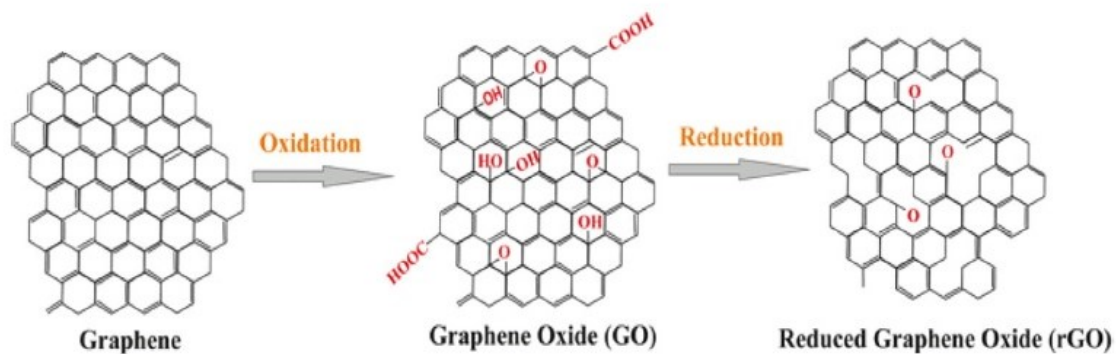
3.3 Grafén

Uhlík je vnímaný ako všestranný materiál, nielen preto, že je má nízku hustotu, ale aj preto, že dokáže vytvoriť rôzne konfigurácie, čo vedie k odlišným vlastnostiam jeho alotropných modifikácií. (23) Medzi materiály na báze uhlíka patria grafit (3D), uhlíkové nanorúrky (CNT) (1D), fullerény (0D), grafén-oxid (2D) a grafén (2D). (24)

Grafén bol po prvý krát izolovaný a charakterizovaný v roku 2004 Andre Geimom a Konstatinom Novoselovom, ktorí za tento objav získali v roku 2010 Nobelovu cenu. (25) Štruktúru grafénu si možno predstaviť ako tenký dvojrozmerný list zložený z sp^2 hybridizovaných atómov uhlíka usporiadaných do hexagón (podoba s včelím plástom). (26) Disponuje pozoruhodnými vlastnosťami ako je vysoká mechanická pevnosť vychádzajúca zo silných planárnych σ väzieb, elektrická vodivosť vznikajúca z π väzieb, dobrá tepelná vodivosť, schopnosť vytvoriť molekulárnu bariéru a iné. (8) (23) Jedná sa o transparentný materiál s 2,3% optickou absorpciou. Vzhľadom na nulovú pásmovú medzeru medzi jednotlivými listami je grafén polovodič, pretože najvyšší a najnižší obsadený molekulový orbitál sa navzájom dotýkajú. (24) Veľmi rýchlo sa stal nevyhnutným materiálom v širokom rozsahu aplikácií, ako sú optoelektronické zariadenia, senzory, fotovoltaičné články, displeje, zariadenia na čistenie vody atď. (23)

Použitie čistého grafénu je náročné kvôli zložitej syntéze, zlej rozpustnosti a aglomerácii v roztoku v dôsledku van der Waalsových interakcií. Alternatívou je syntéza zlúčenín so zachovalými výhodnými vlastnosťami grafénu z grafitu alebo iných zdrojov uhlíka. (8) O tomto chemickom procese prípravy grafénu prvýkrát informovali Stankovich a iní (2006). Grafit bol oxidovaný na GO a následne redukovaný na rGO pomocou hydrazínu (Obr. 9-10). Výhodami prípravy grafénu z GO sú celková nízka cena, lacný východiskový materiál z grafitu, masívna škálovateľnosť, veľké adsorpčné miesta a schopnosť získať grafén s mikrometrovou veľkosťou. (24)

GO je chemicky modifikovaný grafén, má podobnú hexagonálnu štruktúru uhlíka ako grafén, ale obsahuje kyslíkaté funkčné skupiny, napr. hydroxylové, alkoxylové, karbonylové, karboxylové, a iné. (5) (27) Tieto funkčné skupiny zvyšujú rozpustnosť a umožňujú funkcionalizáciu povrchu. V snahe minimalizovať počet kyslíkatých funkčných skupín a dosiahnuť vlastnosti približujúce sa k vlastnostiam pôvodného grafénu boli vyvinuté viaceré metódy redukcie GO na rGO (viď 3.3.2). (8)



Obr. 9 Schéma modifikácie grafénu na GO a rGO (prevzaté z (25))

3.3.1 Syntéza GO

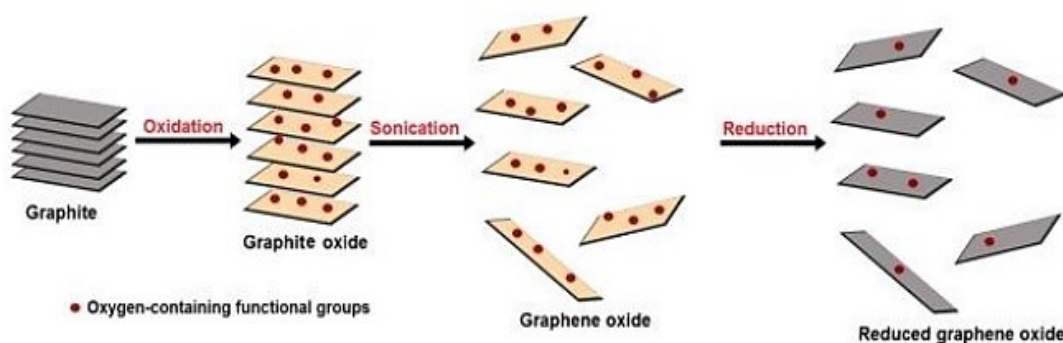
Syntézu GO možno rozdeliť do dvoch hlavných kategórií: metódy „zdola nahor,“ pri ktorých sa na vytvorenie čistého grafénu používajú molekuly uhlíka, a metódy „zhora nadol,“ pri ktorých sa vrstvy derivátov grafénu získavajú zo zdroja uhlíka, najčastejšie z grafítu. Ukázalo sa, že syntéza „zdola nahor,“ napr. chemická depozícia z plynnej fázy, epitaxiálny rast na kremíkových karbidových doštičkách je časovo náročná metóda čelí problémom s rozšíriteľnosťou výroby. Preto sú metódy „zhora nadol“ populárnejšie na výrobu derivátov grafénu, ktoré najskôr generujú GO a/alebo rGO. (8)

Najbežnejšou metódou na syntézu GO bola v minulosti Hummersova a Offemanova metóda. Pôsobením silných oxidačných činidiel (dusičnan sodný a manganistan draselný v kyseline sírovej) na grafit. Dochádza k vnášaniu hydrofilných funkčných skupín medzi jednotlivé vrstvy grafítu, čo spôsobuje nielen oddiaľovanie jednotlivých vrstiev, ale aj to, že materiál sa stáva hydrofilným. (28) Úplne zoxidovaná zlúčenina grafít-oxidu sa následne môže rozptýliť vo vode a je stabilná. Vo vodnej disperzii následne dochádza k exfoliácii GO. (27) Akýkoľvek spôsob, ktorý mení alebo zlepšuje spôsob syntézy navrhnutý Hummersom je považovaný za „upravenú Hummersovu metódu. (8).

3.3.2 Redukcia GO na rGO

V snahe vyrobiť materiály s vlastnosťami čo najbližšie k pôvodnému grafénu, bol vykonaný rozsiahly výskum metód na odstránenie kyslíkatých funkčných skupiny GO. (29) Redukcia GO môže byť realizovaná množstvom spôsobov, od tepelných cez chemické až po elektrochemické, z ktorých každá vedie k rozdielom v morfológii,

elektrických vlastností atď. Kľúčové faktory na redukciiu GO zahŕňajú pomer C/O konečného produktu, selektivitu pri odstraňovaní jediného typu kyslíkatej skupiny (hydroxylová × karboxylová kyselina × epoxidová, atď.), zacelenie povrchových defektov GO z oxidácie a výber ekologických redukčných činidiel, ako aj udržanie alebo zlepšenie požadovanej fyzikálnej a chemickej vlastnosti GO (mechanická pevnosť, vodivosť, optické vlastnosti, rozpustnosť/dispergovateľnosť plátov atď.). Tepelná redukcia závisí od rozkladu kyslíkatých skupín na CO a CO₂ plyny pri zvýšených teplotách. (8) Ukázalo sa, že rýchly vývoj týchto plynov exfoliuje jednotlivé GO pláty. Tepelná redukcia sa môže uskutočniť tepelným žiňaním pri zvýšenej teplote v bezkyslíkatom prostredí alebo pomocou menej konvenčných metód, ako je pôsobenie mikrovln na GO prášok alebo redukcia GO plátov svetlom s vysokou intenzitou. (23) Pridávanie redukčných činidiel do roztoku GO sú bežné a mnohé techniky sú dobre podložené literatúrou, môžu zahŕňať hydrazín, hydridy kovov (NaBH₄, LiAlH₄) alebo halogenovodíkové kyseliny, či kyselina askorbová alebo železný prášok. (29) Spomedzi nich hydrazín vykazuje vyššiu účinnosť produktu s menším množstvom nečistôt. (24)



Obr. 10 Príprava rGO spočíva v prvej oxidácii grafitu na grafít-oxid, následná exfoliácia pomocou sonikácie na GO a v poslednom kroku redukcia na rGO (prevzaté z (28))

3.3.3 Adsorpcia organických zlúčenín na GO a rGO

Organické zlúčeniny sa môžu v priebehu SPE adsorbovať na nanoštruktúrne materiály prostredníctvom nekovalentných interakcií vrátane elektrostatických interakcií, vodíkových väzieb, $\pi - \pi$ interakcií, disperzných síl a hydrofóbného efektu. (5) V prípade GO/rGO hrá dominantnú úlohu delokalizovaný systém π elektrónov, vďaka ktorému deriváty grafénu interagujú prostredníctvom $\pi - \pi$ interakcií

s aromatickými zlúčeninami. Za adsorpciu môže byť zodpovedná aj kation – π väzba a hydrofóbny efekt. (5) (30) Vďaka zmiešanému retenčnému mechanizmu uľahčuje separáciu látok s podobnou hydrofóbnosťou. (30)

Pei a kol. (31) skúmali adsorpciu aromatických látok s rôznou štruktúrou na GO a rGO, konkrétne sa jednalo o 2,4,6-trichlórfenol (TCP); 2-naftol; 1,2,4-trichlórbenzén (TCB) a naftalén (NAPH). Tieto aromatické látky dosahovali podobnú absorpčnú kapacitu. Zlúčeniny boli na materiál naviazané prostredníctvom hydrofóbnej interakcie a π – π interakcií. GO má v porovnaní s rGO nižšiu π elektrónovú hustotu a viac kyslíkatých funkčných skupín, takže vyššia adsorpcia TCP a 2-naftolu bola spôsobená tvorbou vodíkových mostíkov. Adsorpčná afinita aromatických látok k GO bola zvyšovaná v poradí: NAPH < TCB < TCP < 2-naftol.

Gao a kol. (32) študovali adsorpciu tetracyklínových antibiotík na GO. Veľká adsorpčná kapacita GO bola vysvetlená tvorbou π – π interakcií a kation – π väzbou. Kation – π väzba sa môže vytvoriť medzi ľahko protonizovanou aminoskupinou v molekule tetracyklínu a π elektrónmi grafénu. Tetracyklín sa skladá zo štyroch aromatických kruhov s rôznymi funkčnými skupinami na každom kruhu, vrátane fenolu, alkoholu, ketónu a aminoskupiny, vďaka čomu môže vytvárať elektrostatické interakcie a vodíkové väzby.

Georgakilas a kol. (33) uviedli, že organické zlúčeniny môžu byť adsorbované GO alebo rGO prostredníctvom piatich elektrostatických interakcií vrátane hydrofóbných účinkov, kovalentnej väzby, vodíkovej väzby a π – π interakcií.

Sitko a kol. (5): „Hlavné interakcie medzi organickými iónmi a grafénom sú π – π interakcie, kation – π interakcie, kovalentná väzba a hydrofóbne účinky. Polarizácia kationov a vzájomné elektrostatické pôsobenie medzi kationmi môže spôsobiť vznik kation – π interakcie v procese adsorpcie.“

3.3.4 Využitie materiálov na báze grafénu v SPE

Vďaka svojim neobyčajným vlastnostiam ako je veľký povrch (teoretická hodnota je $2630 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$), obojstranný polyaromatický skelet, zmiešaný retenčný mechanizmus analytov, sa grafén ukazuje ako sľubný materiál pre SPE. Jeho využitie ako SF je vo výskumnom štádiu, avšak existuje niekoľko štúdií a výsledkov, ktoré dokazujú jeho vysoký potenciál. (30) (34) V tejto podkapitole budú rozobrané aplikácie grafénu a materiálov na báze grafénu pri SPE či mikroextrakčných technikách SPE.

Liu a kol. (35) vyvinuli novú metódu kombináciou SPE na báze rGO s HPLC-UV na extrakciu a analýzu ôsmich chlórphenolov z environmentálnych vzoriek vody a výťažnosť dosiahnutá pomocou grafénu bola vyššia ako výťažnosť dosiahnutá pomocou iných sorbentov vrátane modifikovaného silikagélu C₁₈, grafitického uhlíka a CNT. (36) V porovnaní s CNT grafén dosahoval vyššiu výťažnosť, pretože obe strany grafénovej roviny sú ľahko dostupné pre extrakciu analytu. Extrakcia pomocou grafénu v tomto prípade zvyčajne zahŕňa nekovalentné interakcie s cieľovými analytmi. (24)

Han a kol. (25) publikovali podobnú štúdiu, v ktorej bol použitý rGO ako účinný sorbent pre SPE organochlórových pesticídov vo vzorkách vody, pričom boli prezentované podobné výhody.

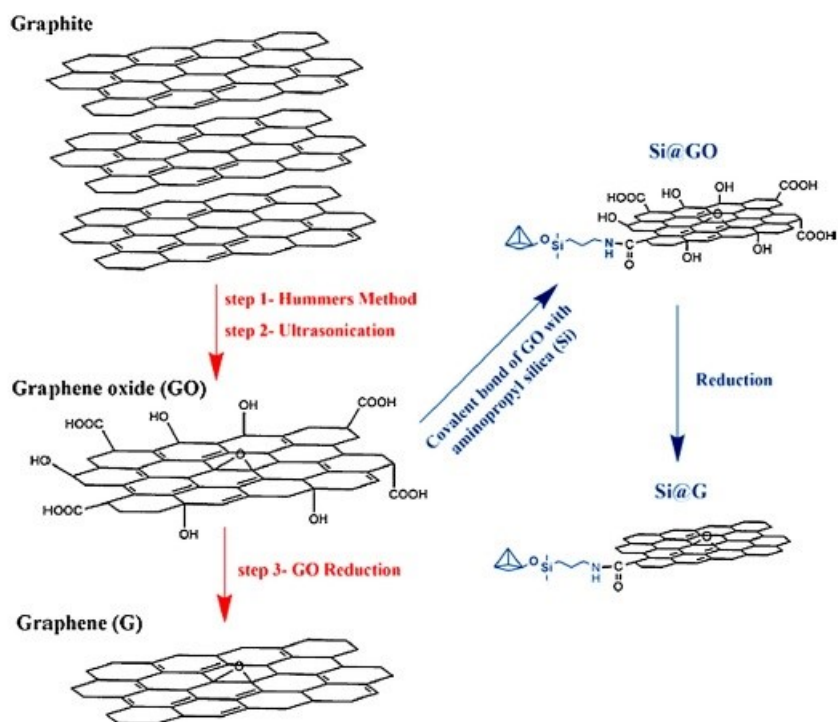
Huang a kol. (37) zaviedli novú SPE metódu na báze rGO pre extrakciu derivátov glutatiónu zo vzoriek ľudskej plazmy. Dosiahnuté hodnoty precíznosti, výťažnosti a nízke limity detekcie naznačujú, že táto navrhovaná metóda je použiteľná na stanovenie glutatiónu v ľudskej plazme. Táto práca ukázala, že grafén má potenciál na adsorpciu pri analýze biologických vzoriek. (36) (37)

Huang a kol. (38) uviedli ďalšiu bioanalytickú aplikáciu rGO v metóde SPE na extrakciu neurotransmitterov z mozgov potkanov. Izolácia analytov z biologickej vzorky bola zjednodušená v dôsledku dostatočne silnej väzby medzi analytmi a rGO a nízkej retencie interferujúcich látok, čo viedlo k vysokej selektivitě a robustnosti.

Liu a kol. (6) však vymenovali niekoľko nevýhod použitia grafénu v SPE (agregácia GO a rGO plátov, polydisperzita). Riešením týchto problémov so zachovaním výhodných vlastností boli vyvinuté nové sorbenty pre SPE, a to naviazaním GO/rGO na nosič (napr. silikagél). (5) (6).

Karboxyskupiny GO boli spojené s aminoskupinami aminosilikagélu. Týmto spôsobom sa nový sorbent (GO@sil) môže použiť v separačnom móde NF pre SPE. Na prípravu sorbentu vhodného pre SPE na RF sa GO@sil redukoval pomocou hydrazínu (rGO@sil) (viď Obr. 11). Porovnanie rGO@sil s inými sorbentmi ako sú modifikovaný silikagél C₁₈ alebo nanorúrky preukázalo výhodu rGO@sil, ktorá vyplýva z veľkého povrchu a zmäčavosti vodou v dôsledku prítomnosti niektorých hydrofilných skupín, ktoré ostali po redukcii hydrazínom na povrchu rGO. V dôsledku toho sa zlepšuje adsorpcia polárnych a desorpcia nepolárnych zlúčenín. Z tohto dôvodu sa rGO správa ako rovnovážny hydrofilno-lipofilný sorbent, čo je vhodné pri stanovovaní analytov so širokou škálou polarít. (6)

Okrem toho ďalšie experimenty ukázali, že grafén viazaný na oxid kremičitý je vhodný predovšetkým na použitie ako SPE adsorbent na extrakciu malých molekúl, peptidov a proteínov. (36)



Obr. 11 Možný spôsob získania GO a rGO z grafitu a možné naviazanie týchto materiálov na povrch aminopropylkremičitanu (prevzaté z (2))

Yu a kol. (39) vytvorili citlivú a spoľahlivú analytickú metódu založenú na rGO sorbente pre SPE. GO bol syntetizovaný prostredníctvom chemickej exfoliácie grafitu, ďalej bol derivatizovaný *N*-terc-butyldimetylsilyl-*N*-metyltrifluóracetamidom a hydrotermálne redukovaný, čím vznikol rGO@sil sorbent. (39) Podľa porovnávacej štúdie. Metóda založená na rGO@sil ponúkla mierne lepšiu výťažnosť v porovnaní s polymérnym typom sorbentu a tento výsledok možno pripísať π - π interakciám a hydrofóbnym interakciám medzi analytmi a rGO@sil. (36)

Huang a kol. (40) vytvorili podobný materiál, rGO funkcionalizovaný silikagél (Gr-SiO₂). Bol pripravený a použitý ako nový sorbent pre SPE polycyklických aromatických uhľovodíkov (PAU). Za optimalizovaných podmienok sa táto metóda úspešne použila na kvantifikáciu PAU vo vzorkách vody a mlieka, bola preukázaná vysoká citlivosť tejto metódy.

Huang a kol. (41) vytvorili ďalší podobný materiál, rGO funkcionalizovaný (3-aminopropyl)triethoxysilánom, ktorý bol syntetizovaný jednoduchou hydrotermálnou reakciou a bol použitý ako SPE sorbent na extrakciu stopových PAU zo vzoriek environmentálnej vody. Tento nový rGO materiál poskytol vyššiu selektivitu a účinnosť extrakcie.

Luo a kol. (42) vyvinuli jednoduchú hydrotermálnu redukčnú stratégiu na prípravu oxidu kremičitého s redukovaným grafénom ($\text{SiO}_2@\text{rGO}$). Pripravený funkcionalizovaný oxid kremičitý vykazoval pozoruhodnú adsorpčnú kapacitu voči chlórphenolom (CP) a peptidom. Keď sa použil ako sorbent pre SPE bola dosiahnutá vyššia výťažnosť v porovnaní s komerčnými sorbentmi, ako sú oxid kremičitý C_{18} , grafitizované sadze a uhlíkové nanorúrky.

Problémy s rGO možno prekonať nielen kovalentnou väzbou rGO plátov na nosič, ale aj vývojom nekonvenčných metód. *Zhang a kol.* (43) použili sulfónované rGO pláty uzavreté v obale z polypropylénovej membrány pri mikro-SPE. Pri navrhovanom postupe sa podarilo vyhnúť strate rGO plátov počas extrakcie. Okrem toho zavedením sulfónových skupín do plátov rGO zlepšilo rozpustnosť vo vode a prítomnosť zápornej $-\text{SO}^-$ skupiny zapríčinila elektrostatické odpudzovanie, čo zabránilo aj agregácii plátov.

Li a kol. navrhli magnetickú metódu SPE na prekoncentráciu karbamátov z uhoriek a hrušiek, ktorá využívala ako sorbent nový nanokompozit Fe_3O_4 potiahnutý grafénom a kremíkom. (44) Porovnávacie štúdie ukázali, že vyvinutá metóda poskytuje lepšiu citlivosť spolu s jednoduchšími a rýchlejšími separačnými procesmi. Okrem toho sa zistilo, že $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2/\text{grafén}$ je stabilnejší ako magnetické nanokompozity na báze grafénu. Na základe výsledkov tejto štúdie sa tie isté syntetické materiály použili ako magnetický SPE sorbent na prekoncentráciu štyroch neonikotinoidných pesticídov zo vzoriek hrušiek a paradajok pred HPLC-DAD analýzou. (36)

Wang a kol. (45) vyvinuli metódu SPE založenú na sorbente ($\text{TiO}_2/\text{grafén}$), ktorá bola použitá pred stanovením *S*-nitrozobiolov zo vzoriek krvi. Za optimalizovaných extrakčných podmienok metóda vykazovala dobrú linearitu, výťažnosť a nízky limit detekcie. Táto práca odhalila veľký potenciál $\text{TiO}_2/\text{grafénu}$ ako vynikajúceho sorbentu pri analýze biologických vzoriek.

S cieľom zlepšiť selektivitu, stabilitu a kompatibilitu grafénu a zabrániť jeho agregácii v metóde SPE bol grafén funkcionalizovaný rôznymi organickými a anorganickými materiálmi, ako sú aminokyseliny, oxid kremičitý, TiO₂, polyméry a MNP. Okrem toho sa grafén môže funkcionalizovať aj jednoducho z GO cesty. Materiál na báze GO ako sorbent SPE sa používa v separačnom móde NF. Ukázalo sa, že má vysokú adsorpčnú afinitu k iónom kovov, polárnym zlúčeninám vrátane polárnych skupín (hydroxylové, karboxylové, amíny) a heteroatómom (O, N, S, P). Grafén ako sorbent SPE je vhodný na adsorpciu chelátov kovov a nepolárnych analytov (aromatické látky, alkyly, alicyly), tzv. extrakciu na RF. Nedávno boli sorbenty na báze grafénu úspešne použité ako nový sorbent SPE v procese prípravy vzoriek. Vykazoval rýchlu extrakciu, vysokú adsorpčnú kapacitu a nízky limit detekcie (LOD) pre pesticídy, PAU, ftaláty, ióny ťažkých kovov, kovové druhy, sulfonamidy, proteíny a deoxyribonukleovú kyselinu. (24) (36)

4 CIEĽ PRÁCE

Cieľom tejto diplomovej práce je príprava modifikovanej SF pre SPE založenej na graféne. Konkrétne sa jedná o naviazanie GO plátov na aminosilikagél prostredníctvom amidovej väzby medzi karboxylovými skupinami GO a aminoskupinami silikagélu, s následnou hydrazínovou redukciou na rGO. Bude skúmaná reprodukovateľnosť procesu modifikácie, ako aj opakovateľnosť extrakcií SPE kolóniek naplnenej modifikovaným sorbentom.

Následne bude prevedené štúdium retenčných schopností novo pripraveného sorbentu prostredníctvom modelových analytov s rôznymi fyzikálno-chemickými vlastnosťami, a to ibuprofen (pKa 5,3), propylparaben (pKa 8,5) a metoprolol (pKa 9,7). Budú optimalizované podmienky pre retenciu a elúciu analytov s cieľom zachovať vysokú výťažnosť.

Získané výsledky z SPE pri použití aminosilikagélu modifikovaného rGO ako SF budú porovnané s výsledkami výťažnosti pri použití komerčného materiálu, konkrétne aminosilikagélu a C₁₈ modifikovaného silikagélu za rovnakých extrakčných podmienok.

Táto diplomová práca slúži ako pilotný projekt pre ďalšiu prípravu podobných materiálov založených na graféne, výsledky práce poskytnú cenný základ pre budúci výskum v tejto oblasti.

5 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

5.1 Chemikálie a materiál

5.1.1 Modelové analyty

- Ibuprofen (IBU) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Metoprolol (MET) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Metylparaben (MeP) (Fagron, Česká republika)
- Propylparaben (PrP) (Fagron, Česká republika)

5.1.2 Rozpúšťadlá

- Acetonitril gradient grade HPLC (ACN) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Čistěná voda, pripravěna reverzní osmózou prostřenictvom Millipore purifikačního systému (MerckMillipore, Nemecko), Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova, Česká republika
- Metanol gradient grade HPLC (MeOH) (Sigma-Aldrich, Nemecko)

5.1.3 Ostatné chemikálie

- 1-etyl-3-(3-dimetylaminopropyl)karbodiimid (EDC) (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Amoniak 25% GR (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát (Chemifarm s.r.o., Česká republika)
- Grafěn-oxid (GO) vodná disperzia 4 mg/ml (Graphenea, Španielsko)
- Hydrazín hydrát 50% (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát (ČL 2005, Dr. Kulich Pharma, s.r.o., Česká republika)
- Kyselina fosforečná 85% čistá (Riedel-de Haën, Nemecko)
- Kyselina chlorovodíková 35% (Lachner, Česká republika)
- Kyselina mravčia VWR 99% (HiPerSolv Chromanorm, Česká Republika)
- Kyselina octová 35% p.a (Penta, Česká republika)
- *N*-hydroxysukcinimid (NHS) (TCI chemicals, Japonsko)

- Octan amónny (Lachema, Česká republika)
- tris(hydroxymetyl)aminometán (TRIS) (Sigma-Aldrich, Nemecko)

5.2 Prístrojové vybavenie

5.2.1 Prístrojové vybavenie pre HPLC

Chromatografická sústava Prominence UFLC-XR (Schimadzu, Japonsko) je zložená:

- Degaser DGU-20A₃
- 2× Pumpa A LC-20AD
- Autosampler SIL-20AC_{HT}
- Termostatovaný kolónový priestor CTO-20AC
- Kolóna Zorbax SB-Aq, C18, 4,6 × 150 mm, 5 μm, 80 Å (Agilent Technologies, USA)
- Detektor UV-VIS SPD-20A
- Komunikačná jednotka CBM-20A
- počítač – program LC LabSolutions Software (Schimadzu, Japonsko)

5.2.2 Prístrojové vybavenie a pomôcky pre SPE

- Generátor vákua Mevacs M46 (Medist s.r.o, Slovensko)
- Kolónky SPE Supelco C₁₈ 1 ml, 100 mg (Sigma-Aldrich, Nemecko)
- Kolónky SPE Strata NH₂ 1 ml, 20 ± 0,15 mg (Phenomenex, USA)
- Kolónky SPE 1 ml, prázdne
- SPE Manifold (Sigma Aldrich, Nemecko)

5.2.3 Ďalšie prístroje a pomôcky

- Analytické váhy CPA225D-OCE (Sartorium AG, Nemecko)
- Centrifúga IEC CL31R Multispeed (Thermo electron corporation, USA)
- Filter 0,22 μm Millex (Labstore, Česká republika)
- Filter 0,45 μm Millex (Labstore 13 mm, Česká republika)
- Inzulínová striekačka 1 ml (Medilab, Česká republika)
- Mikropipety (Eppendorf Research plus, 1000 μl, 100 μl, 20 μl, 10 μl, (Eppendorf, Nemecko)

- Ph meter – pH 8 + DHS (XS instrument, XS Standard T-BNC DHS, Taliansko)
- Ultrasonikátor (Qsonica – Q500, ultrasonic processor, USA)
- Ultrazvuková vaňa (Kraintek s.r.o., K-10, Slovenská republika)
- Vortex mixer (Velp scientifica, Taliansko)
- Zdroj dusíku (Nitrogen Generator, Nemecko)

5.3 Príprava roztokov

5.3.1 HPLC

5mM fosfátový tlmivý roztok s 5% ACN (v/v)

Fosfátový tlmivý roztok bol pripravený rozpustením 1,30 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a 1,26 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ v 100 ml vody. Tlmivý roztok bol ponorený v ultrazvukovej vani 10–15 minút pre zaistenie dokonalého rozpustenia. Príprava pokračovala úpravou pH pomocou kyseliny fosforečnej na 6,40 a doplnením vody po rysku 1000 ml odmernej banky. Tlmivý roztok bol prefiltrovaný cez 0,45 μm filter. 950 ml pripraveného roztoku bolo zmiešaných s 50 ml ACN.

5.3.2 SPE

5mM amónno-octanový tlmivý roztok

Amónno-octanový tlmivý roztok bol pripravený rozpustením 19 mg octanu amónneho vo vode, úpravou pH pomocou kyseliny mravčej na 3,50 a doplnením vody po rysku 50 ml odmernej banky.

5mM TRIS tlmivý roztok

TRIS tlmivý roztok bol pripravený rozpustením 0,030 g TRIS vo vode, úpravou pH pomocou kyseliny chlorovodíkovej na 8,00 a doplnením vody po rysku 50 ml odmernej banky.

Roztoky analyzovaných látok

Zásobné roztoky jednotlivých modelových analytov (IBU, MET, PrP, MeP) boli pripravené rozpustením 1 mg každej z látok v 1 ml MeOH.

100 μl zásobného roztoku každej látky bolo následne nariadených príslušným prostredím (tzn. pri práci v neutrálnom pH bola použitá voda, v kyslom pH bol použitý

amónno-octanový tlmivý roztok a v zásaditom pH bol použitý TRIS tlmivý roztok) na koncentráciu 100 µg/ml.

Takto pripravené roztoky boli zároveň použité aj ako roztoky vonkajších štandardov pre kvantifikáciu analytov metódou vonkajšieho štandardu.

10 mM EDC/5 mM NHS

Na prípravu činidla bolo použitých 0,0078 g EDC a 0,0029 g NHS, tieto navážky boli rozpustené v 5 ml čistenej vody.

Elučné činidlo 0,1M NH₃ v MeOH (5:95, v:v)

0,1 M NH₃ bol nariadený metanolom v pomere 5:95.

Elučné činidlo 0,1M CH₃COOH v MeOH (60:40, v:v)

0,1 M CH₃COOH bol nariadený metanolom v pomere 60:40.

10% roztok MeOH použitý pre rekonštitúciu

10 ml MeOH bolo zriedených s 90 ml čistenej vody alebo 90 ml TRIS alebo 90 ml amónno-octanovým tlmivým roztokom. Typ roztoku pre rekonštitúciu bol vybraný podľa typu použitej kondicionácie SPE.

5.4 Príprava sorbentu

Príprava modifikovaného sorbentu pre SPE bola s obmenami (viď 6.1) prevzatá z publikovaného článku (6), pozostávala z dvoch krokov, a to:

1. modifikácia komerčného aminosilikagélového sorbentu GO,
2. redukcia modifikovaných častíc hydrazinom

1. Modifikácia aminosilikagélového sorbentu GO

5 ml GO vodnej disperzie (4 mg/ml) bolo dispergovaných v 35 ml čistenej vody (koncentrácia GO 0,5 mg/ml). Vzniknutá disperzia bola 30 sekúnd premiešaná na vortexe, následne bola urobená sonikácia pomocou kontaktného sonikátoru v celkovom čase 31,5 minúty (30% amplitúda, pulz/pauza zodpovedala 5/5 sekúnd, 9 cyklov po 3,5 minúty, po každom cykle bola disperzia chladená po dobu 3,5 minúty).

K 16 ml takto pripravenej disperzie bolo pridaných 160 µl čerstvo pripraveného roztoku činidiel 10 mM EDC/5 mM NHS.

Po 30 minútovom miešaní pri laboratórnej teplote, bolo pridaných 200 mg aminosilikagelových častíc a vzniknutá disperzia bola miešaná po dobu 4 hodín za laboratórnej teploty.

Ďalším krokom bola centrifugácia (1500 otáčok, 10 minút) a niekoľkonásobné premytie získaných častíc ako s vodou, tak aj s MeOH. Následne bol odobraný a odstránený supernatant, častice boli sušené na vzduchu cez noc. Pripravený materiál bol označený ako GO@sil (aminosilikagél funkcionalizovaný grafén-oxidom).

2. Redukcia modifikovaných častíc hydrazínom

Finálnym krokom bola redukcia GO@sil s hydrazínom, 100 mg GO@sil a 80 μ l hydrazín hydrátu (50%, v/v) bolo pridaných do 5 ml čistenej vody. Redukčná reakcia bola uskutočnená pri 95°C pod pasívnym chladičom a zmes bola miešaná 2 hodiny. Častice rGO@sil boli obdobne spracované ako GO@sil, a teda centrifugácia (2000 otáčok, 10 minút), niekoľkonásobné premytie vodou a metanolom, sušenie na vzduchu cez noc.

Takto pripravený sorbent rGO@sil (aminosilikagél funkcionalizovaný redukovaným grafén-oxidom) bol naplnený do kolóniek, a využitý pri SPE metóde v tejto práci.

5.5 Príprava SPE kolóniek

Zhotovený rGO@sil bol rozvážený do jednotlivých kolóniek. Každá kolónka obsahovala $20 \pm 0,15$ mg pripraveného sorbentu.

Aminosilikagél bol rozvážený do jednotlivých kolóniek s náplňou jednej kolónky $20 \pm 0,15$ mg častíc. Kolónky C₁₈ boli používané predplnené od výrobcu, každá obsahovala 100 mg častíc.

5.6 Prevedenie SPE metódy

SPE metóda bola prevádzaná v rozdielnych podmienkach (pri neutrálnej, kyslej a bázičkej kondicionácii), postup jednotlivých krokov je uvedený v Tabuľkách 2-4.

Pri prevádzaní SPE boli do jednotlivých vialok zbierané: nanosenie (INJ), premytie (W), elúcie (E1-E3). Všetky eluáty boli odparené pod prúdom dusíka, rekonštituované v 500 μ l 10 % MeOH v rozpúšťadle zvolenom podľa typu kondicionácie (viď Tab. 2-4)

Tabuľka 2 Postup prevedenia SPE pri kyslej kondicionácii kolónky

KYSLÁ KONDICIONÁCIA SPE	
Aktivácia	1 ml MeOH
Kondicionácia	1 ml 5mM amónno-octanový tlmivý roztok, pH 3,50
Nanesenie vzorku (INJ)	100 µl vzorku; 50 µg/ml; MeOH/amónno-octanový tlmivý roztok (10:90, v:v)
Premytie (W)	1 ml 5mM amónno-octanový tlmivý roztok, pH 3,50
Sušenie	
Elúcia1 (E1)	1 ml MeOH
Elúcia2 (E2)	1 ml 0,1M NH ₃ MeOH (5:95, v:v)
Elúcia3 (E3)	1 ml 0,1M CH ₃ COOOH/MeOH (60:40, v:v)
Odparenie pod prúdom dusíka	
Rekonštitúcia vzorky	500 µl MeOH/amónno-octanový tlmivý roztok (10:90, v:v)

Tabuľka 3 Postup prevedenia SPE pri neutrálnej kondicionácii kolónky

NEUTRÁLNA KONDICIONÁCIA SPE	
Aktivácia	1 ml MeOH
Kondicionácia	1 ml H ₂ O, pH 7,00
Nanesenie vzorku (INJ)	100 µl vzorku; 50 µg/ml; MeOH/H ₂ O (10:90, v:v)
Premytie (W)	1 ml H ₂ O, pH 7,00
Sušenie	
Elúcia1 (E1)	1 ml MeOH
Elúcia2 (E2)	1 ml MeOH
Elúcia3 (E3)	1 ml 0,1M NH ₃ MeOH (5:95, v:v)
Odparenie pod prúdom dusíka	
Rekonštitúcia vzorky	500 µl MeOH/H ₂ O (10:90, v:v)

Tabuľka 4 Postup prevedenia SPE pri bázičkej kondicionácii kolónky

BÁZICKÁ KONDICIONÁCIA SPE	
Aktivácia	1 ml MeOH
Kondicionácia	1 ml 5mM TRIS, pH 8,00
Nanesenie vzorku (INJ)	100 µl vzorku; 50 µg/ml; MeOH/TRIS (10:90, v:v)
Premytie (W)	1 ml 5mM TRIS, pH 8,00
Sušenie	
Elúcia1 (E1)	1 ml MeOH
Elúcia2 (E2)	1 ml 0,1M NH ₃ MeOH (5:95, v:v)
Odparenie pod prúdom dusíka	
Rekonštitúcia vzorky	500 µl MeOH/TRIS (10:90, v:v)

Ako štandard pre kvantifikáciu modelových analytov podľa metódy vonkajšieho štandardu, bol použitý roztok analyzovaných látok o koncentrácií každého analytu 100 µg/ml. Štandard bol taktiež odparený po prúdom dusíka a rekonštituovaný v 500 µl 10 % MeOH v čistenej vode.

Všetky vyššie spomenuté kroky boli následne analyzované prostredníctvom HPLC metódy uvedenej v kapitole 5.8.

5.7 Opakované použitie SPE kolóniek

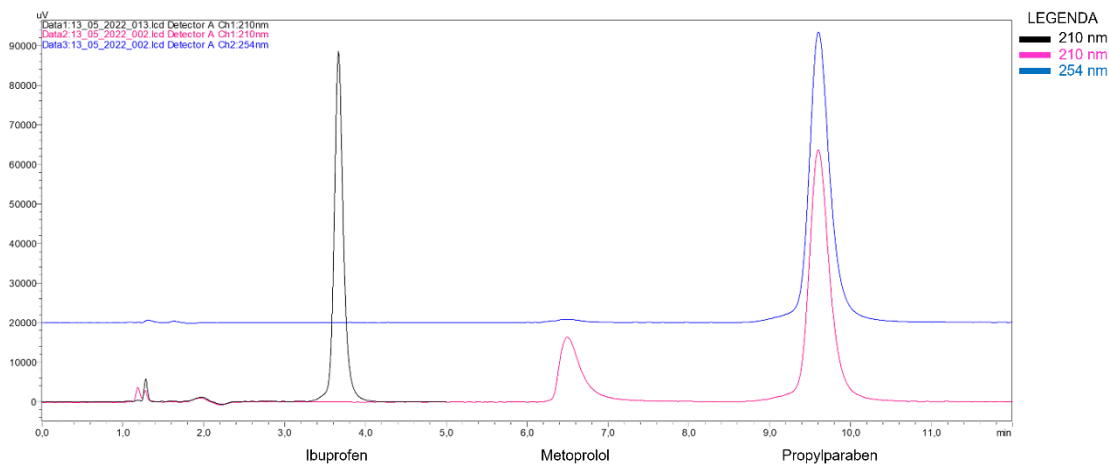
Na prevedenie SPE bola každá z kolóniek so sorbentom – rGO@sil a aminosilikagél využitá viac krát, preto bola nutná regenerácia kolóniek. Kolónky C₁₈ boli využité jednorazovo.

V neutrálnom prostredí bolo na oplach jednotlivých kolóniek využívaných viacero rozpúšťadiel, a to: 3 ml vody, 3 ml acetónu a 1 ml metanolu na vysušenie.

Pri práci v kyslom a bázickom pH, teda po použití amónno-octanového tlmivého roztoku a TRIS boli na regeneráciu kolónky využité: 1 ml MeOH, 1 ml H₂O, 1 ml TRIS, 1 ml H₂O, 1 ml amónno-octanový tlmivý roztok, 1 ml H₂O, 1 ml MeOH.

5.8 HPLC analýza

Ako SF bola použitá kolóna Agilent Zorbax SB-Aq C₁₈ (150x4,6mm 5 µm, 80 Å). Teplota v kolónovom priestore bola nastavená na 25°C. MF A bola tvorená 5mM fosfátovým tlmivým roztokom (pH 6,40) s 5% ACN (v:v), . Ako MF B bol použitý ACN. Na analýzu bola využitá metóda izokratickej elúcie, vzájomne sa tieto MF (A:B) miešali v pomere 65:35 (v/v). Nástrek modelových analytov bol o objeme 10 µl a



Obr. 12 Chromatogram modelových analytov

prietok mobilnej fázy 1 ml/min. Celková doba analýzy zodpovedala 11 minútam, s retenčnými časmi analytov: 3,75 min. pre IBU; 6,58 min pre MET a 9,8 min. pre PrP.

Modelové analyty boli detegované prostredníctvom UV/VIS detektoru pri vlnovej dĺžke 220 nm (IBU, MET) a 254 nm (PrP), vid' Obr. 12 (zhrnutie parametrov HPLC popisuje Tabuľka 5).

Na kvantifikáciu bola využitá metóda vonkajšieho štandardu.

Tabuľka 5 Zhrnutie podmienok HPLC analýzy

Zhrnutie podmienok HPLC analýzy					
Stacionárna fáza a mobilná fáza					
STACIONÁRNA FÁZA	Agilent Zorbax SB-Aq		MOBILNÁ FÁZA	vodná zložka (pumpa A)	5mM fosfátový tlmivý roztok, pH 6,40
	typ aktívnej skupiny	C18			5% prídavok ACN
	dĺžka	150 mm		organická zložka (pumpa B)	ACN
	priemer	4,6 mm			
	veľkosť častíc	5 µm		pomer miešania A:B	65:35
	pórovitosť	80 Å			
HPLC podmienky					
parameter		hodnota	analyt		
prietok		1 ml/min			
čas analýzy		11 minút			
nástreč		10 µl			
teplota		25°C			
detekcia		220 nm	IBU		
			MET		
		254 nm	PrP		
Retenčné časy analytov					
analyt		Rt (min)			
IBU		3,75			
MET		6,58			
PrP		9,80			

5.9 Hodnotenie výsledkov, popis grafov

V kapitole 6 Výsledky a diskusia je uvedených niekoľko grafov. Popis grafov je nasledovný. V grafoch sú vždy uvedené percentuálne výťažky vzhľadom na štandard zvlášť pre každú kolónku. Jeden stĺpec vid' uálne znázorňuje jednu kolónku, pod stĺpcom je vždy označenie použitej šarže prípravy sorbentu, čísla kolónky a koľký krát bola kolónka použitá, napr. 1G_02_04 znamená kolónka číslo 2 z prvej šarže použitá štvrtý raz.

6 VÝSLEDKY A DISKUSIA

V roku 2004 sa grafén dostal do popredia, vďaka prvému experimentálnemu dôkazu jeho elektronických vlastností. Od tej doby sa stal horúcou oblasťou výskumu vo viacerých vedeckých odvetviach, vrátane analytickej chémie. Analytických chemikov najmä zaujal veľký špecifický povrch (teoretická hodnota predstavuje $2630 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$) a obojstranný polyaromatický skelet vytvárajúci delokalizovaný systém π elektrónov. (5) (6) Veľký povrch grafénu zaručuje dostatok priestoru na adsorpciu analytov a hexagonálne usporiadanie sp^2 hybridizovaných atómov uhlíka umožňuje interakcie s inými molekulami. Tieto parametre tak predstavujú vhodné vlastnosti pre použité grafénu ako sorbentu pri SPE. (30)

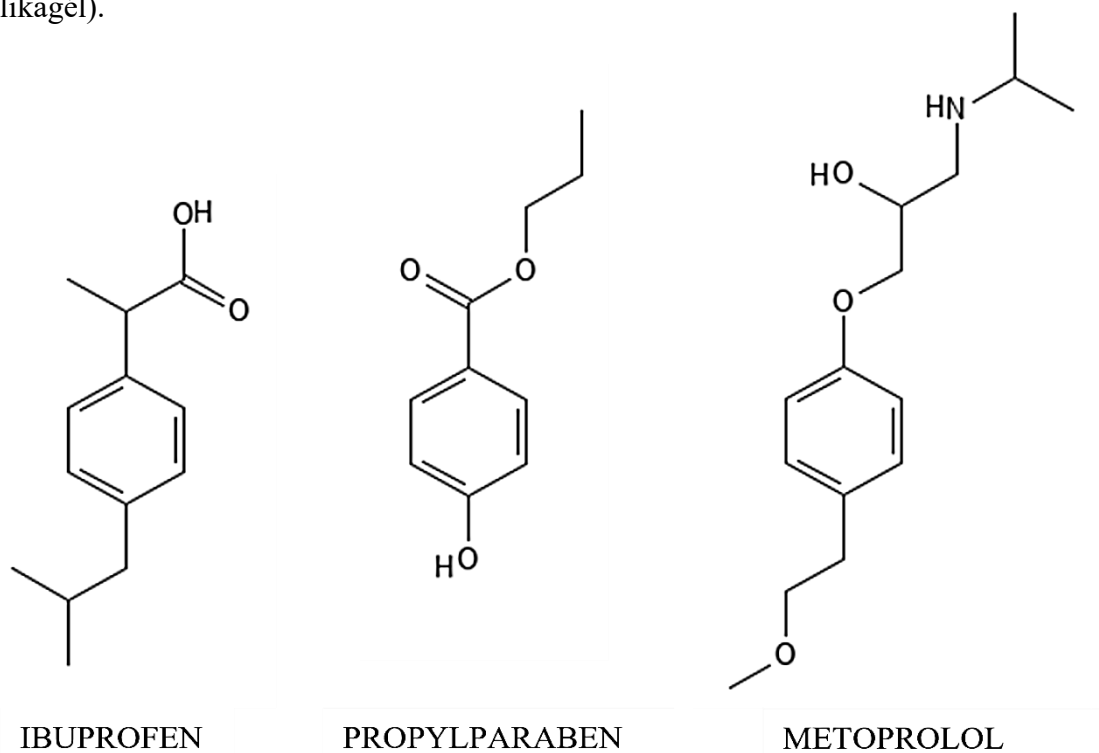
Použitie GO a rGO ako sorbentov pre SPE poskytuje niekoľko výhod (viď vyššie), avšak ich priame použitie čelí niekoľkým problémom. Po prvé, ireverzibilná agregácia plátov GO a rGO počas izolácie z roztoku. Agregácia znižuje sorpčnú kapacitu sorbentu, a tak bráni účinnej extrakcii analytov. Po druhé, pláty GO a rGO sú polydisperzné, jednotlivé pláty sa líšia vo svojej hrúbke, veľkosti a tvare. (6) (8) Z tohto dôvodu existuje obava, že v priebehu extrakcie môže dochádzať k úniku veľmi malých častíc GO a rGO z kolóny, najmä ak sa extrakcia prevádza pri vysokom tlaku. Okrem toho, je náročné úplne zachytenie miniatúrnych častíc GO a rGO z roztoku, dokonca aj pri vysokorýchlostnej centrifugácii. (5) (6) Liu a kol. (6) sa venovali vyriešeniu týchto problémov so súčasným zachovaním výhodných vlastností grafénu. Vyvinuli nové sorbenty pre SPE, kovalentným naviazaním GO a rGO plátov na častice aminokremičitanov. Táto práca nás inšpirovala a motivovala pri diplomovej práci.

Diplomová práca bola zameraná na prípravu modifikovaného rGO sorbentu pre SPE a na štúdium jeho vlastností v SPE. Skúmaná bola opakovateľnosť procesu modifikácie, celkovo boli pripravené tri rôzne šarže modifikovaného rGO a výsledky výťažností SPE z jednotlivých šarží boli medzi sebou porovnané.

Pre náš experiment boli využité tri modelové analyty s rôznymi fyzikálno-chemickými vlastnosťami, a to kyslý ibuprofen (pK_a 5,3), neutrálny propylparaben (pK_a 8,5) a zásaditý metoprolol (pK_a 9,7) (štruktúry analytov viď Obr. 13).

Experiment bol ďalej zameraný na hodnotenie vplyvu experimentálnych podmienok na extrakčnú výťažnosť modelových analytov (vplyv typu elučného činidla a prostredia (pH)).

V závere experimentu boli porovnané retenčné schopnosti upraveného rGO sorbentu s komerčne dostupnými sorbentmi (aminosilikagél a C₁₈ modifikovaný silikagél).



Obr. 13 Štruktúry modelových analytov

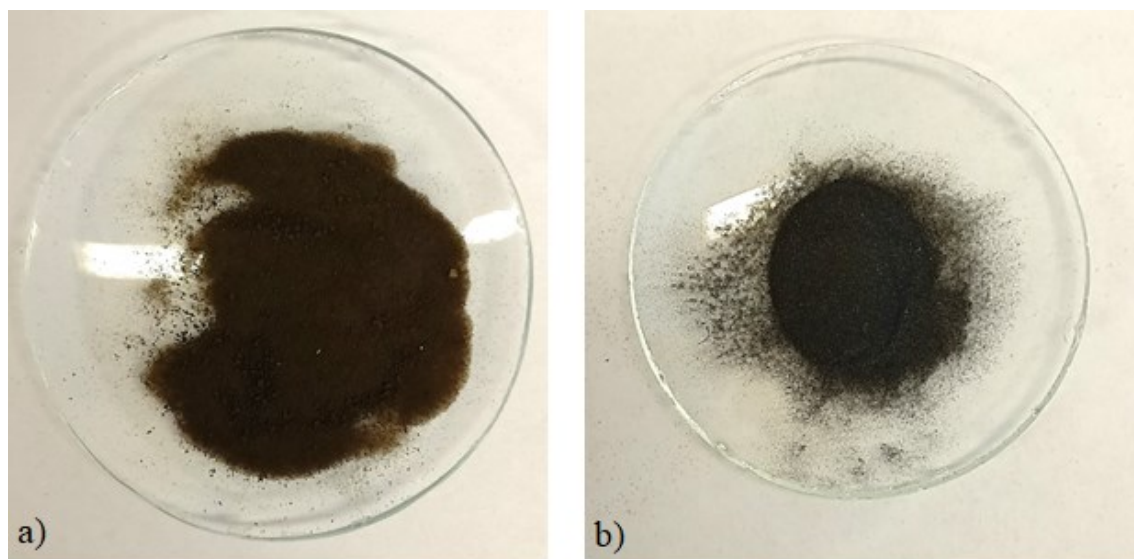
6.1 Príprava modifikovaného rGO sorbentu pre SPE

Liu a kol. (6): GO bol pripravený upravenou metódou podľa Hummersa. Príprava GO kovalentne naviazaného na častice oxidu kremičitého (GO@sil) bola uskutočnená prostredníctvom chemickej reakcie, pri ktorej karboxylové skupiny GO interagovali s aminoskupinami silikagélu. Boli porovnávané dve metódy imobilizácie GO plátov na aminosilikagéle, prvou bola metóda vodnej syntézy s použitím 0,4 ml 10 mM EDC/5 mM NHS ako aktivačným činidlom karboxylových skupín GO a druhou bola cesta organickej syntézy s *N,N'*-dicyklohexylkarbodiimid/dimetylformamid (DCC/DMF). GO@sil bol redukovaný pomocou 0,1 ml hydrazín-hydrátom (85%), čím bol získaný rGO naviazaný na aminosilikagél (rGO@sil).

Luo a kol. (42): V tejto štúdií bola vyvinutá hydrotermálna redukčná stratégia na prípravu rGO funkcionalizovaného aminosilikagélom. GO bol syntetizovaný z grafitového prášku modifikovanou Hummersovou metódou. Hydrotermálnou redukciou bol pripravený rGO@sil prostredníctvom elektrostatickej interakcie medzi záporne nabitým GO vo vodnom roztoku a kladne nabitými aminoskupinami aminokremičitanu.

Upravený rGO bol s obmenami pripravený v priebehu diplomovej práce podľa postupu uvedenom v publikovanom článku Liu a kol. (podrobnosti vid' kapitola 6.4). Zmeny v postupe sú zhrnuté nasledovne. Na prípravu GO@sil bola použitá vodná disperzia GO (4 mg/ml, Graphenea, Španielsko), čím odpadla príprava GO Hummersovou metódou (teda bola zvolená cesta vodnej syntézy s 10 mM EDC/5 mM NHS ako aktivačným činidlom). Množstvá všetkých reagentov a použitých činidiel boli použité v ekvivalentom množstve, prerátaných podľa množstva častíc aminosilikagél sorbentu pre 200 mg. Sušenie častíc GO@sil a rGO@sil neprebiehalo 24 hodín sušením mrazom vo vákuu, ale počas noci pri laboratórnej teplote.

Po prvom kroku, modifikácií aminosilikagélového sorbentu rGO (vid' kapitola 5.4) bola dosiahnutá 90% výťažnosť rGO@sil častíc. Po druhom kroku, redukcii potiahnutých častíc hydrazínom bola dosiahnutá 80% výťažnosť a bola pozorovaná zmena farby z hnedej (GO@sil) na čiernu farbu (rGO@sil) (vid' Obr. 14). Uvedené výsledky výťažnosti boli spočítané ako priemerná hodnota z celkovej prípravy troch šarží.



Obr. 14 a) hnedé častice pripraveného GO@sil, b) čierne častice pripraveného rGO@sil

6.2 Naplnenie SPE kolóniek rGO@sil sorbentom

Vďaka vynikajúcim adsorpčným vlastnostiam možno použiť rGO už vo veľmi malých množstvách (20-30 mg). (5) (35) (37) (38) (46)

Z viacerých štúdií vyplýva, že použitie malého množstvo (10-30 mg) rGO naviazaného na silikagél častice ako sorbentu pre SPE prináša optimálne výsledky. (6) (35) (39) (40) (41)

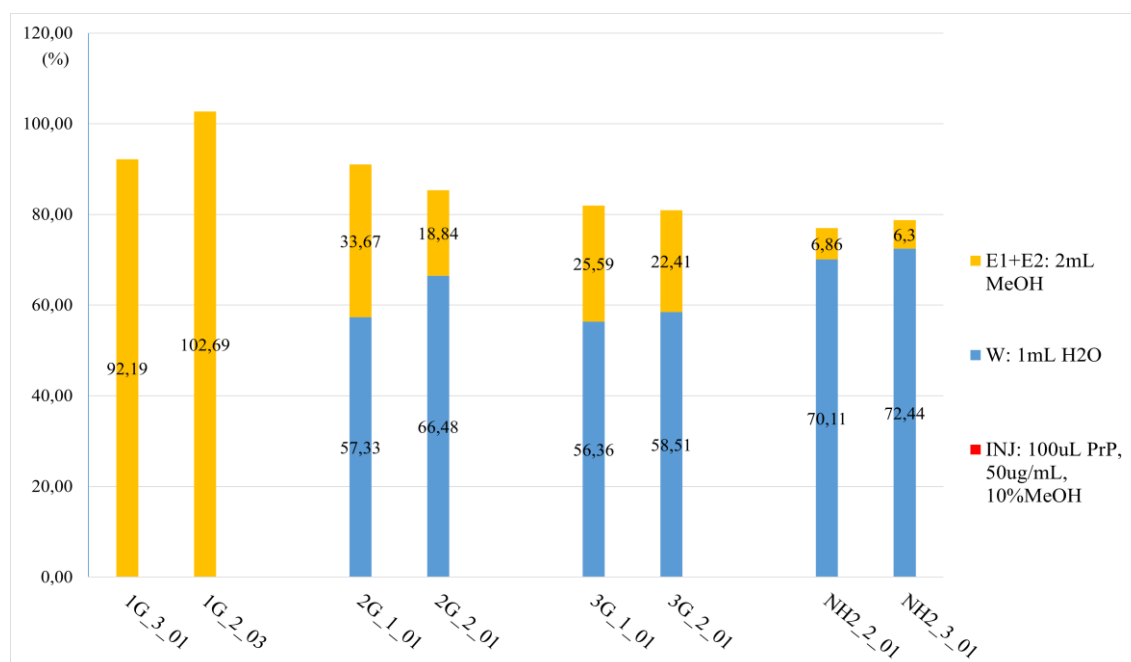
Z tohto dôvodu bol upravený sorbent naplnený do viacerých kolóniek v množstve $20 \pm 0,15$ mg a uzatvorený fritami z oboch strán.

6.3 Opakovateľnosť prípravy rGO@sil sorbentu pre SPE

Jedným z cieľov nášho experimentu bolo zistiť, či je postup modifikácie sorbentu opakovateľný.

Celkovo boli pripravené tri šarže rGO@sil, vždy za rovnakých podmienok. Pri prevádzaní experimentu boli použité z každej šarže aspoň dve rôzne kolónky, jedna kolónka je vyobrazená v grafe ako jeden stĺpec, pričom kolónky z tej istej šarže sú prezentované spoločne.

PrP vzhľadom pre svoje neutrálne vlastnosti bol vybraný ako modelový analyt pre prevedenie SPE. Porovnávali sme výťažnosti jednotlivých šarží, následne bola posúdená opakovateľnosť prípravy rGO@sil sorbentu.



Graf 1 Opakovateľnosť prípravy modifikovaného rGO sorbentu pre SPE, porovnanie výťažnosti jednotlivých šarží pri použití propylparabenu ako modelového analytu

Po prevedení experimentu bolo dokázané, že pri použití prvej šarže rGO@sil sorbentu boli dosiahnuté vynikajúce výsledky, pri INJ a W bol analyt zadržovaný na kolónke a E bola dosiahnutá viac ako 90 % výťažnosť. Zatiaľ čo, pri druhej a tretej šarži bolo pri W stratených 62 % a 57 % analytu a E bola dosiahnutá 26% a 24% výťažnosť analytu (viď Graf 1).

Pri použití prvej šarže rGO@sil sorbentu pre SPE bola pozorovaná lepšia adsorpčná schopnosť materiálu pri porovnaní s nemodifikovaným sorbentom (aminosilikagél). Výsledky experimentu tak preukázali, že príprava rGO@sil materiálu prebehla úspešne.

Príprava avšak neposkytovala reprodukovateľné výsledky, pretože nebolo pozorované rovnaké retenčné správanie PrP v druhej a tretej pripravenej šarži.

6.4 Hodnotenie vplyvu experimentálnych podmienok na extrakčnú výťažnosť

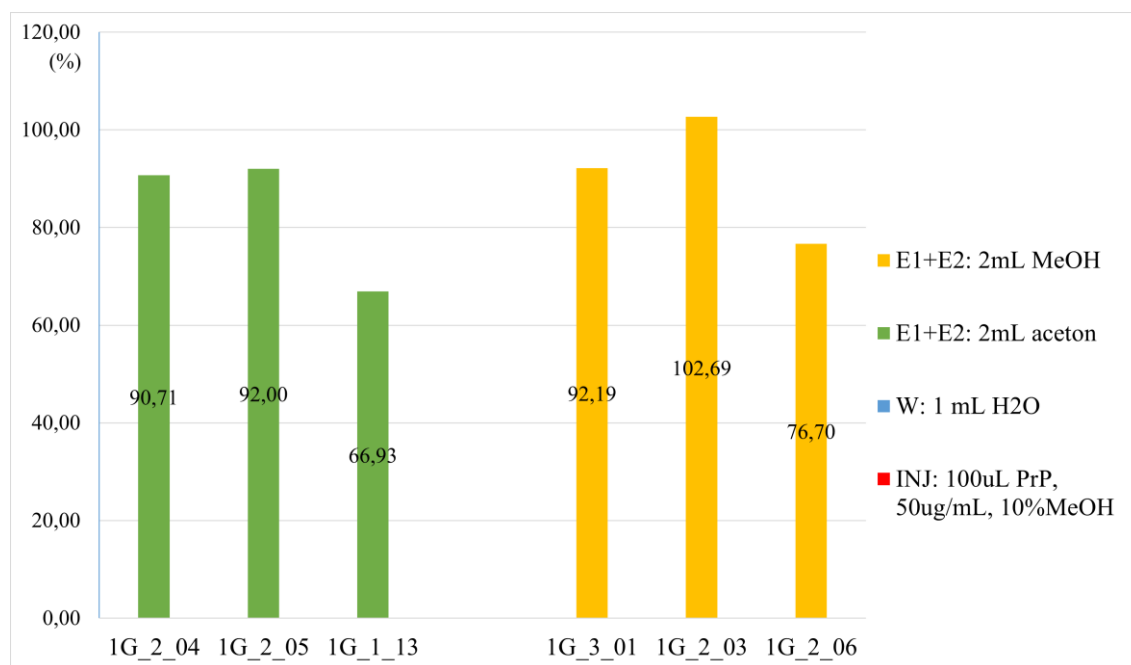
Ďalším cieľom bolo hodnotenie experimentálnych podmienok na extrakčnú výťažnosť pri použití novo pripraveného sorbentu, v tomto bode bol kladený dôraz na dva podciele. Po prvé, bol hodnotený vplyv typu elučného činidla na extrakčnú výťažnosť, v tomto bode bola SPE prevádzaná vo vodnom prostredí, teda pri neutrálnom pH. Po druhé, bol skúmaný vplyv pH na retenčnú schopnosť sorbentu a extrakčnú výťažnosť analytu. Vplyv pH, pri ktorom bola prevádzaná extrakcia sa rozumie použitie vody alebo tlmivého roztoku (amónno-octanového, pH 3,5 alebo TRIS, pH 8) pri kondicionácií, nanosení vzorky a premývaní kolónky. SPE v neutrálnom, kyslom a bázičkom prostredí bolo prevedené podľa postupu v kapitole 5.6.

6.4.1 Vplyv výberu elučného činidla na extrakčnú výťažnosť

Vplyv výberu elučného činidla na extrakčnú výťažnosť propylparabenu vo vodnom prostredí (pH 7,00)

SPE bolo prevádzané vo vodnom prostredí, pri neutrálnom pH, rGO@sil sorbent bol použitý ako SF. Po INJ a W bol analyt úplne zadržaný na kolónke. Acetónom (2 ml) bola dosiahnutá elučná výťažnosť v priemere 83 % a s MeOH (2 ml) 91 % (viď Graf 2). Výsledky experimentu ukázali, že najvhodnejšími elučnými činidlami pre PrP boli MeOH aj acetón.

Vďaka dostatočne silným $\pi - \pi$ interakciám medzi rGO@sil sorbentom a PrP bol analyt zadržaný na kolónke v priebehu INJ a W. Obe použité organické rozpúšťadlá v priebehu E dostatočne oslabili tieto väzby, čím bol analyt vymytý z kolónky. Z dôvodu vyššej výťažnosti o 8 % bol MeOH používaný ako 1. voľba elučného činidla v ďalších experimentoch s PrP.

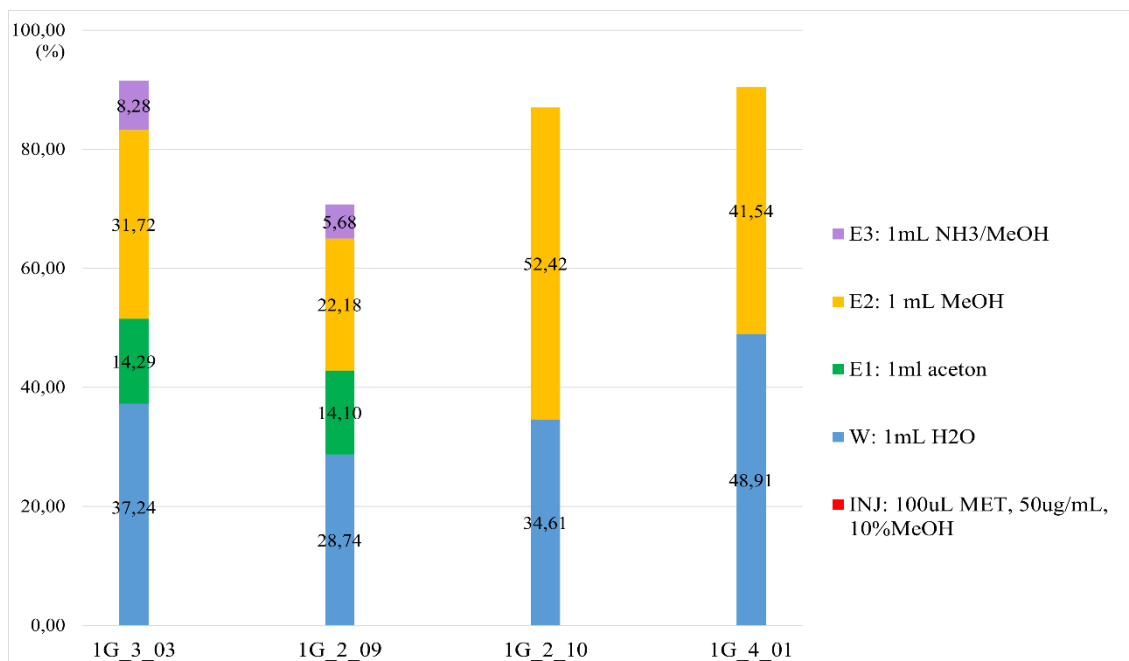


Graf 2 Vplyv výberu elučného činidla na extrakčnú výťažnosť propylparabenu

Vplyv výberu elučného činidla na extrakčnú výťažnosť metoprololu vo vodnom prostredí (pH 7,00)

SPE bolo prevádzané vo vodnom prostredí, pri neutrálnom pH, rGO@sil sorbent bol použitý ako SF. INJ bol zadržaný na sorbente. V priebehu W kolónky bolo stratených v priemere 37 % analytu. Na E analytu boli využité tri organické rozpúšťadlá, a to acetón (E1, 1 ml), MeOH (E2, 1 ml) a NH₃/MeOH (E3, 1 ml). Extrakčná výťažnosť v prípade kombinácie elučných činidiel bola 48 %, v prípade samotného MeOH bola 47 %. Výsledky experimentu preukázali, že použitie kombinácie elučných činidiel bolo rovnako výhodné ako použitie samotného MeOH (viď Graf 3). Pri ďalších SPE s nadväznosťou na metoprolol bol použitý MeOH ako východiskové elučné činidlo.

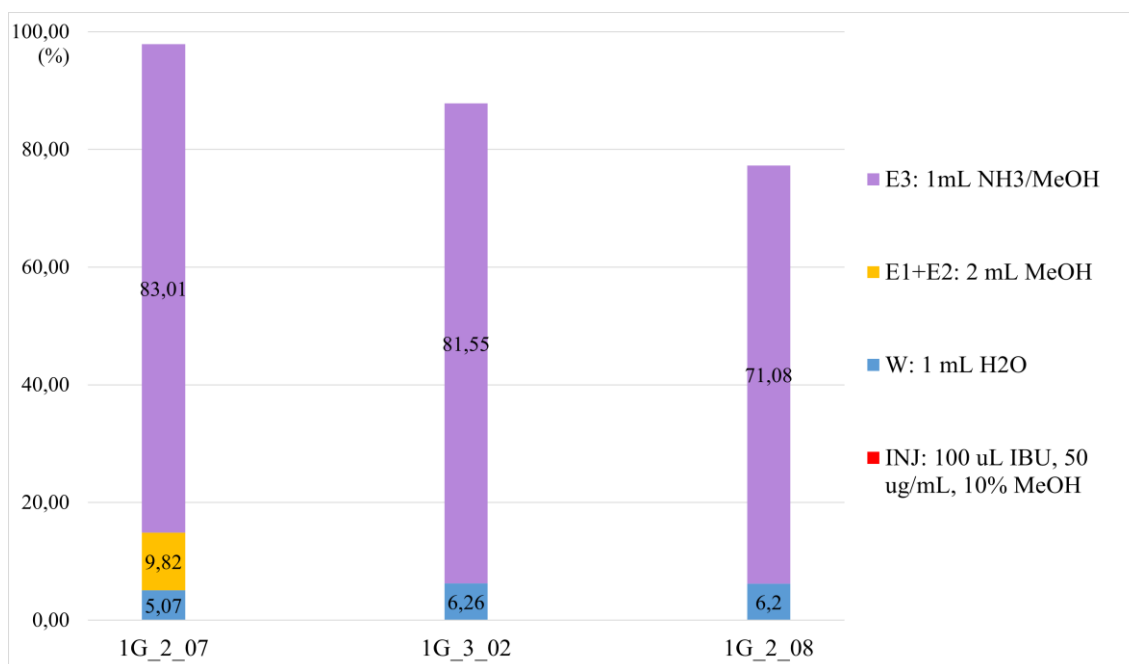
Medzi metoprololom a modifikovaným rGO sorbentom boli vytvorené nedostatočne silné väzby, z tohto dôvodu bol analyt vymytý už v priebehu premývania kolónky. V ďalšej časti diplomovej práce bol preto skúmaný vplyv zníženia/zvýšenia pH na retenciu analytu v priebehu nanášania a premývania kolónky (viď kapitola 6.5.2).



Graf 3 Vplyv výberu elučného činidla na extrakčnú výťažnosť metoprololu

Vplyv výberu elučného činidla na extrakčnú výťažnosť ibuprofenu vo vodnom prostredí (pH 7,00)

SPE bolo prevádzané vo vodnom prostredí, pri neutrálnom pH, rGO@sil sorbent bol použitý ako SF. INJ bol zadržaný na kolónke. V priebehu W kolónky bolo stratených v priemere 6 % modelového analytu. Po pridaní 2 ml MeOH (E1+E2) na kolónku 1G_2_07 bola pozorovaná nedostatočná elúcia analytu (10 %), z dôvodu vytvorenie silných interakcií medzi IBU a rGO@sil sorbentom. Po pridaní 1 ml NH₃/MeOH (E3) bola elučná výťažnosť zvýšená o 83 % (viď Graf 4). Alkalické podmienky boli priaznivé pre ionizáciu IBU, čím bola oslabená afinita analytu k rGO@sil, a tým bola uľahčená E analytu. Následne bola na kolónkách 1G_3_02 a 1G_2_08 overená sila 1 ml 0NH₃/MeOH. Výsledky experimentu ukázali, že toto činidlo je dostatočne silné, pretože bola dosiahnutá 76% elučná výťažnosť (viď Graf 4). Z tohto dôvodu bolo dané činidlo zvolené ako východiskové pri ďalších SPE s IBU ako modelovým analytom.



Graf 4 Vplyv výberu elučného činidla na extrakčnú výťažnosť ibuprofenu

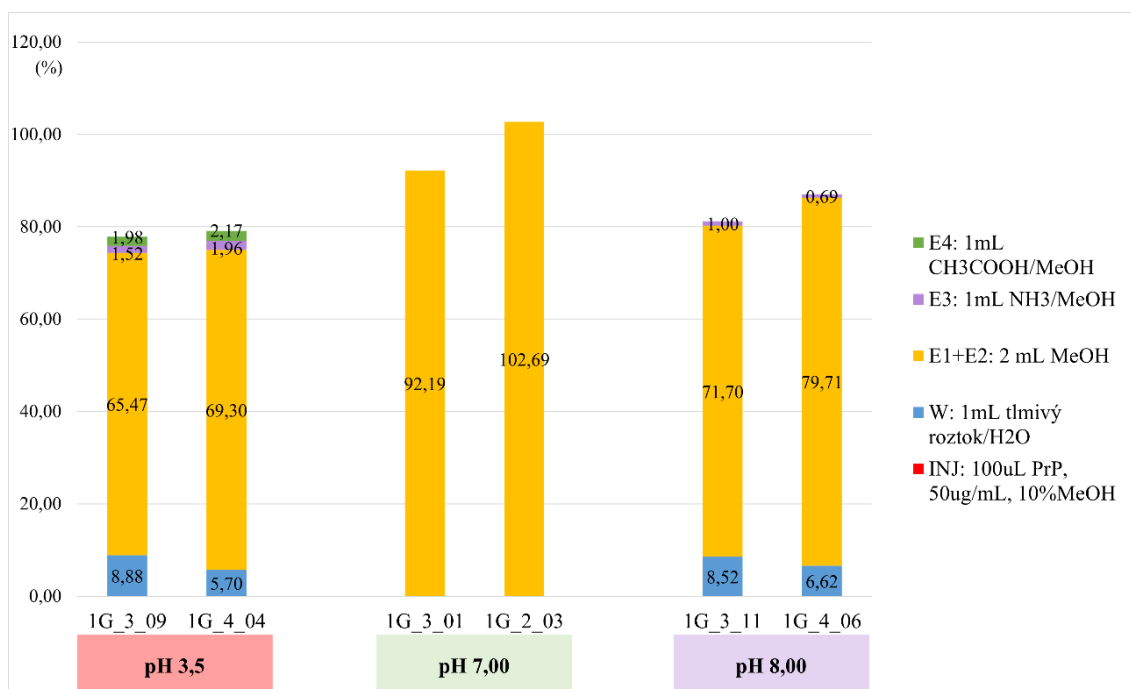
6.4.2 Vplyv pH na retenčné vlastnosti sorbentu a extrakčnú výťažnosť analytu

Vplyv pH na retenčné vlastnosti sorbentu a extrakčnú výťažnosť propylparabenu

Znížením pH kondicionácie kolónky prostredníctvom amónno-octanového tlmivého roztoku (pH 3,5) bolo stratených 7 % PrP v priebehu W kolónky, pretože neboli vytvorené dostatočne silné väzby medzi sorbentom a analytom. Po pridaní MeOH (E1+E2, 2 ml) bola dosiahnutá 67% elučná výťažnosť. Na E boli použité ďalšie dve činidlá s cieľom zvýšiť extrakčnú výťažnosť. Po nanosení 1 ml NH₃/MeOH (E3) a 1 ml CH₃COOH/ MeOH (E4), bola výťažnosť zvýšená len o 2 % (zvlášť pre E3 a E4) (vid' Graf 5).

Podobný priebeh bol zaznamenaný aj v prípade zvýšenia pH vzorky a premývacieho činidla prostredníctvom TRIS (pH 8,0). V priebehu W kolónky bolo stratených 8 % analytu a po E MeOH (E1+E2, 2 ml) bola dosiahnutá 75% výťažnosť (vid' Graf 5).

Výsledky experimentu ukázali, že v prípade neutrálnych látok (PrP) bola najvýhodnejšia neutrálna kondicionácia SPE, a teda aj nanosenie vzorku rozpusteného vo vode a premytie kolónky vodou. V priebehu INJ a W bol analyt zadržaný na kolónke a extrakčná výťažnosť presahovala 95 %.

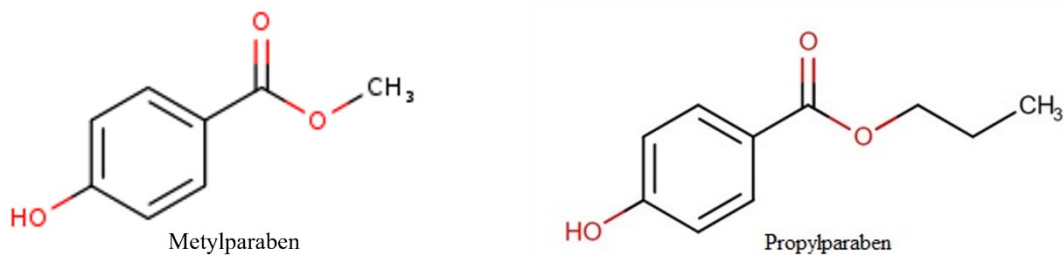


Graf 5 Vplyv pH na retenciu a extrakčnú výťažnosť propylparabenu

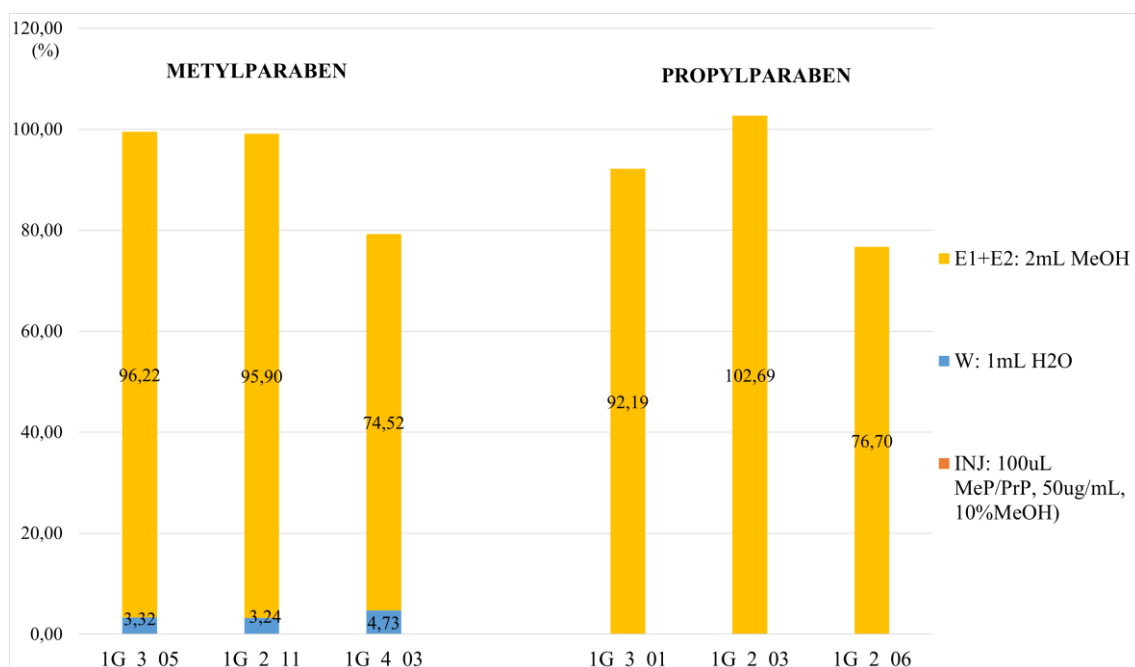
Porovnanie retenčnej schopnosti propylparabenu a nižšieho analogu metylparabenu pri prevádzaní SPE s použitím rGO ako stacionárnej fázy

Ďalším krokom pri sledovaní elučných podmienok PrP (pKa 8,5) bolo jeho porovnanie s nižším analagom, MeP (pKa 8,5). SPE bolo prevádzané v neutrálnom (vodnom) prostredí, MeOH bol zvolený ako elučné činidlo.

Výsledky experimentu ukázali, že v priemere 4 % MeP boli eluované už v priebehu W kolónky, zatiaľ čo PrP bol celý zadržaný na kolónke (viď Graf 6). Napriek tomu, že 4% strata v priebehu W nebola úplne signifikantná, príčinou tohto rozdielu bol kratší postranný uhlíkový reťazec MeP v porovnaní s PrP (viď Obr. 15), a teda slabšie väzby s rGO@sil sorbentom ako SF.



Obr. 15 Štruktúry metylparabenu a propylparabenu



Graf 6 Porovnanie extrakčných výťažností propylparabenu a jeho nižšieho analógu metylparabenu vo vodnom prostredí (pH 7,00)

Vplyv pH na retenčné vlastnosti sorbentu a extrakčnú výťažnosť metoprololu

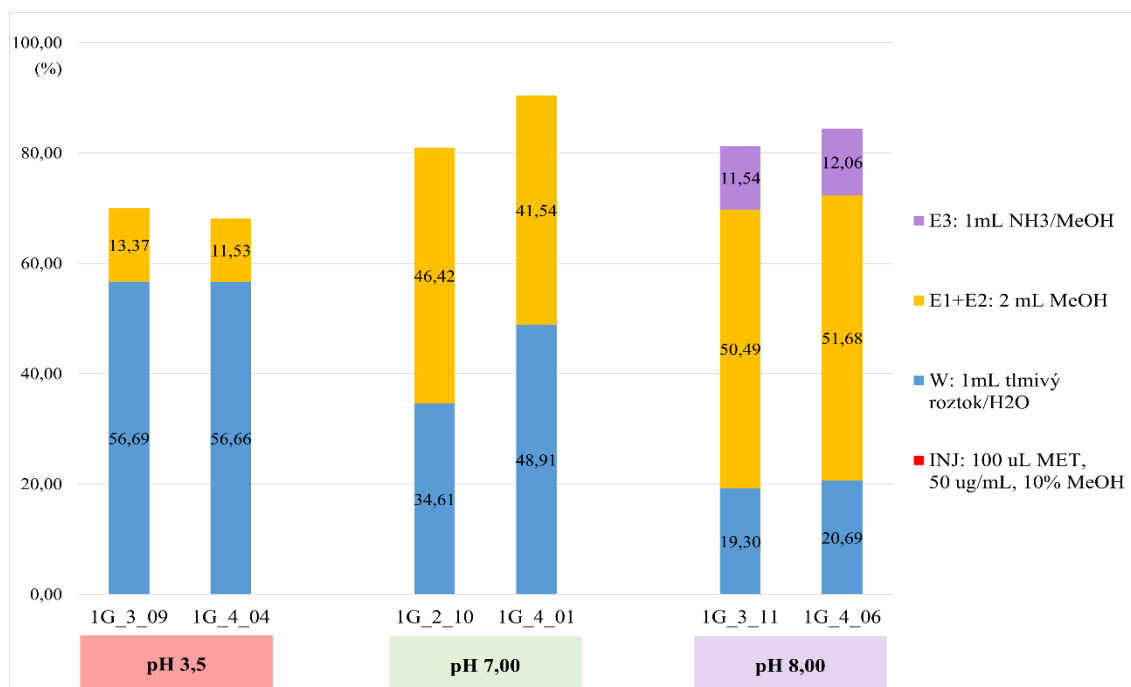
Použitie amónno-octanového tlmivého roztoku (pH 3,5) namiesto vody pri kondicionácii kolónky bolo pre retenciu analytu na rGO@sil sorbente nevýhodné. V priebehu W kolónky bolo vymytých 42 % analytu. E metanolom (E1+E2, 2 ml) bola dosiahnutá 12% výťažnosť (viď Graf 7).

Vo vodnom prostredí bola pozorovaná 42% strata analytu v priebehu W kolónky, elúciou MeOH bola dosiahnutá 44% výťažnosť (viď Graf 7).

Najvýhodnejšie podmienky pre MET bolo pozorované v prostredí TRIS tlmivého roztoku. V priebehu W kolónky bolo stratených 20 % metoprololu. Elúciou MeOH (E1+E2, 2 ml) bola dosiahnutá 51% výťažnosť, avšak po pridaní 1 ml NH₃/MeOH (E3, 1 ml) bola elučná výťažnosť zvýšená o 12 % (viď Graf 7).

Gudarzi vo svojej štúdií uvádza: „Zvýšením pH o 1 alebo 2 jednotky nad hodnotu pK_a rGO sorbentu (pK_a 8,00) vedie k úplnej ionizácii kyslíkatých funkčných skupín.“ (47)

V priebehu experimentu bolo pozorované postupné zvýšenie retencie analytu na modifikovanom rGO sorbente pomyselným zvyšovaním pH prostredia, v ktorom sa SPE prevádzala (amónno-octanový tlmivý roztok, voda, TRIS).



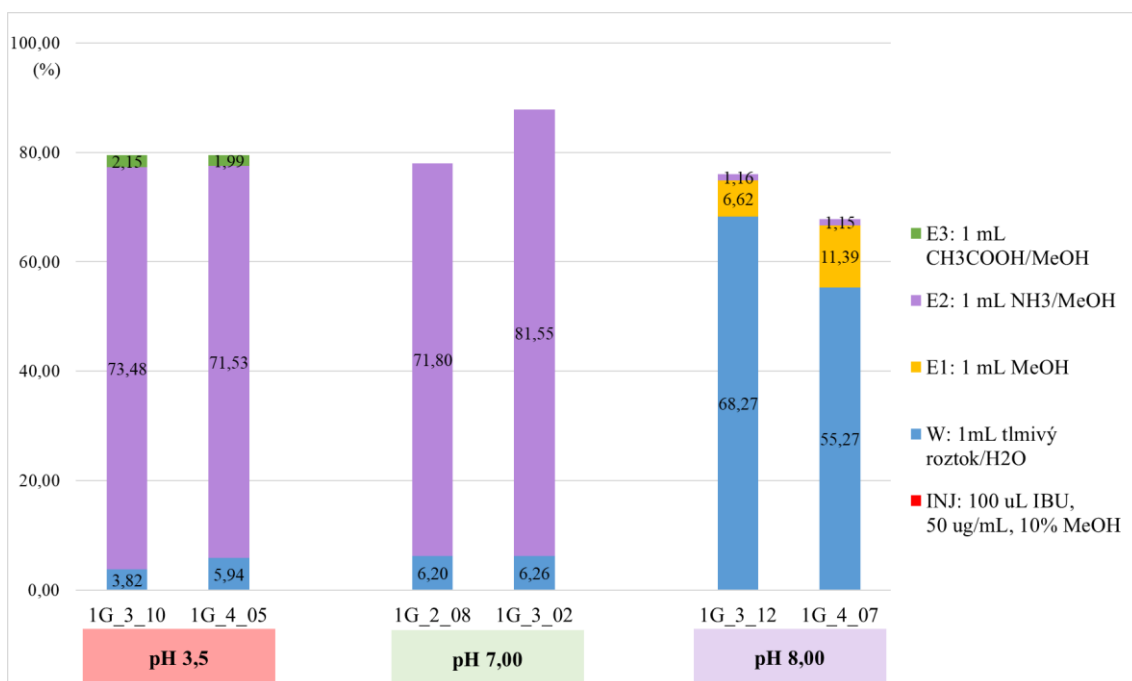
Graf 7 Vplyv pH na retenciu a extrakčnú výťažnosť metoprololu

Vplyv pH na retenčné vlastnosti sorbentu a extrakčnú výťažnosť ibuprofenu

Po kyslej kondicionácii sorbentu, v priebehu W bolo stratených v priemere 5 % analytu a elúciou (E1, 1 ml 0,1M amoniaku v MeOH (5:95, v:v)) bola dosiahnutá 73% výťažnosť. V snahe zvýšiť výťažnosť, a teda oslabiť väzby medzi analytom a rGO@sil sorbentom, bolo na kolónku nanosené ďalšie elučné činidlo CH₃COOH/MeOH (E3, 1 ml), avšak výťažnosť bola zvýšená o 2 %. Po neutrálnej kondicionácii sorbentu, v priebehu W bolo stratených 6 % analytu a elúciou bola dosiahnutá 77% výťažnosť (viď Graf 8).

Po bázičkej kondicionácii, bolo po premytí kolónky 1 ml TRIS stratených v priemere 62 % IBU. Elúciou 1 ml MeOH a 1 ml NH₃/MeOH (E1+E2) bola dosiahnutá 10% výťažnosť (viď Graf 8).

Najvýhodnejšie podmienky pre IBU boli pozorované v neutrálnom prostredí, kvôli nižšej strate v priebehu W kolónky a vyššej výťažnosti v priebehu elúcie analytu.



Graf 8 Vplyv pH na retenciu a extrakčnú výťažnosť ibuprofenu

6.5 Porovnanie rGO a komerčného materiálu

Posledným cieľom tejto diplomovej práce bolo porovnanie pripraveného rGO@sil sorbentu s komerčne dostupnými SPE kolónkami. Konkrétne sa jednalo aminosilikagél (kolónky SPE Strata NH2 1 ml, $20 \pm 0,15$ mg (Phenomenex, USA)) a C₁₈ modifikovaný silikagél (kolónky SPE Supelco C18 1 ml, 100 mg (Sigma-Aldrich, Nemecko)). Pre každú látku boli vybrané najvhodnejšie extrakčné podmienky, tak aby bola dosiahnutá najvyššia výťažnosť.

Propylparaben

Výsledky experimentu ukázali, že v prípade PrP bolo použitie rGO@sil ako sorbentu pre SPE rovnako vhodné ako použitie C₁₈ modifikovaného silikagélu, najmenej účinný bol aminosilikagél.

C₁₈ modifikovaný silikagél a a rGO@sil sú sorbenty, ktoré sú využívané v separačnom móde RF, sú vhodné pre extrakciu nepolárnych analytov, ktoré sa zadržiavajú hydrofóbnymi interakciami. PrP tak vytváral dostatočne silné väzby s týmito sorbentmi, zadržiaval sa pri INJ a W na kolónke (viď Graf 9). V priebehu E metanol väzby medzi PrP a sorbentmi oslabil, čím došlo k vymytiu analytu. Elučná výťažnosť pri použití rGO@sil sorbentu siahala až k 100 %, pri použití C₁₈ modifikovaného silikagélu bola 87 % (viď Graf 9). Príčinu tohto rozdielu

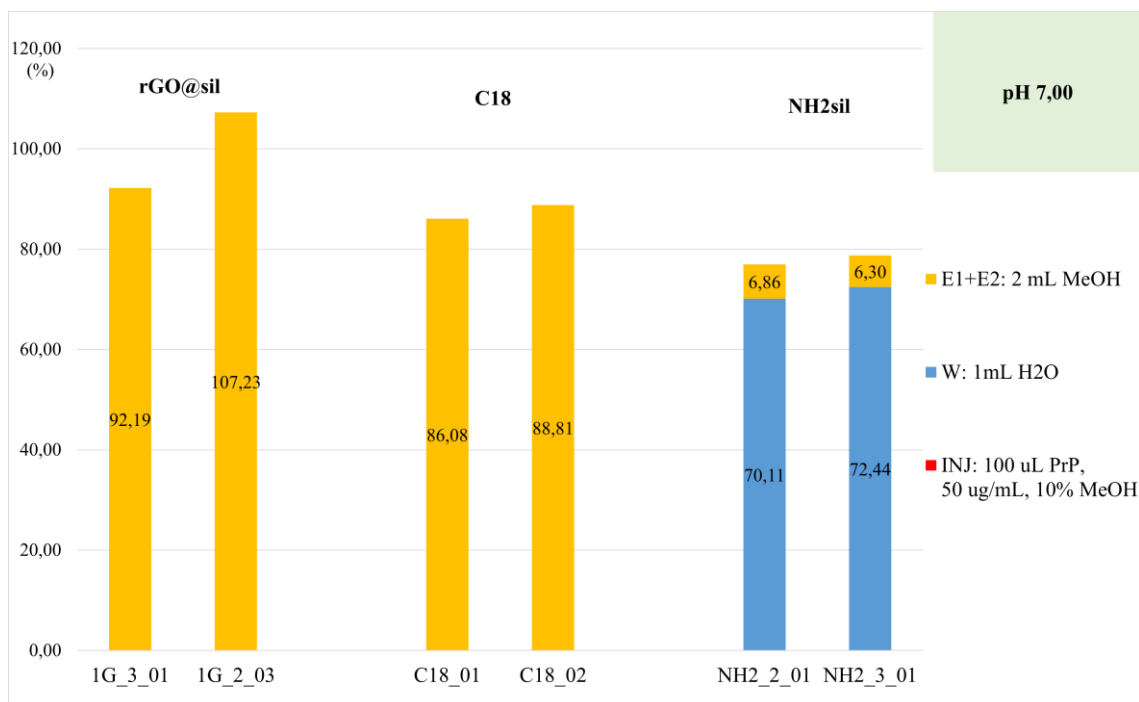
si vysvetľujeme vďaka veľkému povrchu rGO a delokalizovanému systému π elektrónov, ktorý zohrával dominantnú úlohu pri tvorbe $\pi - \pi$ interakcií medzi rGO a aromatickými molekulami.

Je nutné poukázať, že SPE bolo prevádzané s náplňou kolóniek $20 \pm 0,15$ mg rGO@sil sorbentu a 100 mg C₁₈ modifikovaného silikagélu. Na dosiahnutie optimálnych výsledkov bola potreba väčšieho množstva sorbentu pri použití komerčného materiálu pre SPE (C₁₈ modifikovaného silikagélu) ako pri použití rGO@sil sorbentu.

Aminosilikagél je typ sorbentu, ktorý sa používa v separačnom móde NF pre SPE, je vhodný pre polárnejšie analyty, ktoré sú zadržované hydrofilnými interakciami. PrP vytváral slabé väzby s aminosilikagél sorbentom, preto bolo zadržiavanie PrP na sorbente veľmi nízke a dochádzalo k strate analytu už v priebehu INJ a W kolónky (71 %) a elučná výťažnosť dosiahla len 6 % (vid' Graf 9).

Na základe rozdielneho správania sa sorbentov NH₂sil a rGO@sil bol dokázaný úspešný priebeh prípravy rGO@sil. Bola pozorovaná zvýšená adsorpčná vlastnosť, pretože v prípade rGO@sil bol analyt úplne zadržaný na kolónke, zatiaľ čo pri neupravenom materiáli bolo stratených viac ako 70 % analytu (vid' Graf 9).

Kolónky s rGO@sil sorbentom a aminosilikagélom boli naplnené rovnakým množstvom, a to $20 \pm 0,15$ mg.

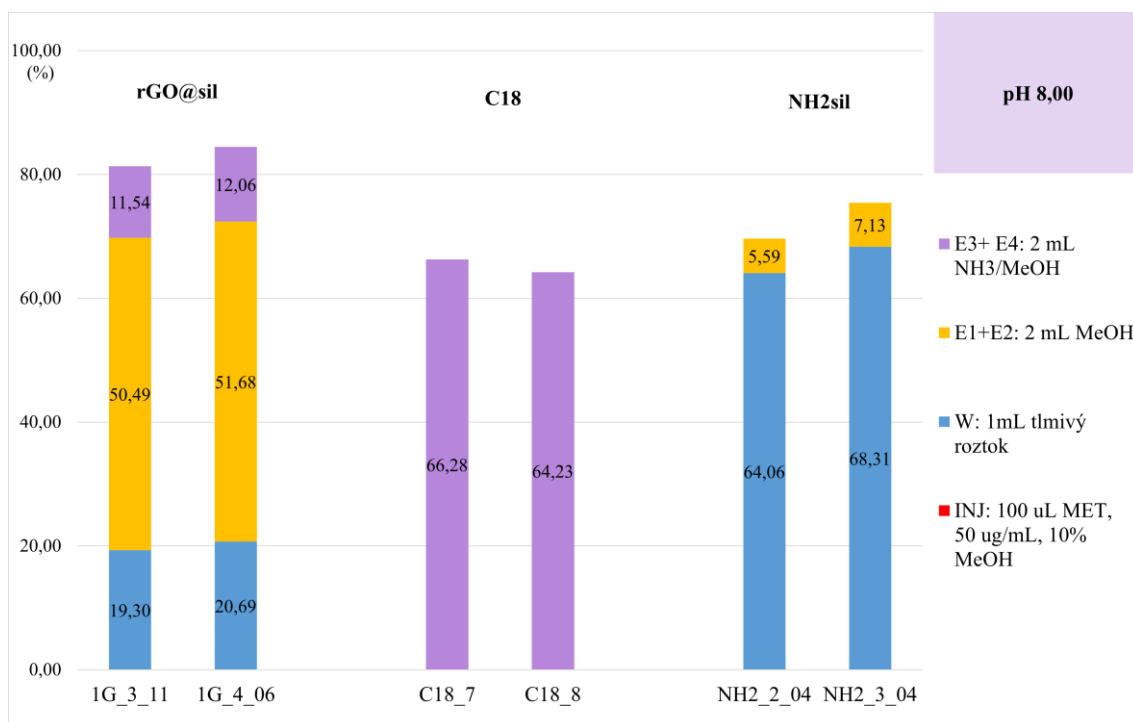


Graf 9 Porovnanie extrakčných výťažností pri použití modifikovaného rGO a komerčných materiálov ako sorbentov pre SPE, modelový analyt: propylparaben, pH: 7,00 (SPE prevádzané vo vodnom prostredí)

Metoprolol

Pre MET boli vybrané podmienky práce v zásaditom prostredí. Výsledky experimentu ukázali, že pre MET bolo použitie rGO@sil ako sorbentu pre SPE menej výhodné ako použitie komerčného C₁₈ modifikovaného silikagélu a zároveň viac výhodné v porovnaní s aminosilikagélom. Pri použití rGO@sil dochádzalo k 20% strate v priebehu INJ a W kolónky, elučná výťažnosť dosahovala 63 %. V prípade C₁₈ modifikovaného silikagélu sa MET zdržiaval na kolónke pri INJ a W, k jeho vymytiu došlo až v priebehu E, výťažnosť činila 65 % (viď Graf 10). Elučná výťažnosť bola porovnateľná medzi týmito dvomi typmi SF, ale v prípade rGO@sil sorbentu bola celková extrakčná výťažnosť vyššia ako pri C₁₈ modifikovanom silikagéle.

Modifikáciou aminosilikagélového sorbentu redukovaným grafén-oxidom sa zvýšila adsorpčná schopnosť materiálu o 46% v priebehu W, a tým bola zvýšená extrakčná výťažnosť MET z pôvodných 6 % (NH₂sil) na 62 % (rGO@sil) (viď Graf 10).



Graf 10 Porovnanie extrakčných výťažností pri použití modifikovaného rGO a komerčných materiálov ako sorbentov pre SPE, modelový analyt: metoprolol, pH: 8,00 (SPE prevádzané v TRIS tlmivom roztoku)

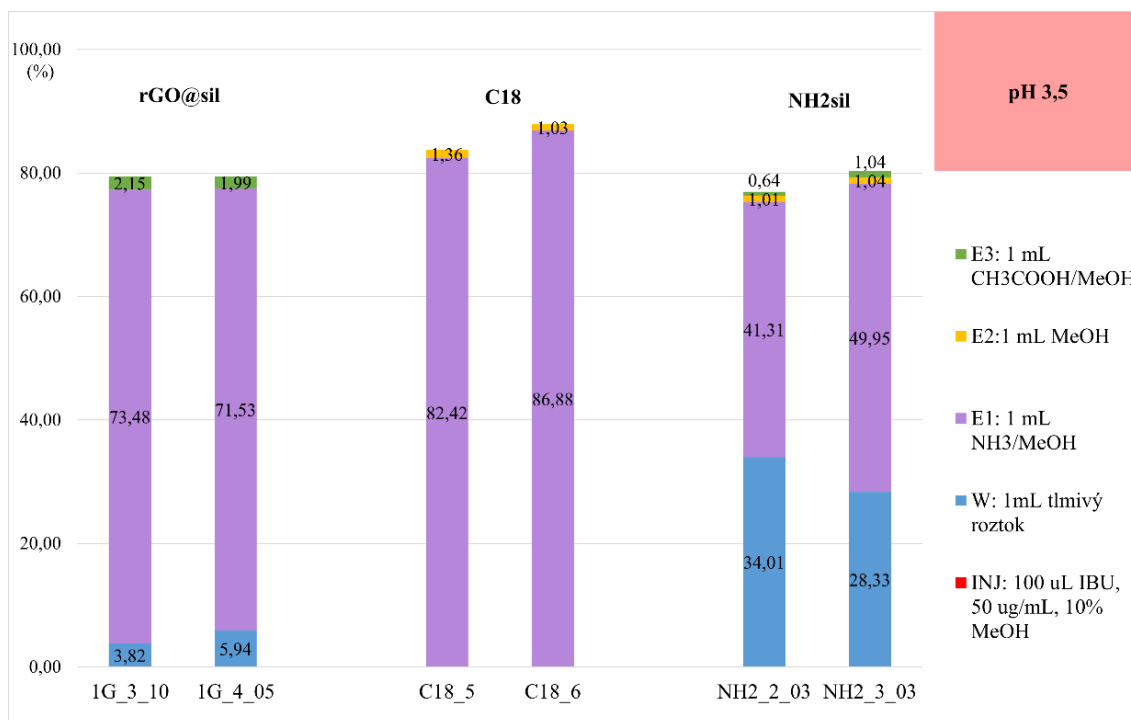
Ibuprofen

V prípade použitia komerčného C₁₈ modifikovaného silikagélu bol analyt úplne zadržaný na kolónke, elučná výťažnosť zmesou NH₃/MeOH (E1, 1 ml) bola v priemere 85% (viď Graf 11).

V prípade použitia rGO@sil sorbentu bolo stratených 5% analytu, elučná výťažnosť zmesou NH₃/MeOH (E1, 1 ml) bola 75 %. V snahe oslabenia väzieb medzi IBU a upraveným rGO sorbentom bola použitá zmes CH₃COOH/MeOH (E3, 1 ml), elučná výťažnosť bola zvýšená o 2 %. Bola dosiahnutá 82% celková extrakčná výťažnosť (viď Graf 11).

Použitím rGO@sil sorbentu boli dosiahnuté porovnateľne dobré výsledky ako pri použití modifikovaného silikagélu C₁₈.

Aj v tomto prípade bola potvrdená úspešnosť prípravy rGO@sil sorbentu na základe porovnania správania sa nemoifikovaného (NH₂sil) a modifikovaného (rGO@sil) materiálu. V priebehu W bolo adsorbovaných o 26 % viac analytu na upravenom materiáli, čím bola zvýšená aj výťažnosť extrakcie (viď Graf 11).



Graf 11 Porovnanie extrakčných výťažností pri použití modifikovaného rGO a komerčných materiálov ako sorbentov pre SPE, modelový analyt: ibuprofen., pH: 3,50 (SPE prevádzané v amónno-octanovom tlmivom roztoku)

7 ZÁVER

V tejto diplomovej práci bola pripravená modifikovaná stacionárna fáza pre SPE založená na graféne. Príprava sorbentu spočívala v naviazaní GO plátov na aminosilikagél prostredníctvom amidovej väzby medzi karboxylovými skupinami GO a aminoskupinami silikagélu s následnou hydrazínovou redukciou GO. Bol tak vytvorený rGO@sil sorbent.

Celkovo boli pripravené tri šarže rGO@sil sorbentu. Avšak po prevedení SPE s použitím jednotlivých šarží nebolo pozorované rovnaké retenčné správanie modelového analytu (PrP). Z tohto dôvodu príprava neposkytovala reprodukovateľné výsledky.

Prvá šarža rGO@sil sorbentu pre SPE bola zvolená pre štúdium jeho vlastností, pretože pri jej použití nedochádzalo k strate analytu v priebehu nanosenia vzorky a premývania a elučná výťažnosť dosahovala k 100 %. Modifikácia prvej šarže rGO@sil sorbentu bola pravdepodobne najúspešnejšia. Okrem PrP boli zvolené ďalšie dva modelové analyty s rôznymi fyzikálno-chemickými vlastnosťami, a to IBU a MET.

Bol študovaný vplyv elučného činidla na extrakčnú výťažnosť a vplyv pH na retenčnú schopnosť rGO@sil sorbentu a extrakčnú výťažnosť analytov. Najvyššia extrakčná výťažnosť bola dosiahnutá elúciou metanolom v prípade PrP a MET a elúciou zmesi amoniaku v metanole v prípade IBU. Najlepšie podmienky na retenciu analytu a extrakčnú výťažnosť boli pozorované pri neutrálnej kondicionácii v prípade neutrálnych (PrP) a kyslých látok (IBU), a pri bázičkej kondicionácii v prípade zásaditých látok (MET).

Použitím rGO@sil sorbentu ako SF pre SPE bol preukázaný zmiešaný retenčný mechanizmus rGO. Analyty boli pravdepodobne adsorbované veľkým špecifickým povrchom, interagovali prostredníctvom $\pi - \pi$ interakcií a hydrofóbnemu efektu. rGO@sil sorbent tak poskytol sľubné výsledky pre ďalší vývoj materiálov založených na graféne.

Pri porovnaní sorbentov používaných v separačnom móde RF, teda rGO@sil a modifikovaný silikagél C₁₈, boli dosiahnuté porovnateľne retencie analytov na sorbent v priebehu premytia kolónky a vysoké elučné výťažnosti analytov. Avšak je treba podotknúť, že na dosiahnutie týchto výsledkov bolo použité päťnásobne menšie množstvo rGO@sil sorbentu, čím bol dokázaný jeho veľký špecifický povrch. Nemodifikovaný aminosilikagél je používaný v separačnom móde NF, pri jeho použití

neboli vytvorené dostatočne silné väzby medzi organickými nepolárnymi zlúčeninami a sorbentom. Dochádzalo k vysokej strate analytu už v priebehu premytia kolónky.

Výsledky experimentov v rámci diplomovej práce dokázali, že modifikácia silikagél sorbentu rGO (rGO@sil) pre SPE prebehla úspešne. Hlavným dôkazom tohto tvrdenia bolo porovnanie správania sa analytov na aminosilikagéle a na vytvorenom rGO@sil sorbente. Diplomová práca bola pilotným experimentom pre modifikované sorbenty grafénom pre SPE, výsledky práce sa stanú dobrým základom pre ďalší vývoj a výskum nových materiálov.

8 ZOZNAM OBRÁZKOV

Obr. 1 Schematické znázornenie separačného procesu v chromatografii, v čase t_0 je vzorka zmesi látok A a B nastrekovaná na kolónu, v časoch t_1 a t_2 dochádza k separácii látok, v čase t_3 je látka A vymytá z kolóny ako prvá kvôli slabším interakciám so SF (na chromatograme ako pík A), v čase t_4 je vymytá z kolóny látka B ako druhá v poradí kvôli silnejším interakciám so SF (na chromatograme ako pík B) (prevzaté z (9)).....	15
Obr. 2 Základný popis prístrojového vybavenia HPLC (prevzaté z (13))	19
Obr. 3 Rôzne možnosti priestorovej ochrany povrchu silikagélu (prevzaté z (12))	24
Obr. 4 Postup extrakcie na pevnej fáze (prevzaté z (20))	29
Obr. 5 Manifold pripojený k zdroju vákua, umožňuje prevádzanie SPE viacerých vzoriek v jednom čase (prevzaté z (36))	30
Obr. 6 Hydrofilné väzby medzi polárnou skupinou analytu a polárnou funkčnou skupinou sorbentu (prevzaté z (21)).....	31
Obr. 7 Hydrofóbne väzby medzi analytom a funkčnou skupinou sorbentu(prevzaté z (21)).....	32
Obr. 8 Elektrostatické väzby medzi nabitou funkčnou skupinou sorbentu a opačne nabitým analytom (prevzaté z (21))	34
Obr. 9 Schéma modifikácie grafénu na GO a rGO (prevzaté z (25)).....	38
Obr. 10 Príprava rGO spočíva v prvotnej oxidácii grafitu na grafit-oxid, následná exfoliácia pomocou sonikácie na GO a v poslednom kroku redukcia na rGO (prevzaté z (28)).....	39
Obr. 11 Možný spôsob získania GO a rGO z grafitu a možné naviazanie týchto materiálov na povrch aminopropylkremičitanu (prevzaté z (2)).....	42
Obr. 12 Chromatogram modelových analytov	52
Obr. 13 Štruktúry modelových analytov	55
Obr. 14 a) hnedé častice pripraveného GO@sil, b) čierne častice pripraveného rGO@sil	56
Obr. 15 Štruktúry metylparabenu a propylparabenu	62

9 ZOZNAM TABULIEK

Tabuľka 1 Polarita a chemická štruktúra modifikovaných silikagélov (prevzaté z (12))	33
Tabuľka 2 Postup prevedenia SPE pri kyslej kondicionácii kolónky.....	51
Tabuľka 3 Postup prevedenia SPE pri neutrálnej kondicionácii kolónky	51
Tabuľka 4 Postup prevedenia SPE pri bázičkej kondicionácii kolónky	51
Tabuľka 5 Zhrnutie podmienok HPLC analýzy	53

10 ZOZNAM GRAFOV

Graf 1 Opakovateľnosť prípravy modifikovaného rGO sorbentu pre SPE, porovnanie výťažností jednotlivých šarží pri použití propylparabenu ako modelového analytu	57
Graf 2 Vplyv výberu elučného činidla na extrakčnú výťažnosť propylparabenu	59
Graf 3 Vplyv výberu elučného činidla na extrakčnú výťažnosť metoprololu	60
Graf 4 Vplyv výberu elučného činidla na extrakčnú výťažnosť ibuprofenu	61
Graf 5 Vplyv pH na retenciu a extrakčnú výťažnosť propylparabenu	62
Graf 6 Porovnanie extrakčných výťažností propylparabenu a jeho nižšieho analógu metylparabenu vo vodnom prostredí (pH 7,00)	63
Graf 7 Vplyv pH na retenciu a extrakčnú výťažnosť metoprololu	64
Graf 8 Vplyv pH na retenciu a extrakčnú výťažnosť ibuprofenu	65
Graf 9 Porovnanie extrakčných výťažností pri použití modifikovaného rGO a komerčných materiálov ako sorbentov pre SPE, modelový analyt: propylparaben, pH: 7,00 (SPE prevádzané vo vodnom prostredí).....	66
Graf 10 Porovnanie extrakčných výťažností pri použití modifikovaného rGO a komerčných materiálov ako sorbentov pre SPE, modelový analyt: metoprolol, pH: 8,00 (SPE prevádzané v TRIS tlmivom roztoku).....	67
Graf 11 Porovnanie extrakčných výťažností pri použití modifikovaného rGO a komerčných materiálov ako sorbentov pre SPE, modelový analyt: ibuprofen., pH: 3,50 (SPE prevádzané v amónno-octanovom tlmivom roztoku)	68

11 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

1. **Niu, Z., Zhang, W., Yu, C. et al.** Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques. *Trends in Analytical Chemistry*. 2018, Zv. 102, 123-146.
2. **Nazario, C. E. D., Fumes, B. H., da Silva, M. R., Lanca, F. M.** New materials for sample preparation techniques in bioanalysis. *Journal of Chromatography B*. 2017, Zv. 1043, 81-95.
3. **Hansen, S. J., Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K. E.** *Introduction to Pharmaceutical chemical analysis*. Chichester : John Wiley and sons, 2012. ISBN: 9780470661215.
4. **Snyder, L. R., Kirkland, J. J., Dolan J. W.** *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. Hoboken : John Wiley & Sons, 2010. ISBN 978-0-470-16754-0.
5. **Sitko, R., Zawisza, B., Malicka, E.** Graphene as a new sorbent in analytical chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*. 2013, Zv. 51, 33-43.
6. **Liu, Q.; Shi, J.; Sun et al.** Graphene and Graphene Oxide Sheets Supported on Silica as Versatile and High-Performance Adsorbents for Solid-Phase Extraction. *Chemie, Angewandte*. 2011, Zv. 50, 5913-5917.
7. **Maciel, E. V. S., de Toffoli, A. L., Neto E. S. et al.** New materials in sample preparation: Recent advances and future trends. *Trends in Analytical Chemistry*. 2019, Zv. 119, 115633.
8. **Smith, A. T., LaChance, A. M., Zeng, S., et al.** Synthesis, properties, and applications of graphene oxide/reduced graphene. *Nano Materials Science*. 2019, Zv. 1, 31-47.
9. **Skoog, D. A., Holler, F. J., Crouch, S. R.** *Principles of Instrumental analysis*. Boston : Cengage Learning, 2018. ISBN: 978-1-305-57721-3.
10. **Moldoveanu, S. C., David., V.** *Essentials in Modern HPLC Separations*. Amsterdam : Elsevier, 2022. ISBN 9780323911771.
11. **Meyer, Veronika R.** *Practical High Performance Liquid Chromatography, Fifth Edition*. USA : John Willey and sons, 2010. ISBN: 978-0-470-68218-0.
12. **Tekeľ, J., Mikuš, P.** *Vybrané kapitoly analytickej chémie*. Bratislava : Univerzita Komenského, 2005. ISBN: 80-223-1988-0.
13. **Cibiček, N., Vacek, J., a kol.** *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně*. Olomouc : Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN: 978-80-244-3951-8.
14. **Ramis-Ramos, G., Garcia-Álvarez-Coque, M. C., Navarro-Huerta, J. A.** *Solvent selection in liquid chromatography*. Amsterdam : Elsevier, 2017. ISBN: 978-0-12-805393-5.
15. **Buszewski, B., Noga, S.** Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012, Zv. 402, 231-247.
16. **LaCourse, M. E., LaCourse, W. R.** General instrumentation in HPLC. *Liquid Chromatography*. Amsterdam : Elsevier, 2017.
17. **Cabrera, K.** Applications of silica-based monolithic HPLC columns. *Journal of Separation Science*. 2004, Zv. 27, 843-852.
18. Guide to Solid Phase Extraction. *SUPELCO*. [Online] [Dátum: 12. 07 2022.] <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/572/614/4538.pdf>.
19. **Thurman, E. M., Mills, M. S.** *Solid-Phase Extraction, Principles and Practise*. New York : John Wiley and Sons, 1998. ISBN 978-0-471-61422-7.

20. Marešová, V. Principy řízených extrakcí nox z biologického materiálu pro různé typy. [Online] [Datum: 12. 07 2022.] <https://docplayer.cz/36217146-Principy-rizenych-extrakci-nox-z-biologickeho-materialu-pro-ruzne-typy-toxikologicckych-analyz-vyznam-spravne-pripravy-vzorky-pro-konecny-vysledek.html>.
21. Overview of SPE Technology/Method Development & New Trends in Sample Preparation. *SUPELCO*. [Online] [Datum: 14. 4 2023.] <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/marketing/global/documents/407/572/t407048h.pdf>.
22. **Mitra, S.** *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. New Jersey : John Wiley & Sons, 2003. ISBN: 9780471328452.
23. **Tarcan, R., Todor-Boer, O., Petrovai, I., Leordean, C., Astilean, S., & Botiz, I.** Reduced graphene oxide today. *Journal of Materials Chemistry C*. 2020, Zv. 8, 1198-1224.
24. **Ibrahim, W. A. W., Nodeh, H. R., & Sanagi, M. M.** Graphene-Based Materials as Solid Phase Extraction Sorbent for Trace Metal Ions, Organic Compounds, and Biological Sample Preparation. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2015, Zv. 46(4), 267–283.
25. **Han, Q., Wang, Z., Xia, J., Xia, L., Chen, S., Zhang, X., & Ding, M.** Graphene as an efficient sorbent for the SPE of organochlorine pesticides in water samples coupled with GC-MS. *Journal of Separation Science*. 2013, Zv. 36(21-22), 3586–3591.
26. **Rao, C. N. R., Sood, A. K.** *Graphene: Synthesis, Properties, and Phenomena*. Weinheim : WILEY-VCH, 2013. ISBN: 978-3-527-33258-8.
27. **Kavitha, C.** A review on reduced Graphene oxide hybrid nano composites and their prominent applications. *Materials Today: Proceedings*. 2021, Zv. 49, 811-816.
28. Graphene vs. Graphite: Which one's more Useful? *Psiberg*. [Online] 09. 09 2022. [Datum: 26. 04 2023.] <https://psiberg.com/graphene-vs-graphite/>.
29. **Dong, L., Hou, L., Wang, Z., Gu, P., Chen, G., & Jiang, R.** A new function of spent activated carbon in BAC process: Removing heavy metals by ion exchange mechanism. *Journal of Hazardous Materials*. 2018, Zv. 359, 76-84.
30. **Zhang, X., Chen, S., Han, Q., Ding M.** Preparation and retention mechanism study of graphene and graphene oxide bonded silica microspheres as stationary phases for high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2013, Zv. 1307, 135-143.
31. **Pei, Z., Li, L., Sun, L., Zhang, S., et al.** Adsorption characteristics of 1,2,4-trichlorobenzene, 2,4,6-trichlorophenol, 2-naphthol and naphthalene on graphene and graphene oxide. *Carbon*. 2013, Zv. 51, 156-163.
32. **Gao, Y., Li, Y., Zhang, L., Huang, H., Hu, J., Shah, S. M., & Su, X.** Adsorption and removal of tetracycline antibiotics from aqueous solution by graphene oxide. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2012, Zv. 368, 540-546.
33. **Georgakilas, V., Otyepka, M., Bourlinos, A. B., Chandra, V. et al.** Functionalization of Graphene: Covalent and Non-Covalent Approaches, Derivatives and Applications. *Chemical Reviews*. 2012, Zv. 112(11), 6156–6214.
34. **Gao, W., Alemany, L. B., Ci, L., Ajayan, P. M.** New insights into the structure and reduction of graphite oxide. *Nature Chemistry*. 2009, Zv. 1, 403-408.
35. **Liu, Q., Shi, J., Zeng, L., Wang, T. et al.** Evaluation of graphene as an advantageous adsorbent for solid-phase extraction with chlorophenols as model analytes. *Journal of Chromatography A*. 2011, Zv. 1218, 2.

36. **Ye, N., & Shi, P.** Applications of Graphene-Based Materials in Solid-Phase Extraction and Solid-Phase Microextraction. *Separation & Purification Reviews*. 2014, Zv. 44(3), 183–198.
37. **Huang, K.-J., Jing, Q.-S., Wei, C.-Y., & Wu, Y.-Y.** Spectrofluorimetric determination of glutathione in human plasma by solid-phase extraction using graphene as adsorbent. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2011, Zv. 79(5), 1860–1865.
38. **Huang, K.-J., Yu, S., Li, J., Wu, Z.-W., & Wei, C.-Y.** Extraction of neurotransmitters from rat brain using graphene as a solid-phase sorbent, and their fluorescent detection by HPLC. *Microchimica Acta*. 2011, Zv. 176(3-4), 327–335.
39. **Yu, Y., & Wu, L.** Application of graphene for the analysis of pharmaceuticals and personal care products in wastewater. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013, Zv. 405(14), 4913–4919.
40. **Huang, K.-J., Liu, Y.-J., Li, J., Gan, T., & Liu, Y.-M.** Ultra-trace determination of polycyclic aromatic hydrocarbons using solid-phase extraction coupled with HPLC based on graphene-functionalized silica gel composites. *Anal. Methods*. 2014, Zv. 6(1), 194-201.
41. **Huang, K.-J., Li, J., Liu, Y.-M., & Wang, L.** Sensitive determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples by HPLC coupled with SPE based on graphene functionalized with triethoxysilane. *Journal of Separation Science*. 2013, Zv. 36(4), 789–795.
42. **Luo, Y.-B., Zhu, G.-T., Li, X.-S. et al.** Facile fabrication of reduced graphene oxide-encapsulated silica: A sorbent for solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*. 2013, Zv. 1299, 10-17.
43. **Zhang, H., Loe, W. P., Lee, H. K.** Evaluation of sulfonated graphene sheets as sorbent for micro-solid-phase extraction combined with gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2012, Zv. 1233, 16-21.
44. **Li, Z., Hou, M., Bai, S., Wang, C., & Wang, Z.** Extraction of Imide Fungicides in Water and Juice Samples Using Magnetic Graphene Nanoparticles as Adsorbent Followed by Their Determination with Gas Chromatography and Electron Capture Detection. *Analytical Science*. 2013, Zv. 29(3), 325-331.
45. **Wang, L.-L., Yu, S., & Yu, M.** Ultrasensitive and selective spectrofluorimetric determination of S-nitrosothiols by solid-phase extraction. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2012, Zv. 98, 337–342.
46. **Yu, L., Ma, F., Ding, X., Wang, H., Li, P.** Silica/graphene oxide nanocomposites: Potential adsorbents for solid phase extraction of trace aflatoxins in cereal crops coupled with high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*. 2018, Zv. 245, 1018-1024.
47. **Gudarzi, M. M.** Colloidal Stability of Graphene Oxide: Aggregation in Two Dimensions. *Langmuir*. 2016, Zv. 32, 5058-5068.