

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra analytické chemie



**MODERNÍ EXTRAKČNÍ TECHNIKY VE SPOJENÍ S HPLC PRO
ANALÝZU KONTAMINANTŮ**

Disertační práce

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

Konzultant: PharmDr. Ivona Lhotská, Ph.D.

2023

Mgr. Aneta Kholová

Ráda bych zde poděkovala svému školiteli, prof. RNDr. Daliborovi Šatínskému, Ph.D., za nabídku doktorského studia pod jeho vedením. Jsem moc vděčná za jeho klid, trpělivost, podporu a velkou ochotu pomoci v nouzi. Bez toho všeho a cenných odborných rad bych nikdy nedošla až do tohoto cíle. Děkuji také své konzultantce PharmDr. Ivoně Lhotské za její velkou pomoc a podporu, pracovní i osobní, za vstřícnost a milá slova.

Poděkování patří i kolegům z Katedry analytické chemie za vlídné přijetí po celou dobu mého studia. Za příjemnou atmosféru, znalosti a zkušenosti, které jsem od vás získala. Děkuji za přátelství, která jsem zde navázala. Naše společné zážitky a vzpomínky jsou důležitou částí mého života.

Velký dík patří i celé mé rodině, která mě plně podporovala a vytvářela potřebné zázemí a klid po celou dobu mého studia. Poděkování patří i Honzovi a prarodičům, kteří někdy až s vypětím všech sil spolupracovali na hlídacím plánu a vlastně i synovi, že byl hodný a nechal mi dostatek času toto studium dokončit.

Bez všech těchto zmíněných bych nemohla dojít takhle daleko a sepsat tuto práci, která shrnuje mé vědecké snažení. Na celé toto období budu vždy ráda vzpomínat.

V neposlední řadě děkuji Technické univerzitě v Liberci za poskytnuté materiály a finanční podpoře z fondů Specifického vysokoškolského výzkumu SVV 260 662, Grantové agentury Univerzity Karlovy (projekty 321421, 1134119 a 146619), Grantové agentury ČR (projekt 20-19297S) a projektu STARSS (Reg. No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000465).

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

V Hradci Králové

Mgr. Aneta Kholová

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Mgr. Aneta Kholová

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

Konzultant: PharmDr. Ivona Lhotská, Ph.D.

Název disertační práce: Moderní extrakční techniky ve spojení s HPLC pro analýzu kontaminantů

V předložené disertační práci je prezentován komentovaný soubor šesti publikací zaměřujících se na využití a vzájemné porovnání extrakčních sorbentů k analýze kontaminujících látek v potravinách a v potravinových doplncích. Hlavním cílem bylo představit nanovláknenné materiály jako vhodný extrakční sorbent pro využití v analytické chemii. Pro tento účel byla vlákna porovnáována s dalšími, většinou komerčními extrakčními sorbenty vhodnými pro testovaný typ matrice. Všechny experimenty byly prováděny v on-line zapojení extrakčního sorbentu přes selekční ventil s analytickou kolonou v chromatografickém přístroji. Nedílnou součástí bylo i využití zjištěných extrakčních vlastností nanovláken při analýze reálných vzorků.

Nejdříve byla studována extrakční účinnost na jednoduchých kapalných matricích, kde není potřeba složité přečištění matrice a hlavním cílem je dostatečné zadržení a zakoncentrování analytů. Pro porovnání s nanovláknem byla k úpravě matrice Tokajského vína pro stanovení mykotoxinů zvolena C18 komerční předkolona a molekulárně vtištěné polymery. Získané poznatky byly následně využity pro testování vláken v komplexních matricích, jako jsou kravská a rostlinná mléka, která obsahují široké spektrum látek. U těchto matric bylo nutné odstranit i velké množství interferujících makromolekulárních látek za současné retence analytů. Tyto vlastnosti pak dělají z nanovláken slibné sorbenty i pro složité matrice.

Široké portfolio vláken bylo otestováno v rozsáhlé studii. Součástí této srovnávací studie bylo otestovat samotná vlákna různých typů výroby i funkcionalizovaná vlákna

potážená oxidovaným grafenem nebo polyfenoly či hybridní vlákna s příměsí grafenu. V této studii byly testovány širší možnosti jejich využití v environmentální analýze či při analýze biologických vzorků.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Mgr. Aneta Kholová

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

Co-Supervisor: PharmDr. Ivona Lhotská, Ph.D.

Title of dissertation thesis: Modern extraction techniques in connection with HPLC for analysis of contaminants

A compilation of six publications is presented in this dissertation thesis. The work focuses on applying and comparing extraction sorbents to analyze contaminating substances in food and food supplements. The main aim of this thesis was to present micro and nanofibers as suitable extraction sorbents for use in analytical chemistry. For this purpose, the fibers were compared with other, mostly commercial, extraction sorbents suitable for the type of matrix tested. All experiments were carried out in the on-line connection of the extraction sorbent through the selection valve with the analytical column in the chromatographic system. A crucial part was also the use of the extraction properties of nanofibers for the analysis of real-life samples.

In the first part, the extraction efficiency was studied on liquid matrices, where no need for complex matrix purification was required. The main aim was sufficient retention and preconcentration of analytes. For this purpose, commercial C18 pre-column and molecularly imprinted polymers were selected for comparison with nanofibers for the treatment of the matrix of Tokaj wine before the determination of mycotoxins. The knowledge was subsequently used to test fibers in complex matrices, such as bovine milk and plant-based beverages, which contain many other substances. With these matrices, removing a large amount of interfering macromolecular substances was also necessary while simultaneously retaining the analytes. These properties then make nanofibers promising sorbents even for complex matrices.

A wide portfolio of the fibers has been tested in an extensive study. Part of this comparative study was to test neat fibers of different types of fabrication as well as the

fibers functionalized by oxidized graphene, polyphenols or hybrid fibers with graphene admixture. This part of dissertation thesis tested the wider possibilities of their use in environmental analyses or the analysis of biological samples.

OBSAH

1. Úvod	15
2. Cíl práce	17
3. Teoretická část.....	19
3.1. Kontaminující látky	19
3.2. Extrakce na tuhou fázi	20
3.3. Konvenční metody v SPE	21
3.4. Moderní trendy v SPE	23
3.4.1. Molekulárně vtištěné polymery.....	24
3.4.1.1. Hodnocení a charakterizace MIP	28
3.4.2. Materiály s omezeným přístupem	28
3.4.2.1. Materiály s vnitřním hydrofobním povrchem (ISRP)	30
3.4.2.2. Alkyl-diol-silica sorbent (ADS)	30
3.4.2.3. Semipermeabilní povrchy (SPS)	31
3.4.2.4. Materiály ze silikagelu potaženého proteinem	31
3.4.2.5. Vícefunkční fáze	31
3.4.2.6. Stíněné hydrofobní fáze (SHP)	32
3.4.3. Nanovlákná	33
3.4.3.1. Zvlákňování z taveniny polymeru.....	34
3.4.3.2. Elektrostatické zvlákňování využívající stejnosměrný proud	35
3.4.3.3. Elektrostatické zvlákňování využívající střídavý proud.....	37
3.4.3.4. Modifikace a úpravy vláken	39
3.5. On-line SPE-HPLC.....	40
4. Publikované práce	43

4.1.	Komentář č.1: Preparation of citrinin-selective molecularly imprinted polymer and its use for on-line solid-phase extraction coupled to liquid chromatography	45
4.2.	Komentář č.2: Determination of ochratoxin A and ochratoxin B in archived Tokaj wines (vintage 1959–2017) using on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography	48
4.3.	Komentář č.3: Comparison study of nanofibers, composite nano/microfiber materials, molecularly imprinted polymers, and core-shell sorbents used for on-line extraction-liquid chromatography of ochratoxins in Tokaj wines	50
4.4.	Komentář č.4: Comparing adsorption performance of microfibers and nanofibers with commercial molecularly imprinted polymers and restricted access media for extraction of bisphenols from milk coupled with liquid chromatography	52
4.5.	Komentář č.5: Comparison of nanofibers, microfibers, nano/microfiber graphene doped composites, molecularly imprinted polymers, and restricted access materials for on-line extraction and chromatographic determination of ochratoxin A, zearalenone, and citrinin in plant-based milk drinks.....	54
4.6.	Komentář č. 6: Advanced nanofibrous materials for the extraction of pollutants in river waters and protein matrix	56
5.	Závěr.....	59
6.	Citace.....	62
7.	Prezentace výsledků	70
8.	Účast na projektech a stážích.....	71
9.	Přílohy	72

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACE	alternating-current electrospinning, elektrostatické zvlákňování využívající střídavý proud
ADS	alkyl-diol-silica sorbent
AOAC	association of official analytical collaboration
CIT	citric acid, citrinin
DCE	direct-current electrospinning, elektrostatické zvlákňování využívající stejnosměrný proud
GN	graphene nanoplatelets, grafenové nanovrstvy
HPLC	high performance liquid chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie
ISRP	internal surface reversed-phase, materiál s vnitřním hydrofobním povrchem
LLE	liquid-liquid extraction, extrakce z kapaliny do kapaliny
MEPS	microextraction by packed sorbent, mikroextrakce pomocí tuhého baleného sorbentu
MIP	molecularly imprinted polymer, molekulárně vtištěný polymer
MISPE	molecularly imprinted solid phase extraction, extrakce na tuhou fázi molekulárně vtištěnými polymery
MS	mass spectrometry, hmotnostní spektrometrie
NIP	non-imprinted polymer, nevtištěný polymer
NP	normal-phase system, systém normálních fází
OTA	ochratoxin A
OTB	ochratoxin B
PA	polyamide, polyamid
PAN	polyacrylonitrile, polyakrylonitril
PBT	polybutylene terephthalate, polybutylentereftalát

PCL	poly- ϵ -caprolactone, poly- ϵ -kaprolakton
PE	polyethylene, polyethylen
PET	polyethylene terephthalate, polyethylentereftalát
PLA	polylactic acid, kyselina polymléčná
PP	polypropylene, polypropylen
PTFE	polytetrafluorethylene, polytetrafluorethylen
PUR	polyurethane, polyuretan
PVC	polyvinylchloride, polyvinylchlorid
PVDF	polyvinyliden difluoride, polyvinyliden difluorid
QuEChERS	quick, easy, cheap, effective, rugged and safe, extrakční metoda – rychlý, jednoduchý, levný, efektivní, robustní a bezpečný
RAM	restricted-access material, materiál s omezeným přístupem
RASFF	rapid alert system for food and feed, systém rychlého varování pro potraviny a krmiva
RP	reversed-phase system, systém reverzních fází
RYR	red yeast rice, červená fermentovaná rýže
SBSE	stir-bar sorptive extraction, extrakce pomocí magnetického míchadla
SCX	strong cation exchange, silný iontoměnič kationtů
SPE	solid-phase extraction, extrakce na tuhou fázi
SPME	solid-phase microextraction, mikroextrakce na tuhou fázi
SPS	semi-permeable surface, semipermeabilní povrchy
UV	ultra-violet spectrum, ultrafialová oblast spektra
ZEA	zearalenone, zearalenon

1. Úvod

Nedílnou součástí většiny analytických laboratorních postupů je úprava vzorku před analýzou. Všechny biologické či potravinové vzorky po přijetí do laboratoře je potřeba před analýzou upravit a selektivně izolovat analyty z matrice. Při úpravě vzorku dochází k zakoncentrování cílových analytů, izolaci a přečištění od balastních látek matrice, které jsou nevhodné pro laboratorní instrumentaci a tím se zabrání případnému poškození analytického přístroje. Tato pre-analytická fáze je nejrizikovější částí celé analýzy vzorku a může způsobovat chyby a ztráty analytů. Tento krok ovšem na druhou stranu zvyšuje citlivost a selektivitu měření nebo také umožňuje případnou derivatizaci stanovovaných analytů před jejich detekcí.

K úpravě komplexních vzorků se nejčastěji používají různé extrakční metody. Jednou z nejčastěji používaných technik pro laboratoře všech zaměření je extrakce na tuhou fázi (SPE). Jedná se o univerzální metodu s dobrou výtěžností a nízkou spotřebou organických rozpouštědel. SPE je nejčastěji používána při zpracování kapalných vzorků, především pro extrakci středně těkavých a netěkavých látek. Při prvním kroku dochází zároveň k zakoncentrování analytů a odstranění nežádoucích látek, které ruší následná analytická stanovení.

Jedná se o poměrně jednoduchou techniku, jejíž podstatou je zachycení molekul látky na tuhém sorbentu, přes který protéká vzorek na základě rozdílné afinity matrice a analytu. Používají se nepřilíš drahé extrakční kolony či disky na jedno použití o nejrůznějších velikostech a náplních sorbentů. Mezi nejčastější sorbenty patří chemicky modifikované silikagely, polymery či kombinace těchto materiálů. Velkou výhodou metody je možnost její automatizace a její využití jak v off-line, tak i v on-line zapojení.

Technika on-line extrakce umožňuje nástřik neupravovaného vzorku přímo na extrakční předkolonu v chromatografickém systému. Vysokouúčinná či ultra-účinná kapalinová chromatografie je díky své vysoké účinnosti, dobré opakovatelnosti a robustnosti nejčastěji používanou separační metodou. Tento moderní trend spojení extrakční techniky a chromatografické separace dává vzniku spolehlivé metody pro rychlou analýzu různých vzorků. Proto i velmi komplexní či toxické vzorky mohou být dávkovány do SPE-HPLC systému s minimální či žádnou úpravou a tím je možné omezit kontakt personálu s potenciálně nebezpečnými vzorky.

Současným požadavkem moderní doby je hledání nových pokročilých sorbentů vykazujících lepší selektivitu, vyšší extrakční účinnost pro širší spektrum látek, zkrácení času pro úpravu vzorku, a také hlavně vývoj opakovaně použitelných sorbentů. Imunosorbenty, materiály s omezeným přístupem, magnetické částice, molekulárně vtištěné polymery či nanomateriály mají velký potenciál tyto požadavky splnit.

Nanomateriály jsou již několik let v experimentálních laboratořích intenzivně studovány pro využití v různých odvětvích vědy a v biotechnologických aplikacích. Avšak i v analytické chemii se nabízí jejich využití jako slibné extrakční sorbenty. Jejich vlastnosti zahrnující stabilitu, nízké cenové náklady, reprodukovatelnost a opakovatelnost extrakce splňují přísná kritéria dnešní doby, včetně možné plné automatizace. Testování a studium těchto nanovlákných sorbentů využívá jejich pozitivních vlastností a snaží se přijít na řešení jejich slabších stránek. Od prvotního off-line zapojení se nanovláknena začala také využívat na plnění extrakčních chromatografických kolonek a tím dochází k rozšíření jejich potenciálu i v přímém on-line spojení se separačními technikami.

Porovnání účinnosti různých extrakčních sorbentů v on-line chromatografickém provedení je proto prezentováno v této práci. Zjištění limitujících faktorů nanovlákných materiálů různého zapojení a testování jejich účinnosti při extrakcích kontaminujících látek z odlišných typů matric je proto logickým vyústěním předložené disertační práce.

2. Cíl práce

Cílem této disertační práce, komponované jako komentovaný soubor prací, je představit několik chromatografických metod porovnávajících různé druhy on-line extrakčních materiálů při analýze kontaminujících látek v potravinách či potravinových doplňcích.

On-line extrakce jsou výhodným spojením úpravy vzorku a separace do jednoho kroku. Nejpoužívanější metodou tohoto spojení je on-line SPE HPLC, která má výhody ve velké úspoře času, minimalizaci lidských chyb, úspoře chemikálií a zjednodušení celého procesu. V práci jsou popsány různé druhy úprav vzorků, se kterými se běžně v laboratořích pracuje, od konvenčních až po moderní trendy, které jsou často ještě ve fázi vývoje a zkoumání. On-line SPE extrakce patří mezi moderní přístupy k úpravě vzorků a je stále ještě ve fázi výzkumu z důvodu hledání řešení jejích slabších stránek.

Cílem předložené disertační práce je testování různých, zejména nanovlákných a komerčních sorbentů, vhodných pro přímé zapojení do HPLC systému a jejich vzájemné porovnání. Stěžejní částí je testování základních parametrů extrakce pro úpravu vzorku pomocí nanovlákných polymerů a porovnat jejich účinnost, chemickou a mechanickou stabilitu s ostatními, již zavedenými sorbenty pro on-line SPE HPLC. V této práci byly používány jednoduché kapalně vzorky pro zjištění extrakční účinnosti různých nanovlákných polymerů a jejich chování ve vysokotlakých systémech. Později byla testována schopnost vláken upravovat složitější a komplexnější matrice. K dispozici pro naplnění cílů práce byla široká škála nanovlákných polymerů odlišné výroby a složení připravené ve spolupráci s Technickou univerzitou v Liberci. Bylo zjištěno, že zejména způsob produkce vláken ovlivňuje jejich průměr, mechanickou stabilitu a uspořádání vhodné pro on-line extrakce. Tyto parametry ovlivňují extrakční účinnost a pouze dostatečně pevná a mechanicky odolná vlákna mohou být použita ve vysokých tlacích v kapalinové chromatografii. Nejčastěji byly pro srovnávání používány velice selektivní extrakční sorbenty na bázi molekulárně vtištěných polymerů (MIP). Dalším sorbentem zvoleným pro srovnání byly materiály s omezeným přístupem, vhodné k úpravám komplexních biologických matric s vysokým obsahem proteinů.

Hlavním cílem práce bylo představit nanovlákná jako plnohodnotný sorbent schopný konkurovat komerčním sorbentům využívaným v on-line extrakcích. Nabídnout vlákně sorbenty jako možnou alternativu a najít jejich uplatnění v environmentální či

biologické analýze s využitím jejich dostatečné extrakční účinnosti a vysoké chemické variability.

3. Teoretická část

3.1. Kontaminující látky

Předmětem této disertační práce byl vývoj chromatografických metod pro stanovení cizorodých a kontaminujících látek nejen v potravinách, ale i nápojích, léčivech a potravinových doplňcích. Klasifikace dělí kontaminanty na primární (vnější zdroje) a sekundární (vznik v potravine). Příčina výskytu cizorodých látek ve vzorku může být různá. Od nesprávné výroby a špatného technologického zpracování, tak nevhodným skladováním jak dílčích surovin (špatné skladování obilí a následný výskyt mykotoxinů ve výrobcích z nich), tak špatným skladováním finálních produktů (např. bisfenoly v mléce skladovaném v plastových lahvích). Další z možností může být i používání pesticidních přípravků, hnojení a produkce toxických látek od ušlechtilých plísní (Tokajská vína, sýry s ušlechtilou plísní). Příčiny jejich výskytu mohou být tedy naprosto odlišné.

Analýza těchto kontaminujících látek je velice náročná také z toho důvodu, že se ve vzorcích nacházejí zpravidla ve stopových množstvích. Proto je nezbytné před analýzou provést ještě důležitý prekoncentrační krok, čímž zvýšíme šanci k detekci kontaminující látky. Důležité je tedy zvolení správné a selektivní extrakční metody. Ruku v ruce s výbornou extrakční technikou je i nutnost citlivé detekce (např. fluorescenční vs. UV detektor). Důležitou pozici v analýze kontaminantů mají i univerzální širokospektré metody s hmotnostně spektrometrickým detektorem (LC-MS). Tyto metody jsou velice finančně nákladné a pro rutinní analýzu ve většině laboratoří tedy hůře dosažitelné, přestože pomáhají odhalit při jedné analýze velké množství cizorodých látek a identifikovat je pomocí určení hmoty. Můžeme proto v posledních letech sledovat vzestupný trend pro levnější metody zaměřené na sledování a analýzu užší cílené skupiny látek, než na univerzální širokospektré metody [1, 2].

Sledování cizorodých a kontaminujících látek v celém potravním řetězci, nejen v potravinách, ale i v surovinách, je nezbytnou činností státních laboratoří. Pokud dojde ke zjištění nadlimitního výskytu jakéhokoliv kontaminantu, musí laboratoř podat hlášení do Systému rychlého varování pro potraviny a krmiva (RASFF, Rapid Alert System for Food and Feed). Tento systém je využíván k ohlášení rizikových potravin za účelem jejich stažení z oběhu a společného evropského trhu [3].

Potravinová legislativa je označení širokého spektra právních předpisů, které se z různých hledisek dotýkají potravin. Lze sem zahrnout předpisy, které řeší problematiku celého potravinového řetězce – od produkce potravinářských surovin, přes jejich zpracování, distribuci až po prodej konečnému spotřebiteli. Patří sem např. předpisy regulující kvalitu potravin, ochranu zdraví lidí, ochranu životního prostředí a hospodářské a finanční záležitosti. Do legislativy, která řeší užší oblast bezpečnosti potravin, patří předpisy regulující rostlinnou a živočišnou produkci, předpisy týkající se hygieny, sanitace a správné praxe při zpracování, skladování, přepravě i prodeji potravin, předpisy stanovující limity mikroorganismů a limity škodlivých látek [3, 4]. Právě Evropská unie, přesněji Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) stanovuje limity a maximální množství výskytu a vydává závazná nařízení a právní předpisy, kterými se řídí jednotlivé země, přičemž evropská legislativa je nadřazena národní legislativě. Pokud určitá oblast není regulována předpisy EU, může si členský stát stanovit pravidla vlastní. V některých záležitostech EU umožňuje nebo požaduje, aby členské státy přijaly detailnější předpisy. Kromě toho existují v některých předpisech EU klausule s podmínkami, při jejichž splnění mohou členské státy na vlastním území upravit (zprůsňit, zmírnit či rozpracovat do podrobností) požadavky předpisů EU. O oprávněnosti takových úprav rozhodují příslušné orgány EU. K takovým úpravám mají členské státy (včetně ČR) právo se vyjádřit. Tento poměrně složitý systém zajišťuje, že v rámci EU nejsou vytvářeny zbytečné překážky volnému pohybu osob, zboží a služeb. Avšak do určité míry tento systém také umožňuje stanovit specifická národní pravidla [4].

3.2. Extrakce na tuhou fázi

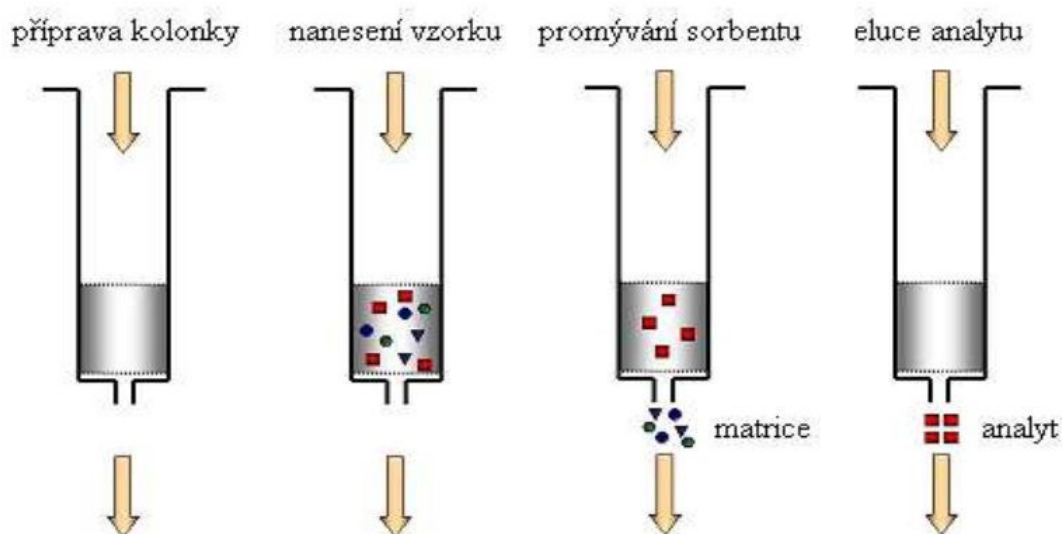
Úprava vzorku je nedílnou součástí celého procesu, kterým vzorek prochází po přijetí do laboratoře, a právě extrakční techniky jsou nejčastěji používanými metodami [1]. Z dříve používané extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE, liquid-liquid extraction) se v dnešní době přechází na extrakci na tuhou fázi (SPE, solid-phase extraction), která vyniká úsporou chemických rozpouštědel, vyšší extrakční účinností a často také i vyšší čistotou finálního produktu [1, 5]. Oblibu SPE metody zvyšuje také široká nabídka komerčních sorbentů a variabilita jejich uspořádání a zapojení a tím i široká aplikovatelnost na téměř všechny druhy kapalných matric a rozpuštěných vzorků. Volba vhodného sorbentu je klíčovým krokem každé úspěšné extrakce. Mezi nevýhody však patří časová a manuální

náročnost či vysoká spotřeba jednorázového laboratorního materiálu, čímž vyvstává i ekonomický a ekologický problém [5, 6].

SPE metoda funguje na principu adsorpce analytu na tuhém povrchu sorbentu. Molekuly látky vzorku se zachytávají na tuhém sorbentu v důsledku mezimolekulových interakcí, které je možné rozdělit na hydrofobní, polární a elektrostatické [5, 6]. Zachycené analyty jsou pak ze sorbentu eluovány za použití organických rozpouštědel nebo v případě on-line SPE HPLC zpět do mobilní fáze [7]. Tento princip je pro svoji podobnost s HPLC technikami často využíván právě v on-line spojení separačních a chromatografických technik.

3.3. Konvenční metody v SPE

Konvenční metody SPE jsou již dobře zavedené, a proto patří mezi nejrozšířenější extrakční techniky v rutinní praxi, zejména pak v laboratořích s vysokou prostupností vzorků. Jejich technické uspořádání pro úspěšnou realizaci je již optimalizované, vývoj a validace metody není nijak problematická a sorbenty jsou komerčně dostupné. Základní princip klasického uspořádání se běžně skládá z pěti kroků. Během prvního kroku dochází k předúpravě sorbentu jeho kondicionováním pomocí vhodného rozpouštědla, které odpovídá typu použitého sorbentu a poté rozpouštědlem podobným vzorku. Tím dochází k odstranění zbytků interferencí z výroby a aktivaci pevné fáze, která je připravena na dávkování vzorku. U reverzních fází se používají polární rozpouštědla mísitelná s vodou, a naopak u normálních fází je nutno použít rozpouštědla nepolární. Po nadávkování vzorku je cílová skupina látek selektivně sorbována k pevné fázi a nesorbované látky z matrice procházejí volně do odpadu. Následuje promytí sorbentu rozpouštědlem vhodným pro tento účel, aby nevymylo látky, jež mají na sorbentu zůstat, ale naopak se odstranily zbytky matrice. V této fázi by měla být v sorbentu zachycena pouze cílová látka či skupina látek, proto posledním krokem je jejich vymytí pomocí elučního rozpouštědla. Pokud se ale toto rozpouštědlo výrazně liší od promývacího roztoku v předchozím kroku, je potřeba celý sorbent před elucí vysušit proudem inertního plynu. Při eluci látek dochází k selektivní desorpci z pevné fáze [8].



Obrázek 1: Schéma extrakce na tuhou fázi

Pro extrakci na tuhé fázi se nabízí široká škála sorbentů. Silikagelové sorbenty, které jsou všestranné s vysokou extrakční účinností a mechanickou odolností, se často také používají k modifikacím kyano-, amino-, diolovými skupinami či připojením uhlíkatých řetězců, pro extrakci nepolárních látek. Nevýhodami silikagelů jsou sekundární interakce a chemická nestabilita v roztocích o pH nižším než 2 a vyšším než 8 [8, 9, 10]. Dalším typem jsou hybridní (polymerní) sorbenty, které byly vyvinuty z důvodu překonání limitace silikagelu, a proto jsou v dnešní době schopné konkurovat silikagelu v oblasti chemické stability [7]. Ko-polymery styrenu a divinylbenzenu jsou jedny z nejběžněji používaných sorbentů, které se svými modifikacemi umožňují polární, nepolární i iontové interakce [9]. Z dalších typů sorbentů lze uvést iontoměničce umožňující extrakci kyselin a zásad z vodných roztoků podle zásad iontové výměny, směsné sorbenty, imunosorbenty či materiály založené na uhlíku.

Kromě mnoha typů náplní existuje i spousta možností uspořádání celé extrakce. Mezi nejznámější typ patří SPE kolonky vyrobené z plastu či skla a dostupné v mnoha velikostech [9, 10]. Tyto kolonky se používají zejména pro menší objemy vzorků z důvodu omezeného průtoku a malého poměru průtočné plochy. Další možností jsou SPE disky umožňující využití vyšších průtokových rychlostí při dosažení stejné extrakční účinnosti díky velké průtočné ploše, proto se mohou používat pro vzorky s velkými objemy [11].

Disky jsou tvořeny buď velice hustými skleněnými vlákny se zakotvenou fází nebo mohou obsahovat pružnou PVC či PTFE síť s chemicky vázanou stacionární fází [12]. Mikrotitrační destičky byly představeny pro zvyšující se poptávku po urychlení celé fáze extrakce. Každá deska obsahuje 96, 384 nebo 1536 jamek pro samostatnou extrakci velkého množství vzorků. Může se jednat o fixní či flexibilní destičky podle možností sorbentů [12].

Mezi extrakce disperzní tuhou fází patří QuEChERS metoda, jejíž název je odvozen ze slov Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (rychlé, snadné, levné, odolné, efektivní a bezpečné) a umožňuje snadnější a méně nákladnou extrakci chemických látek v potravinách a environmentálních vzorcích [13]. Principem je extrakce látek méně polárních než voda, která probíhá pomocí acetonitrilu za přídavku anorganických solí. Extrakty jsou připraveny bez nebezpečných odpadů a s vysokou výtěžností, ale při velkém množství jednotlivých kroků, vyšší spotřebě chemikálií a za relativně dlouhou dobu při porovnání s modernějšími extrakčními technikami [13].

3.4. Moderní trendy v SPE

Kromě hledání nových sorbentů je výrazným trendem také vývoj nového uspořádání a miniaturizace celé extrakce, tzv. mikroextrakční techniky [14]. Tyto techniky jsou schopné pracovat s minimálním množstvím vzorku, což je velký přínos především v bioanalýze, a také s minimální spotřebou organických rozpouštědel. Dalším směrem vývoje extrakčních technik, kromě vyšší přesnosti a účinnosti, je zajistit co největší množství různých analytů v rámci jedné extrakce, snížit čas a náročnost úpravy [12].

Právě s malým množstvím vzorku pracuje SPME (Solid-phase microextraction), jednoduchá a účinná technika přípravy vzorku k analýze. Používá se k izolaci a zakoncentrování vzorku s minimální spotřebou organických rozpouštědel, jako miniaturizovaná SPE metoda [15]. Mikroextrakce a izolace cílového analytu probíhá na vlákne po propíchnutí septa lahvičky injekční stříkačkou, ze které se vysune křemenné vlákno pokryté sorbentem např. polydimethylsiloxanem. Vlákno se sorbentem zadrží cílový analyt a zase se uschová zpět do nerezové kapiláry. Podle způsobu vystavení vlákna vzorku se dělí tato technika na dvě metody. Při tzv. direct-immersion (DI-SPME) dochází k přímému kontaktu vlákna se vzorkem a při tzv. head-space (HS-SPME) je vlákno umístěno do par vzorku s těkavými analyty. Po dosažení rovnováhy mezi vláknem a

vzorkem se vlákno znovu zasune a celá jehla se ze vzorku opatrně vloží do nástřikového prostoru chromatografu (plynového nebo kapalinového) a vlákno se opět vysune. Tyto techniky jsou jednoduché na provedení, ale je problematické jejich spojení s HPLC [16].

Další využití malého množství plněného sorbentu je MEPS (Microextraction by Packed Sorbent), kdy se používá injekční mikrostříkačka o objemu 100-250 μl , ve které je umístěno 1-2 mg sorbentu. Celý proces tedy probíhá za minimální spotřeby vzorku a rozpouštědel [5]. Podobně je tomu i u techniky, kdy je sorbent naplněn v pipetovacích špičkách. Další možností je umístění sorbentu na magnetickém míchadle (SBSE, Stir Bar Sorptive Extraction), které je potaženo větším množstvím sorbentu [15]. SBSE je vhodná na extrakci organických látek z vodného prostředí. Přes všechny tyto výhody nejsou mikroextrakční techniky příliš rozšířené do rutinních laboratoří a nejsou využívány pro on-line automatické systémy spojené s HPLC.

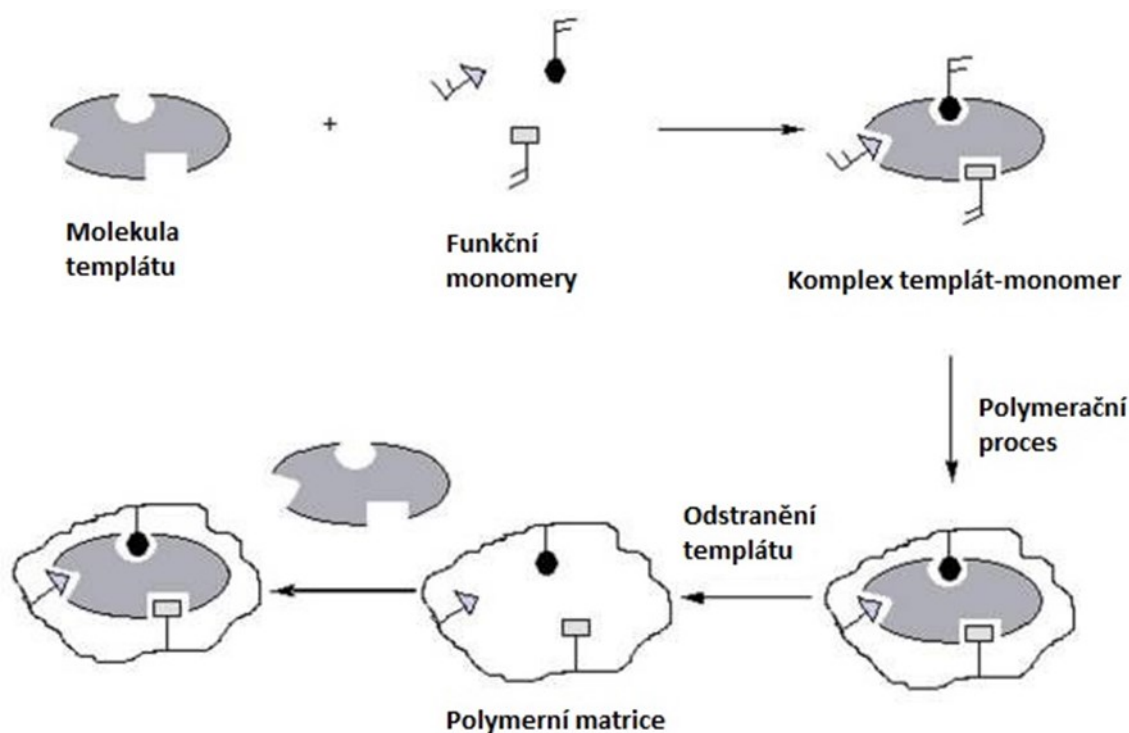
V této disertační práci byly použity nejčastěji techniky využívající sorbenty na bázi MIP, RAM a nanovláknů, kterým se budou věnovat podrobněji následující kapitoly.

3.4.1. Molekulárně vtištěné polymery

Mezi moderní techniky pro úpravu vzorku na bázi SPE patří i vysoce selektivní, jednoduchá a robustní metoda molekulárně vtištěných polymerů (MIP, Molecularly imprinted polymer). Díky své selektivitě a stabilitě jsou MIP vhodné k oddělení složité matrice a analýze komplikovaných vzorků jak chemických, tak biologických. Tato metoda, předurčená pro analýzu jedné určité látky nebo skupiny strukturních analogů, funguje na systému zámku a klíče, stejně jako je tomu u interakcí enzymů. Během syntézy vznikají na míru připravené umělé receptory pro strukturu požadované molekuly vtištěním pomocí templátové molekuly do 3D polymerní struktury. Molekulárně vtištěné sorbenty jsou připravovány třemi metodami – metodou kovalentního vtištění, nekovalentního vtištění či kombinací dvou předchozích. Jako vzorová molekula může být použita buď přímo molekula analyzované látky nebo strukturně podobná látka. Nevýhodou je dlouhý čas extrakce, použití velkých objemů rozpouštědel a riziko degradace polymerů vlivem teplotních změn.

Princip syntézy je založen na vazbách mezi templátovou molekulou a funkčním monomerem. Polymerizační směs tvoří také síťovací činidlo, radikálový iniciátor a

porogenní rozpouštědlo. Po odstranění templátu se odhalí vazebná místa v polymerní síti, která jsou komplementární k molekulové šabloně jak ve velikosti a tvaru, tak i v pozici funkčních skupin. Kritickým bodem pro výslednou selektivitu je zvolení správných poměrů při polymerizaci mezi templátem a monomerem. Komplex templát-monomer využívá nekovalentní vazby – hydrofobní π - π interakce, vodíkové vazby, iontové a dipólové interakce, van der Waalsovy síly [17]. Syntéza může probíhat i pomocí kovalentních vazeb, kdy sice vazby vznikají kontrolovaně a homogenněji, ale nevýhodou je náročné odstraňování templátu z polymeru. Proto je vhodná pouze pro omezené typy sloučenin (dioly, karboxylové kyseliny, aldehydy a ketony) a častěji je pro jednoduchost a univerzálnost využívána syntéza s nekovalentními vazbami [18].



Obrázek 2: Schéma molekulárního vtištění [19]

Porogenní rozpouštědlo má nemalý vliv na celý průběh reakce. Nejenže umožňuje pomocí fázové separace vznik pórů, ale také slouží jako ideální prostředí pro interakce a stabilizuje komplex templát-monomer [17, 20]. Velikost pórů má vliv na morfologické vlastnosti, takže pokud je použito rozpouštědlo s nízkou rozpustností, polymer se dříve separuje, vznikají větší póry a tím je menší celkový povrch. Proto se nejčastěji používají

aprotické solventy, jako jsou acetonitril či aceton, protože neruší interakci svými vodíkovými vazbami, a naopak podporují reakci mezi templátem a monomerem [21]. Polární protická rozpouštědla (metanol, voda, kys. octová) podporují vznik hydrofobních a iontových vazeb, čímž ruší interakce templátu s monomerem, a proto ztrácí výsledný MIP selektivitu [22].

Dalším důležitým faktorem pro správnou funkci MIP je míra zesítnění. Při vysokém zesítnění vzniká velmi tuhý polymer s nízkou porozitou a vyšším počtem vazebných míst, a proto lze nadávkovat velké množství vzorku, ovšem pro svou nízkou porozitu se může zvyšovat zpětný tlak. Oproti tomu při malém zesítnění je v porézním materiálu nedostatečné množství vazebných míst a struktur pro dostatečné navázání analytu, čímž dochází ke snižování extrakční kapacity. Jedním z nejčastěji používaných síťovacích činidel je glykol dimethakrylát [23]. Často dochází k polymerizaci radikálové, kdy volné radikály vznikají pomocí UV světla nebo termálně za využití radikálového iniciátoru.

Posledním krokem při přípravě MIP je vymytí templátu z vytvořených kavit. Toto uvolňování musí probíhat kvantitativně pro předcházení problémům s postupným vymýváním analytů. Nejvhodnější je intenzivní vymývání elučním solventem, kdy bývá často využívána Soxhletova extrakce. Použitím velmi strukturně podobné látky jako templátu se dá předejít falešně pozitivním výsledkům z uvolňovaného templátu [22, 24].

Existují různé způsoby přípravy MIP sorbentu, kdy hlavní z nich byly porovnány v tabulce č.1. Konvenčním způsobem přípravy MIP je bloková polymerace v roztoku, po níž je nutné výsledný monolit mechanicky rozemlít na malé částice. Tyto částice je nutné prosít na požadovanou velikost částic a také propláchnout pro vymytí drobnějších prachových částíček tzv. procesem flotace. Tento způsob přípravy je pro svou jednoduchost velice oblíbený, ale nepravidelné tvary a velikosti částic snižují účinnost extrakce [25]. Poměrně jednoduchým způsobem přípravy natištěných nosičů nevyžadujících mechanické mletí je suspenzní polymerace, která poskytuje agregáty kulovitých částic, ovšem neslučitelných s vodou, což je zásadní problém. Mikrokulovité tvary MIP s jednotnější velikostí lze získat metodou precipitační polymerace, která nabízí vyšší aktivní povrch. Při povrchové polymerizaci dochází ke vtištění přímo na povrchu různých materiálů a při polymerizaci *in situ* vzniká monolitní kolonka přímo v plášti. Ovšem tyto techniky mají složitý proces a zdlouhavou optimalizaci. Publikovány byly také práce využívající postupné víceetapové bobtnání, které je vhodné pro kombinaci

s následnou HPLC analýzou [25]. Volba polymerizace by měla záviset na zamýšleném použití MIP a požadavcích na vlastnosti MIP částic.

Tabulka 1: Stručný přehled metod polymerizace MIP [25]

Typ polymerizace	Výhody	Nevýhody
Bloková (Bulk)	Jednoduché, bez potřeby speciální instrumentace	Časově náročné kvůli drcení, prosévání a plnění kolon. Nepravidelné tvary a velikosti částic. Nízká účinnost
Suspenní (Suspension)	Kulové částice, reprodukovatelnost, rozsáhlé využití	Neslučitelnost s vodou, vyžaduje specifické povrchově aktivní látky
Vícestupňové bobtnání (multi-step swelling)	Monodisperzní kapky s kontrolovaným průměrem. Vynikající částice pro HPLC	Složité postupy a reakční podmínky, vyžaduje vodnou emulzi
Precipitace (Precipitation)	Vtíštěné mikrokuličky, jednotná velikost, vysoké výtěžky	Spotřeba velkého množství templátu a vysoký ředící faktor
Povrchová (Surface)	Monodisperzní výtěžek, tenká vrstva	Složitý systém, zdlouhavý proces
<i>In situ</i>	Jednokrokové, <i>in situ</i> proces, relativně levná a porézní struktura	Vyžaduje rozsáhlou optimalizaci pro různé druhy templátu
Sol-gel	Pohodlná a všestranná metoda pro stejně porézní povrchy, vysoká tepelná a chemická stabilita	Obtížné a pomalé navazování

3.4.1.1. Hodnocení a charakterizace MIP

Hodnocení úspěšnosti záchytu analytu ve vyrobených vtištěných polymerech se provádí pomocí selektivity, koeficientu selektivity, sorpční kapacity a specifické sorpční kapacity. Pro tyto účely je při výrobě připraven i kontrolní polymer, tzv. nevtištěný (NIP), u kterého nebyla použita templátová molekula. Tím dochází ke vzniku polymeru bez vazebných míst a pro hodnocení selektivity se využívá porovnání s NIP.

Sorpční kapacita vyjadřuje, jaké maximální množství analytu je schopen sorbent zadržet na 100 mg polymeru. Tento parametr je závislý na pórovitosti a bobtnavosti materiálu za použití různých rozpouštědel. Pro kvalitnější porovnání vzniklého polymeru se používá specifická sorpční kapacita, která porovnává rozdíl sorpčních kapacit mezi MIP a NIP. Tím dochází k odlišení obecných vlastností a afinity polymeru od vlastností získaných vtištěním.

Selektivitu MIP udává množství kavit a vazebných míst po odstranění templátové molekuly. Pro hodnocení míry selektivity, zvýšení afinity a sorpční kapacity v porovnání s NIP se používají vazebné studie. Dle požadavků na sorbent je volen statický adsorpční test nebo dynamický průtokový test. Tzv. imprinting faktor udávající sílu vazeb, efektivnost a míru vtištění určuje retenční faktor MIP a NIP [26]. Další možnosti hodnocení je porovnání IČ spekter kontrolující navázání templátu či porovnání adsorpčních izoterem pro popis kinetiky extrakce. Elektronový mikroskop pomáhá hodnotit morfologii a povrch částic a distribuce velikosti částic.

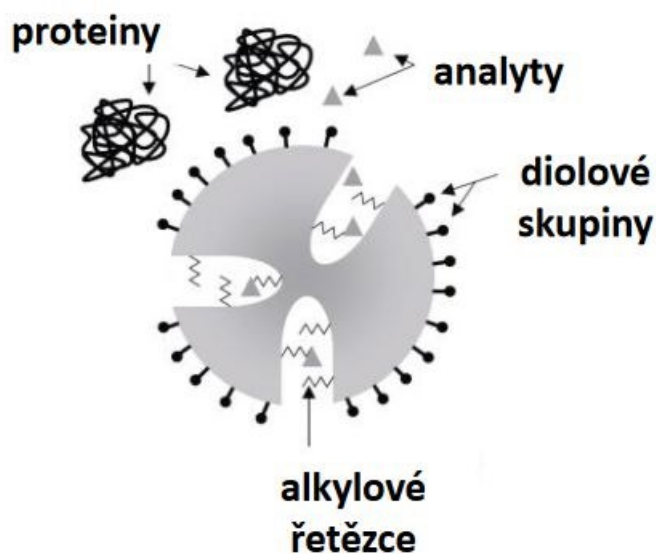
3.4.2. Materiály s omezeným přístupem (RAM)

Další skupinou extrakčních materiálů založených na extrakci na tuhé fázi jsou tzv. materiály s omezeným přístupem (RAM, restricted-access media). Termín média s omezeným přístupem zavedli Desilets et al. v roce 1991 [27]. Tyto materiály byly vyvinuty speciálně pro oddělování nízkomolekulárních látek za přítomnosti vysokomolekulárních látek v matrici bez složité předúpravy vzorku. Tyto sorbenty jsou schopny v jednom kroku přečistit matrici a zakoncentrovat analyt. Proto mohou být komplexní matrice vzorků přímo dávkovány do přístroje k detekci léčiv, jejich metabolitů, peptidů a dalších analytů.

RAM materiály jsou plněny do speciálních ocelových či plastových kolonek, pro jejich rychlé a snadné zapojení. Nejčastěji jsou používány pro zapojení do HPLC, kdy

umožňují i zapojení on-line pomocí systému přepínání kolon. Z toho důvodu je jejich velkou výhodou, vedle jednoduchosti a rychlosti analýzy, i možnost automatizace extrakce, protože umožňují přímý a opakovatelný nástřik vzorku do analytického systému.

Jejich částice mají místa pro interakci uvnitř pórů, které jsou přístupné pro malé molekuly, kde dochází k interakci na základě hydrofobních a elektrostatických interakcí dle typu sorbentu. Makromolekuly jsou odloučeny a interagují pouze s vnějším povrchem částic potaženým hydrofilními skupinami, což minimalizuje adsorpci matricových proteinů. Odstranění makromolekul funguje na základě fyzikální bariéry díky průměru pórů a hydrofilním ligandům nebo na základě chemické difúzní bariéry tvořené proteinovou či polymerovou sítí na vnějším povrchu částic. Separaci tedy umožňují dva principy – princip gelové chromatografie (separace na základě velikosti molekul) a princip adsorpční nebo iontově-výměnné chromatografie (separace na základě interakcí malých molekul se stacionární fází).



Obrázek 3: Schematická struktura materiálu s omezeným přístupem [28]

Boos a Rudolphi [29] doplnili klasifikaci RAM sorbentů podle jejich povrchové chemie. Tito autoři popsali fáze s různými typy vazeb na vnějším a vnitřním povrchu (bimodální fáze) a fáze s jedinečnou vazbou na oba povrchy (unimodální fáze). Bimodální fáze jsou charakterizovány přítomností vnějších hydrofilních a vnitřních hydrofobních

povrchů. Když mají vnitřní a vnější povrchy stejné vlastnosti, jedná se o RAM s unimodální fází [30].

Dle struktury povrchu a charakteru bariéry se tyto sorbenty dělí na několik druhů. Mezi RAM s fyzikální bariérou patří materiály s vnitřním hydrofóbním povrchem (ISRP, internal surface reversed-phase) a alkyl-diol-silica sorbenty. Dalším typem jsou RAM s chemickou bariérou, kam patří materiály s polopropustným povrchem, proteinem potažený silikagel a stíněná hydrofobní fáze [28].

3.4.2.1. Materiály s vnitřním hydrofóbním povrchem (ISRP)

Sorbenty s vnitřním hydrofobním povrchem byly představeny v roce 1986. Skládají se z porézních částic oxidu křemičitého s dvěma typy funkčních skupin vázaných k vnitřnímu a vnějšímu povrchu. Vnější povrch je pokrytý hydrofilní částí, která omezuje adsorpci proteinu (diol-glycinové skupiny) a vnitřní povrch obsahuje hydrofobní tripeptidovou rozdělovací fázi (glycin-fenylalanin-fenylalanin neboli GFF). Základem enzymatické syntézy je silikagel s velikostí pórů 8 nm, což umožňuje vyloučit proteiny větší než přibližně 20 000 Da [31, 32]. Proto krevní protein, jako je albumin s molekulovou hmotností 65 600 Da, může být přímo eluován pryč z nosiče, zatímco malé molekuly, které jsou předmětem zájmu, mohou být zadrženy v pórech tripeptidovou fází [32, 33]. Retenční mechanismus je způsoben především interakcí π -elektronů. Navíc volná karboxylová skupina koncového fenylalaninu vykazuje slabé iontoměničové vlastnosti. Materiál GFF je vhodný pro přímou analýzu léčiv a metabolitů z biologických matric.

3.4.2.2. Alkyl-diol-silica sorbent (ADS)

Nejoblíbenějším RAM sorbentem je tzv. alkyl-diol-silica (ADS). Jedná se o nejpopulárnější RAM vůbec. Je vyráběn od počátku 90. let minulého století. Jako fyzikální bariéra slouží silikagel s velikostí pórů 6 nm, který vylučuje makromolekuly díky hydrofilním skupinám (glycerylpropyl, či diol) navázaným na vnějším povrchu částic. Vnitřní povrch pokrývají reverzní fáze C4, C8 nebo C18, u novějších ADS materiálů to bývají také iontovýměnné skupiny, např. kyseliny sulfonové [28]. ADS-RP materiály snesou nástřik až 80-100 ml plazmy, a proto jsou schopny přímé analýzy léčiv, farmaceutických a endogenních sloučenin v biologických matricích.

3.4.2.3. Semipermeabilní povrchy (SPS)

Semipermeabilní povrchy (SPS) byly vyvinuty poté, co Desilets a kol. [27] prokázali, že polyoxyethylenový polymer navázaný na povrchu chromatografické náplně s reverzní fází (tj. fáze C8 nebo C18) vytváří semipermeabilní hydrofilní vrstvu, která může omezit přístup proteinu k podkladové hydrofobní stacionární fázi. Materiál SPS má vnější a vnitřní části nezávisle syntetizované a kovalentně navázané na povrchu částic silikagelu. Vnější povrch odpuzuje velké molekuly, jako jsou proteiny, zatímco vnitřní povrch, tvořený různými typy hydrofobní fáze váže malé analyty, které pronikly skrz polymerní vrstvu. Komerčně dostupné jsou SPS materiály s různými vnitřními povrchy (nitril, fenyl, C8 a C18). Životnost těchto materiálů je podobná ADS sorbentům. Na tento extrakční sorbent lze skutečně nadávkovat až 50 ml plazmy [34]. Materiál SPS byl úspěšně aplikován na analýzu malých molekul v biologických tekutinách [34].

3.4.2.4. Materiály ze silikagelu potaženého proteinem

Materiál silikagelu potažený proteinem je založen na vyloučení makromolekul pomocí chemické difúzní bariéry, jak bylo popsáno dříve. Tento sorbent však místo polymeru využívá proteinovou síť na vnějším povrchu. Extrakční princip vyvinutý pro přímé dávkování biologických tekutin byl představena Hermanssonem a Grahnem v roce 1994 [35]. Sorbent se skládá z porézních částic oxidu křemičitého s vnějším povrchem pokrytým proteinem lidské plazmy; kovalentně vázaným kyselým α -glykoproteinem (AGP), což je hydrofilní protein, který poměrně dobře snáší přítomnost organických rozpouštědel v mobilní fázi. Díky tomu je vnější povrch částic kompatibilní s proteinovým vzorkem, který nemůže proniknout do malých pórů (10 nm). Hydrofobní skupiny (C8 nebo C18) na vnitřním povrchu jsou zodpovědné za interakci s malými analyty.

3.4.2.5. Vícefunkční fáze

Vícefunkční RAM, poprvé představené Kandou a kol. [36] v roce 1994, mají stejné vlastnosti vnitřního i vnějšího povrchu. Vnitřní i vnější povrchy se skládají ze směsi hydrofilních polyoxyethylenových a hydrofobních styrenových skupin navázaných na silikonový polymer, pokrývající porézní silikagel. Dlouhé polyoxyethylenové řetězce

omezují přístup k makromolekulám, stejně jako malý průměr pórů použitého silikagelu (8nm). Proto složky matrice interagují pouze s hydrofilní, neadsorpční polymerní sítí a eluují se v mrtvém objemu. Malé analyty jsou zadržovány na navázaných hydrofobních nebo iontoměničových skupinách. K dispozici je několik extrakčních materiálů, které mají místo styrenových skupin fenyl, C8 či silný iontoměnič (SCX). Na tento extrakční materiál lze přímo dávkovat několik ml biologických tekutin bez ztráty účinnosti extrakce.

3.4.2.6. Stíněné hydrofóbní fáze (SHP)

V roce 1988 Gisch a kol. [37] vyvinuli nový postup pro přímou injekční analýzu, nazývaný stíněná hydrofobní fáze (SHP). Tento sorbent funguje na bázi silikagelu pokrytého hydrofilní sítí polyethylenoxidu se zabudovanými hydrofobními fenylovými skupinami. Kontakt makromolekul s povrchem je zabráněno hydrofilním stíněním, tedy chemickou bariérou. Malé molekuly mohou pronikat vrstvou polymeru a interagovat s hydrofobními skupinami uvnitř polymerní sítě. Tato kolona snese 16 ml séra bez významné ztráty extrakční účinnosti a byla použita pro přímou analýzu endogenních sloučenin a léčiv v biologických matricích [38].

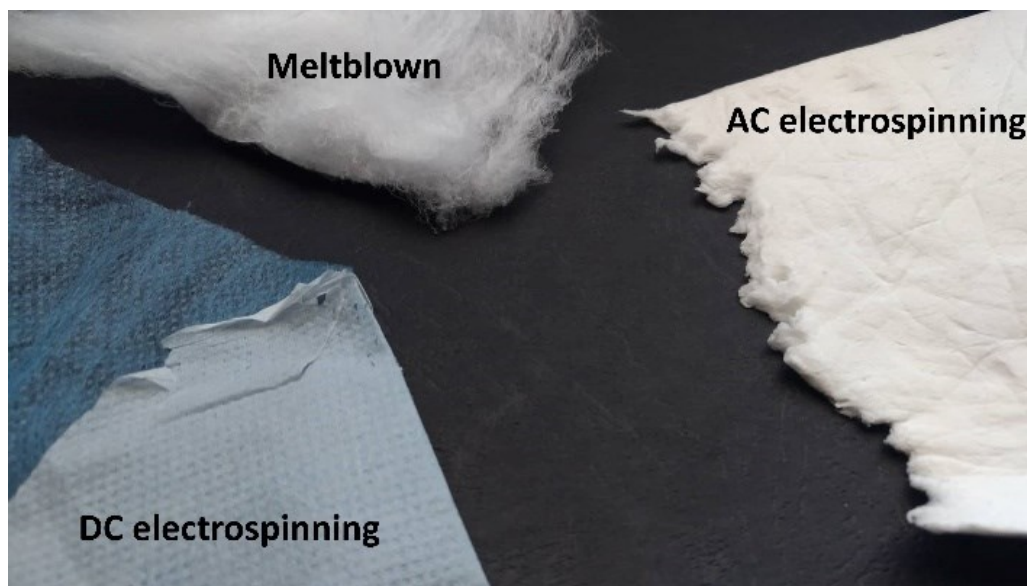
3.4.3. Nanovlákna

Nanovlákna jsou díky svým jedinečným vlastnostem materiálem 21. století. Nejčastěji jsou charakterizována jako vlákna s průměrem menším než 1 μm , přestože v literatuře lze nalézt i přísnější definice [39]. Pro účely analytické chemie a využití nanovláken jako extrakčních sorbentů jsou používána i mikrovlákna či kombinace těchto velikostí. Mikrovlákna jsou charakterizována jako vlákna s průměrem naopak větším než 1 μm .

Vlákenné materiály mají velice výhodné vlastnosti, jako je selektivita, stabilita, či vyšší sorpční kapacita díky velkému specifickému povrchu, kde může docházet k adsorpci analytů [40]. Právě tento jejich povrch je možno ještě upravovat a modifikovat a vzhledem k velkému množství výchozích materiálů je možné vyrobit nanovlákna s různými mechanickými, fyzikálními a chemickými vlastnostmi. Polyuretan [41], či polyetherimid [42] jsou například stabilní při vysokých teplotách, a proto mohou být využity pro spojení s plynovou chromatografií. Jiné polymery jsou zase stabilní v organických rozpouštědlech, a proto jsou vhodné pro spojení s kapalinovou chromatografií. Příkladem těchto materiálů jsou například polykaprolakton (PCL) [43], polyamid 6 (PA 6) [44] nebo polyethylen (PE) [45].

Vlastnosti vlákenných sorbentů jsou významně ovlivněny způsobem výroby. Nejznámějšími druhy jsou elektrostatické zvlákňování a technika meltblown neboli zvlákňování z taveniny polymeru. Vlákna vyrobená různými technikami se liší viditelně v průměru vláken a v jejich uspořádání. Mohou vypadat jako vata, tenká vrstva lepidelného papíru či nadýchaný plát molitanu, jako je znázorněno na obrázku č. 4. Každá z technik výroby má své výhody, a proto je důležité zvolit správný typ výroby pro účel využití nanovláken. Je možné dle podmínek a nastavených parametrů výroby připravit vlákna se zvýšenou porézností, s určitým povrchovým poměrem, různou smáčivostí a stabilitou [46]. Relativně nedávno byly prezentovány první aplikace elektrostatického zvlákňování pomocí střídavého proudu „alternating current electrospinning“ (ACE) namísto dříve běžně používaného stejnosměrného proudu. Výsledkem této změny typu elektrického proudu je vyšší produktivita výroby a také vznik nanosorbentů se zvýšenou stabilitou za vysokých tlaků, což je výhodné právě pro spojení extrakčních vlastností vláken s kapalinovou chromatografií. To je důkaz toho, že neustálý vývoj těchto stávajících a nových metod

výroby cílí na zvyšování produktivity, zpracovávání nových materiálů a také dopad na životní prostředí [47].



Obrázek 4: Rozdílný vzhled a struktura polymerních vláken při použití různých technik výroby.

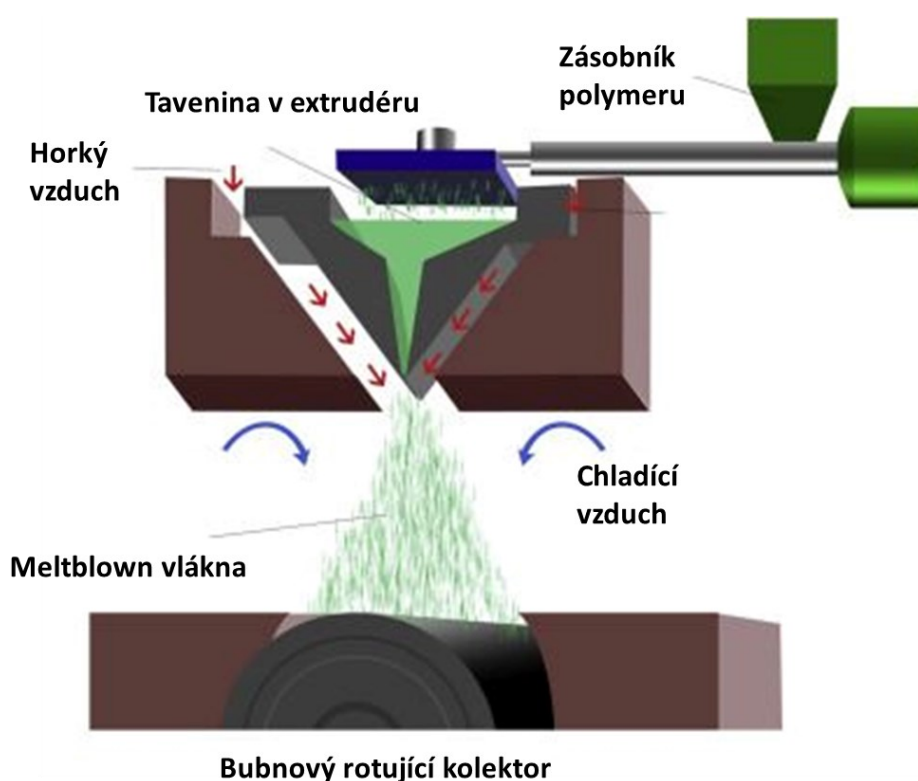
3.4.3.1. Zvlákňování z taveniny polymeru

Zvlákňování z taveniny polymeru (meltblown) je technologie výroby vláken bez použití napětí, a proto je tato technika vhodná pro materiály s nízkou dielektrickou konstantou či elektrickou vodivostí. Tato metoda je velice efektivní a z toho důvodu si našla své uplatnění i v komerčním využití nanovláken [48].

Princip spočívá v protlačení horkých polymerů (30-60 °C nad bodem tavení) skrz lineární trysku se stovkami otvorů a ochlazení vláken proudem studeného vzduchu pomocí kterého jsou nesené ke kolektoru. Během této cesty dochází k tuhnutí, zeslabování a prodlužování vláken s jemnou strukturou. Na kolektoru jsou potom sbírána mikroválka ve formě nadýchané vaty [48]. Tato technologie je velmi univerzální, pokud jde o zpracování různých typů termoplastických polymerů. Nejčastěji se používají polypropylen (PP), polyethylen (PE), polyamidy (PA) a polyestery – polyethyltereftalát (PET), polybutyltereftalát (PBT).

Vliv na tloušťku vláken má nastavení výrobních parametrů – tavicí teplota, rychlost proudu ochlazovacího vzduchu, typ a teplota trysky, nebo vzdálenost mezi tryskou a kolektorem [49]. Technologie meltblown byla dříve schopná vyrobit pouze mikroválka,

ovšem postupně se podařilo výrobní postup vylepšit natolik, že dnes mohou vznikat vlákna pod submikrometrovou hranicí [50, 51]. Výsledná vláknitá vrstva vyrobená technologií meltblown má vyšší poréznost asi o 80-90 % ve srovnání s vlákny vyrobenými technologií elektrostatického zvlákňování, dále lepší mechanické vlastnosti spolu se strukturální stabilitou, ale nižší specifický povrch. Právě lepší mechanické vlastnosti jsou výhodné pro použití v LC.



Obrázek 5: Schéma zařízení pro zvlákňování z taveniny polymeru – meltblown [52]

3.4.3.2. Elektrostatické zvlákňování využívající stejnosměrný proud

Elektrostatické zvlákňování pro výrobu vláken využívající stejnosměrný proud (DCE, direct-current electrospinning) je nejpoužívanější metodou přípravy submikronových vláken (obvykle stovky mikrometrů v průměru) z polymerních roztoků, malých molekul, koloidních částic a kompozitů [53]. Oblibu této metody podporuje jednoduchost celého procesu a nízké výrobní náklady [54].

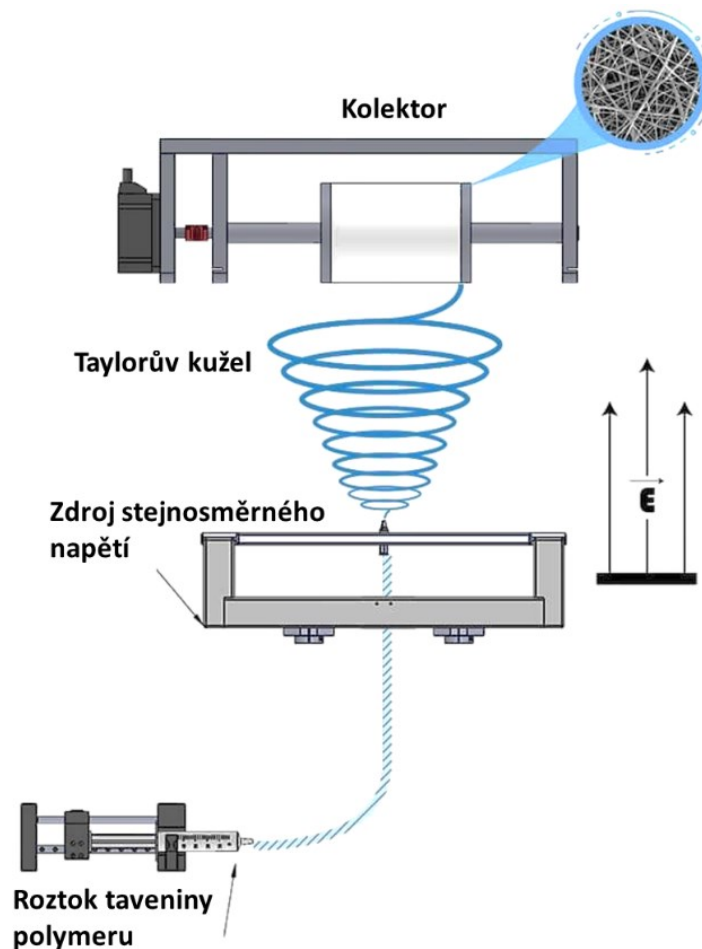
Mezi hlavní součásti celého zařízení patří vysokonapěťový napájecí zdroj, injekční pumpa, zvlákňovací tryska (jehla s tupým hrotem) a vodivý kolektor [53]. Princip

elektrostatického zvlákňování zahrnuje elektrodynamický proces, během kterého je kapička roztoku polymeru přivedena na trysku ve tvaru jehly. Tato kapička se elektrifikuje, tím se snižuje povrchový náboj a po překročení kritického napětí se vytvoří paprsek, tzv. Taylorův kužel. Tento paprsek vymrští kapičky taveniny, která překročila povrchové napětí, do trysek ve formě proudu na opačně nabitý kolektor. Během doby letu dochází k protahování vlákna, jeho ztenčování a také k tunutí [55].

Parametry výroby je třeba optimalizovat pro vznik ideálních vláken. Mezi tyto parametry, které nejvíce ovlivňují průměr a tvorbu vláken patří napětí, rychlost kapaliny na trysce a vzdálenost kolektoru od trysky. Metodou elektrostatického zvlákňování lze zvlákňovat téměř všechny polymery rozpuštěné v příslušném organickém rozpouštědle, které splňují základní charakteristiky roztoku. Jedná se především o vhodnou molekulovou hmotnost polymeru, koncentraci, povrchové napětí a viskozitu roztoku polymeru [56, 57].

Důvod řešení problému s nízkou výrobní rychlostí dal za vznik bezjehlovému systému elektrostatického zvlákňování (needleless electrospinning). Tento princip získal na oblibě a díky svým nízkým pořizovacím nákladům se stal nejpoužívanější výrobní technologií pro komerční účely. Místo jehly je elektrické pole aplikováno přímo na volnou hladinu roztoku taveniny polymeru a pomocí „samoorganizace“ se vytvářejí jemné pramínky vláken, které jsou přitahovány ke kolektoru [58].

Vlákna jsou na kolektoru formována do nahodile orientované kompaktní povrchové struktury s charakteristickou porozitou 50–70 % a vysokým specifickým povrchem. Vlákenné vrstvy připravené technikou DCE mají tendenci ke strukturálnímu kolapsu ve vysokotlakých průtokových systémech kvůli jejich charakteristické jemnosti a křehkosti.



Obrázek 6: Schéma elektrostatického zvlákňování využívající stejnosměrný proud [59]

3.4.3.3. Elektrostatické zvlákňování využívající střídavý proud

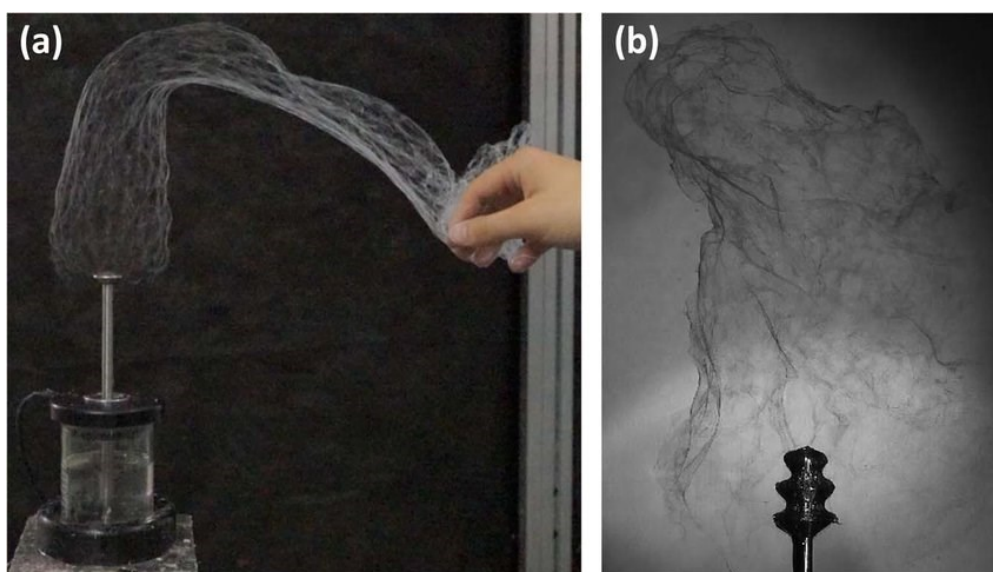
Výroba nanovláken metodou elektrostatického zvlákňování střídavým proudem (ACE, alternating-current electrospinning) je relativně novým přístupem. Dlouhé roky bylo používáno pouze zvlákňování stejnosměrným proudem, až v roce 2004 Kessick a kol. přišli s novou aplikací a důkazem, že i střídavý proud dokáže zvlákňovat polymerní vlákna [60]. Technologie výroby jsou si s DCE velmi podobné, jen pro tvorbu a odtahování proudu kapaliny je využíván střídavý proud.

Nanovlákná se „samoorganizují“ do oblaku nanovláken z roztoku polymeru změnou polarity během procesu elektrostatického zvlákňování [60]. Hlavním rysem ACE je vznik oblaku nanovláken připomínající nadýchaný rukáv. Z důvodu, že výsledný oblak nenese zbytkový náboj není zapotřebí žádný elektricky aktivní kolektor. Pohyb a přesun nanovláken usnadňuje především elektrický vítr ve směru zvlákňovací elektrody. Vzniklá

nanovláknenná příze je tvořena náhodně orientovanými vlákny se širokou distribucí průměrů [61].

Systémové vybavení pro ACE může mít různá uspořádání, ale vždy musí obsahovat zdroj vysokého napětí, kolektor a elektrodu. Důležitým parametrem, který má vliv na produktivitu a správnou výrobu, je frekvence proudu. Když je frekvence proudu příliš vysoká, přenos nábojů nebo pohyblivost iontu nemusí být dostatečně rychlá, aby dostatečně nabily roztok pro elektrostatické zvlákňování. Když je frekvence naopak příliš nízká, proud pohybující se mezi špičkou a kolektorem může obsahovat jen jedinou polaritu namísto periodických kladných a záporných segmentů [62]. Dalším důležitým parametrem je napětí a vzdálenost kolektoru od elektrody.

Ačkoli tato technologie výroby ještě není zcela prozkoumána a stále jsou určité části předmětem výzkumu, už teď lze konstatovat, že ACE má větší produktivitu tvorby vláken. Vzniklá vlákna jsou také lehce nadýchaná, a proto jsou vhodná pro využití jako extrakční sorbenty ve spojení s LC. Mají totiž mnohem větší mechanickou stabilitu za vysokých tlaků než vlákna vyrobená pomocí DCE.

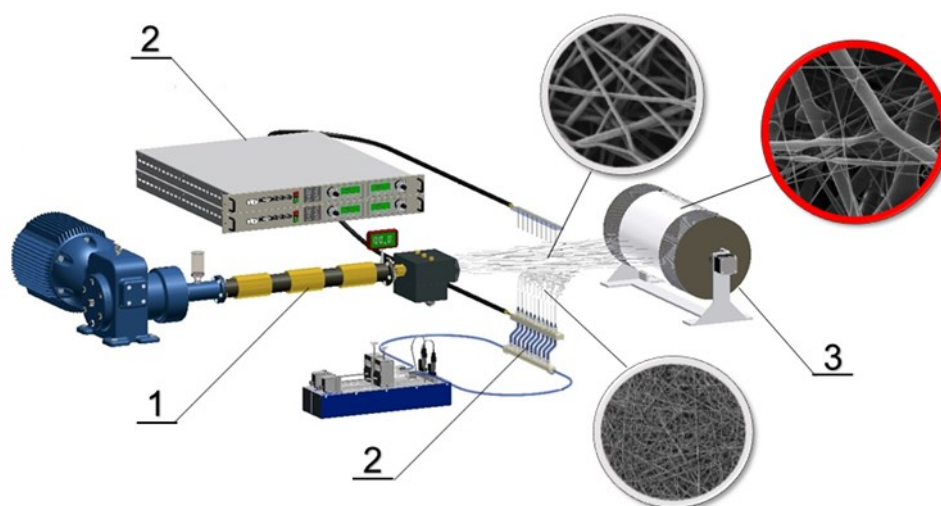


Obrázek 7: Bezprostředním produktem AC elektrostatického zvlákňování je kompaktní oblak nanovláken, se kterým lze snadno manipulovat pro další zpracování. Schopnost uchopit a manipulovat s vlákny ručně ukazuje, že tato metoda funguje bez jakéhokoli elektricky aktivního kolektoru. (b) Oblak nanovláken připomíná jemný kouř vycházející ze střídavého elektrostatického zvlákňování. Zvlákňovací hlava elektrody může být složena ze tří kotoučů. [61].

3.4.3.4. Modifikace a další úpravy vláken

Další alternativou, jak zlepšit vlastnosti vlákněných polymerů pro potřeby extrakcí analytů ze vzorku je jejich modifikace. Tu lze provést několika způsoby – výrobou kopolymerů, kompozitů, výrobou hybridních materiálů či povrchovými úpravami.

Polymer-polymerové kompozity byly studovány za účelem zlepšení chemických nebo fyzikálních vlastností jednoho z polymerů. Vlákná vyrobená technologií DCE nejsou mechanicky stabilní za vysokých tlaků, a proto je jejich spojení s HPLC problematické. Jednou z možností, jak zlepšit tyto mechanické vlastnosti DCE a zároveň i vlastnosti meltblown technologie, je spojit tyto dvě výrobní technologie dohromady. Kombinací těchto technologií vznikají směsná mikro a nanovlákná kompozitního charakteru, které mají vyšší poměr vláken v materiálu a tím se navyšuje i jejich specifický povrch [63, 64]. Homogenní vlákněná směs vzniká spojením vláken při letu na kolektor. V této době spojování nejsou vlákna ještě zcela zatuhlá, a proto dochází ke vzniku velmi pevného spojení. Spojení mikrovláken a nanovláken je velice výhodné pro mechanické vlastnosti a usnadňuje manipulaci s výsledným kompozitním materiálem. Tyto kompozitní materiály mají větší specifický povrch, který je výhodný pro jejich extrakční vlastnosti. Využitím těchto technologií lze kombinovat i různé polymery a tím dosáhnout lepších vlastností vzniklého materiálu. Takto vyrobená nanovlákná byla použita i při našich studiích [65].



Obrázek 8: Schéma kombinace technologie meltblown a technologie DC elektrostatičkého zvlákňování: 1 - zařízení technologie meltblown, 2 – zařízení technologie DC elektrostatičkého zvlákňování, 3 – bubnový kolektor se shromážděnou finální vláknitou strukturou [66]

Hybridní materiály lze také získat disperzí jiného materiálu do roztoku polymeru před jeho polymerací. Takovými materiály mohou být molekulárně vtištěné polymery, karbonová aditiva, či magnetické nanočástice. Tyto povrchové modifikace polymerních vláken zlepšují jejich vlastnosti změnou funkcionalizace povrchu.

V současné době je věnována velká pozornost nanomateriálům na bázi uhlíku, který zesiluje hydrofobní interakce. Právě přimícháním grafenu nebo oxidu grafenu do roztoku polymeru před polymerací je způsob, jak vyrobit tento nový a inovativní druh hybridních vláken. Výroba pomocí elektrostatického zvlákňování vychází z polymerů s uhlíkatým řetězcem, velmi často jde o PAN, PVDF či PCL. Prostřednictvím procesu karbonizace je pak zvlákněný materiál převeden na uhlíková nanovlákná [67]. Grafen má velkou adsorpční schopnost a také silné hydrofobní interakce s afinitou k organickým planárním strukturám s benzenovými jádry [68]. Další možností je použití oxidu grafenu, který díky svým hydroxylovým funkčním skupinám má lepší afinitu k polárnějším látkám. Nové přístupy, jako je AC elektrostatické zvlákňování, jsou slibné ve výrobě polymerů se zvýšeným poměrem grafenu, podle našich předběžných studií až 10 % (w/w). Všechny tyto nové materiály je nutné ještě podrobně prostudovat a optimalizovat i jejich výrobní procesy. O to se částečně snaží i naše screeningová studie porovnávající extrakční vlastnosti vláken vyrobených různými typy výroby a s odlišnými modifikacemi (viz kapitola 4.6).

Byla uvedena také studie o zpracování nanovláken až po polymerizaci tzv. dip coating, kdy je polymerní vlákno smáčeno či ponořováno do roztoku různých látek, například polydopaminu za účelem nanosení na polymerní vlákno pro úpravu extrakčních vlastností, zejména zvýšení smáčivosti vláken vodou [69, 70]. Všechny výše uvedené přístupy modifikací rozšiřují značný potenciál nových variací a zlepšování vlastností nanovláken.

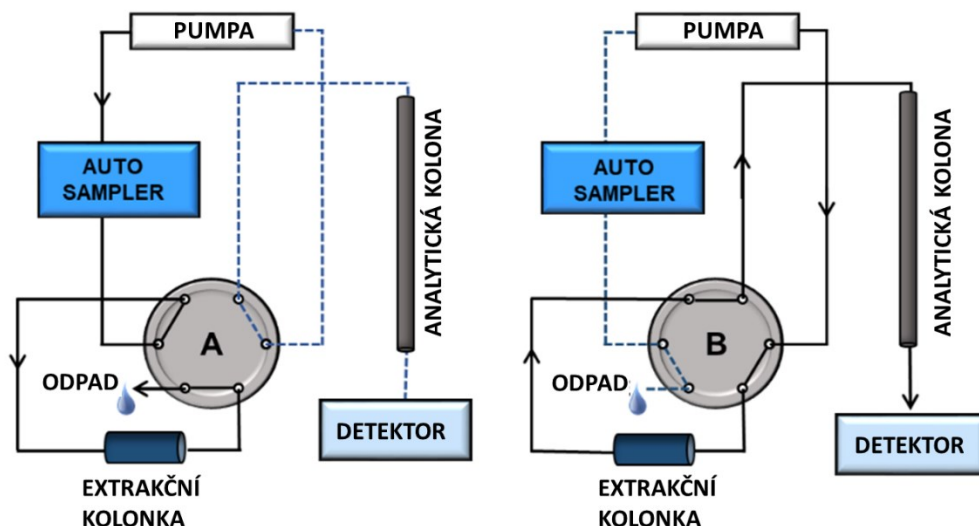
3.5. Technika přepínání kolon (column-switching system)

Extrakci na tuhé fázi lze provádět dvěma způsoby. Při off-line způsobu zapojení je úprava vzorku oddělena od následné chromatografické analýzy, na rozdíl od provedení on-line, kdy je extrakční sorbent spojen s chromatografickým systémem [71]. On-line techniky velmi snižují časovou náročnost celé analýzy díky minimální manipulaci se vzorkem. Plně automatizovaná on-line extrakce umožňuje vyšší opakovatelnost a preciznost procesu.

Dalšími důležitými výhodami je omezení laboratorních chyb, snížení rizika kontaminace i vzorku, či ztrát analytu odpařováním. Právě toto spojení extrakčních technik a chromatografického systému využívá systém přepínání kolon neboli on-line SPE HPLC.

Nejběžněji se pro on-line zapojení používají extrakce na tuhou fázi s různými sorbenty polymerními či silikagelovými s povrchovými úpravami pro RP, NP, MIP, RAM či nanovlákná. Tyto sorbenty jsou plněny do různých kolonek, kovových i plastových, schopných vydržet vysoké tlaky po zapojení do HPLC. Rozměry těchto kolonek jsou zpravidla 10 až 20 mm x 2 až 4,6 mm. Pro zvýšení selektivity lze zapojit i více kolonek za sebou [72].

Získaný vzorek je po minimální úpravě (centrifugace, filtrace) dávkován přímo do přístroje na extrakční kolonu a po extrakci následně na separační analytickou kolonu. Přepínání mezi extrakcí a separací zajišťuje vícecestný selekční ventil. Dále jsou vyžadovány také minimálně dvě pumpy, kdy jedna umožňuje promytí vzorku a odstranění balastu promývací mobilní fází a druhá pumpa vymývá analyt ze sorbentu a zajišťuje následnou separaci jednotlivých složek směsi. Celý systém je velice flexibilní, kdy tvorbou gradientu ze dvou složek zajišťuje promývací i separační část procesu [73, 74]. Po nástřiku vzorku je ventil v poloze A a vzorek je dávkován na extrakční kolonu společně s elučně slabou promývací fází tak, aby se analyt na extrakční koloně zachytil, zakoncentroval a promývací fáze vymyla veškeré interference z matrice. Výhodou je, že lze dávkovat velké objemy vzorků až do doby, než bude naplněn objem dávkovací smyčky či sorpční kapacita kolony. Při dávkování mililitrových objemů je pak možné získat značné zakoncentrování analytu v porovnání s klasickým mikrolitrovým dávkováním. Po přepnutí ventilu do polohy B dochází k eluci zachyceného analytu z extrakční kolony pomocí elučně silné mobilní fáze do analytické kolony k separaci a následné detekci. Zapojení pump a selekčního ventilu může být buď v módu straight-flush nebo back-flush. Vzhledem k zachytávání většiny analytů na čele sorbentu v koloně, back-flush mód zajišťuje efektivnější eluci s lepší fokusací chromatografické zóny [75].



Obrázek 9: Schéma on-line SPE HPLC systému v polohách extrakce a separace

On-line techniky jsou náročnější na optimalizaci, protože je nutné najít nejvhodnější podmínky pro extrakční i pro separační část současně. Ovšem čas strávený u optimalizace celé metody se poté bohatě vrátí u rychlé analýzy vzorků vyžadující minimální zásahy personálu. U optimalizace on-line technik jsou důležité parametry jako dávkovaný objem vzorku, objem a složení mobilních fází, doba promývání vzorku a průtoková rychlost [72]. Hlavními problémy jsou tlakování systému od nepravidelného průtoku sorbentem, pulzace průtoku a vznik systémového píku po přepnutí ventilu, či oscilace základní linie [73]. Důležitý je výběr analytické kolony z hlediska jejích rozměrů a vyššího tlaku v systému kvůli zapojené extrakční kolonce a také mrtvého objemu a velikosti částic.

On-line extrakce spojená s LC považovaná za moderní analytický přístup byla již použita pro různé typy analýz, a i nadále dochází k jejímu vývoji. Vylepšuje se instrumentace i SPE sorbenty, a tím dochází ke zvyšování atraktivnosti této techniky.

4. Publikované práce a komentáře

Seznam publikovaných prací

Lhotská I., **Kholová A.**, Machyňáková A., Hroboňová K., Solich P., Švec F., Šatínský D.:

Preparation of citrinin-selective molecularly imprinted polymer and its use for on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography

Analytical and Bioanalytical Chemistry (2019), 411 (11), 2395-2404, **IF 4,478– Q2**

- Podíl autorky: spolupráce na experimentální práci (optimalizace metody, validace, analýza reálných vzorků), zpracování dat

Kholová A., Lhotská I., Uhrová A., Špáňík I., Machyňáková A., Solich P., Švec F., Šatínský D.:

Determination of ochratoxin A and ochratoxin B in archived Tokaj wines (vintage 1959–2017) using on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography

Toxins (2020), 12(12), 739, **IF 5,075 – Q2**

- Podíl autorky: experimentální práce (optimalizace a validace metody, analýza reálných vzorků), zpracování dat, příprava a revize publikace

Kholová A., Lhotská I., Erben J., Chvojka J., Švec F., Solich P., Šatínský D.:

Comparison study of nanofibers, composite nano/microfiber materials, molecularly imprinted polymers, and core-shell sorbents used for on-line extraction-liquid chromatography of ochratoxins in Tokaj wines

Microchemical Journal (2021), 170, 106680, **IF 5,304 – Q1**

- Podíl autorky: experimentální práce (vývoj, optimalizace a validace metody), zpracování dat, příprava a revize publikace

Kholová A., Lhotská I., Erben J., Chvojka J., Švec F., Solich P., Šatínský D.:

Comparing adsorption performance of microfibers and nanofibers with commercial molecularly imprinted polymers and restricted access media for extraction of bisphenols from milk coupled with liquid chromatography

Talanta (2023), 252, 123822, **IF 6,556 – Q1**

- Podíl autorky: experimentální práce (vývoj, optimalizace a validace metody, analýza reálných vzorků), zpracování dat, příprava a revize publikace

Kholová A., Lhotská I., Erben J., Chvojka J., Švec F., Solich P., Šatínský D.:

Comparison of nanofibers, microfibers, nano/microfiber graphene doped composites, molecularly imprinted polymers, and restricted access materials for on-line extraction and chromatographic determination of citrinin, zearalenone, and ochratoxin A in plant-based milk drinks

Microchemical Journal (2023), 191, 108937, **IF 5,304 – Q1**

- Podíl autorky: experimentální práce (vývoj, optimalizace a validace metody, analýza reálných vzorků), zpracování dat, příprava a revize publikace

Kholová A., Lhotská I., Erben J., Chvojka J., Švec F., Solich P., Šatínský D.:

Advanced nanofibrous sorbents for the extraction of pollutants from river waters and protein matrixes

Talanta (v recenzním řízení)

- Podíl autorky: experimentální práce (vývoj, optimalizace a validace metody, analýza reálných vzorků), zpracování dat, příprava a revize publikace

4.1. Komentář č. 1: Preparation of citrinin-selective molecularly imprinted polymer and its use for on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography

V rámci seznámení se s moderními vysoce selektivními sorbenty byla věnována pozornost molekulárně vtištěným polymerům a jejich vlastní přípravě. Cílem práce bylo vyvinout, optimalizovat a validovat on-line SPE-HPLC metodu s využitím MIP ke stanovení mykotoxinu citrininu v doplňcích stravy na snižování cholesterolu.

Při výrobě nového MIP bylo testováno správné chemické složení jednotlivých komponent polymerizace sorbentů, které byly postupně testovány připojením do HPLC systému. Právě na schopnosti vázat a zachytávat cílový analyt mykotoxin citrinin byla zjišťována úspěšnost polymerizace a výroby. Na základě studia literatury byla jako templátová molekula použita 1-hydroxy-2-naftoová kyselina, která je velice strukturně podobná citrininu, ale není tak finančně nákladná jako originální mykotoxin. Z dostupných strukturních monomerů byly pro testování vybrány akrylamid a 4-vinylpyridin a jako porogenní rozpouštědlo byly použity acetonitril a aceton. Dalšími komponenty použitými pro výrobu MIP jsou síťovací činidlo ethylenglykol dimethakrylát a radikálový iniciátor azobisisobutyronitril.



Obrázek 10: Ukázka vzniklého bloku polymeru a jeho drcení před plněním do cartridge.

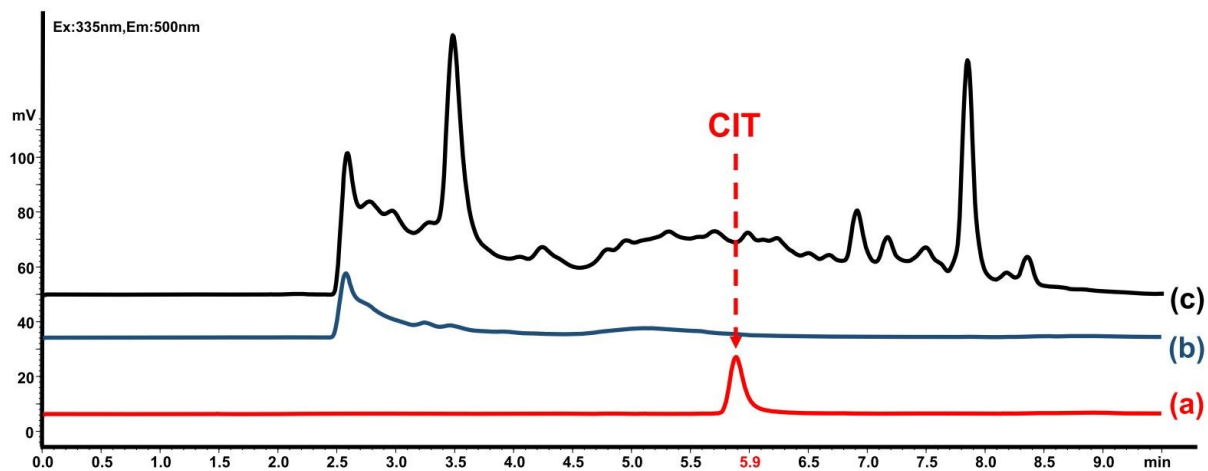
Pro hodnocení funkčnosti vyrobeného MIP se používá porovnání s nevtištěným molekulárním polymerem – NIP, který je vyroben naprosto stejným postupem a za stejných podmínek, pouze s vynecháním templátové molekuly. Porovnáním naměřených hodnot pro MIP a NIP získáme selektivitu, imprinting faktor (míru vtištění) či sorpční kapacitu.

Nejlépe tak ze 4 vzniklých kombinací vycházel MIP vyrobený z akrylamidu s acetonitrilem. Vykazoval nejvyšší selektivitu a vazebnou kapacitu v porovnání s NIP, a proto byl vybrán pro další optimalizace a následnou validaci on-line SPE-HPLC metody.

Na kolonu byl dávkován objem vzorku 50 μ l, který byl promýván 25% metanolem, aby citrinin a příbuzné sloučeniny byly v sorbentu zadrženy, zatímco balastní látky z matrice se vymývají do odpadu. Metanol má slabší eluční sílu, proto je vhodný jako promývací fáze, na rozdíl od acetonitrilu, který byl zvolen jako eluční činidlo pro analyt po přepnutí selekčního ventilu. Tato nová on-line MISPE-HPLC metoda byla validována pro použití na vzorky s předpokládaným výskytem mykotoxinu citrininu, tedy cereálie a červenou fermentovanou rýži (RYR). Tento druh RYR se používá pro výrobu doplňků stravy pro snížení cholesterolu z důvodu výskytu monakolinu K. Celá metoda trvala 9,5 minuty a byla validována s výtěžností 76-91 % a precizností 2,7 %. Pro výskyt citrininu v doplňcích stravy na bázi červené fermentované rýže je stanoven limit Evropskou unií na hodnotu 2000 μ g/kg. Tato metoda s limitem kvantifikace 2-25 μ g/kg a se svým rozsahem kalibrace byla hluboko pod tímto limitem.

Tabulka 2: Zjištěný obsah mykotoxinu citrininu v reálných vzorcích doplňků stravy a obilí.

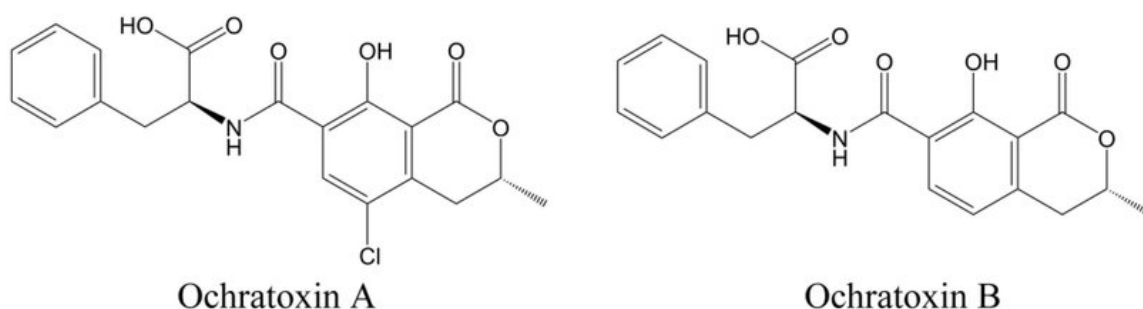
Vzorek	c CIT (μ g/kg)
LipiControl	550,5
Arterin	< LOD
Cholesten	< LOD
MycoCholest	< LOD
Reduchol	1105,8
Sibyl	< LOD
Pšenice	< LOD
Ječmen	< LOQ
Červená ferm. rýže	5292,2



Obrázek 11: Chromatogram ukazuje přečištění a selektivitu validované metody pro stanovení citrininu: A) standard citrininu o koncentraci 200 $\mu\text{g/l}$, B) záznam reálného vzorku obilí a C) záznam doplňku stravy na bázi RYR

4.2. Komentář č. 2: Determination of ochratoxin A and ochratoxin B in archived Tokaj wines (vintage 1959–2017) using on-line solid phase extraction coupled to liquid chromatography

Cílem této publikované práce bylo vyvinout jednoduchou a rychlou metodu pro kontrolu archivních Tokajských vín pro výskyt mykotoxinů ochratoxinu A (OTA) a ochratoxinu B (OTB). Tento druh mykotoxinů se často vyskytuje u obilovin, sušeného ovoce a dalších potravin, a z toho důvodu je Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny klasifikován jako potencionální karcinogen. Účinky ochratoxinů jsou převážně nefrotoxické, ale ani imunotoxické či teratogenní účinky nejsou zanedbatelné.



Obrázek 12: Mykotoxiny ochratoxiny a jejich strukturní uspořádání

Tokajská vína jsou speciální druh vín, která obsahují ušlechtilou plíseň *Botrytis cinerea*. Tento typ plísně podporuje dehydrataci bobulí a udává vínu jeho typickou sladkou chuť. Ovšem narušení povrchu bobulí hroznů jednou plísní může mít za následek i růst plísní jiných, například rodu *Aspergillus* nebo *Penicillium*, které mohou být potenciálním producentem mykotoxinů na botrytizovaných bobulích.

Analýza toxických kontaminujících látek vyžaduje velice sofistikovanou metodu. Nejen z důvodu omezení manipulace se vzorkem a tím zvýšení bezpečnosti laboranta, ale také z hlediska výskytu stopových množství těchto látek. Vyvinutá on-line SPE-HPLC metoda tyto podmínky splňovala i díky volbě citlivé fluorescenční detekce, která byla vhodná pro tyto nativně fluoreskující látky. Při analýze stopových množství látek je vhodné analyty ze vzorku zakoncentrovat. Tento krok je umožněn větším objemem nástříku vzorku a zároveň se předejde objemovému kolapsu analytické kolony. Analyty ze vzorku se v on-line kroku zachytí na sorbentu a přečistí od balastní matrice dříve, než jsou eluovány na separační analytickou kolonu.

Cílem optimalizací byla rychlá extrakce analytů a vymytí interferencí na extrakční předkolumně Ascentis Express C18 (5 × 4.6 mm, velikost částic 2.7 μm) před přepnutím selekčního ventilu a eluování analytů na kolonu. Pro separaci poměrně lipofilních molekul analytů byla zvolena kolona Kinetex Phenyl-Hexyl (100 × 4.6 mm, s velikostí částic 2.6 μm) s reverzní fází. Obě kolony mají stejný průměr a podobné velikosti částic, což snižuje zpětný tlak. Zvolené mykotoxiny jsou slabě kyselé látky, a proto byla vodná složka použité mobilní fáze okyselená 0,5% kyselinou octovou pro potlačení ionizace a zvýšení jejich retence. Vzorek vína byl dávkován bez předchozí úpravy přímo do HPLC.

Po optimalizaci byla metoda validována s limity detekce 0,03 μg L⁻¹ pro OTA a 0,06 μg L⁻¹ pro OTB. Výtěžnost metody se pohybovala mezi 93-103 %. Tato metoda byla v praxi použita pro stanovení OTA a OTB v 59 vzorcích archivních Tokajských vín. Maximální limit výskytu OTA v nápojích je stanoven Evropskou unií na 2 μg L⁻¹. Ochratoxiny byly detekovány pouze ve 4 vzorcích vín, kdy nejvyšší stanovená koncentrace byla 1,2 μg L⁻¹, která je stále pod hranicí maximálního výskytu. Bližší informace o výsledcích je ukázána v tabulce č.2 a v příložené publikované práci.

Tabulka 3: Obsah ochratoxinů v tokajských vínech, u kterých byla zjištěna kontaminace.

OTA (EU limit: 2 μg L ⁻¹)	Archívné víno 6-Put, Zlatý Strapec 1993	1,2 μg L ⁻¹
	Archívné víno Esencia, Ostrožovič 2000	0,8 μg L ⁻¹
	Muškát žltý, Slámové víno, Ostrožovič 2010	0,7 μg L ⁻¹
	Archívné víno 6-Put, Ostrožovič 1999	0,3 μg L ⁻¹
OTB	Nenalezeny	

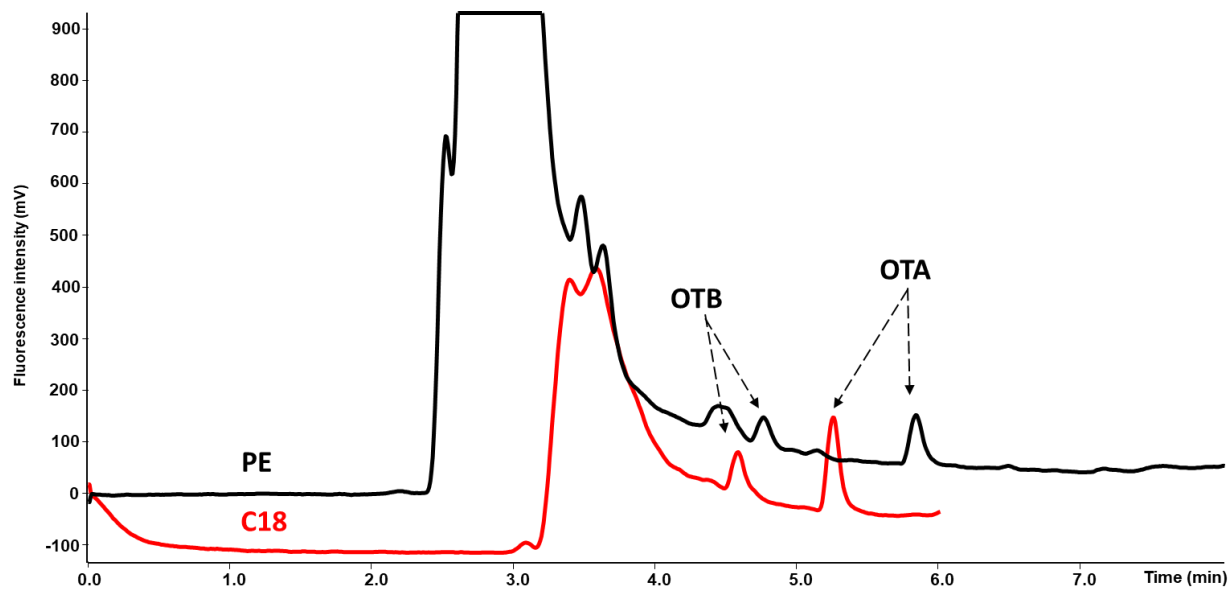
4.3. Komentář č. 3: Comparison study of nanofibers, composite nano/microfiber materials, molecularly imprinted polymers, and core-shell sorbents used for on-line extraction-liquid chromatography of ochratoxins in Tokaj wines

Po nastudování vlastností pokročilých extrakčních sorbentů byly v této práci použity získané poznatky pro porovnání tří různých sorbentů v on-line zapojení pro stanovení ochratoxinu A a ochratoxinu B v Tokajském víně. Předchozí publikace používala metodu s C18 extrakční předkolonou pro velkou screeningovou studii 59 archivních Tokajských vín a v této publikaci je vyvinutá a validovaná metoda použita pro srovnání a popis vlastností jednotlivých sorpčních materiálů.

Pro stanovení ochratoxinů ze vzorků vín byla vyvinuta a optimalizována rychlá a plně automatizovaná metoda. Víno bylo bez úpravy dávkováno přímo do systému, kde celková analýza včetně zakoncentrování, přečištění a separace na analytické koloně Kinetex Phenyl-Hexyl (100 × 4.6 mm i.d., 2.6 μm) trvala pouze 6-8 minut.

Cílem práce bylo porovnat MIP (Affinimip SPE selektivní pro Ochratoxin A) a C18 komerční předkolona (Ascentis Express RP C18) s několika typy vláknenných polymerů. Mezi testovanými sorbenty byla vlákna získaná metodou meltblown (μPP, μPE) a metodou kombinující electrospinning a meltblown (μPCL/nPCL, μPCL/nPVD). Během testování bylo nutné optimalizovat plnění cartridge polymerními vlákny, aby nedocházelo k tlakování vlivem přeplnění vlákny, optimalizovat složení promývací mobilní fáze a teplotu v systému pro každé vlákno. Teplota systému je pro nanovlákna důležitá z hlediska stability vláken. Vláknenné materiály s příměsí PCL se totiž u teplot vyšších než 20 °C rozpouštějí, gelovají a ucpávají systém. Kromě μPE neumožňovala ostatní testovaná vlákna selektivní a spolehlivou extrakci ochratoxinů z vína z důvodu rušení interferencemi v retenčním čase analytů. Právě tato vybraná mikrovlákna fungovala srovnatelně s komerční C18 extrakční předkolonou, která vykazovala vyšší citlivost a lepší opakovatelnost. Právě ruční plnění kolonek vlákny může mít vliv na nižší opakovatelnost. U vláken byla potvrzena opětovná použitelnost a robustnost ve vysokotlakých systémech, a také opakovatelné použití naplněné předkolony snižuje použití jednorázových pomůcek. Použitý MIP poskytoval dostatečnou selektivitu pouze pro OTA, hydrofilnější OTB se zadržoval pouze na základě nespecifických interakcí, stejně jako matrice a z toho důvodu bylo jeho oddělení od interferenčních látek matrice složité.

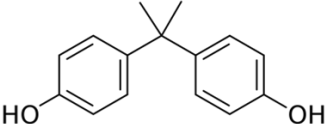
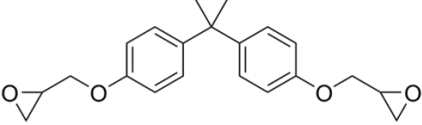
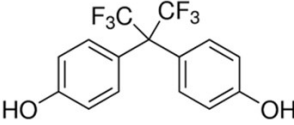
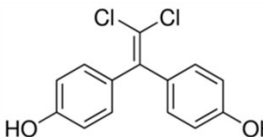
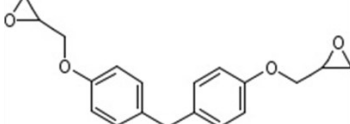
Tato studie ukázala vhodnost použití vláken ve vysokotlakých systémech a jejich konkurenceschopnost s ostatními komerčními extrakčními sorbety při analýze jednoduchých potravinových vzorků.



Obrázek 13: Porovnání dvou nejlepších sorbentů a jejich optimalizovaných metod pro stanovení ochratoxinů ve víně.

4.4. Komentář č. 4: Comparing adsorption performance of microfibers and nanofibers with commercial molecularly imprinted polymers and restricted access media for extraction of bisphenols from milk coupled with liquid chromatography

Ze získaných poznatků pro on-line spojení nanovláknenné extrakce s kapalinovou chromatografií byla v rámci dalšího studia nanovláken testována jejich schopnost přecistit i složitější matrici jako je například mléko. Proto byly pro tuto studii vybrány jako porovnávací sorbenty materiály s omezeným přístupem a molekulárně vtištěné polymery, které jsou také schopny přecistit komplexní matrice. Tyto vzorky obsahují vysoké procento makromolekulárních látek, jako jsou lipidy, proteiny a další složky, které ruší stanovení analytů. Z toho důvodu je úprava těchto vzorků před analýzou velice zdlouhavá a několikakroková procedura. Tato práce si kladla za cíl porovnat RAM, MIP a sedm nových vláknenných sorbentů pro stanovení pěti druhů bisfenolů v matrici mléka a také vyvinout rychlou metodu s minimální úpravou vzorku před analýzou.

Bisphenol A	
Bisphenol A diglycidyl ether	
Bisphenol AF	
Bisphenol C	
Bisphenol F diglycidyl ether	

Obrázek 14: Strukturní uspořádání stanovovaných bisfenolů.

Schopnost extrahovat nízkomolekulární analyty z biologických matic v přítomnosti vysokomolekulárních látek je výzvou pro každý sorbent. Proto byla zvolena pro testování vlákna různých typů výroby – meltblown, electrospinning a meltblown-co-electrospinning, kdy vznikají i 3D struktury vláken. Tyto struktury zajišťují rovnoměrnější a opakovatelnější plnění extrakční kolonky. Komerční RAM kolonky ADS RP-C18 jsou díky své jedinečné struktuře vhodné pro přímý nástřik vzorků do chromatografického systému, ovšem jejich náročná výroba, vysoká cena a horší chemická stabilita trochu ubírá na jejich atraktivnosti. Pokud by se vlákna zvládla vyrovnat kvalitám RAM, byla by výborným všestranným sorbentem pro přípravu a extrakci různých typů vzorků. Jako porovnávací MIP sorbent byl vybrán komerční Affinimip SPE selektivní pro bisfenol A a jeho příbuzné struktury.

Pro přípravu vzorku před dávkováním do HPLC byla zvolena velice rychlá proteinová precipitace s acetonitrilem v poměru 1:1 za použití centrifugy a získaný supernatant mohl být již přímo dávkován do systému na připravenou extrakční kolonku. Po přepnutí selekčního ventilu probíhala separace na analytické koloně a poté citlivá detekce na fluorescenčním detektoru. Použitelnost metody byla ověřena na třech různých typech mléka – polotučné a plnotučné kravské mléko a plnotučné kozí mléko.

Nově vyvinutá on-line SPE metoda využívající moderní sorbenty pro přímou purifikaci proteinové matrice umožnila výrazné zrychlení celého postupu oproti oficiálním AOAC metodám. Kritickým bodem srovnávací studie bylo odstranění proteinů při zachování plné funkčnosti sorbentů a opakovatelnosti celé analýzy. Bohužel MIP neměly ideální výsledky pro další srovnávání, na rozdíl od μ PCL/nPCL vláken a RAM. Tyto sorbenty umožnily dobrou extrakci bisfenolů z komplexní matrice a dosažení nejlepších limitů detekce a kvantifikace. Tyto limity jsou desetkrát nižší než současné limity stanovené Evropskou komisí. Naše kompozitní vlákna μ PCL/nPCL poskytla nejúčinnější přečištění vzorků díky vysoké polaritě sorbentu a díky 3D struktuře, která tvoří dostatečně velké prostory pro odstranění matricového balastu na základě síťového efektu a zároveň pro jemnost a tvar vláken neposkytují vazebná místa pro hydrofobní a hydrofilní interakce s makromolekulárními látkami. I další výsledky vláken byly srovnatelné s komerční RAM. Závěry z této studie pokročilých extrakčních sorbentů lze použít jako model pro zjednodušení a zkrácení oficiální metody AOAC pro stanovení bisfenolů.

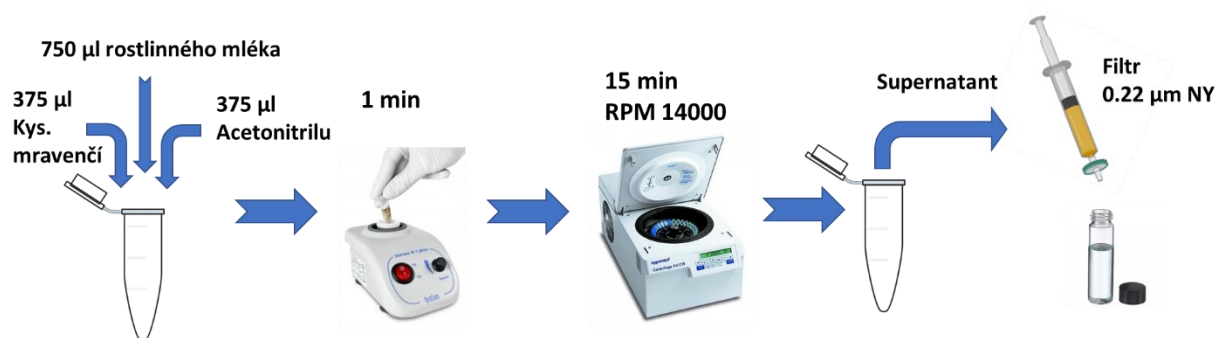
4.5. Komentář č. 5: Comparison of nanofibers, microfibers, nano/microfiber graphene doped composites, molecularly imprinted polymers, and restricted access materials for on-line extraction and chromatographic determination of ochratoxin A, zearalenone, and citrinin in plant-based milk drinks

Tato další porovnávací studie navazuje na předchozí výzkumy a testování vláken a dalších moderních sorbentů pro jejich schopnosti přečistit komplexní vzorky od balastních látek. Pro tuto studii byla zvolena rostlinná mléka jako další typ matrice obsahující makromolekulární látky, ale jiného složení. Tyto nápoje se vyrábějí přidáním vody k obilninám, semínkům či ořechům, rozmixováním této směsi a následným louhováním a scezením. Výsledný nápoj je tedy stabilní emulze proteinů, oleje, sacharidů a vody, a svým vzhledem podobný živočišnému mléku. Rostlinná mléka neobsahují, na rozdíl od mléka kravského, laktózu, liší se složením mastných kyselin a také nasycené tuky jsou mnohem nižší. Z důvodu použití semínek, ořechů či obilnin pro výrobu je reálná pravděpodobnost, že výchozí suroviny mohou být kontaminované mykotoxiny, které se mohou přenést do konečného produktu.

Cílem práce bylo porovnat tři druhy sorbentů vhodných pro on-line extrakci komplexních matric pro stanovení mykotoxinů citrininu, zearalenonu a ochratoxinu A. Porovnat jejich schopnosti extrahovat tyto analyty, přečistit matici a získat rychlou a účinnou metodu. Z tohoto důvodu byly pro testování vybrány RAM, MIP tvořené směsí komerčních MIP pro zearalenon a ochratoxin A a námi připravený MIP pro citrinin v poměru 1:1:1 a dvanáct nových druhů vlákných polymerů – μ PE, μ PP, μ PHB, μ PHB/ μ PP, μ PCL/nPVDF, nPCL i s příměsí 7,7, 20,2 a 30,7% (w/w) grafenu, nPAN, nPUR, a nPA6. Tato vlákna byla vyrobena různými postupy a měla tedy i různá rozložení průměru vláken.

V průběhu testování bylo nutné optimalizovat přípravu extrakčních kolonek, složení promývací fáze pro každý sorbent. Všechny mykotoxiny byly poměrně lipofilní a slabě kyselé látky, proto byla použita okyselená mobilní fáze pro potlačení jejich ionizace. V neposlední řadě bylo nutné optimalizovat i další chromatografické parametry pro separaci mykotoxinů a následnou detekci pomocí fluorescenčního detektoru. Během optimalizace gradientu bylo nutné zohlednit i přepínání emisních a excitačních hodnot lampy pro nastavení vhodných vlnových délek pro každý mykotoxin zvlášť. Po každém

přepnutí lampy bylo nutné před elucí dalšího analytu nechat nulovou linii detektoru pár vteřin ustálit. Retenční časy mezi jednotlivými analyty musely být proto dostatečně velké. Optimalizovaná a validovaná metoda pro RAM byla pro potvrzení funkčnosti použita pro stanovení ZEA, CIT a OTA v deseti vzorcích rýžových a ovesných rostlinných nápojů.



Obrázek 15: Ukázka rychlé a jednoduché úpravy vzorků rostlinného mléka

4.6. Komentář č. 6: Advanced nanofibrous materials for the extraction of pollutants in river waters and protein matrix

Poslední přehledová experimentální studie porovnává a testuje velké množství vláken získaných během 4 roků studia. Bylo použito přes třicet druhů polymerních vláken odlišné výroby a s různými typy modifikací – hybridní vlákna, chemicky modifikovaná vlákna, grafenem obohacená vlákna a jiná další. Na tomto širokém souboru sorbentů byla provedena podrobná studie adsorpční selektivity vláken pro několik nitrofenolů a chlorofenolů jako cílových analytů lišících se hodnotou log P. Dále byly porovnávány retenční vlastnosti našich sorbentů s komerční C18 extrakční kolonou a jejich schopnost přečistit proteinové matrice. Jako vzorová matrice byla použita říční voda a následovalo testování sorbentů na hovězím sérovém albuminu a lidském lyofilizovaném séru.

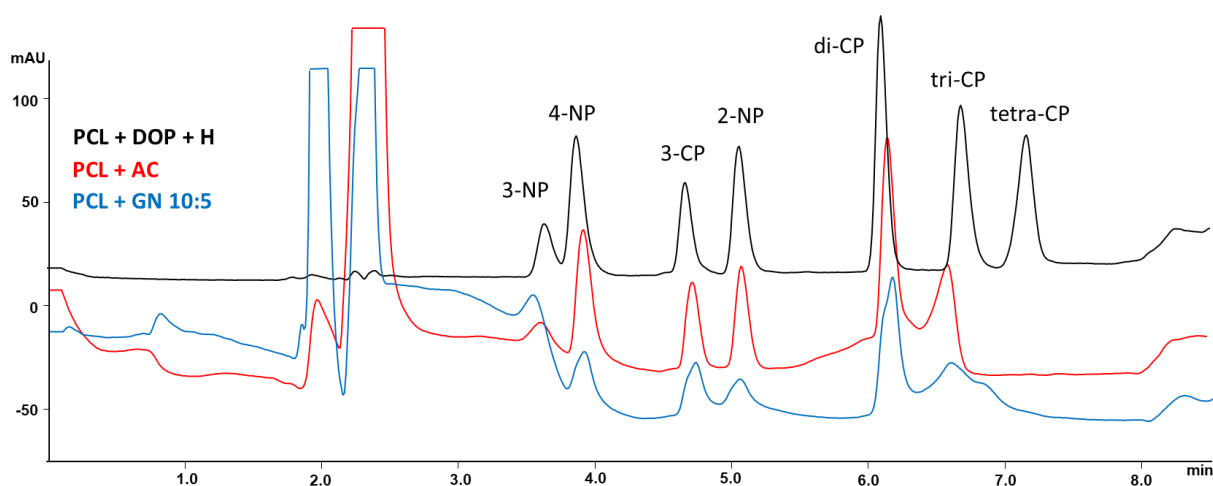
Tabulka 4: Přehledná tabulka použitých polymerních vláken

Polymer	Výroba	Poměr výroby; typ coatovaného materiálu
PHB/PP	Meltblown	10:0, 9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 5:5
tPUR	Meltblown	
PUR	AC electrospinning	
PLA	AC electrospinning	
PCL	AC electrospinning	
		Coating – grafen oxid
		Hybridní vlákna s grafenem 10:10, 10:8, 10:7, 10:6, 10:5, 10:4, 10:3, 10:2, 10:1
		Hybridní vlákna s aktivním uhlím
		Hybridní vlákna se sazemi
	Meltblown-co-electrospinning	μPCL/nPCL
		Coating – grafen oxid
		Coating – tannin
		Coating – hesperidin
		Coating – dopamin
		Coating – dopamin + heparin

Každá extrakční kolona byla naplněna 55-70 mg jednotlivých polymerních vláken. Tato kolonka byla poté vložena do kovového držáku, který se připojí přímo do HPLC přístroje. Před použitím každého vlákna musí dojít k proplachu pomocí směsi ACN/voda pro vymytí nečistot z výroby či z manipulace během ručního plnění. Takto připravená vlákna již mohou být použita k analýze. 10 μl vzorku bylo dávkováno do extrakční kolonky

k promytí od balastu a až poté je šestice ventíl přepnut a zakoncentrovaný vzorek je separován na analytické koloně. Celá devítiminutová analýza probíhá při gradientové eluci a je zakončena UV detekcí při vlnové délce 210 nm.

Kromě PLA vláken, která při zapojení do HPLC kolabovala a tlakovala systém, byla všechna ostatní vlákna dostatečně robustní a vhodná pro extrakční účely. PCL vlákna dokonce dosahovala výsledků porovnatelných s C18 extrakčním sorbentem. Vynikající výtěžnosti a přečištění matrice vzorků obsahujících proteiny v on-line SPE bylo dosaženo po aplikaci povrchově modifikovaných vláken s navázanými polyhydroxyskupinami díky jejich zvýšené smáčivosti a afinitě k polárním sloučeninám. Přestože náš výběr vláken byl demonstrován extrakcí pouze chlorofenolů a nitrofenolů z komplexních matric, je pravděpodobné, že nejlepší vlákna budou stejně dobře extrahovat další sloučeniny, čímž se rozšíří jejich aplikační rozsah.



Obrázek 16: Ukázka účinnosti on-line extrakce lidského séra o koncentraci 10 mg L^{-1} na třech vybraných vláknech – PCL vlákna potažená dopaminem a heparinem (PCL + DOP + H), PCL hybridní vlákna s aktivním uhlím (PCL + AC) a PCL hybridní vlákna s grafenem (PCL + GN).

5. Závěr

Předložená disertační práce shrnuje mou vědeckou práci za uplynulých pět let postgraduálního studia. Je věnována především moderním extrakčním technikám na tuhé fázi výlučně v on-line zapojení za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Tento výzkum navazoval na výsledky získané naší vědeckou skupinou a také na výsledky mé diplomové práce. V experimentální části první práce jsem se seznamovala s vysoce selektivními sorbenty a s jejich on-line zapojením. Spojením extrakčního a separačního kroku do jednoho vzniknou metody, které jsou rychlé, velice jednoduché a automatizovatelné. Tím se zvýší prostupnost vzorků laboratoří, minimalizují se chyby během analytické části a sníží se riziko případné nechtěné kontaminace vzorku. U kontaminujících látek je také velice důležitý krok zakoncentrování, protože tyto látky se vyskytují ve stopových množstvích. Nezbytná je také metoda s vhodně zvolenou detekcí.

Během studia byly publikovány tři srovnávací články, ve kterých byly pro extrakce zvoleny moderní sorbenty na tuhé fázi, které umožňují spojení s HPLC přístrojem pomocí systému přepínání kolon. Hlavním cílem jejich vzájemného porovnávání bylo představit nanovlákně a mikrovlákně polymery jako moderní sorpční materiál schopný konkurovat ostatním, komerčně vyráběným sorbentům. Při výzkumech byly nejčastěji používány extrakční sorbenty RAM, MIP a C18. Nedílnou součástí všech metod pro porovnávání byla i rozsáhlá optimalizace, vývoj a validace on-line SPE HPLC metod a následné testování vyvinutých metod na reálných vzorcích. Jako první matrice bylo zvoleno Tokajské víno pro stanovení ochratoxinu A a B, které nevyžaduje náročnou úpravu před dávkováním do přístroje. Bylo zjištěno, že PE vlákna mají mechanickou odolnost i za vysokých tlaků používaných v HPLC a jsou schopna přečistit a upravit matrici vína pro stanovení ochratoxinů za podobných podmínek jako ostatní komerční sorbenty. Nejlepší sorbent tohoto testování, zejména z hlediska úspory času, byla však C18 extrakční kolonka, která byla použita pro další článek kontrolní studie 59 archivních Tokajských vín pro výskyt ochratoxinu A a B.

Další testování směřovalo ke složitějším matricím, jako je například kravské mléko či rostlinná mléka pro stanovení kontaminantů – bisfenolů a mykotoxinů. V těchto studiích byla vlákna porovnávána s MIP a RAM sorbentem, který je ideální pro extrakce komplexních matric. Kompozitní vlákna μ PCL/nPCL dokázala po předchozí velice jednoduché a krátké předúpravě vzorku přečistit matrici kravského mléka od interferencí a

dalších balastních látek díky 3D polární struktuře vláken. Tím se vyrovnala ostatním testovaným sorbentům, a dokonce v některých parametrech i komerční sorbenty překonala. V matrici rostlinných mlék byla provedena podobná rychlá předúprava vzorku precipitací a poté již byl vzorek dávkován přímo do přístroje. Všechny naše vyvinuté on-line SPE-HPLC metody umožnily automatizované stanovení mykotoxinů. Nejlepší z testovaných vláken bylo nPCL, které navíc od ostatních sorbentů umožnilo nejrychlejší a účinnější přečištění matrice. Výsledky těchto studií lze použít pro zkrácení a zjednodušení oficiálních metod AOAC.

Poslední publikovanou prací byla velká přehledová a screeningová studie přibližně 30 nových druhů nanovláknenných a mikrovláknenných materiálů připravených různými typy výroby (DCE, ACE a meltblown) a použití různých modifikací vláken pro zlepšení jejich fyzikálně chemických vlastností. Každý typ výroby vláken má svá specifika, a proto i různou vhodnost pro použití ve vysokotlakých systémech. Byla vyrobena hybridní vlákna s příměsí grafenů a také vlákna na povrchu obohacená o polyfenolické látky či oxidy grafenu. Tato široká skupina vláken byla testována pro stanovení nitrofenolů a chlorofenolů v různých matricích a výsledky byly porovnány s komerční C18 extrakční předkolumnou. Nejprve byla testována schopnost extrakce na jednoduché matrici říčních vod a poté byly zvoleny komplexní matrice hovězího albuminu a lidského séra. Tímto výzkumem bylo zjištěno, že některé typy vláken jsou zcela nevhodné pro použití v těchto matricích, ať už z hlediska tlakování systému nebo z důvodu nedostatečné retence cílových analytů. Naopak PCL vlákna vyrobená DCE s modifikacemi i bez nich předčila ostatní vlákna a jejich účinnost byla srovnatelná s účinností C18 extrakčního sorbentu ve všech typech matric.

Tato práce, zabývající se rozsáhlým testováním a porovnáváním vláknenných sorbentů, ukazuje jejich potenciál a právo řadit i nanovláknena či mikrovláknena mezi moderní extrakční materiály použitelné pro úpravy vzorků v chromatografické analýze. Široká škála jejich možných modifikací dává na výběr velké množství sorbentů použitelných pro různé druhy analýz. Významným výsledkem této práce je kritické srovnání vláken s univerzálními sorbenty, jako jsou RAM a C18 extrakční sorbenty, kdy vláknenné materiály dosahovaly srovnatelné účinnosti. Žádné vyrobené vlákno nebude pravděpodobně nikdy 100% univerzální, ale z našich testů vyplývá, že PCL vlákna vykazují široký aplikační rozsah, a proto mají k této univerzálnosti nejbližší. Jejich výborné výsledky při stanovování různých látek v kravském mléce, rostlinných nápojích, říčních vodách, hovězím sérovém

albuminu či lidském séru to jen dokazují. Důležitou vlastností vláken je jejich schopnost selektivně odstranit makromolekulární látky v matricích při zachování vysoké retence cílových analytů. V dnešním světě s rostoucím zájmem o ekologii a „zelenou chemii“ jsou opakovaně použitelné a biodegradabilní vlákenné materiály také velice žádaným materiálem.

Předmětem dalších výzkumů pro použití vlákenných sorbentů v analytické chemii je otázka jejich nejefektivnějšího uspořádání v extrakční koloně či disku, dalšího objevování stabilních chemických modifikací s vysokou účinností extrakce a širokým využitím či nalezení biodegradabilního materiálu splňující tyto všechny parametry.

6. Citace

- [1] P. Hajeb, L. Zhu, R. Bossi, K. Vorkamp, Sample preparation techniques for suspect and non-target screening of emerging contaminants, *Chemosphere*, 287 (2022) 132306.
- [2] R. Díaz, M. Ibáñez, J. V. Sancho, F. Hernández, Target and non-target screening strategies for organic contaminants, residues and illicit substances in food, environmental and human biological samples by UHPLC-QTOF-MS, *Analytical Methods*, 4 (2012) 196-209.
- [3] Legislativa. *Informační centrum bezpečnosti potravin Ministerstva zemědělství* [online]. 2021 [citováno 2023-02-22]. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/kategorie/legislativa.aspx>
- [4] Právní předpisy ČR – základní informace. *Informační centrum bezpečnosti potravin Ministerstva zemědělství* [online]. 2021 [citováno 2023-02-22]. Dostupné z: <https://www.bezpecnostpotravin.cz/kategorie/legislativa.aspx>
- [5] L. Nováková, H. Vlčková A review of current trends and advances in modern bioanalytical methods: Chromatography and sample preparation, *Analytica Chimica Acta*, 656 (1-2) (2009) 8-35.
- [6] R. Costa, Newly Introduced Sample Preparation Techniques: Towards Miniaturization, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 44(4) (2014) 299-310.
- [7] B. Buszewski, M. Szultka: Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42(3) (2012) 198-213.
- [8] Sigma-Aldrich, Guide to solid phase extraction. Supelco, S.-A., Ed. USA, 1998.
- [9] A. Zwir-Ferenc, M. Biziuk, Solid phase extraction technique - Trends, opportunities and applications, *Polish Journal of Environmental Studies*, 15(5) (2006) 677-690.
- [10] L. Nováková, M. Douša, Moderní HPLC separace v teorii a praxi, 1. díl. Europrint a.s.: Praha, (2013) 448 stran, ISBN 9788027085590.
- [11] K. Wrobel, S. Kannamkumarath, K. Wrobel, Environmentally friendly sample treatment for speciation analysis by hyphenated techniques, *Green Chemistry*, 5(2) (2003) 250-259.

- [12] J. Plotka-Wasyłka, N. Szczepanska, M. de la Guardia, J. Namiesnik, Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media, *Trends in Analytical Chemistry*, 77 (2016) 23-43.
- [13] M. Sarraf, A. Beig-babaei, S. Naji-Tabasi, Application of QuEChERS method for extraction of functional compounds, *SN Applied Sciences*, 2(11) (2020) 1858.
- [14] E. Yilmaz, M. Soylak: Chapter 3 - Type of new generation separation and preconcentration methods, *New Generation Green Solvents for Separation and Preconcentration of Organic and Inorganic Species*, Elsevier (2020) 75-148.
- [15] L. Nováková, Challenges in the development of bioanalytical liquid chromatography–mass spectrometry method with emphasis on fast analysis, *Journal of Chromatography A*, 1292 (2013) 25-37.
- [16] P. Sadílek, Moderní trendy v úpravě vzorků biologického materiálu k analýze vybraných biologicky aktivních látek. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta, Katedra analytické chemie, Hradec Králové (2012)
- [17] D. A. Spivak, Optimization, evaluation, and characterization of Molecularly imprinted polymers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57 (2005) 1779-1794.
- [18] R. Walsh, Development and characterisation of molecularly imprinted suspension polymers. Waterford Institute of Technology, Pharmaceutical and Molecular Biotechnology Research Centre, Waterford (2010)
- [19] G. Vasapollo, R.D. Sole, L. Mergola, M.R. Lazzoi, A. Scardino, S. Scorrano, G. Mele, Molecularly imprinted polymers: Present and future perspectives, *International Journal of Molecular Sciences*, 12(9) (2011) 5908-5945.
- [20] N. Gilart, F. Borrull, N. Fontanals, R.M. Marcé, Selective materials for solid-phase extraction in environmental analysis, *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 1 (2014) e8-e18.
- [21] B. Sellergren, K. J. Shea, Influence of polymer morphology on the ability of imprinted network polymers to resolve enantiomers, *Journal of Chromatography A*, 635 (1993) 31-49.
- [22] M. Lasáková, P. Jandera, Molecularly imprinted polymers and their application in solid phase extraction, *Journal of Separation Science*, 32 (2009) 799-812.

- [23] G. Wulff, J. Vietmeier, H. G. Poll, Enzyme-analogue built polymers, 22. Influence of the nature of the crosslinking agent on the performance of imprinted polymers in racemic resolution, *Makromolekular Chemistry*, 188 (1987) 731-740.
- [24] M. Sobiech, P. Lulinski, Chapter Six - Magnetic molecularly imprinted microspheres—Analytical approach, *Comprehensive Analytical Chemistry*, 86 (2019) 119-152.
- [25] M. Moein Mohammad, A.-R. Mohamed, Molecularly imprinted polymers for on-line extraction techniques. *Bioanalysis*. 7(17) (2015) 2145–2153.
- [26] V. Pichon, A. Combès, Selective tools for the solid-phase extraction of Ochratoxin A from various complex samples: immunosorbents, oligosorbents, and Molecularly imprinted polymers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408 (2016) 6983-6999.
- [27] C.P. Desilets, M.A. Rounds, F.E. Regnier, Semipermeable-surface reversed-phase media for high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 544 (1991) 25.
- [28] S. Souverain, S. Rudaz, J.L. Veuthex, Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis, *Journal of Chromatography B*, 801(2) (2004) 141-156.
- [29] K.S. Boos, A. Rudolphi, The use of restricted-access media in HPLC, part I-classification and review. *LC-GC*, 15 (1997) 602–611.
- [30] N.M. Cassiano, V.V. Lima, R.V. Oliveira, A.C. de Pietro, Q.B. Cass, Development of restricted-access media supports and their application to the direct analysis of biological fluid samples via high-performance liquid chromatography, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 384 (2006) 1462-1469.
- [31] H. Hagestam, T.C. Pinkerton, Internal surface reversed-phase silica supports for liquid chromatography, *Analytical Chemistry*, 57 (1985) 1757-1763.
- [32] S.E. Cook, T.C. Pinkerton, Characterization of internal surface reversed-phase silica supports for liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 368 (1986) 233-248.
- [33] T. Nakagawa, A. Shibukawa, N. Shimono, T. Kawashima, H. Tanaka, Retention properties of internal-surface reversed-phase silica parking and recovery of drugs from human plasma, *Journal of Chromatography A*, 420 (1987) 297-311.

- [34] Z. Yu, D. Westerlund, Direct injection of large volumes of plasma in a column-switching system for the analysis of local anaesthetics I. Optimization of semi-permeable surface precolumns in the system and characterization of some interference peaks, *Journal of Chromatography A*, 725 (1996) 137-147.
- [35] J. Hermansson, A. Grahn, Determination of drugs by direct injection of plasma into a biocompatible extraction column based on a protein-entrapped hydrophobic phase, *Journal of Chromatography A*, 660 (1994) 119-129.
- [36] T. Kanda, H. Kutsuna, Y. Ohtsu, M. Yamaguchi, Synthesis of polymer-coated mixed-functional packing materials for direct analysis of drug-containing serum and plasma by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 672 (1994) 51-57.
- [37] D.J. Gisch, B.T. Hunter, B. Feibush, Shielded hydrophobic phase: a new concept for direct injection analysis of biological fluids by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 433 (1988) 264-268.
- [38] K. Uno, I. Maeda, Simultaneous determination of sulphamonomethoxine and its N4-acetyl metabolite in blood serum by high-performance liquid chromatography with direct injection, *Journal of Chromatography B*, 663 (1995) 177-180.
- [39] G. Ward, Nanofibres: media at the nanoscale, *Filtration & Separation* 42 (7) (2005) 22-24.
- [40] S. Chigome, G. Darko, N. Torto, Electrospun nanofibers as sorbent material for solid phase extraction, *Analyst* 136(14) (2011) 2879-89.
- [41] H. Bagheri, A. Aghakhani, Novel nanofiber coatings prepared by electrospinning technique for headspace solid-phase microextraction of chlorobenzenes from environmental samples, *Analytical Methods*, 3(6) (2011) 1284-1289.
- [42] H. Bagheri, A. Akbarinejad, A. Aghakhani, A highly thermal-resistant electrospun-based polyetherimide nanofibers coating for solid-phase microextraction, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(8) (2014) 2141-2149.
- [43] A. Kholová, I. Lhotská, J. Erben, J. Chvojka, F. Švec, P. Solich, D. Šatínský, Comparing adsorption performance of microfibers and nanofibers with commercial

molecularly imprinted polymers and restricted access media for extraction of bisphenols from milk coupled with liquid chromatography, *Talanta*, 252 (2023) 123822.

[44] M. Háková, H. Raabová, L. Chocholoušová Havlíková, P. Chocholouš, J. Chvojka, D. Šatínský, Testing of nylon 6 nanofibers with different surface densities as sorbents for solid phase extraction and their selectivity comparison with commercial sorbent, *Talanta*, 181 (2018) 326-332.

[45] A. Kholová, I. Lhotská, J. Erben, J. Chvojka, F. Švec, P. Solich, D. Šatínský, Comparison study of nanofibers, composite nano/microfiber materials, molecularly imprinted polymers, and core-shell sorbents used for on-line extraction-liquid chromatography of ochratoxins in Tokaj wines, *Microchemical Journal*, 170 (2021) 106680.

[46] M. Háková, L. Chocholoušová Havlíková, J. Chvojka, J. Erben, P. Solich, F. Švec, D. Šatínský, A comparison study of nanofiber, microfiber, and new composite nano/microfiber polymers used as sorbents for on-line solid phase extraction in chromatography system, *Analytica Chimica Acta*, 1023 (2018) 44-52.

[47] C.J. Luo, S.D. Stoyanov, E. Stride, E. Pelan, M. Edirisinghe, Electrospinning versus fibre production methods: from specifics to technological convergence, *Chemical Society Reviews*, 41 (13) (2012) 4708-4735.

[48] Y. Wan, K.F. Ko, Introduction to Nanofiber Materials. Cambridge University Press: Cambridge, United Kingdom, (2014) ISBN 9781139021333.

[49] J. Drabek, M. Zatloukal, Meltblown technology for production of polymeric microfibers/nanofibers: A review. *Physics of Fluids*, 31(9) (2019) 091301.

[50] R. Uppal, G. Bhat, C. Eash, K. Akato, Meltblown nanofiber media for enhanced quality factor, *Fibers and Polymers*, 14 (4) (2013) 660-668.

[51] C. J. Ellison, A. Phatak, D.W. Giles, C.W. Macosko, F.S. Bates, Melt blown nanofibers: Fiber diameter distributions and onset of fiber breakup. *Polymer*, 48 (11) (2007) 3306-3316.

[52] E. Ramazan, 18 - Advances in fabric structures for wound care, *Advanced Textiles for Wound Care (Second Edition)*, (2019) 509-540.

- [53] J.J. Xue, T. Wu, Y.Q. Dai, Y.N. Xia, Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications, *Chemical Reviews*, 119 (8) (2019) 5298-5415.
- [54] F.L. Zhou, R.H. Gong, I. Porat, Needle and Needleless Electrospinning for Nanofibers, *Journal of Applied Polymer Science*, 115(5) (2010) 2591-2598.
- [55] D. Lukas, A. Sarkar, L. Martinová, K. Vodsed'álková, D. Lubasova, J. Chaloupek, P. Pokorný, P. Mikeš, J. Chvojka, M. Komárek, Physical of electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century), *Textile progress*, 41(2) (2009) 59-140.
- [56] G. Eda, S. Shivkumar, Bead-to-fiber transition in electrospun polystyrene, *Journal of Applied Polymer Science*, 106(1) (2007) 475-487.
- [57] Q.B. Yang, Z. Y. Li, Y. L. Hong, Y. Y. Zhao, S. Qiu, C. Wang, Y. Wei, Influence of solvents on the formation of ultrathin uniform poly(vinyl pyrrolidone) nanofibers with electrospinning, *Journal of Polymer Science Part B Polymer Physics*, 42(20) (2004) 3721-3726.
- [58] M. Yu, R.H. Dong, X. Yan, G.F. Yu, M.H. You, X. Ning, Y.Z. Long, Recent Advances in Needleless Electrospinning of Ultrathin Fibers: From Academia to Industrial Production, *Macromolecular Materials and Engineering*, 302 (7) (2017) 1700002.
- [59] Our technology - Electrospinning and electrospraying are two electrohydrodynamic mechanisms used for the fabrication of micro/nanofiber and micro/nanoparticles. *Inovenso* [online]. 2023 [citováno 2023-03-10]. Dostupné z: <https://www.inovenso.com/ourtechnology/ourtechnology/>
- [60] R. Kessick, J. Fenn, G. Tepper, The Use of AC Potentials in Electrospraying and Electrospinning Processes, *Polymer*, 45 (9) (2004) 2981–2984.
- [61] J. Valtera, T. Kalous, P. Pokorný, O. Bařka, M. Bilek, J. Chvojka, P. Mikes, E.K. Kostaková, P. Źabka, J. Ornstová, J. Beran, A. Stanishevsky, D. Lukas, Fabrication of dual-functional composite yarns with a nanofibrous envelope using high throughput AC needleless and collectorless electrospinning, *Scientific Reports*, 9(1) (2019) 1801.
- [62] J. Erben, M. Klicova, A. Klapstova, M. Háková, I. Lhotská, S. Zatrochová, D. Šatínský, J. Chvojka, New polyamide 6 nanofibrous sorbents produced via alternating

current electrospinning for the on-line solid phase extraction of small molecules in chromatography systems, *Microchemical Journal*, 174 (2022) 107084.

[63] J. Erben, V. Jencová, J. Chvojka, L. Blažková, K. Strnadová, M. Modrak, E.K. Kostaková, The combination of meltblown technology and electrospinning - The influence of the ratio of micro and nanofibers on cell viability, *Materials Letters*, 173 (2016) 153-157.

[64] J. Erben, K. Pilarová, F. Sanetnik, J. Chvojka, V. Jencová, L. Blažková, J. Havlíček, O. Novák, P. Mikes, E. Prosecká, D. Lukas, E.K. Kostaková, The combination of meltblown and electrospinning for bone tissue engineering, *Materials Letters*, 143 (2015) 172-176.

[65] M. Háková, L. Chocholoušová Havlíková, J. Chvojka, F. Švec, P. Solich, D. Šatínský, Nanofiber polymers as novel sorbents for on-line solid phase extraction in chromatographic system: A comparison with monolithic reversed phase C18 sorbent, *Analytica Chimica Acta*, 1018 (2018) 26-34.

[66] J. Erben, R. Jirkovec, T. Kalous, M. Klicová, J. Chvojka, The combination of hydrogels with 3D fibrous scaffolds based on electrospinning and meltblown technology, *Bioengineering*, 9(11) (2022) 660.

[67] M. Inagaki, Y. Yang, F.Y. Kang, Carbon Nanofibers Prepared via Electrospinning. *Advanced Materials*, 24 (19) (2012) 2547-2566.

[68] X. Wang, B. Liu, Q. Lu, Q. Qu, Graphene-based materials: Fabrication and application for adsorption in analytical chemistry, *Journal of Chromatography A*, 1362 (2014) 1-15.

[69] M. Háková, L. Chocholoušová Havlíková, J. Chvojka, J. Erben, P. Solich, F. Švec, D. Šatínský, Polycaprolactone nanofibers functionalized with a dopamine coating for on-line solid phase extraction of bisphenols, betablockers, nonsteroidal drugs, and phenolic acids. *Microchimica Acta*, 186 (2019) 710.

[70] M. Háková, P. Chocholouš, A. Valachovič, J. Erben, J. Chvojka, P. Solich, F. Švec, D. Šatínský, On-line polydopamine coating as a new way to functionalize polypropylene fiber sorbent for solid phase extraction. *Talanta*, 219 (2020) 121189.

[71] M.C. Hennion, Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, 856 (1999) 3-54.

- [72] T. Hyotylainen, Principles, developments and applications of on-line coupling of extraction with chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1153 (1-2) (2007) 14-28.
- [73] C. Fernandez-Ramos, D. Satinsky, B. Smidova, P. Solich, Analysis of trace organic compounds in environmental, food and biological matrices using large-volume sample injection in column-switching liquid chromatography, *Trends in Analytical Chemistry* 62 (2014) 69-85.
- [74] J.L. Pan, C.J. Zhang, Z.M. Zhang, G.K. Li, Review of online coupling of sample preparation techniques with liquid chromatography, *Analytica Chimica Acta*, 815 (2014) 1-15.
- [75] J.C. Masini, F. Svec, Porous monoliths for on-line sample preparation: A review, *Analytica Chimica Acta*, 964 (2017) 24-44.

7. Prezentace výsledků

33rd International Symposium on Chromatography, Budapešť – Maďarsko, 2022,
posterová prezentace

11. Postgraduální a 9. Postdoktorandská vědecká konference, Hradec Králové, 2021,
ústní prezentace

4th International Caparica Christmas Conference on Sample Treatment, Lisabon – Portugalsko, 2020, posterová prezentace (cena za nejlepší poster)

10. Postgraduální a 8. Postdoktorandská vědecká konference, Hradec Králové, 2020,
ústní prezentace

16th International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Separation Technology, Gent – Belgie, 2020, posterová prezentace

Česká chromatografická škola, Zaječí – ČR, 2019, ústní prezentace

41st Mycotoxin Workshop, Lisabon – Portugalsko, 2019, posterová prezentace

9. Postgraduální a 7. Postdoktorandská konference, Hradec Králové, 2019, ústní prezentace

8. Účast na projektech a stážích

Stáž na Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (září–prosinec 2019)

Institute of Environmental Studies and Natural Resources, supervisor Prof. Dr. José Juan Santana Rodríguez

2021–2023 Grantová agentura Univerzity Karlovy, projekt č. 321421

Využití moderních chromatografických přístupů v profilování fenolických látek a analýze mykotoxinů v archivních tokajských vínech (spoluřešitel)

2020–2022 Grantová agentura České republiky, projekt č. 20-19297S

Nanovláknenné polymery s funkcí materiálů s omezeným přístupem pro on-line chromatografické extrakce komplexních matic (student spoluřešitel)

2019–2021 Grantová agentura Univerzity Karlovy, projekt č. 1134119

On-line extrakční techniky v kapalinové chromatografii s využitím moderních extrakčních sorbentů (hlavní řešitel)

2019–2021 Grantová agentura Univerzity Karlovy, projekt č. 1466119

Vývoj on-line SPE v spojení s UHPLC-DAD separací a off-line SFE v kombinácii s UHPLC-DAD-CAD/ SFC-UV-MS separací pro rychlé stanovení fenolických látek v ovocných vzorkách (spoluřešitel)

2019–2021 STARSS projekt č. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/ 0000465

Specialized Team for Advanced Research on Separation Science (student spoluřešitel)

9. Přílohy