

**Univerzita Karlova**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra analytické chemie**



**Diplomová práce**

**Stanovení kontaminantů pomocí online spojení  
extrakce a kapalinové chromatografie systémem  
přepínání kolon**

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

**Hradec Králové 2024**

**Bc. Tadeáš Čeřovský**



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

V Hradci Králové 19. 4. 2024

Tadeáš Čerovský



## **Poděkování**

Rád bych poděkoval paní PharmDr. Ivoně Lhotské, Ph.D. za čas a odborné vedení při vypracovávání této diplomové práce. Pochválit mohu jak ochotu, přístup, trpělivost, tak také i poskytnutí moc cenných odborných rad. Samozřejmě poděkování patří i Technické univerzitě v Liberci, ze které nám byla zaslána testovaná nanovlákna.



## Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Tadeáš Čeřovský

Školitel: PharmDr. Ivona Lhotská, Ph.D.

Název diplomové práce: Stanovení kontaminantů pomocí online spojení extrakce a kapalinové chromatografie systémem přepínání kolon

Tato diplomová práce se zaměřuje na testování nových typů nanovláken jako sorbent pro extrakci a její online spojení s kapalinovou chromatografií systémem přepínání kolon. V práci byla testována polyamidová nanovlákná (PA) typu PA 6, PA 11, PA 4/6, PA 6/12, PA 6(3)T. S nanovláknou typu PA 4/6, která vykazovala nejlepší extrakční vlastnosti, byla optimalizována metoda online spojení extrakce a kapalinové chromatografie systémem přepínání kolon pro stanovení kontaminantů v přírodních vodách.

Během optimalizace metody byla vybrána vhodná analytická kolona. Dále byla experimentálně zjištěna vhodná gradientová eluce, optimalizoval se proces plnění extrakční kolonky, která se ručně plnila polyamidovými nanovláknou. Byly také optimalizovány parametry jako je délka promytí a čas přepnutí ventilu, velikost nástřiku vzorku. Detekce byla provedena DAD detektorem při vlnové délce 220 nm. Výsledkem práce byla úspěšně vyvinutá a validovaná analytická metoda včetně extrakce, vykazující dobrou přesnost i preciznost.

Metoda byla poté použita pro stanovení kontaminantů v řekách z různých míst v České republice. Kontaminanty, které si tato práce dala za cíl stanovovat, jsou výběr pesticidů a fenolických látek, které se mohou objevovat v řekách, podzemních vodách, okolní půdě. Únik těchto látek do přírody je hlavně důsledkem průmyslové výroby a hnojení půd. Žádný z hledaných analytů nikde nedosahoval limitu kvantifikace. To je obecně pozitivní zpráva, jelikož vzhledem k jejich toxickým účinkům je snaha je z místních vod a okolních půd co nejvíce eliminovat.





## **Abstract**

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Tadeáš Čeřovský

Supervisor: PharmDr. Ivona Lhotská, Ph.D.

Title of the diploma thesis: Determination of contaminants using online hyphenation of extraction and liquid chromatography via column-switching system

This diploma thesis is focused on testing new types of nanofibers as sorbents for extraction and their online connection with liquid chromatography using a column-switching system. In this work, polyamide nanofibers (PA) were tested, including types PA 6, PA 11, PA 4/6, PA 6/12, and PA 6(3)T. PA 4/6 nanofibers, which exhibited the best extraction properties, were applied for a method optimization using the online connection of extraction and liquid chromatography via a column-switching system for the determination of contaminants in natural waters. During the method optimization, a suitable analytical column was selected. Furthermore, optimal gradient elution was determined experimentally, and the process of packing the extraction column, manually filled with polyamide nanofibers, was optimized. Parameters such as duration of washing, valve switching time, and sample volume were also optimized. Detection was carried out using a DAD detector at a wavelength of 220 nm. The result of the work was a successfully developed and validated analytical method, including extraction, demonstrating good accuracy and precision.

Afterwards, the method was applied for the determination of contaminants in rivers from various locations in the Czech Republic. The target contaminants in this thesis are a selection of pesticides and phenolic compounds that may appear in rivers, groundwater, and surrounding soil. The release of these substances into the environment is mainly a consequence of industrial production and soil fertilization. None of the sought analytes reached the limit of quantification. This is generally positive news, as efforts are made to minimize their presence in local waters and surrounding soils due to their toxic effects.



## Obsah

1	Úvod .....	15
2	Cíl a popis práce .....	16
3	Teoretická část .....	17
3.1	Kontaminanty – sledované analyty .....	17
3.1.1	4-nitrofenol .....	17
3.1.2	Bisfenol A.....	18
3.1.3	2,4,6-trichlorfenol .....	19
3.1.4	Nonylfenol .....	20
3.1.5	Cypermethrin a deltamethrin .....	21
3.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) .....	23
3.2.1	Povrchově porézní částice.....	24
3.3	Extrakce na tuhé fázi a její online spojení s HPLC .....	25
3.4	Nanovlákná.....	28
3.4.1	Technologie melt-blown .....	29
3.4.2	Technologie elektrostatického zvlákňování (electrospinning).....	30
3.4.3	Polyamidová vlákna.....	31
3.4.3.1	Polyamid 6 – Nylon.....	33
3.4.4	Využití polyamidů pro extrakci.....	34
4	Experimentální část.....	36
4.1	Přístrojové vybavení, materiály a pomůcky .....	36
4.2	Použité standardy, chemikálie a vzorky .....	36
4.3	Příprava roztoků .....	38
4.3.1	Příprava zásobních roztoků .....	38
4.3.2	Příprava pracovních roztoků .....	38

4.3.3	Příprava mobilních fází .....	39
4.4	Optimalizace chromatografických podmínek .....	39
4.4.1	Volba chromatografické kolony .....	39
4.4.2	Optimalizace gradientové eluce .....	43
4.5	Optimalizace online zapojení SPE .....	45
4.5.1	Proces plnění extrakční kolony .....	45
4.5.2	Volba sorbentu .....	48
4.5.3	Volba promývací mobilní fáze a stabilita .....	48
4.5.4	Délka promytí a následné přepnutí ventilu .....	50
4.5.5	Velikost nástřiku .....	52
4.6	Shrnutí optimalizovaných podmínek .....	54
4.7	Validace metody .....	55
4.7.1	Test způsobilosti systému (SST) .....	56
4.7.2	Linearita .....	57
4.7.3	Preciznost .....	59
4.7.4	Přesnost .....	60
4.7.5	Limit kvantifikace a limit detekce .....	60
4.8	Stanovení obsahu látek v reálných vzorcích .....	61
5	Závěr .....	64
6	Seznam použité literatury .....	65

## Seznam zkratek

ACN	acetonitril
EPA (U. S.)	Úřad pro ochranu životního prostředí
FLD	fluorescenční detektor
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MeOH	methanol
MS	hmotnostní spektrometrie
NP-HPLC	HPLC na normálních fázích
PA	polyamid
PVC	polyvinylchlorid
RP-HPLC	HPLC na obrácených fázích
RSD	relativní směrodatná odchylka
SEM	skenovací elektronový mikroskop
SPE	extrakce na tuhou fázi
TUL	Technická univerzita Liberec
UV	ultrafialová detekce



## 1 Úvod

V oblasti analytické chemie se v současnosti usiluje o co největší miniaturizaci a automatizaci všech procesů. Důvodem je zkrácení doby analýzy, omezení lidské chybovosti a také zmenšení celkové spotřeby organických činidel a samotného analyzovaného materiálu. Snahu o automatizaci naplňuje právě i online spojení extrakce a kapalinové chromatografie. Jako slibný materiál pro extrakci se díky své velké absorpční ploše jeví nanovláknenné polymery. Jedná se o poměrně různorodý materiál, protože je polymerů spousta druhů, a lze je tak použít pro širokou škálu analýz.

V této práci byla konkrétně vyzkoušena nanovláknna vyrobená z polyamidů. Polyamid 6 je již poměrně zavedeným materiálem v analytické chemii a jsou s ním dobré zkušenosti. Proto si dala tato práce za cíl otestovat také jiné druhy polyamidů. Nanovláknna byla použita jako extrakční sorbent pro stanovení kontaminantů životního prostředí pomocí online spojení extrakce a kapalinové chromatografie systémem přepínání kolon.

## 2 Cíl a popis práce

Cílem této práce bylo otestování nových typů polyamidových nanovláken. Sledovala se zde jejich stabilita, retence a také jejich selektivita pro modelové analyty. Všechna testovaná nanovláknata byla vyrobená na Technické univerzitě v Liberci technikou elektrostatického zvlákňování.

S nanovláknou, která vykazovala nejlepší extrakční vlastnosti, se poté optimalizovala metoda online spojení extrakce a kapalinové chromatografie systémem přepínání kolon pro stanovení kontaminantů v přírodních vodách.

Během práce byly optimalizovány podmínky jak extrakční, tak chromatografické. U podmínek chromatografických byla vybrána vhodná kolona, mobilní fáze a nastavena gradientová eluce. Optimalizace extrakčních podmínek zahrnovala primárně proces plnění extrakční kolonky, volbu vhodného polyamidového nanovláknata jakožto sorbentu, délku promytí kolonky a následné přepnutí ventilu, ale také velikost nástřiku vzorku. Následně byly ověřeny validační parametry jako test způsobilosti systému, linearita, preciznost a přesnost a také limit kvantifikace a limit detekce.

Po validaci metody došlo k vlastnímu stanovení vybraných kontaminantů v reálných vzorcích, které reprezentovaly vzorky různých řek z různých míst v České republice.



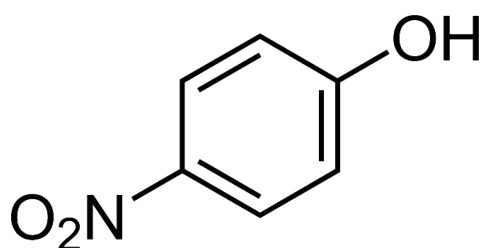
## 3 Teoretická část

### 3.1 Kontaminanty – sledované analyty

#### 3.1.1 4-nitrofenol

Prvním sledovaným analytem v této práci je 4-nitrofenol. Jeho použití je velmi rozsáhlé, nejčastěji se jedná o výrobu barviv, pesticidů, výbušnin, léčiv, polymerů ve strojírenství, nebo například se používá při výrobě maziva proti korozi. Kvůli těmto výrobním procesům se velmi často vyskytuje v odpadních vodách průmyslových továren. Americká organizace Environmental protection agency (EPA), v překladu Úřad pro ochranu životního prostředí, uvádí 4-nitrofenol na seznamu významných kontaminantů (Priority Pollutant List). Jedná se tedy o látku, která je sledována a je snaha ji co nejvíce regulovat [1,2].

Hlavní nevýhodou je vysoká rozpustnost právě ve vodě a jeho velká stabilita v přírodě. To může velmi lehce negativně ovlivnit okolní organismy, tedy i ten lidský – ať už je to přes dýchací systém, ústa, přes trávicí systém, či s jedná o pouhý kontakt s kůží. To pak vede k nepříznivým účinkům na játra, ledviny, na buňky krve a na centrální nervový systém. Dále je 4-nitrofenol označován jako potenciální karcinogen, teratogen a mutagen, který ohrožuje lidi, zvířata i rostliny už při velmi nízké koncentraci [1,3,4].



Molekulová hmotnost: 139,11

log P: 1,44

pKa: 8,569

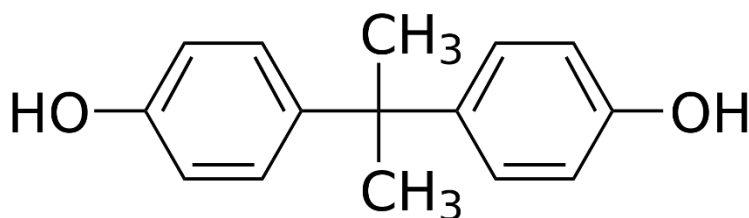
[5]

### 3.1.2 Bisfenol A

Jedná se o organickou sloučeninu ze skupiny bisfenolů. Řadí se mezi takzvané endokrinní disruptory, tedy o látku s estrogení aktivitou [6].

Bisfenol A se především používá pro výrobu epoxidových pryskyřic a polykarbonátových plastů. Tedy hlavně k výrobě plastových přístrojů, CD a DVD a plastových nádob. Polykarbonátové plasty mají využití i v potravinářství, i proto je jejich kontrola důležitá. Dále se využívá při výrobě povrchových laků pro konzervy, pro kovová víčka nádob, ale například se jím potírají i polyvinylchloridové (PVC) trubky. Z těchto výrobků se bisfenol A může dostat i do vodního prostředí a mít pak neblahý účinek na okolní flóru i faunu [6,7].

Vodní prostředí není jediným rizikovým zdrojem, svůj podíl má i vzduch a půda. Primární cesta intoxikace však vede skrze kontaminované potraviny. Jeho vliv na lidský organismus je cytotoxický, genotoxický, neurotoxický a reprodukčně toxický. Evropská komise stanovila limit kontaminace u jídla, které se dostane do kontaktu s plasty na 0,05 mg/kg, jedná se o maximální hodnotu, která nesmí být překročena [7,8].



Molekulová hmotnost: 228,29

log P: 3,32

pKa: 9,6

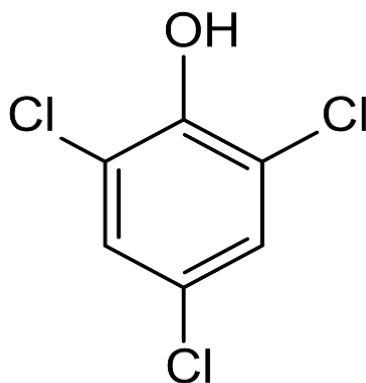
[5]

### 3.1.3 2,4,6-trichlorfenol

2,4,6-trichlorfenol se běžně používá jako pesticid, herbicid a také jako konzervační prostředek na dřevo, kůži a lepidlo. Dochází tak ke kontaminaci odpadních vod a okolní půdy. To pak způsobuje u lidí respirační potíže, jako jsou kašel, chronická bronchitida, tlak na hrudi a může mít také účinek na celkovou funkci plic. Jsou hlášeny i vlivy na nervový systém [9,10].

2,4,6-trichlorfenol způsobuje leukémii u potkanů a u myší benigní/maligní nádory jater. Několik mezinárodních agentur považuje tuto látku jako karcinogenní riziko i pro člověka. Tato látka se řadí mezi extrémně toxické, mutagenní, karcinogenní exogenní xenobiotika v životním prostředí [9,11].

Je snaha o maximální eliminaci a snížení expozice pro primární prevenci proti rakovině a obecně i jako prevence před výše zmíněnými potížemi [10,11].



Molekulová hmotnost: 197,44

log P: 3,32

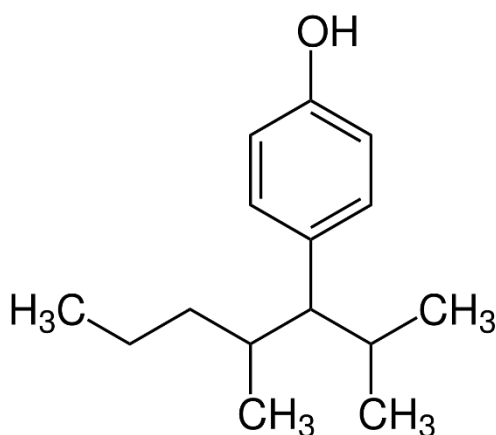
pKa: 6,386 [5]

### 3.1.4 Nonylfenol

Nonylfenol je toxická xenobiotická sloučenina, která se klasifikuje jako endokrinní disruptor. Jedná se tedy o látku negativně ovlivňující hormonální systém lidí a zvířat [12].

Nonylfenol vzniká jako meziprodukt při výrobě nonylfenoletoxylátů. Ty se v průmyslu používají jako povrchově aktivní látky – snižují povrchové napětí vody. Jedná se tedy o průmyslové detergenty neboli čisticí prostředky. Mohou se také používat jako změkčovače a antioxidanty plastů i pryže [12,13,14].

Nonylfenoletoxyláty se pak uvolňují do odpadních vod, a to ve značném množství. Ve vodě pak degradují na různé vedlejší produkty a jedním z nich je právě i nonylfenol. Kvůli značné lipofilitě a velmi špatné rozpustnosti ve vodě se nonylfenol ukládá spíše v říčních sedimentech, čistírenských odpadních vodách a kalech, ale dále pak i v půdě a podzemních vodách. V Evropské unii je nonylfenol na seznamu prioritních látek a jeho koncentrace v povrchových vodách nesmí dle zákona o normách environmentální kvality přesahovat 2 µg/l. Kvůli škodlivým dopadům na životní prostředí bylo používání nonylfenoletoxylátů v Evropské unii zakázáno, to platí i v Kanadě. Například v USA tento zákon však neplatí [12,14,15].



Molekulová hmotnost: 220,36

log P: 5,47

pKa: 9,766

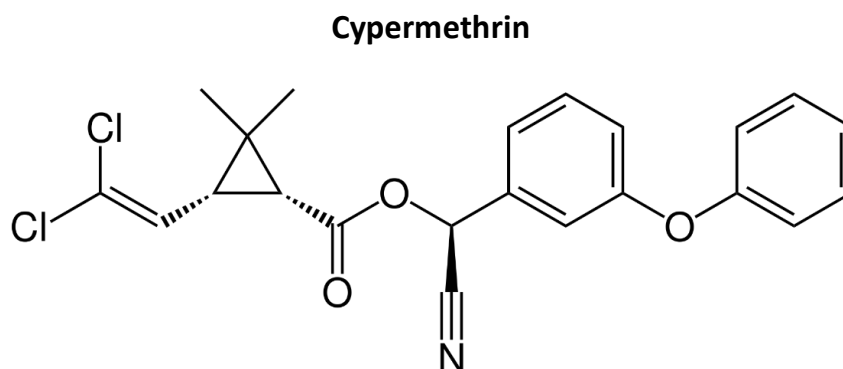
[5]

### 3.1.5 Cypermethrin a deltamethrin

Jedná se o syntetické pyrethroidy, které se používají primárně jako pesticidy – konkrétněji insekticidy. Cypermethrin a deltamethrin jsou jedny z nejvíce používaných látek pro tento účel po celém světě. Jejich použití v zemědělství má pak za následek prosakování půdou, kontaminaci říčních a podzemních vod, ale mohou se přenášet i přímo vzduchem [16,17,18].

Jejich expozice necíleně nejvíce postihuje vodní organismy, převážně ryby, ale jedná se o problém postihující i ostatní organismy včetně člověka. U člověka je pak riziko chronických či trvalých neurotoxických nebo neurologických účinků, selhání reprodukčního procesu (vede k potratu), imunosuprese, teratogenního účinku, či tvorby reaktivních forem kyslíku a inhibici antioxidantních enzymů, což má za následek oxidativní poškození organismu [16,17,19,20].

Opakované vystavování se cypermethrinu a deltamethrinu je spojeno s výskytem rakoviny, nejčastěji s rakovinou močového měchýře, konečníku, ledvin, slinivky, plic atd. Velkým problémem je schopnost pesticidů vázat se na tuk, což vede k následné bioakumulaci v těle, a tedy nejvíce v kůži, játrech, ledvinách, nadledvinách, vaječnících a mozku [17,19,21].



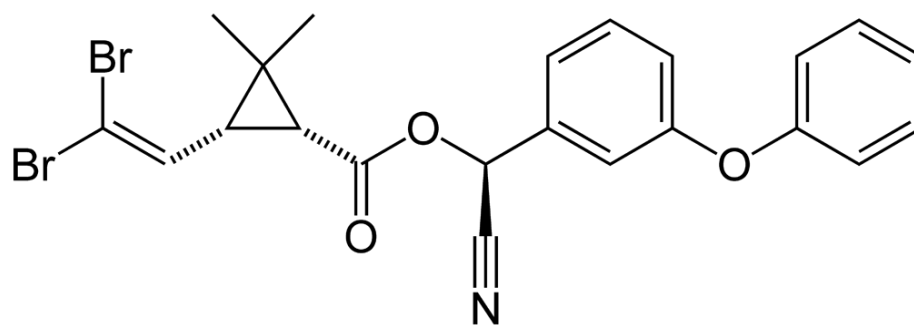
Molekulová hmotnost: 416,30

log P: 5,8

pKa: N/A

[5]

### Deltamethrin



Molekulová hmotnost: 505,21

log P: 6,47

pKa: N/A

[5]

## 3.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC neboli vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High-Performance Liquid Chromatography) je analytická metoda, která se používá k oddělení, identifikaci a kvantifikaci složek směsi kapaliny. Jak již z názvu vyplývá, tato metoda využívá princip kapalinové chromatografie, vzorek je pak poháněn kapalnou mobilní fází (rozpouštědlo), která následně protéká stacionární neboli pevnou fází. Na základě rozdílných interakcí vzorku s mobilní a stacionární fází dochází k oddělení jednotlivých látek ve směsi (vzorek). Existují dva typy HPLC, tzv. NP-HPLC ("normal phase HPLC") neboli HPLC na normálních fázích, v tomto systému má stacionární fáze polární charakter, naopak mobilní fáze je zde nepolární. Druhým typem, tím mnohem více v praxi využívaným, je RP-HPLC ("reverse phase HPLC") neboli HPLC na obrácených fázích, v tomto případě je stacionární fáze nepolární a mobilní fáze polární. Volba systému závisí na charakteru látky/látek, které se snažíme analyzovat. Pro organické kontaminanty povrchových vod vzhledem k charakteru analyzovaných látek je vhodný systém RP-HPLC, jelikož analyty jsou látky lipofilnější – více nepolární [22,23].

Celý systém obsahuje několik klíčových součástí, z nichž každá má svou specifickou funkci. Základními součástmi HPLC systému jsou:

**Pumpa (vysokotlaké čerpadlo)** – má za úkol pohánět mobilní fází skrz celý systém [22,23].

**Autosampler (automatický dávkovač)** - slouží k dávkování vzorku o přesném objemu do proudící mobilní fáze, která jej následně odnáší skrze zbytek systému [22,23].

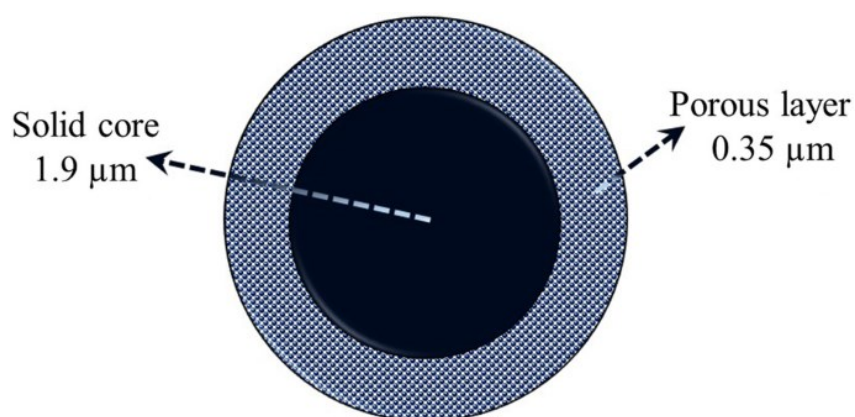
**Chromatografická kolona** – kolona je naplněna stacionární fází, skrze ni protéká mobilní fáze společně se vzorkem, dochází zde k efektivnímu rozdělení složek směsi na základě interakce látky se stacionární a mobilní fází. Kolona může být vyrobena ze široké škály materiálů a mít různé rozměry, opět vše závisí na konkrétní aplikaci a charakteru látek, které se snažíme oddělit. Pro RP-HPLC je stacionární fází nejčastěji silikagel s navázaným ligandem (např. -C18, -C8) [22,23].

**Detektor** – k identifikaci složek vzorku nám slouží detektor. Nejčastěji se jedná o detektory typu UV spektrofotometr, fluorescenční, nebo v dnešní době velmi populární hmotnostní spektrometr [22,23].

### 3.2.1 Povrchově porézní částice

Takzvané core-shell neboli povrchově porézní částice jsou velmi využívané v oblasti analytické chemie jako náplň chromatografických kolon. Kolony plněné povrchově porézními částicemi mají díky své struktuře vysokou separační účinnost srovnatelnou s menšími částicemi ( $<2\mu\text{m}$ ), ale generují nižší zpětný tlak, který je stále kompatibilní s klasickým HPLC. Důvodem je vyšší permeabilita kolony. To nám pomáhá s rychlejší a účinnější separací [24]. Nízký zpětný tlak je také vhodný v online SPE při zapojení dvou kolon, a proto byly povrchově porézní částice využity i během této práce.

Skládají se ze dvou hlavních částí, jak již i název napovídá. “Core” neboli pevné jádro a “shell” neboli obal – respektive se jedná o pórovitou tenkou vrstvu. Právě díky pevnému jádru a relativně nízké pórovitosti je snížena axiální – podélná difúze (jedná se o člen B ve van Deemterově rovnici). Díky pevnému jádru také dochází ke snížení délky difúzní dráhy, neboli převodu hmoty mezi stacionární a mobilní fází (parametr C ve van Deemterově rovnici). A v neposlední řadě je zde nezávislá vířivá difúze na průtoku mobilní fáze, díky velikosti a relativní homogenitě částic (parametr A ve van Deemterově rovnici). Primárně z těchto důvodů jsou právě tyto částice velmi oblíbenou náplní v HPLC analytických kolonách. Existují však celé řady dalších materiálů a je nutné upravovat podmínky separace vždy dle charakteru analyzovaných látek [24,25].



Obrázek 1: Základní struktura povrchově porézní částice (příklad Kinetex částice) [25]



### 3.3 Extrakce na tuhé fázi a její online spojení s HPLC

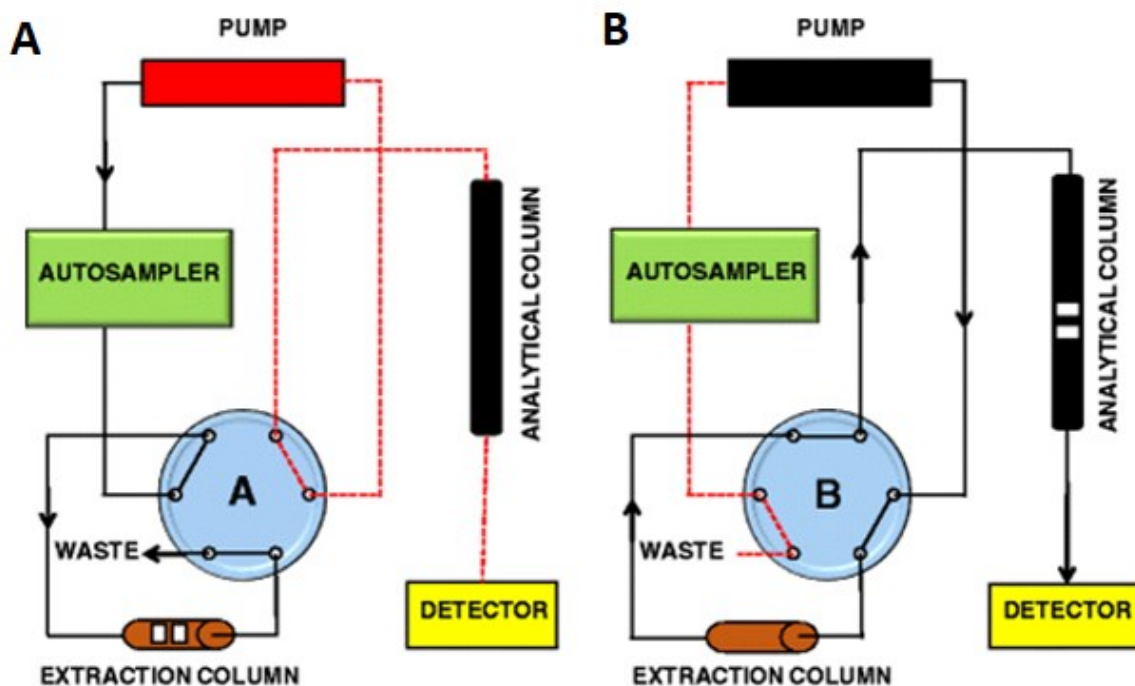
Extrakce na tuhé fázi (SPE – solid phase extraction) je analytická technika pro úpravu vzorku používaná k odstranění rušivých složek matrice a dochází zde k zakoncentrování látek. Principem metody je dělení analytů mezi dvě navzájem nemísitelné fáze. Kapalným vzorkem prochází částicemi pevné fáze neboli sorbentu. Důležitá vlastnost je, aby naše analyty měly vyšší afinitu k sorbentu (retence materiálu) a to proto, aby se v něm analyty zadržely (adsorpce). Poté musí dojít k eluci analytů pomocí elučního činidla/rozpouštědla (desorpce). Ve fázi desorpce musí mít analyty naopak větší afinitu právě k mobilní fázi [26,27].

#### **Kroky SPE:**

- 1) aktivace sorbentu organickým rozpouštědlem
- 2) odstranění organického rozpouštědla a kondicionace rozpouštědlem s podobnými vlastnostmi jako matrice vzorku
- 3) nadávkování vzorku – dojde k zadržení analytů na sorbentu
- 4) promývací krok – odstranění interferujících sloučenin rozpouštědlem, které nevyvazuje již navázané analyty
- 5) eluce analytů [26,27]

Proces SPE lze provádět i online ve spojení s HPLC, v našem případě byl využit systém přepínání kolon. Přepnutí mezi extrakční a analytickou kolonou funguje za pomoci šesticestného ventilu (viz Obr. 2). Jedná se o analytickou techniku, která využívá SPE pro úpravu vzorku a jeho zakoncentrování a následnou analýzu pomocí HPLC bez manuálního zásahu. Vzorek však nemůžeme do systému dávkovat úplně neupravený. Vzorek nesmí obsahovat precipitáty nebo pevné částice. A to z důvodu, že by docházelo k ucpání kolony, nebo v horším případě její degradaci. Proto je zde nutná předchozí úprava, využívají se buď filtry, centrifugace či precipitace. Po této úpravě však už můžeme vzorek dávkovat přímo do systému [28,29,30].

Výhodou online zapojení je, že celý objem zakoncentrovaného analytu se může přímo eluovat na kolonu. Odpadají tím různé mezikroky a manipulace, např. odpaření eluátu a rekonstituce v mobilní fázi. Díky tomu se snižuje i časová náročnost analýzy. Dále se omezuje chybovost způsobená manuální prací člověka, tedy dojde k zvýšení přesnosti a správnosti analýzy. Díky menší manipulaci s například potencionálně infekčním biologickým vzorkem je také i nižší riziko infekce. Můžeme také zvýšit nástřik vzorku, jelikož nejdříve dojde k zakoncentrování na SPE kolonce a je zde tak menší šance, že dojde k rozmývání píků velkým objemem, či přesycení analytické kolony. Problém může nastat v případě, že dochází k zakoncentrování i balastních látek matrice, které mohou vysycovat sorbent na extrakční kolonce a cílené analyty se už tak nemohou dále zadržovat. V online SPE technice dochází také k znatelnému snížení spotřeby rozpouštědel a snížení tvorby odpadu. Optimalizace a vývoj online metod nejsou vůbec jednoduchým a bezproblémovým procesem a je potřeba je vždy upravit podle charakteru analyzovaných materiálů a matrice, v které jsou analyty rozpuštěny [29,30,31].



Obrázek 2: Schéma online spojení SPE a HPLC systémem přepínání kolon [31]

**Ventil v poloze A:** Na tomto obrázku můžeme vidět první polohu ventilu. Pumpa zde pohání promývací mobilní fázi společně se vzorkem. Vzorek je dávkován pomocí automatického dávkovače a je unášen mobilní fází skrze 6-cestný ventil na extrakční kolonku. Mobilní fáze má v tomto prvním kroku slabší eluční sílu, aby docházelo k zachycení analytů na extrakční kolonce a je dodávána přídatnou pumpou. V tomto kroku dochází primárně k zakoncentrování a přečištění vzorku od interferujících látek matrice.

**Ventil v poloze B:** Zde můžeme vidět, jak se změní cesta po přepnutí ventilu do druhé polohy. Dochází k eluci zachyceného analytu – mobilní fáze zde proudí opačným směrem, než tomu bylo u prvního kroku, často se pracuje s elucí gradientovou mísením dvou mobilních fází. Vzorek je eluován z extrakční kolonky a je unášen mobilní fází na analytickou kolonu, kde dochází k vlastní separaci látek. Eluční síla mobilní fáze musí být silnější, než tomu bylo u první polohy, aby došlo k vymytí analytů z extrakční kolonky. Proto musí být mobilní fáze odlišná od promývací mobilní fáze použité v prvním kroku.

### 3.4 Nanovlákna

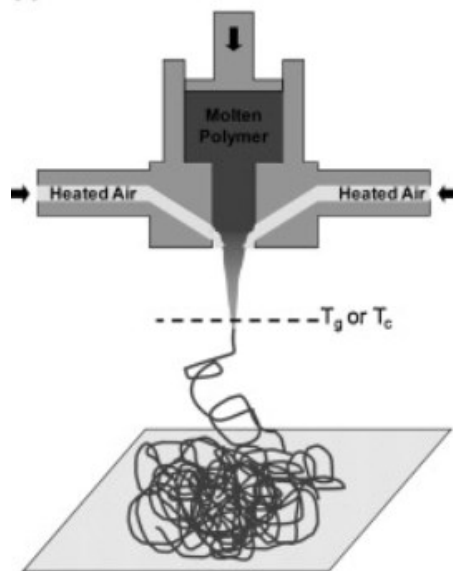
Nanovlákno je definováno jako vlákno, jehož průměr je nižší než 1  $\mu\text{m}$  (1000 nm). Jeho délka je však mnohonásobně vyšší. Průměr neboli tloušťka vlákna závisí na způsobu výroby. V průmyslové výrobě se využívá primárně dvou technologií. Tou první je rozfukování z taveniny, tzv. melt-blown. Touto metodou však vznikají nanovlákna s větším průměrem. Druhou, tou primárně používanější, je technologie elektrostatického zvlákňování neboli electrospinning. Díky němu jsme schopni vytvořit vlákno, které má průměr nižší než 100 nm [7,32]. Kvůli jeho stabilitě však nemůže být při této velikosti samostatné, proto se organizuje do větších struktur v podobě vrstev zachytávaných na nosiči nebo v podobě vat [32,33].

Nanovlákna se vyznačují hlavně velkým povrchem vzhledem k poměru tloušťky a délky a porozitou. To je velmi pozitivní pro využití nanovláken jako sorbentu při extrakcích na tuhou fázi, protože díky svým vlastnostem mají vysokou extrakční účinnost. Další výhodou je, že pro dosažení tak vysoké extrakční účinnosti je zapotřebí pouze minimální množství sorbentu. To nám pomůže snížit použitá rozpouštědla, zkrátit dobu analýzy a je možné použít i malá množství vzorku [32,33].

Zdroje pro výrobu nanovláken jsou velmi různorodé, může se jednat o přírodní nebo syntetické materiály. Mezi ty přírodní můžeme řadit dřevo, houby, nebo schránky korýšů, jedná se pak o biopolymery nejčastěji například na bázi celulózy a chitosanu. Ze syntetických materiálů to mohou být například polymery polyakrylonitril, polyvinylchlorid, polystyren, polyamidy (PA – nylon), polypropylen, nebo polykaprolakton. Ale může se jednat také o nanovlákna keramická, uhlíková, nebo dokonce i kovová. V naší práci se však pracovalo s nanovláknými polyamidovými. Jednotlivé materiály a nanovlákna z nich vyrobená se velmi liší ve svých mechanických vlastnostech a selektivitě, to nám zajišťuje široké spektrum analýz a formátů SPE, které můžeme provádět [32,33,34].

### 3.4.1 Technologie melt-blown

Jak již byl řečeno, tato technologie se používá pro výrobu vláken, která mají větší šířku (1-2  $\mu\text{m}$ ). Jedná se tedy spíše o mikrovlákná, nikoliv nanovlákná. Během vyfukování taveniny (melt-blown) dochází k vytlačení taveniny polymeru skrz extrudér pomocí horkého vzduchu. Tato metoda byla vyvinuta už v 50. letech 20. století [7,35,36].



Obrázek 3: Schéma melt-blownu [36]

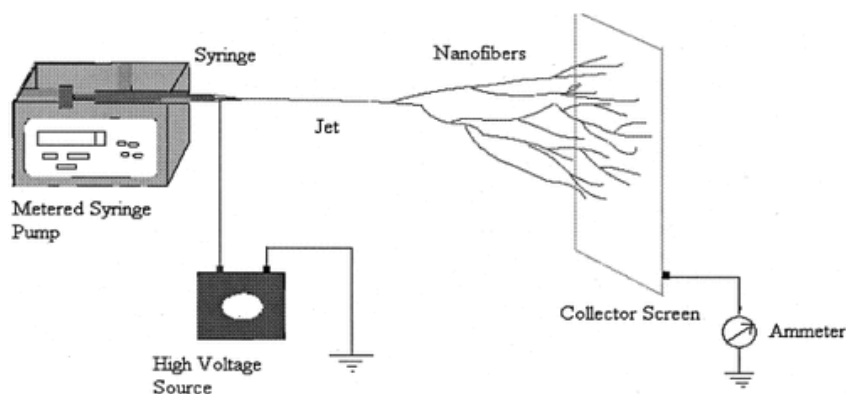
Horký proud vzduchu zrychluje taveninu polymeru a dochází k dramatickému ohýbání a mávání, díky němuž dochází k prodlužování vlákna. Proudící vzduch je většinou nastaven na teplotu atmosféry při pokojové teplotě. Díky tomu, že tavenina polymeru má mnohem vyšší teplotu, dochází tak k chlazení – tuhnutí vlákna v určité vzdálenosti od výstupu a ukládají se jako netkaná vrstva na kolektor. Výsledné vlastnosti vlákna primárně záleží na druhu materiálu, parametrech nastavených při melt-blownu a na proudícím vzduchu. Díky větší tloušťce vlákna však mají sorbenty menší povrch, než by tomu bylo u elektrostatického zvlákňování. Výhodou je však vyšší mechanická odolnost a vyšší porozita [7,35,37].

### 3.4.2 Technologie elektrostatického zvlákňování (electrospinning)

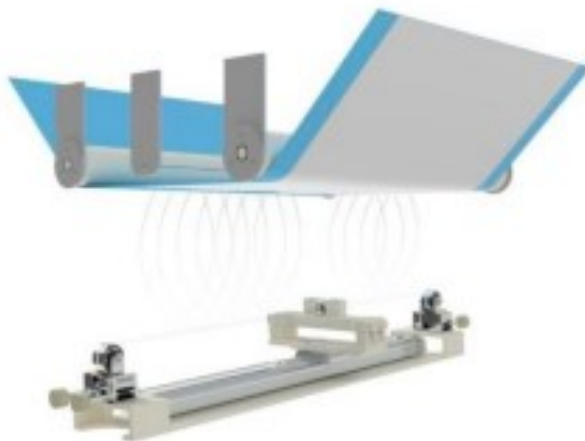
Druhou technologií je metoda takzvaného elektrostatického zvlákňování neboli electrospinning. Principem této technologie je tvorba velmi jemných vláken v řádu desítek až stovek nanometrů působením silného elektrického pole z kapalného (roztok či tavenina) materiálu. Mají tedy menší průměr než u předchozí technologie melt-blownu. Díky různým dostupným polymerům můžeme touto technikou vytvářet širokou škálu nanovláken s unikátními vlastnostmi [7,38].

Základní systém zahrnuje zásobník s kapalinou/taveninou, trysku/jehlu pro vstřik kapaliny, elektrody, zdroj vysokého napětí a sběrnou plochu (kolektor). Roztok nebo tavenina je vedena na konec trysky, což je vlastně malá kapilára, která je vystavena vysokému elektrickému napětí. K tvorbě vlákna dochází mezi 2 opačně nabitými elektrodami. Jedna elektroda je v kontaktu s kapalinou/taveninou a předává jí tak část své energie. Díky tomu je elektroda vystavena elektrostatickým silám druhé elektrody. Elektrostatická síla zde vytvoří tenký proud kapaliny, který je následně roztáhnut do vlákna během cesty ke kolektoru (vytváří se tzv. Taylorův kužel). Po odpaření rozpouštědla dochází ke ztuhnutí vláken na kolektoru a vytvoří se tak síť/matrice nanovláken [7,38,39].

Existuje také i způsob bez použití jehly (takzvaný “needleless electrospinning”), zde dochází k zvlákňování z volného povrchu taveniny/roztoku. Místo jehly se zde použije struna, tyčka či váleček. Vytváří se množství trysek z celého volného povrchu a díky tomu se zvýší množství vyprodukovaného materiálu [7,40,41].



Obrázek 4: Schéma elektrostatického zvlákňování pomocí jehly [39]



Obrázek 5: "Needleless electrospinning" za použití struny [41]

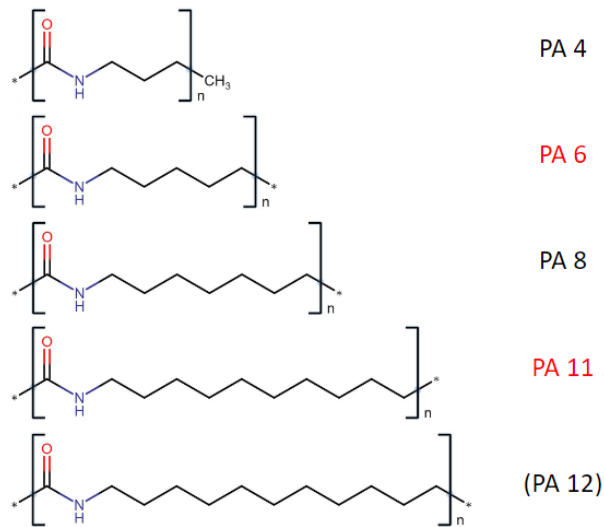
### 3.4.3 Polyamidová vlákna

Polyamidy (PA) jsou syntetické polymery obsahující opakující se amidové skupiny (-CONH-) v jejich molekulové struktuře. Jsou syntetizovány polykondenzací  $\Omega$ -aminokyseliny, polyreakcí diaminu s dikarboxylovou kyselinou nebo halogenidem a polymeračními reakcemi laktamů za otevření kruhu. Polyamidy mají široké využití v průmyslu, a to zejména díky jejich pevnosti, odolnosti proti opotřebení a dobré chemické odolnosti a tepelné stabilitě. Na základě vlhkosti mohou měnit své prostorové a mechanické vlastnosti. Díky těmto vlastnostem mají širokou škálu využití. Jeví se i jako vhodný sorbent právě v SPE. Toho bylo využito během této práce [42,43].

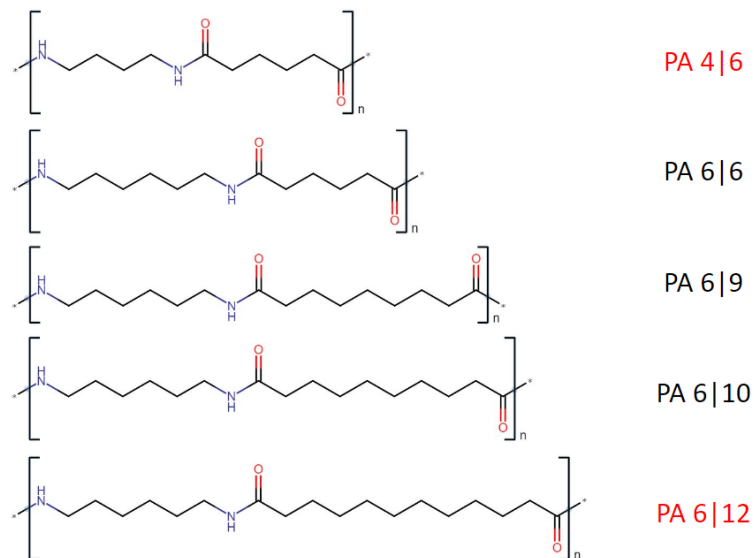
Existuje celá řada druhů polyamidů, jejich struktura má vliv na vlastnosti nanovláken a jejich použití. V této práci bylo pracováno s PA nanovláknou vyrobenými na Technické Univerzitě v Liberci. Vlákna byla vyrobena electrospinningem pomocí patentované bezjehlové technologie Nanospider (Elmarco). Oproti klasickým elektrospinningovým zařízením má Nanospider speciálně navrženou geometrii, která umožňuje precizní kontrolu tlaku, rychlosti a distribuce polymerového roztoku, což vede ke generaci velmi jemných vláken. Výsledná nanovlákna jsou pak uniformní, tenká a mají vysoký stupeň porozity. Tyto vlastnosti jsou pak klíčově právě v SPE [42,43].

Na základě struktury můžeme polyamidy rozdělit na 3 základní typy:

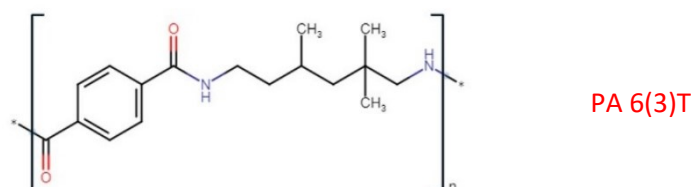
### Homopolyamidy



### Heteropolyamidy

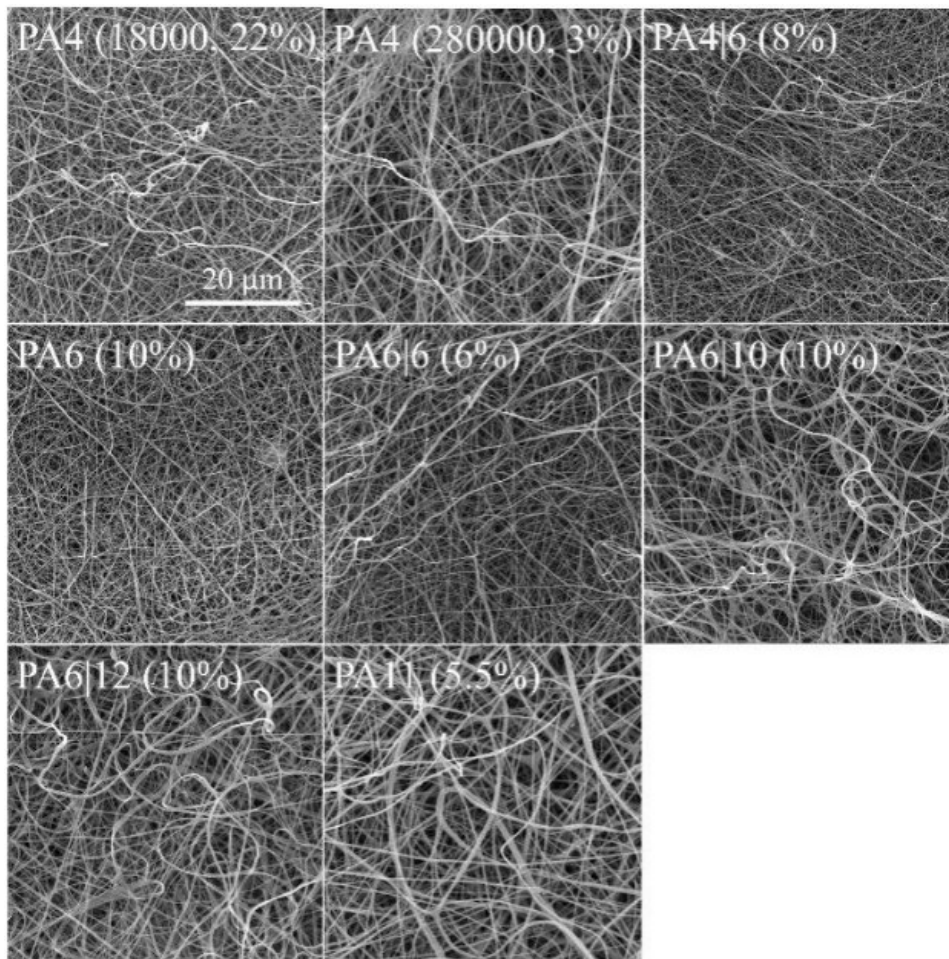


### Semiaromatické polyamidy



Pro lepší přehlednost byly polyamidy použity během této práce vyznačeny červenou barvou.





Obrázek 6: Struktura použitých polyamidových nanovláken z TUL pod elektronovým mikroskopem [43]

### 3.4.3.1 Polyamid 6 – Nylon

Asi nejnámějším a nejvíce používaným polyamidovým nanovláknem je PA 6. Jeho strukturu můžeme vidět na obrázcích výše. PA 6 vzniká polymerizací kaprolaktamu. Používá se v široké škále aplikací díky jeho výjimečným vlastnostem, jako jsou vysoká houževnatost, tepelná odolnost, odolnost proti otěru, dobré elektroizolační vlastnosti a barvitelnost. Proto si své využití najde v oblasti textilního průmyslu (oblečení, koberce, sportovní vybavení), automobilového průmyslu (součástí motorů a interiérů), elektroniky (kryty a izolace) a mnoha dalších. Svoje čestné místo má však i na poli analytické chemie, kde ho nejčastěji můžeme vidět ve formě filtrů. Je ovšem testován i jako potenciální sorbent pro extrakce [44,45,46], stejně tomu bylo tak i během této práce.

### 3.4.4 Využití polyamidů pro extrakci

V následující tabulce je uveden přehled prací využívajících polyamidový sorbent pro extrakci. V drtivé většině případů se sorbent, konkrétně se téměř vždy jedná o PA 6, plní do SPE kolonek/stříkaček. Je zde i uveden komerčně vyráběný sorbent Chromabond, také ve formě extrakční kolony. Velmi často se také vyrábí nanovlákněné membrány. Tento sorbent je pak využíván zejména pro extrakci fenolických látek (estrogeny, flavonoidy, parabeny). Jako nejčastější analytická metoda pro stanovení je zde pak HPLC.

*Tabulka 1: Rešerše použití polyamidů pro extrakci v jiných pracích*

Testované analyty	Typ matrice	Extrakce	Analytická metoda	PA sorbent	Odkaz
Estriol	Voda z jezera	Nanovlákněné membrány 4 cm <sup>2</sup> pláty	molekulární fluorescenční spektrometrie	PA 6 nanovlákněná membrána	[47]
Estrogeny (estradiol, ethinylestradiol, estron)	Dešťová voda, voda z řek, rybníku a vodovodu	Extrakce pomocí plněných injekčních stříkaček	HPLC-UV	PA 6 nanovlákněná membrána	[48]
Estery kyseliny ftalové	Dešťová voda, voda z rybníku a vodovodu	plynotěsné stříkačky s nanovlákněným filtrem	HPLC-UV	PA 6 nanovlákněná membrána	[49]
Flavonoidy (hesperidin, diosmin, eriocitrin)	Limetková šťáva z Íránu	Extrakce v plněných kolonkách	HPLC-UV	PA 6 Chromabond (3 mL/500 mg)	[50]
Mykotoxin citrinin	Obiloviny, mouka, kakao, rozinky	Extrakce v plněných stříkačkách	HPLC-FLD	PA 6 Chromabond (6 mL/1000 mg)	[51]

Clodinafop Propargyl	Okolní voda a půda	Online mikroextrakce v plněné kolonce	HPLC-UV	PA (nespecifikováno) nanovlákná	[52]
Docetaxel	Králičí plasma	Extrakce v plněných stříkačkách	HPLC-UV	PA 6 nanovlákná membrána	[53]
Komplexní analýza těkavých látek v listech	Tymián obecný, Mateřídouška úzkolistá	mikroextrakce pomocí plněných injekčních stříkaček	GC-MS	PA 6 nanovlákná	[54]
Parabeny, steroidy, flavonoidy, pesticidy	Modelové roztoky analytů	extrakce pomocí plněných injekčních stříkaček	HPLC-UV	PA 6 nanovlákná	[55]

## 4 Experimentální část

### 4.1 Příkladové vybavení, materiály a pomůcky

**Ultravysokoúčinný kapalinový chromatograf:** UHPLC Shimadzu Nexera X3 s DAD detektorem

**Software na vyhodnocování výsledků:** LabSolution

**Analytické váhy:** Sartorius ME 5-OCE

**Chromatografická kolona:** Bifenyl Kinetex 100×4,6 mm, částice 5 μm, 100 Å

**Extrakční sorbent:** Polyamidová nanovláknina – PA6, PA11, PA4/6, PA6/12, PA6(3)T

**Mikrozkumavky Eppendorf**

**Běžné laboratorní sklo**

### 4.2 Použité standardy, chemikálie a vzorky

#### Standardy

4-nitrofenol (≥ 99 %) - Lachema n.p. Brno

Bisfenol A (≥ 99 %) - Sigma – Aldrich s.r.o.

2,4,6-trichlorophenol (>98 %) - Sigma – Aldrich s.r.o.

Nonylphenol (>90 %) - Sigma – Aldrich s.r.o.

Cypermethrin (94,3 %) - Fluka Analytical

Deltamethrin (99,6 %) - Sigma – Aldrich s.r.o.

## **Chemikálie**

Acetonitril  $\geq 99,9$  %, třída čistoty HPLC (gradient), VWR chemicals

Methanol  $\geq 99,9$  %, třída čistoty HPLC (gradient), VWR chemicals

Ultračistá voda: připravena pomocí Milli-Q systému

## **Vzorky řek**

Labe – lokalita: Hradec Králové (soutok)

Cidlina – lokalita: Jičín

Lesní potok – lokalita: Německý Žďárek

Morávka – lokalita: Frýdek-Místek

Moravice – lokalita: Opava

Opava – lokalita: Opava

Ostravice – lokalita: Frýdek-Místek

Mohelka – lokalita: Rychnov u Jablonce nad Nisou

Lesní potok – lokalita: Německý Žďárek

## 4.3 Příprava roztoků

### 4.3.1 Příprava zásobních roztoků

Jednotlivé standardy o navážce 1 mg byly rozpuštěny v 1 ml acetonitrilu (ACN), čímž vznikly roztoky o koncentraci 1000 mg/l. Prakticky se navážky pohybovaly v rozmezí 0,7 a 1,3 mg. Podle hmotnosti byly tyto standardy rozpuštěny v příslušném množství ACN, aby výsledná koncentrace odpovídala kýženým 1000 mg/l.

Rovněž byl vytvořen směsný roztok standardů všech šesti látek. Ze zásobních roztoků každého standardu bylo postupně odebráno 100  $\mu$ l (celkový objem 6x 100  $\mu$ l - 600  $\mu$ l) a doplněno 400  $\mu$ l ACN, což poskytlo výslednou koncentraci látek směsného zásobního roztoku 100 mg/l.

Všechny takto připravené roztoky byly využity jako zásobní a skladovány v mrazáku při teplotě -20°C.

### 4.3.2 Příprava pracovních roztoků

Před samotnou analýzou následoval vždy krok přípravy čerstvého roztoku ředěním zásobního roztoku, kde jako rozpouštědlo byla použita voda, nikoliv organické rozpouštědlo.

Pro analýzu jednotlivých standardů bylo použito 100x ředění, kde bylo 10  $\mu$ l zásobního roztoku standardu zředěno 990  $\mu$ l vody. Tímto postupem byla dosažena konečná koncentrace látky 10 mg/l. V případě směsného roztoku byla počáteční koncentrace roztoku standardů 100 mg/l, proto bylo zapotřebí ředění pouze 10x. V praxi bylo tedy použito 70  $\mu$ l směsi standardů a doplněno 630  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Tohoto ředění se využilo i pro přípravu roztoků pro optimalizaci metody.

Pro validaci metody byly připraveny ještě kalibrační roztoky o koncentraci 2500  $\mu$ g/l, 2000  $\mu$ g/l, 1000  $\mu$ g/l, 750  $\mu$ g/l, 500  $\mu$ g/l, 250  $\mu$ g/l, 100  $\mu$ g/l, 50  $\mu$ g/l, 25  $\mu$ g/l ve vodě. Pro hodnocení přesnosti a preciznosti metody byly připraveny roztoky v řece o koncentraci 500  $\mu$ g/l.

### 4.3.3 Příprava mobilních fází

Během analýzy se využívaly tři pumpy, přičemž každá z nich obsahovala odlišnou mobilní fázi. Pumpa A zde pohání 100 % ACN, pumpa B ultračistou vodu. Tyto dvě pumpy měly za úkol vytvářet gradient na analytické koloně. Další pumpa, která byla použita pro online extrakci na tuhou fázi, byla pumpa C. Hlavní účel SPE kroku bylo očistit vzorek a provést extrakci analytů na nanovlákná. Pro pumpu C byly testovány různé mobilní fáze, konkrétněji se jednalo kromě čisté vody o 5-30% methanol (MeOH) a 5-15% ACN.

## 4.4 Optimalizace chromatografických podmínek

Pro optimalizaci chromatografických podmínek bylo nutné určit nejvhodnější parametry pro online spojení SPE a HPLC. Hlavním cílem bylo dosáhnout co nejvyšší separační účinnosti u všech šesti látek na chromatogramu, včetně jejich oddělení od matrice. Píky měly být co nejužší a měly by být jasně oddělené od sebe. Dále bylo třeba zajistit, aby analýza nebyla příliš dlouhá a aby byla dosažena maximální citlivost detekce na detektoru. Teplota pro separaci na koloně byla nastavena na 30 °C. Detekce probíhala při vlnové délce 220 nm. Výsledky testovaných podmínek jsou detailně popsány v následujících kapitolách. Proces začínal výběrem nejvhodnější kolony, následovaným úpravou podmínek separace a gradientové eluce.

### 4.4.1 Volba chromatografické kolony

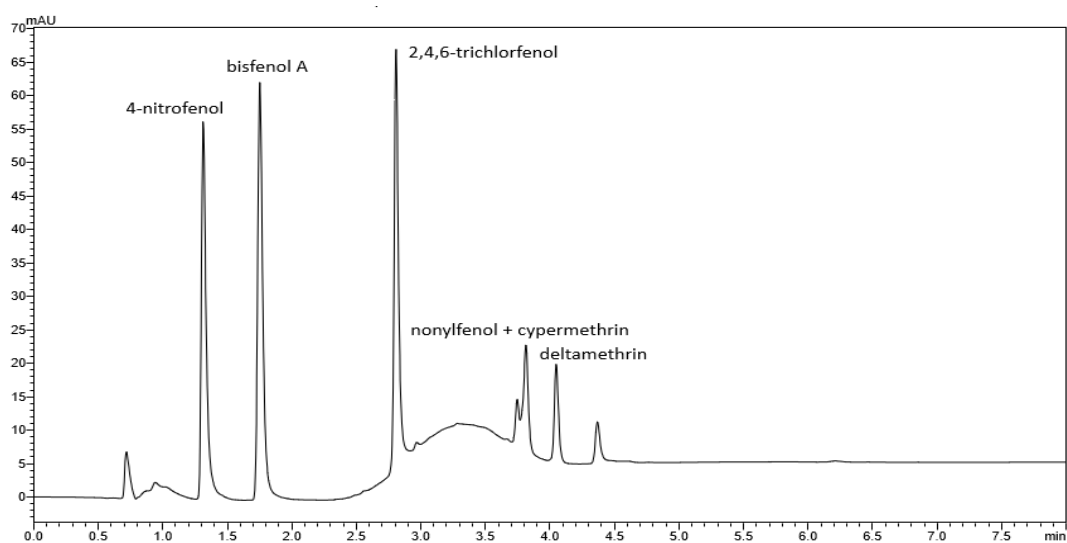
V úplném začátku bylo potřeba zjistit, jaký druh kolony se pro naše účely hodí nejvíce. Bylo testováno několik typů kolon o různých stacionárních fázích s odlišnou selektivitou. Konkrétní typ a velikost částic je vždy uveden u popisu kolony. Dávkování standardních roztoků bylo nastaveno na 5 µl, přičemž koncentrace látek se rovnala 10 mg/l. Průtok byl dle velikosti částic v koloně nastaven na 0,5 ml/min (u kolon od firmy Ascentis® s velikostí částic 2,7 µm), nebo 1 ml/min (ostatní kolony s většími částicemi 5 µm). Volbou správné kolony mělo dojít k oddělení všech 6 látek od sebe samotných a od matrice.

Tabulka 2: Použitý gradient pro testování kolon, (A) 100 % ACN, (B) ultračistá voda

Čas (min)	Koncentrace A (%)	Koncentrace B (%)
	50	50
1,00	50	50
2,00	100	0
8,00	100	0
8,10	50	50

### Ascentis® Express C18 10 cm x 3,0 mm, 2,7 μm, 90 Å

Jedná se o kolonu s technologií core-shell o velikosti částic 2,7 μm, velikost pórů 90 Å. Stacionární fázi je zde silikagel s chemicky navázanými C18. Pracovní tlak na koloně dosahoval hodnoty 19,5 MPa. Docházelo zde k splynutí píku nonylfenolu a cypermethrinu, proto tato kolona nemohla být použita.

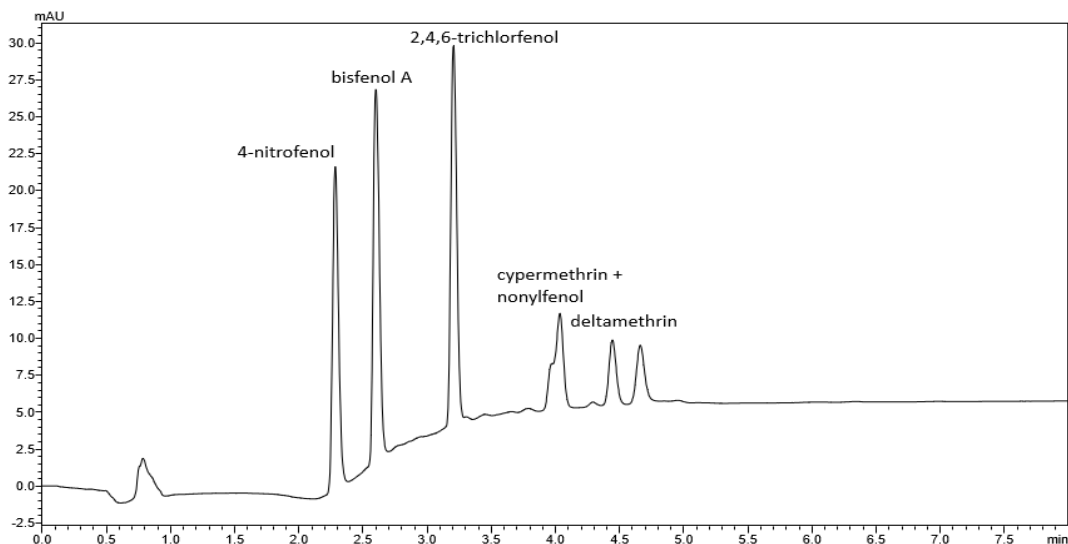


Obrázek 7: Chromatogram separace standardů na koloně Ascentis® Express C18 10 cm x 3,0 mm, 2,7 μm



### YMC-Triart C18, 100 x 4,6 mm, 5 µm, 12nm

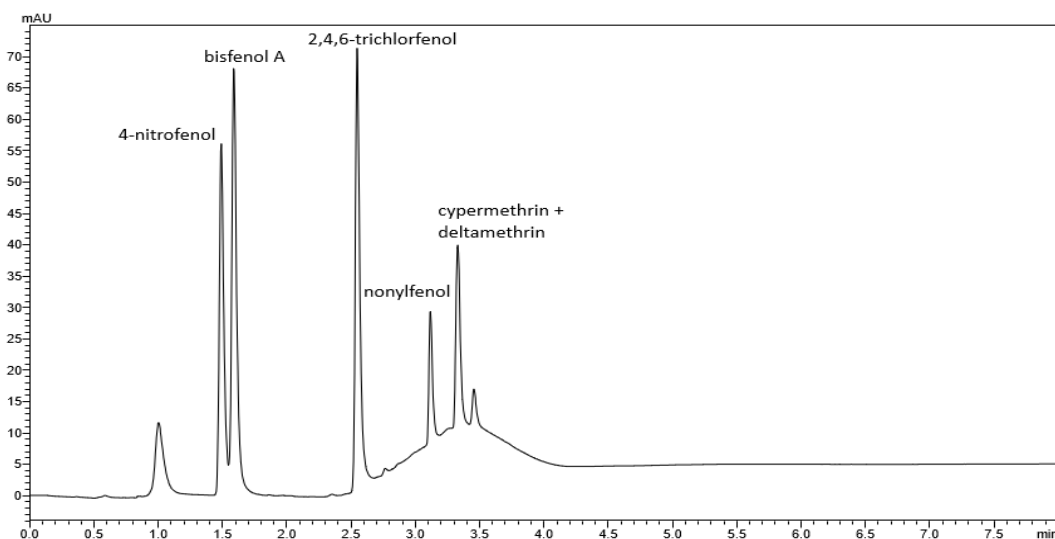
Druhou zkoušenou kolonou byla YMC-triart. Kolona je plněná plně porézními hybridními částicemi o velikosti 5 µm a velikosti pórů 12 nm. Pracovní tlak na koloně dosahoval hodnoty 12 MPa. Ani v tomto případě nedošlo k rozdělení cypermethrinu a nonylfenolu.



Obrázek 8: Chromatogram separace standardů na koloně YMC-Triart C18, 100 x 4,6 mm, 5 µm, 12nm

### Ascentis® Express F5 10 cm x 3,0 mm, 2,7 µm

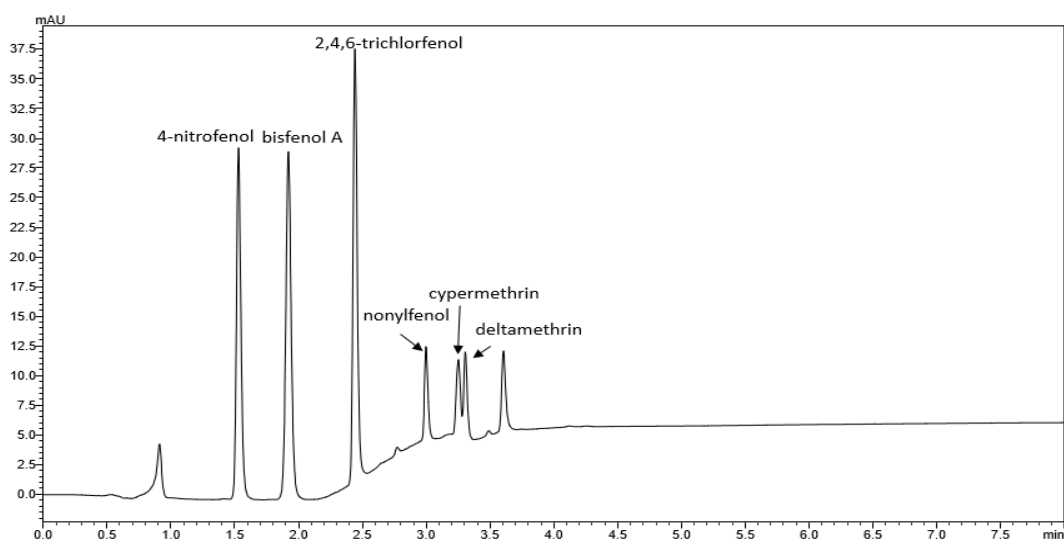
Tato pentafluorfenyllová kolona též používá core-shell částice o velikosti 2,7 µm. Pracovní tlak na koloně zde dosahoval hodnoty 17,2 MPa. Kolona zde bohužel nedokázala rozdělit pík cypermethrinu a deltamethrinu.



Obrázek 9: Chromatogram separace standardů na koloně Ascentis® Express F5 10 cm x 3,0 mm, 2,7 µm

## Bifenylní Kinetex 100 x 4,6 mm, 5 μm, 100 Å

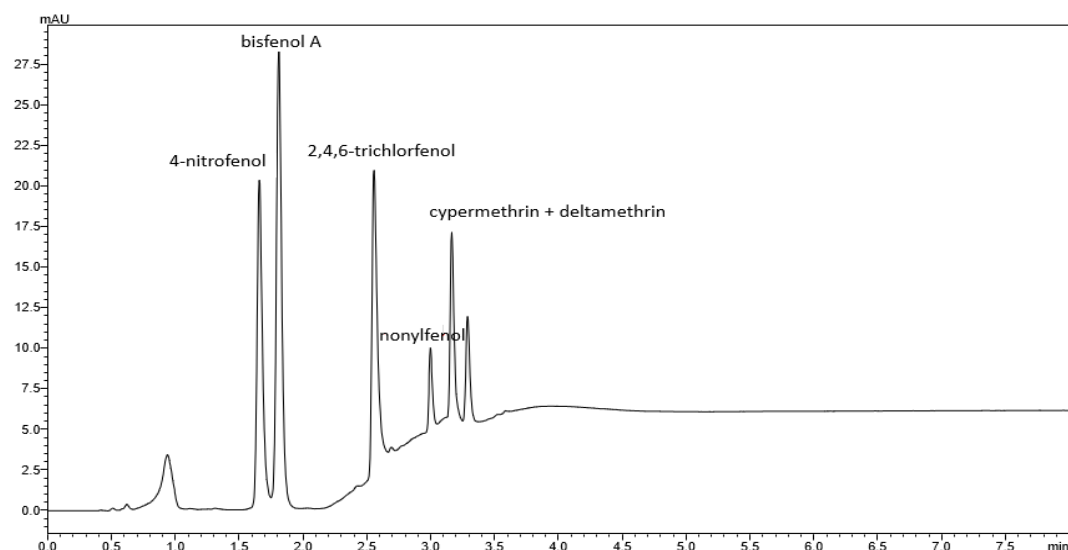
Tato bifenylová kolona opět využívá částice core-shell o velikosti 5 μm, póry o velikosti 100 Å. Pracovní tlak na koloně zde dosahoval hodnot 15 MPa. Tato kolona měla nejlepší separační účinnost, píky byly úzké, nechvostovaly. Došlo k rozdělení cypermethrinu a deltamethrinu. Proto byla tato kolona zvolena jako optimální a pracovalo se s ní dále během celé diplomové práce.



Obrázek 10: Chromatogram separace standardů na koloně Bifenylní Kinetex 100x4,6 mm, 5 μm, 100 Å

## Kinetex PFP 100 x 4,6 mm, 5 μm, 100 Å

Kolona využívá jako stacionární fázi PFP, jedná se tedy pentafluorfenylovou kolonu. Core-shell částice mají rozměry 5 μm a velikost pórů je zde opět 100 Å. Pracovní tlak na koloně dosahoval hodnoty 16,5 MPa. Kolona nedokázala rozdělit píky cypermethrinu a deltamethrinu.



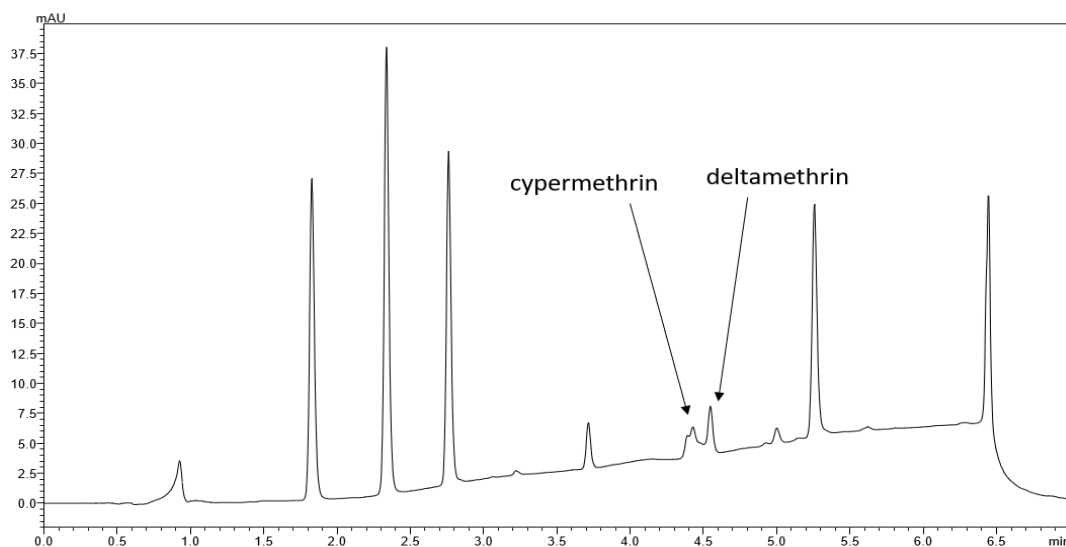
Obrázek 11: Chromatogram separace standardů na koloně Kinetex PFP 100 x 4,6 mm, 5 μm, 100 Å

Å

#### 4.4.2 Optimalizace gradientové eluce

Gradientová eluce je obecně pro vzorky s vyšším počtem analytů vhodnější než eluce isokratická. Pro gradientovou eluci je typické, že se složení mobilní fáze mění s časem. Díky tomu se zvyšuje eluční síla mobilní fáze a dochází tak ke zkrácení doby analýzy, zvyšuje se účinnost separace jednotlivých píků (jsou tak užší a ostřejší), čímž se zvyšuje i citlivost – látky je pak možné detekovat i při nižších koncentracích. Jelikož naše analyty jsou na škále od polární po nepolární látky velmi různorodé, bylo třeba nastavit vhodný gradient, aby se docílilo rychlejší analýzy a zároveň aby píky nechvostovaly. Pro počáteční sestavení gradientu bylo použito mísení mobilních fází z pumpy A (100 % ACN) a pumpy B (ultračistá voda) a to v poměru 50:50. Jedná se o gradient, který byl použit pro výběr kolony (viz. tab. 2)

Pro lepší rozlišení a rozseparování jednotlivých látek bylo třeba gradient dále upravit. Hlavním problémem bylo rozdělení píků cypermethrinu a deltamethrinu. Na obrázku níže můžeme vidět chvostování problémových píků. Bylo vyzkoušeno několik druhů gradientů, které se postupně upravovaly.



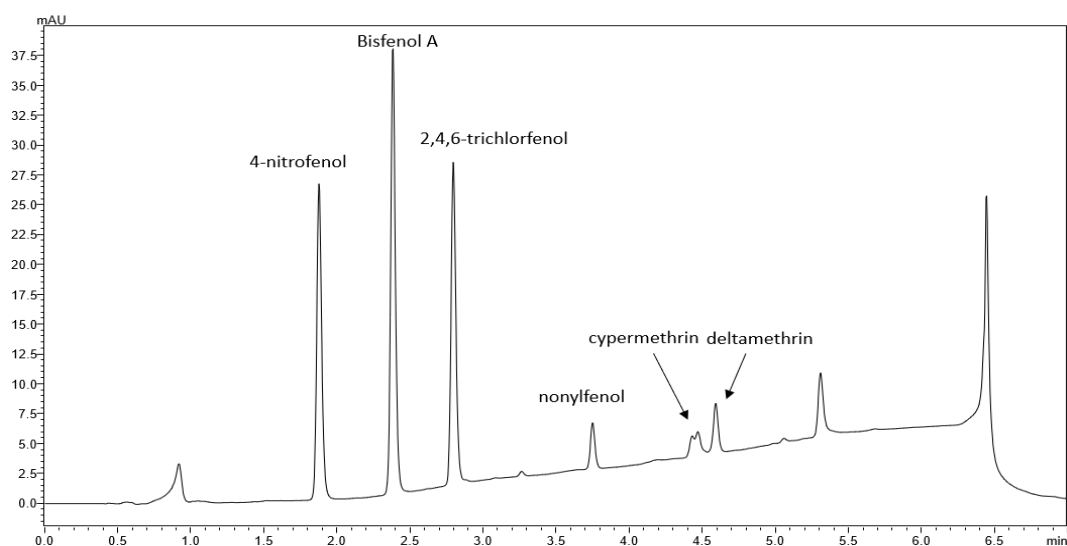
Obrázek 12: Chromatogram s vyobrazenými problémovými píky

Nejvhodnější a také finální gradient, který byl použit dále, vypadal následovně:

Tabulka 3: Finální gradient optimalizace eluce

	Čas (min)	Průtok (ml/min)	Koncentrace A (%)	Koncentrace B (%)
1		1,0	40	60
2	1,00	1,0	50	50
3	2,00	1,0	70	30
4	4,50	1,0	100	0
5	5,00	1,0	100	0
6	5,50	1,0	40	60
7	7,00	1,0	40	60

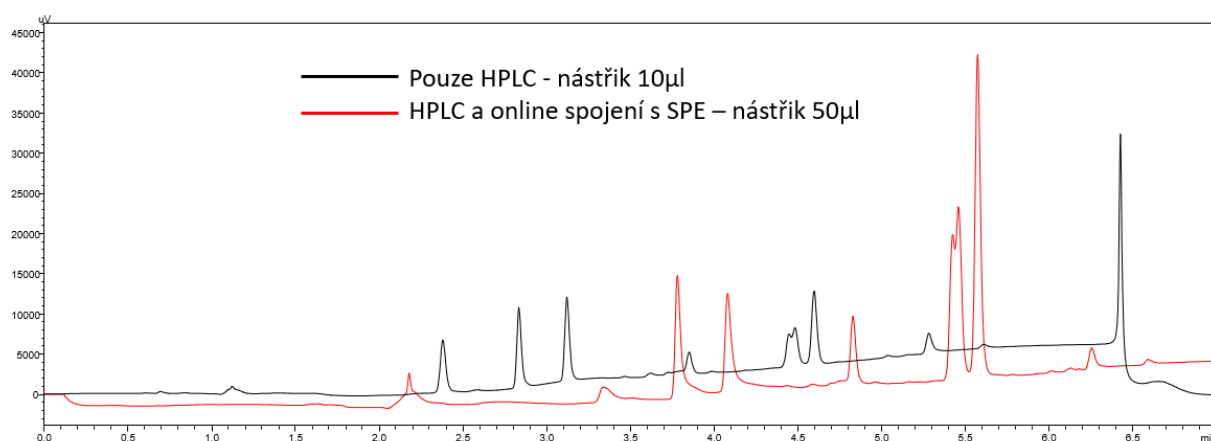
Byl testován pomalejší nástup 100% ACN, který byl ponechán 0,5 min, poté došlo k navrácení na původní poměr 40:60. Tento krok pozvolnějšího nelineárního nárůstu se jevil jako velmi přínosný pro rozdělení kritických píků. Analyty vykazovaly dobrou odezvu a citlivost, protože jejich píky byly štíhlé a symetrické. Podařilo se na rozdíl od předchozího případu také rozdělit pík cypermethrinu a deltamethrinu. Cis/trans forma cypermethrinu nebyla plně rozseparovaná na základní linii, ale jako kontaminant budou hodnoceny v součtu jako obě formy cypermethrinu. Záznam analýzy můžeme vidět na uvedeném chromatogramu.



Obrázek 13: Výsledný chromatogram při použití finálního gradientu

## 4.5 Optimalizace online zapojení SPE

Díky online zapojení kroku SPE a přečištění vzorku na extrakční kolonce, můžeme vzorek nastříknout přímo do systému bez větší úpravy před analýzou. SPE krok nám umožní i větší nástřik a pomáhá nám zvýšit míru zakoncentrování látek. Pro pouhé HPLC byl použit nástřik 10  $\mu\text{l}$  a pro online spojení s SPE mohl být i nástřik 50  $\mu\text{l}$ . Z následujícího chromatogramu můžeme vidět rozdíl mezi pouhou HPLC analýzou a analýzou pomocí online spojení SPE a HPLC.



Obrázek 14: Porovnání pouhého HPLC a HPLC v online spojení s SPE

### 4.5.1 Proces plnění extrakční kolonky

Jako extrakční kolonka byla zvolena malá předkolona o rozměrech 10 x 4,0 mm.



Obrázek 15: Kolonka použitá v této práci k plnění nanovláknny

Kolonka byla plněna nanovláknny. K tomu byla použita pinzeta, kterou se část nanovláken utrhlo, následně zmačkalo a bylo vmačkáno do kolonky.



Obrázek 16: Proces plnění kolonky nanovláknny

Kolonka musela být co nejvíce plná, muselo se tedy použít mírného tlaku pro udusání nanovláknna. Ovšem při moc velkém přeplnění kolonky nastával problém poškození, zničení nanovláken. Také mohlo dojít k slepení, což zapříčinilo špatné protékání mobilní fáze, a to velmi zvýšilo zpětný tlak v systému. Muselo se také dbát na rovnoměrné plnění kolonky, aby nevznikaly dutiny, to by způsobilo obtékání kapaliny kolem sorbentu. Proto se muselo k procesu plnění přistupovat obezřetně a byla potřeba trocha cviku.



Obrázek 17: Naplněná kolonka připravená k zapojení do systému

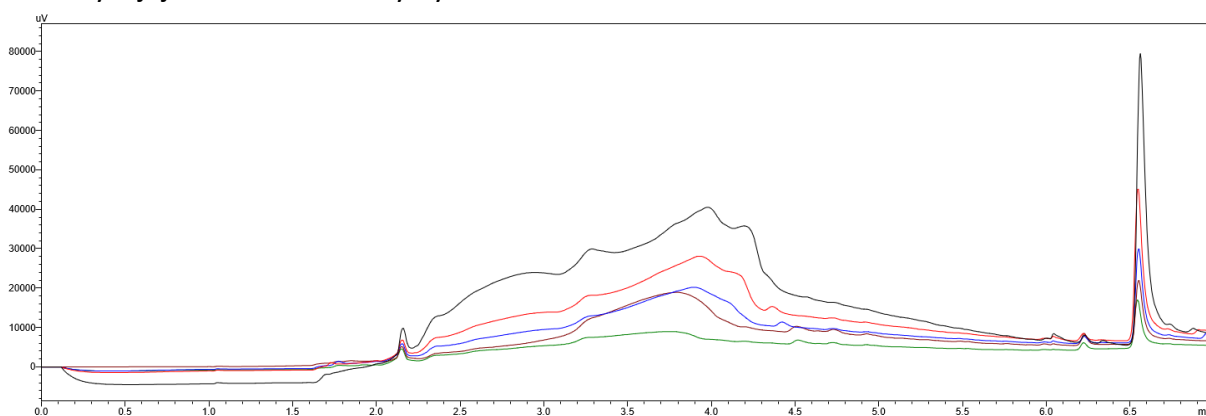
Naplňená kolonka byla nejprve zapojena do systému pouze jedním koncem, aby se nanovlákná aktivovala a vymyly se z něj případné nečistoty z výroby a prachové částice (to se projevilo lehce zakalenější tekutinou, která z kolonky nejprve vytékala). Kolonka byla promývána ACN do odpadní kádinky.



Obrázek 18: Promývání kolonky do odpadu

Následně byla kolonka zapojená oběma kapilárami do celého systému (tedy do systému s analytickou kolonou) a mohlo dojít k měření standardů.

Nejprve se musela ustálit základní linie, k tomu sloužilo pár prvních nástřiků čistého rozpouštědla (blank) a vzorku. Nejčastěji stačilo kolem 2-4 nástřiků, to sloužilo primárně k promytí a ustálení sorbentu. Proces a důvod ustalování můžeme vidět na následujícím chromatogramu. Z počátku byla základní linie opravdu vysoko a námi měřené látky by se tak ztrácely a jejich kvantifikace by byla velmi obtížná.



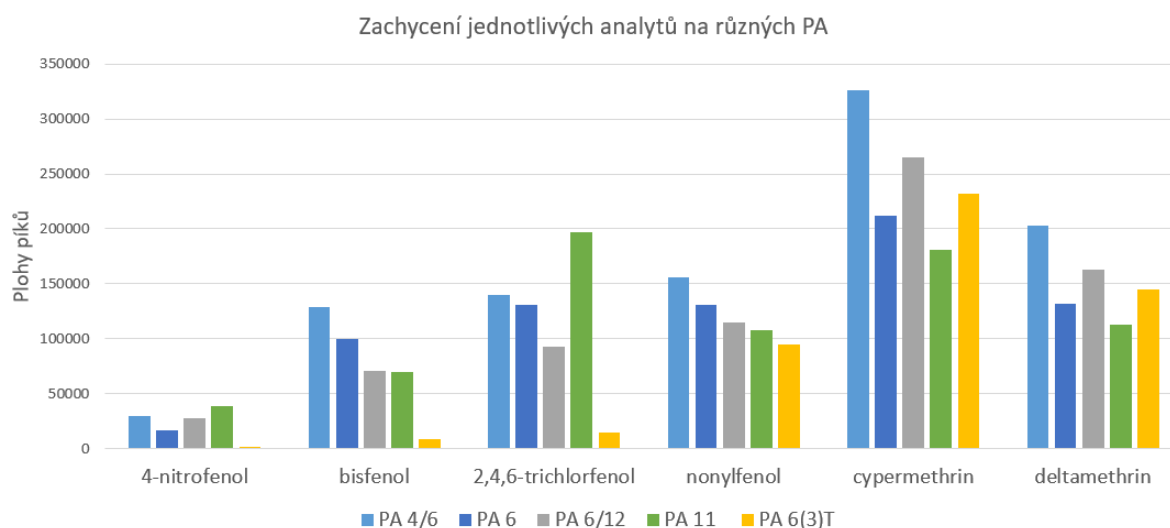
Obrázek 19: Proces ustalování základní linie pomocí opakovaných nástřiků blanku

Poté se mohlo přejít k samotné analýze. Postup při plnění kolonky musel být co nejvíce konzistentní, jelikož docházelo k testování různých typů nanovláken.

### 4.5.2 Volba sorbentu

V první řadě bylo potřeba vybrat vhodný sorbent pro naši analýzu. Bylo testováno celkem 5 druhů nanovláken, konkrétněji polyamidová nanovlákná typu PA 6, PA 11, PA 4/6, PA 6/12, PA 6(3)T. Všechna testovaná nanovlákná byla zvlákněna electrospinningem v gramáži 1 g/m<sup>2</sup> na Technické univerzitě v Liberci. Jako promývací mobilní fáze byla pro volbu sorbentu použita voda, jelikož má nejnižší eluční sílu a je předpoklad, že se budou analyty nejvíce zdržovat. Jednalo se o orientační porovnání sorbentů a jejich schopnosti zdržet analyty a pročistit vzorek. Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml/min a doba promytí na 1 min.

Dle níže vyobrazeného grafu, který nám udává jednotlivé látky a jejich velikost plochy píku se jako nejvhodnější sorbent jevil PA 4/6 s největší retencí modelových analytů.



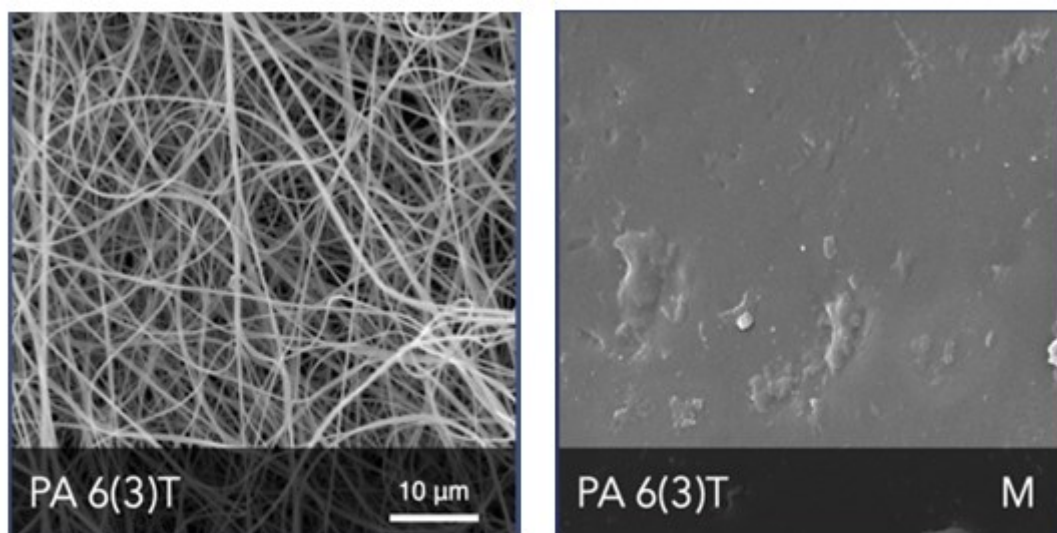
Obrázek 20: Porovnání sorbentů a jejich schopnost zdržet analyty

### 4.5.3 Volba promývací mobilní fáze a stabilita

Přídavek organické fáze nám pomáhá vymýt více nečistot z matrice vzorku. Je však třeba dát si pozor na typ mobilní fáze, ale také na její koncentraci. Obojí nám pak ovlivňuje, jakým způsobem se analyty zdržují, či se naopak už díky eluční síle organické fáze ztrácejí. V průběhu testování bylo zjištěno, že použití methanolu není příliš vhodné. Methanol některé druhy nanovláken rozpouštěl, hlavně tedy PA s delším řetězcem a nejvíce pak PA aromatický (viz obr. 21 a 22).



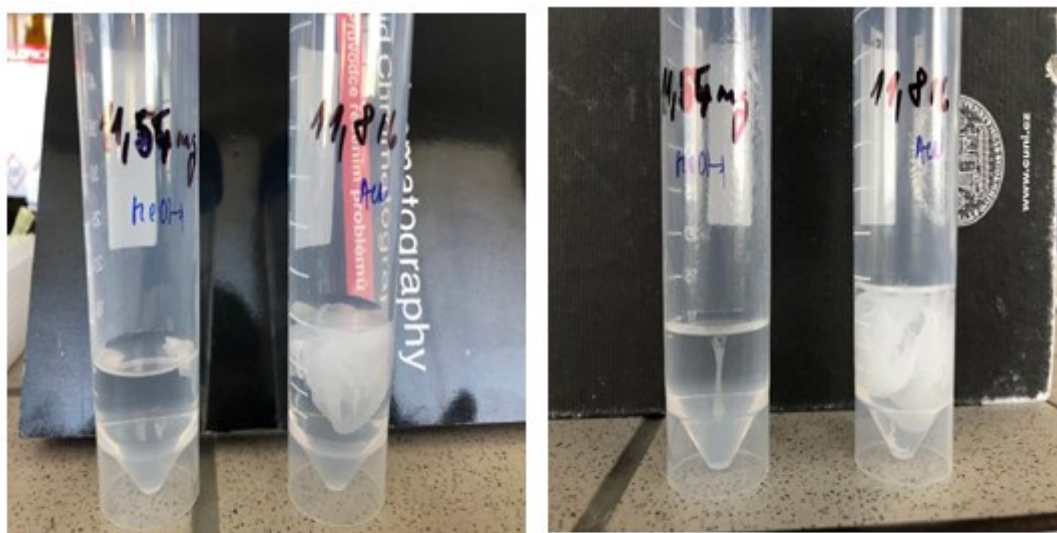
Stabilita nanovláken v MeOH bylo testována i přímo na Technické univerzitě v Liberci. Na obrázku 21 můžeme vidět mikroskopickou strukturu. Snímky nanovláčkové struktury a její následné degradace, včetně makroskopických fotek focených přímo během práce jsou zdokumentovány na následujících obrázcích:



PA původní

PA po 24h v MeOH a jeho následném vysušení

Obrázek 21: Snímky nanovláken a jejich rozpouštění v MeOH pod elektronovým mikroskopem – fotky zaslané TUL



původně

Po 7 dnech v MeOH (vlevo) a ACN (vpravo)

Obrázek 22: Proces rozpouštění nanovláčka v methanolu – fotky pořízené v laboratoři

Z tohoto důvodu byly pro volbu promývací fáze dále testovány pouze různé koncentrace ACN. Experimentálně byly ozkoušeny 3 koncentrace – 2,5%, 5% a 10% roztok ACN. Plochy píků jsou vztaženy k plochám píků naměřené s vodou, jelikož voda má nejmenší eluční sílu (je tedy ustanovena na 100% výtěžnost).

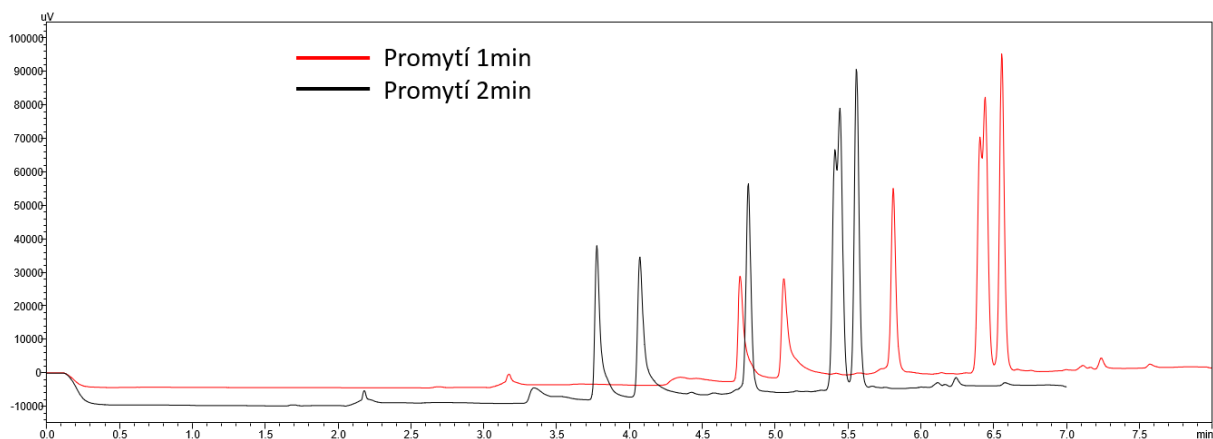
Tabulka 4: Porovnání výtěžnosti jednotlivých koncentrací ACN v promývací mobilní fázi

PA4/6 Analyty	Výtěžnost			
	voda	2,5 % ACN	5 % ACN	10 % ACN
4-nitrofenol	100,00 %	91,92 %	100,14 %	90,16 %
bisfenol A	100,00 %	98,89 %	85,95 %	77,66 %
2,4,6-trichlorfenol	100,00 %	133,91 %	91,54 %	86,32 %
nonylfenol	100,00 %	158,72 %	90,65 %	77,94 %
cypermethrin	100,00 %	112,77 %	99,00 %	94,16 %
deltamethrin	100,00 %	156,49 %	100,17 %	96,23 %

Na základě těchto experimentálních dat zobrazujících výtěžnost bylo rozhodnuto, jaká koncentrace je nejvhodnější. Cílem bylo co nejvíce se blížit 100 % (to jsou plochy píků promývané pouze vodou), a to proto, že se tak látky nevymývají a ani nezadržují v kolonce příliš dlouho. Jako nejideálnější mobilní fáze se tedy jevil 5 % roztok ACN. S větším množstvím ACN už byly výrazné ztráty zejména bisfenolu a nonylfenolu (viz Tab. 4).

#### 4.5.4 Délka promytí a následné přepnutí ventilu

Z následujícího chromatogramu (Obr. 23) a tabulky (č.5) můžeme usoudit, že jako vhodnější se jevílo promytí o délce jedné minuty. Píky zde vykazovaly větší plochu píku (vztažené na měření s vodnou mobilní fází jednu minutu). Pro lepší přehlednost ztrát při volení organické fáze jsou plochy uvedené v procentech. Při nastaveném promytí o délce 2 minut již docházelo ke znatelným ztrátám. Z tohoto důvod bylo zachováno promytí pouze o délce 1 min.



Obrázek 23: Rozdíl mezi nastavením promytí extrakční kolonky 1 a 2 min

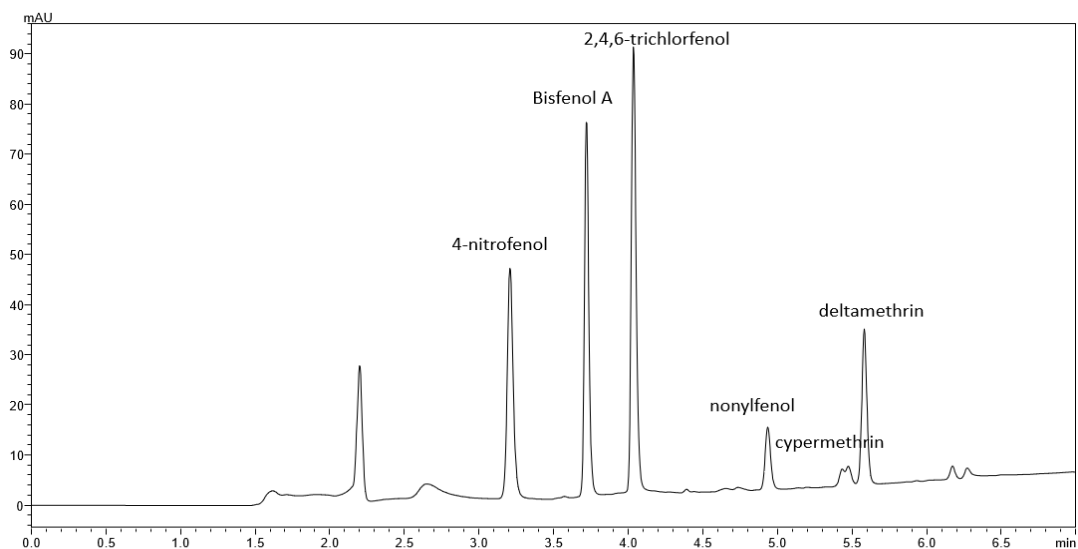
Tabulka 5: Vyjádření % ztrát při použití promytí 1 a 2 min

Analyt	voda	5% roztok ACN	
		Průměr ploch – promytí 1 min	Průměr ploch – promytí 2 min
4-nitrofenol	100 %	100,14 %	60,47 %
bisfenol	100 %	85,95 %	66,80 %
2,4,6-trichlorfenol	100 %	91,54 %	72,32 %
nonylfenol	100 %	90,65 %	82,98 %
cypermethrin	100 %	99,00 %	97,08 %
deltamethrin	100 %	100,17 %	99,16 %

Finální gradient pro zapojení SPE do systému vypadal následovně

Tabulka 6: Finální gradient pro online zapojení SPE do systému

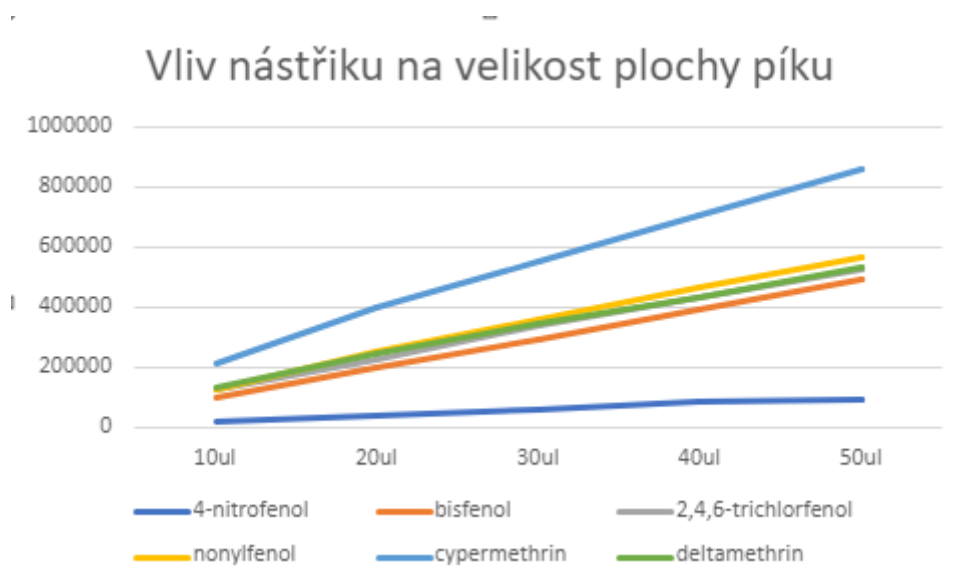
	Čas (min)	Průtok (ml/min)	Koncentrace A (%)	Koncentrace B (%)
1		1,0	30	70
2	2,00	1,0	40	60
3	3,00	1,0	70	30
4	5,50	1,0	100	0
5	6,00	1,0	100	0
6	6,50	1,0	30	70



Obrázek 24: Výsledný chromatogram při použití finálního gradientu pro online zapojení SPE do systému

#### 4.5.5 Velikost nástřiku

Abychom zajistili co nejvíce možné zakoncentrování, bylo třeba otestovat i maximální množství nástřiku, které můžeme pro analýzu použít. Čím vyšší nástřik, tím teoreticky i vyšší zakoncentrování. Testováno bylo 5 možností nástřiku 10-50  $\mu$ l.

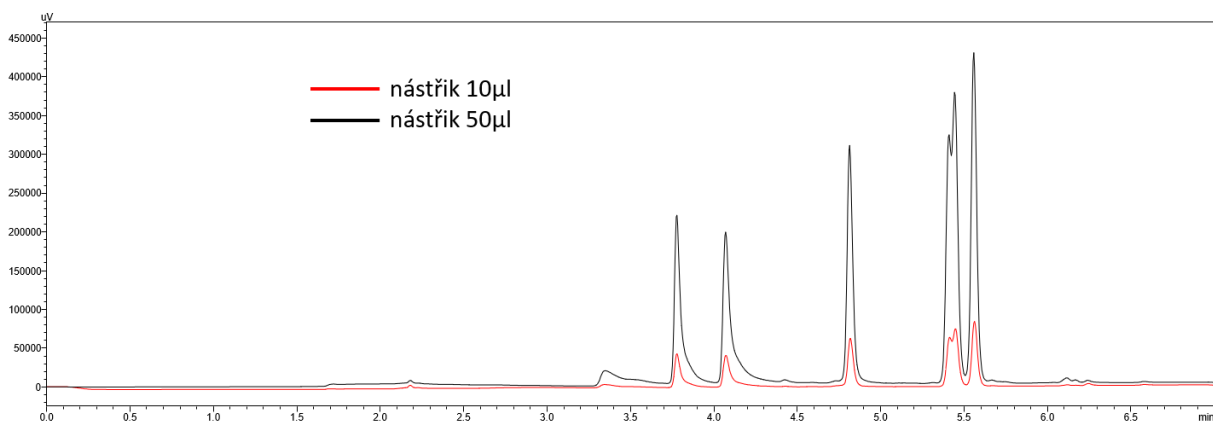


Obrázek 25: Graf zobrazující vliv velikosti nástřiku na velikosti plochy píků

Tabulka 7: Procentuální poměr ploch při použití nástřiku 50  $\mu$ l vůči 10  $\mu$ l

PA4/6	Plochy píků		
nástřik	10 $\mu$ l	50 $\mu$ l	Poměr ploch
4-nitrofenol	22133	113965	514,91 %
bisfenol	127387	634835	498,35 %
2,4,6-trichlorfenol	146167	672345	459,98 %
nonylfenol	148352	725030	488,72 %
cypermethrin	301428	1527820	506,86 %
deltamethrin	187339	951776	508,05 %

Pro lepší představu zde máme tabulku, která nám číselně vyobrazuje procentuálně poměr ploch píků 50  $\mu$ l a 10  $\mu$ l nástřiku. Zde je vidět, že zakoncentrování látek je téměř pětinasobné. Tento nástřik proto bude využit i při analýze vzorků vody z řek.



Obrázek 26: Chromatogram vyobrazující rozdíl mezi nástřiky 10  $\mu$ l a 50  $\mu$ l

## 4.6 Shrnutí optimalizovaných podmínek

### Optimální chromatografické podmínky

**Chromatograf:** UHPLC Shimadzu Nexera X3

**Detektor:** DAD spektrofotometr (220 nm)

**Kolona:** Bifenyl Kinetex 100×4,6 mm, 5 μm, 100 Å

**Typ eluce:** gradientová

**Průtok:** 1 ml/min

**Mobilní fáze:** Pumpa A: Acetonitril

Pumpa B: ultračistá voda

**Celkový čas analýzy:** 7 min

**Teplota:** 30 °C

**Vyhodnocení:** Chromatografický software LabSolution

### Optimální extrakční podmínky

**Cartridge o rozměrech:** 10x4 mm

**Sorbent:** nanovlákna typu PA 4/6

**Délka promytí:** 1 min

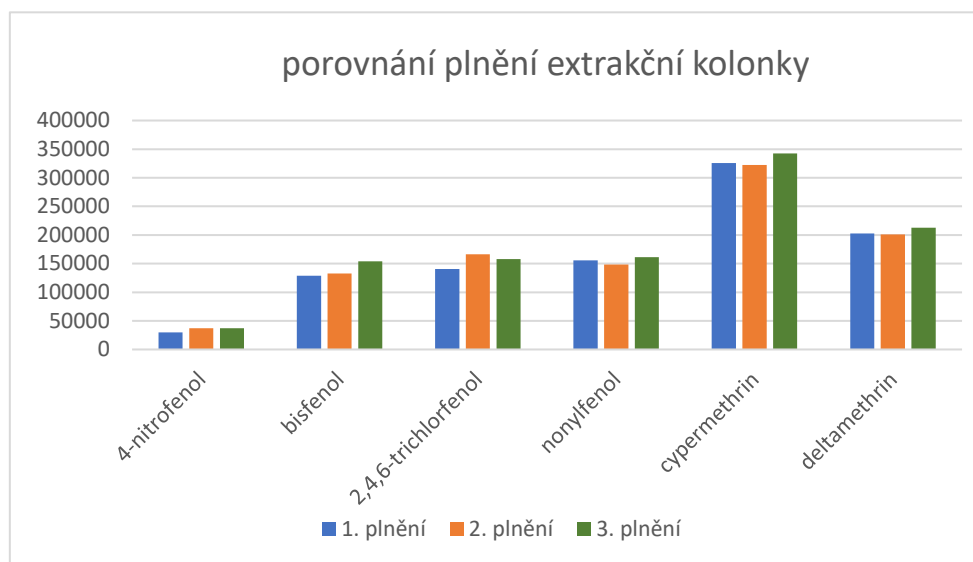
**Průtok:** 1ml/min

**Velikost nástřiku:** 50 μl

**Promývací mobilní fáze:** 5 % acetonitril

## 4.7 Validace metody

Validace metody probíhala za optimalizovaných podmínek uvedených v předchozí kapitole. Pro extrakci byla tedy použita PA4/6 nanovlákná. Byla ověřena i opakovatelnost plnění kolonky – proces plnění byl testován 3x za sebou.



Obrázek 27: Graf opakovatelnosti plnění kolonky nanovláknky

Tabulka 8: Opakovatelnost plnění kolonky

Analyt	průměr ploch	směrodatná odchylka	RSD
4-nitrofenol	34757	4210	12,11 %
bisfenol	138484	13353	9,64 %
2,4,6-trichlorfenol	154825	13286	8,58 %
nonylfenol	155049	6293	4,06 %
cypermethrin	330343	10844	3,28 %
deltamethrin	205374	6367	3,10 %

Z předchozího grafu a tabulky můžeme vyčíst, že se nám úspěšně dařilo proces plnění kolonky nanovláknky zopakovat bez výraznějších změn v odezvě.

#### 4.7.1 Test způsobilosti systému (SST)

Test způsobilosti systému je soubor podmínek, při jejichž splnění platí dříve provedená validace metody [56]. SST bylo hodnoceno ze 6 měření standardu o koncentraci 500 µg/l při online zapojení SPE. V tabulce níže můžeme vidět všechny hodnocené veličiny. Jsou to retenční čas ( $t_R$ ), opakovatelnost nástřiku, která je vyjádřena pomocí relativní směrodatné odchylky (RSD) naměřených ploch 6 měření standardu. Další veličinou je kapacita separace ( $n_p$ ), ta je definována jako počet píků, které mohou být rozlišeny v určitém časovém úseku a to tak, aby byly látky rozděleny s rozlišením  $R=1$  na základní linii [23]. Její hodnotu lze spočítat dle následující rovnice.

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

$T_g$  nám udává čas, po který běžel gradient, v našem případě 5 min.  $W_h$  je šířka v polovině výšky píku.

Faktor symetrie ( $A_s$ ) nás informuje o symetrii daného píku [23]. V rozmezí hodnot 0,8 – 1,5 by píky neměly chvostovat a měly by být symetrické. Bohužel se hodnota prvních píků 4-nitrofenolu (2,013) a píku bisfenolu A (1,689) pohybovala nad touto hodnotou, z důvodu zapojení online SPE. Výpočet se provádí pomocí následující rovnice:

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

$W_{0,05}$  odpovídá šířce píku ve dvacetině jeho výšky,  $d$  je vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku ve dvacetině výšky. Jako poslední veličina je zde uvedena hodnota rozlišení ( $R_s$ ), která udává separaci 2 sousedních píků (analytů) ve směsi [23]. Tato hodnota by měla být ideálně aspoň 1,5, abychom měli jistotu, že je daný pík dobře separován od ostatních.

Tabulka 9: Test způsobilosti chromatografického systému

Analyt	Ret. čas (min)	RSD ploch	$w_h$ (50 %)	$n_p$	$A_s$	$R_s$
4-nitrofenol	3,36	6,55 %	0,068	19,38	2,013	--
bisfenol	3,79	2,55 %	0,036	35,72	1,689	4,517
2,4,6-trichlorfenol	4,08	1,71 %	0,040	32,25	1,770	4,037
nonylfenol	4,82	2,29 %	0,035	36,71	1,153	10,347
cypermethrin	5,45	0,90 %	0,072	18,36	0,802	7,213
deltamethrin	5,57	0,64 %	0,035	36,71	1,096	1,306

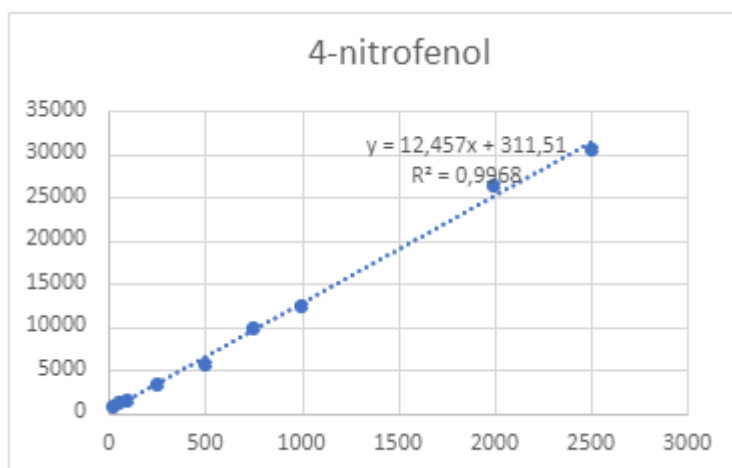


#### 4.7.2 Linearita

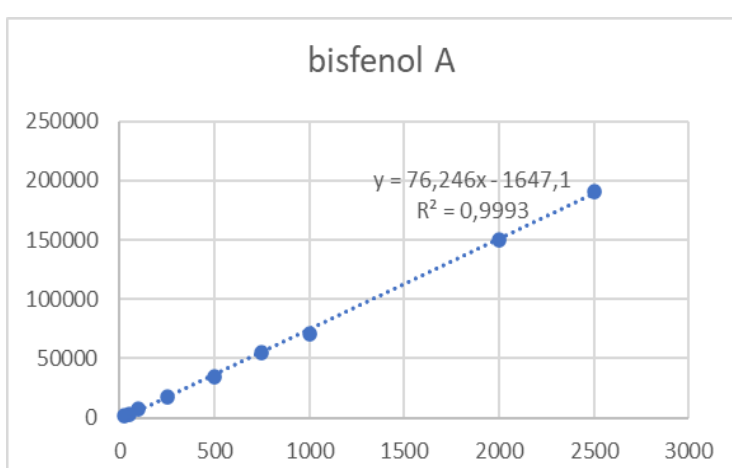
Vyjadřuje schopnost metody poskytovat výsledky přímo úměrné koncentraci stanovované látky ve vzorku [57]. Pro stanovení byly připraveny kalibrační roztoky z původního zásobního roztoku o koncentraci 100 mg/l, které byly poté ředěny do matrice řeky. Hladiny, které jsme použili pro stanovení, jsou: 2500 µg/l, 2000 µg/l, 1000 µg/l, 750 µg/l, 500 µg/l, 250 µg/l, 100 µg/l, 50 µg/l, 25 µg/l.

Pro nonylfenol bylo třeba odečtení pozadí, jelikož docházelo ke koeluci látky s interferencí z matrice (viz Obr. 29). U ostatních látek k tomuto problému nedocházelo.

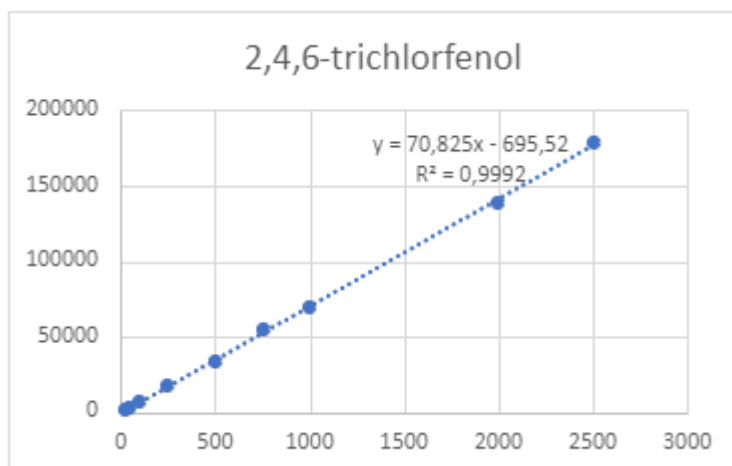
4-nitrofenol	
c (µg/l)	Plocha píku
2500	30698
2000	26471
1000	12411
750	9889
500	5707
250	3347
100	1560
50	1198
25	903



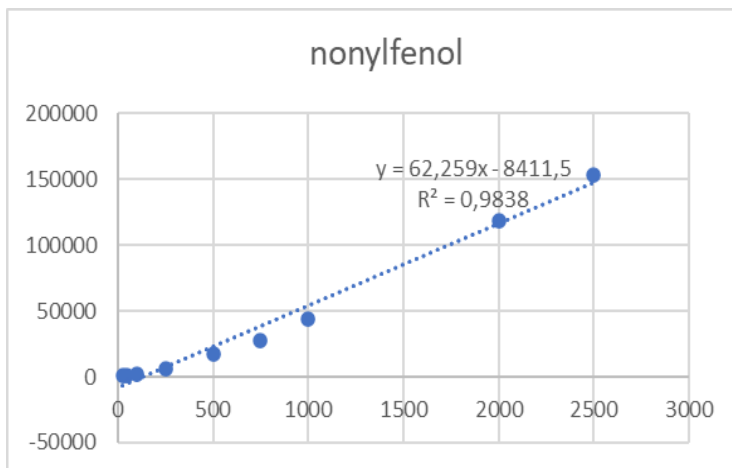
bisfenol A	
c (µg/l)	Plocha píku
2500	191348
2000	149966
1000	71407
750	54981
500	34561
250	18016
100	7348
50	3300
25	1312



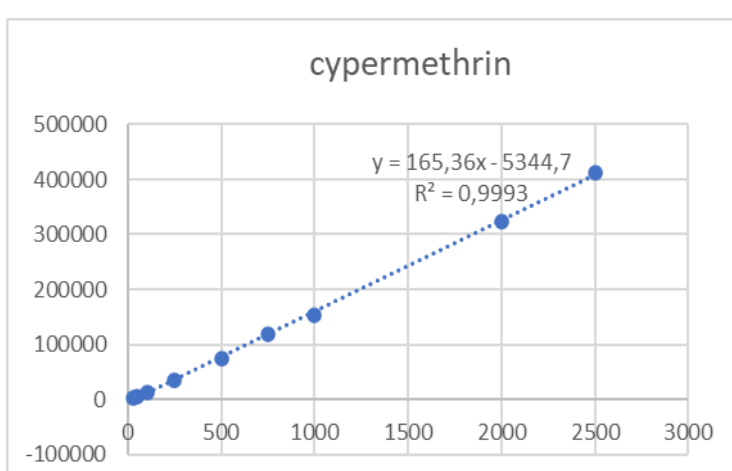
2,4,6-trichlorfenol	
c (µg/l)	Plocha píku
2500	178901
2000	138105
1000	68772
750	54481
500	32817
250	17328
100	6536
50	3221
25	1749



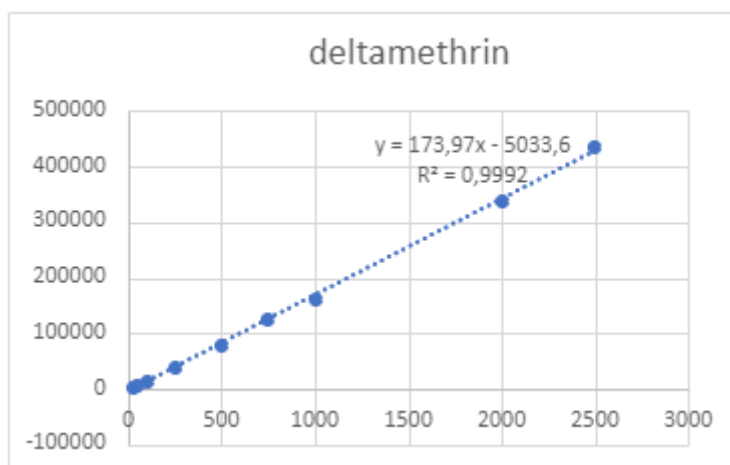
nonylfenol	
c (µg/l)	Plocha píku
2500	153245
2000	118663
1000	43514
750	27657
500	17720
250	5902
100	2532
50	1084
25	688



cypermethrin	
c (µg/l)	Plocha píku
2500	413307
2000	323044
1000	153570
750	118187
500	73636
250	35136
100	13077
50	6021
25	2392



deltamethrin	
c (µg/l)	Plocha píku
2500	436538
2000	339276
1000	161668
750	124634
500	78418
250	37842
100	14490
50	6814
25	3267



Obrázek 28: Stanovené linearity pro jednotlivé analyty

#### 4.7.3 Preciznost

Preciznost vyjadřuje míru shody mezi jednotlivými výsledky metody opakovaně prováděné s homogenním vzorkem [57].

Pro hodnocení míry preciznosti bylo měřeno 6 stejných vzorků řeky, do níž byly přidány standardy o koncentraci 500 µg/l. Každý vzorek byl měřen na 2 nástřicích, z nichž se poté udělal průměr a zaznamenal do následující tabulky. Poté byla z hodnot vypočtena směrodatná odchylka a preciznost uvedená v procentech.

Tabulka 10: Preciznost metody

Analyt	Průměr ploch v řece	směrodatná odchylka	RSD (preciznost)
4-nitrofenol	6368	290,660	4,56 %
bisfenol A	35806	1048,069	2,93 %
2,4,6-trichlorfenol	34688	1162,193	3,35 %
nonylfenol	16557	732,233	4,42 %
cypermethrin	74542	1607,017	2,16 %
deltamethrin	79376	1538,346	1,94 %

#### 4.7.4 Přesnost

Přesnost metody je definována jako blízkost hodnot získaných validovanou metodou s referenční (správnou) hodnotou [57]. Výtěžnost byla získána jako poměr plochy píku látek v matrici (řeka Labe) a plochy píku měřené v ultračisté vodě.

Tabulka 11: Přesnost metody

Analyt	průměr ploch v řece	průměr ploch ve vodě	výtěžnost (%)
4-nitrofenol	6368	6885	92,49 %
bisfenol	35806	39076	91,63 %
2,4,6-trichlorfenol	34688	33012	105,08 %
nonylfenol	16557	19375	85,46 %
cypermethrin	74542	87071	85,61 %
deltamethrin	79376	92519	85,79 %

#### 4.7.5 Limit kvantifikace a limit detekce

Limit detekce (LOD) se definuje jako nejnižší možná koncentrace analytu, která lze detekovat. Limit kvantifikace (LOQ) je nejnižší možná koncentrace, kterou lze změřit s dostatečnou mírou preciznosti a přesnosti. V případě LOD je pík o výšce, která je oproti signálu k šumu (S/N) 3x vyšší, v případě LOQ 10x vyšší [57].

LOD je tedy koncentrace, která nám poskytuje pík s výškou o poměru k signálu šumu  $S/N = 3$  a LOQ  $S/N = 10$  [56]. Z tohoto vztahu lze usoudit, že vztah mezi LOD a LOQ bude vyjádřen rovnicí:

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

Jako hodnota LOQ byla zvolena nejnižší koncentrace, která byla použita při kalibraci metody. Tou je koncentrace 25  $\mu\text{g/l}$ . Je to hodnota, která je experimentálně ověřena, že lze kvantifikovat. Tato hodnota sloužila pro výpočet LOD.

LOQ ( $\mu\text{g/l}$ )	LOD ( $\mu\text{g/l}$ )
25	7,5

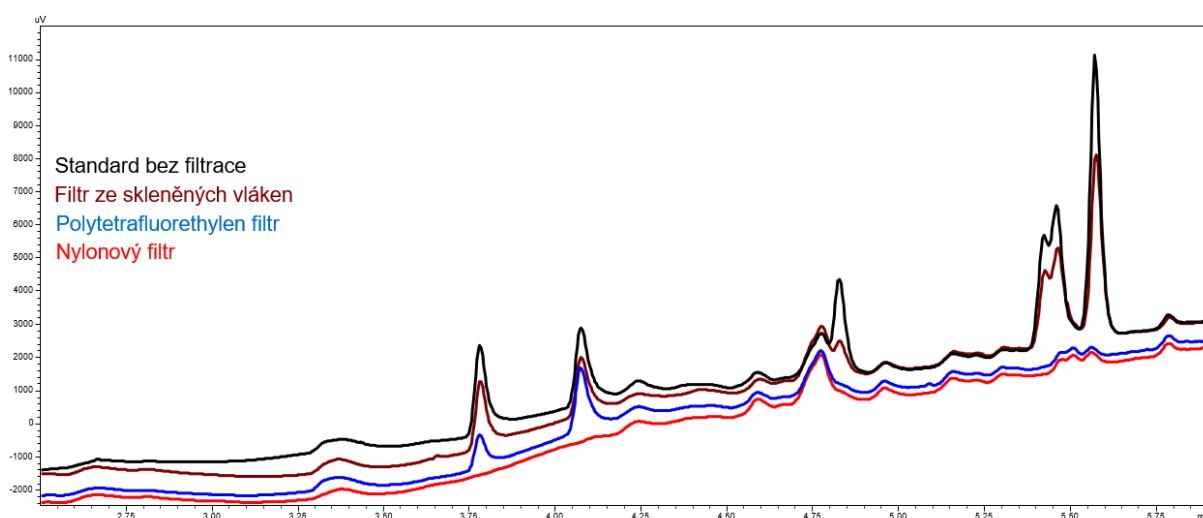
## 4.8 Stanovení obsahu látek v reálných vzorcích

K analýze bylo celkem sesbíráno 8 vzorků různých řek z různých částí České republiky. Běžný postup v chromatografii je takový, že se vzorky přefiltrují, aby se odstranily pevné nečistoty, které se mohly v řece nacházet a které by mohly následně poškodit kolonu. Kvůli tomu, aby se náhodou nefiltrovaly i námi zjišťované látky, byly testovány filtry nejdříve na čistém standardu. Prvním testovaným filtrem byl filtr z acetátu celulózy. Tento se jevil jako nevhodný, docházel tu k zřetelně velkému úbytku testovaných látek. Jako druhý na řadu přišel filtr ze skleněných vláken. Ten působil o poznání lépe.

Tabulka 12: Poměr plochy píku při použití filtru

Analyt	Poměr ploch píků s filtrem oproti hodnotám bez filtru	
	Filtr z acetátu celulózy	Filtr ze skleněných vláken
4-nitrofenol	77,45 %	109,39 %
bisfenol A	50,84 %	72,83 %
2,4,6-trichlorfenol	31,49 %	71,84 %
nonylfenol	56,52 %	84,23 %
cypermethrin	27,35 %	68,81 %
deltamethrin	28,52 %	65,73 %

Byly otestovány další dva běžně používané filtry. Byl jím filtr vyrobený z polytetrafluorethylenu a filtr vyrobený z nylonu. U těchto filtrů však nemělo číselné hodnocení žádný smysl, jelikož došlo k velkému zadržení cílových analytů – znázorněno na chromatogramu níže.



Obrázek 29: Chromatogram zobrazující ztrátu cílových analytů při použití filtrů

Po otestování filtrů se došlo k závěru, že se na filtrech v nejlepším případě zadržovalo přes 20 % analytů. Proto byla využita alespoň centrifugace pro odstranění pevných částic. Výhoda SPE zapojení do systému je taková, že vzorek nejde přímo na chromatografickou kolonu, ale protéká nejprve přes kolonku, která je schopna případné nečistoty zachytit. Takto centrifugovaný vzorek byl přenesen do vialky a následně použit k analýze. Nástřik byl nastaven po předchozí optimalizaci metody na 50  $\mu$ l.

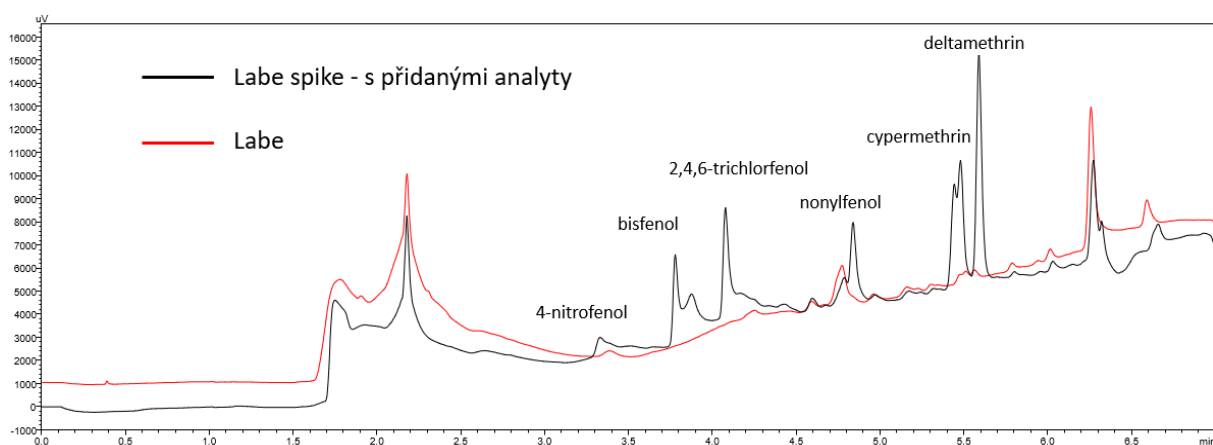
Od každé řeky byly měřeny dva nástřiky. Shrnutí výsledků měření můžeme vidět v následující tabulce:

*Tabulka 13: Výsledné naměřené koncentrace analytů ve vzorcích řek*

	<b>Labe</b>	<b>Cidlina</b>	<b>Morávka</b>	<b>Moravice</b>	<b>Opava</b>	<b>Ostravice</b>	<b>Mohelka</b>	<b>Lesní potok</b>
<b>4-nitrofenol</b>	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
<b>bisfenol</b>	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
<b>2,4,6-trichlorfenol</b>	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
<b>nonylfenol</b>	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD	< LOD
<b>cypermethrin</b>	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
<b>deltamethrin</b>	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

Ani v jedné z řek se nepodařilo naměřit významnou hodnotu koncentrace hledaných látek. Všechny látky byly mimo limit detekce, výjimkou byl však cypermethrin a deltamethrin, které byly detekovány, avšak koncentrace dosahovala velice nízkých hodnot a byla tak pod limitem kvantifikace.

Příklad chromatogramu: Jedná se o chromatogram Labe a jeho porovnání s Labem, do kterého byly přidány analyty o koncentraci 100 µg/l. Na první pohled se může zdát, že se zde nachází i 4-nitrofenol a nonylfenol. 4-nitrofenol by vyřazen na základě svého maxima absorpčního spektra, které píku na chromatogramu bez přidaných analytů neodpovídalo. Nonylfenol pak neodpovídá retenčnímu času, přidaný nonylfenol byl rozlišen od píku na chromatogramu čistého Labe. Možná pozitivita je tak pouze u cypermethrinu a deltamethrinu, jak je také poznat z předešlé tabulky. Obdobným způsobem se projeví i ostatní chromatogramy vzorků řek.



Obrázek 30: Chromatogram Labe a porovnání s Labem s přidanými analyty

## 5 Závěr

V experimentální části diplomové práce byly testovány nové druhy polyamidů pro extrakci v online SPE. Byla porovnávána jejich stabilita a selektivita pro modelové analyty. Během práce bylo zjištěno, že methanol některé druhy nanovláken rozpouští, hlavně tedy PA s delším řetězcem a nejvíce pak PA aromatický - PA 6(3)T. Stabilita v methanolu byla testována i přímo na TUL, kde došlo k potvrzení původního zjištění. Na základě výsledků výtěžnosti cílových analytů byla vybrána jako nejvhodnější sorbent pro extrakci vybraných kontaminantů polyamidová nanovláknina typu 4/6. Poté došlo k optimalizaci metody online spojení extrakce a HPLC systémem přepínání kolon.

V rámci práce byly optimalizovány jak podmínky extrakční, tak podmínky separační. V podmínkách extrakčních se jednalo o proces plnění extrakční kolonky, volbu vhodného polyamidového nanovláknina jakožto sorbentu, délku promytí kolonky a následné přepnutí ventilu, ale také velikost nástřiku vzorku. U podmínek chromatografických se jednalo o volbu vhodné chromatografické kolony, vhodné mobilní fáze a také vhodné gradientové eluce. Následně byly sledovány i validační parametry jako jsou test způsobilosti systému, linearita, preciznost a přesnost a také limit kvantifikace a limit detekce.

Následovala validace metody, vykazující dobrou přesnost i preciznost, a poté byla tato metoda využita pro kontrolu řek z různých míst v České republice. Žádný z hledaných analytů nikde nedosahoval LOQ, dokonce u většiny z nich ani LOD. To je obecně pozitivní zpráva, jelikož vzhledem k jejich toxickým účinkům je snaha je z místních vod a okolních půd co nejvíce eliminovat.



## 6 Seznam použité literatury

- [1] M. Ramalingam, V. K. Ponnusamy, S. N. Sangilimuthu. Electrochemical determination of 4-nitrophenol in environmental water samples using porous graphitic carbon nitride-coated screen-printed electrode. *Environ Sci Pollut Res*, sv 27, pp. 17481–17491, 2020.
- [2] U.S. Environmental Protection Agency. Priority Pollutant List. Dostupné z: <https://www.epa.gov/>. [citováno 2024-03-21]
- [3] T. Rohlenová. Aromatické nitrosloučeniny ve složkách životního prostředí a jejich vliv na organismy. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta v Praze, 2011.
- [4] E. A. Ahmed, H. E. Khaled, A. K. Elsayed. Long-term exposure to p-nitrophenol induces hepatotoxicity via accelerating apoptosis and glycogen accumulation in male Japanese quails. *Environ Sci Pollut Res* s. 28, pp. 44420-44431, 2021.
- [5] „PubChem,“ National Library of Medicine. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. [citováno 2024-02-15]
- [6] A. Kholová, I. Lhotská, J. Erben, J. Chvojka, F. Švec, P. Solich a D. Šatínský. Comparing adsorption performance of microfbers and nanofbers with commercial molecularly imprinted polymers and restricted access media for extraction of bisphenols from milk coupled with liquid chromatography. *Talanta*, sv. 252, pp. 1-7, 2023.
- [7] J. Nastoupilová. Extrakce na nanovlákných sorbentech pro stanovení vybraných léčiv a kontaminantů pomocí kapalinové chromatografie. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2023.
- [8] E. Commision. Commission regulation (EU) 2018/213 of 12 February 2018 on the use of bisphenol A in varnishes and coatings intended to come into contact with food and amending Regulation (EU). *Off. J. Eur. Union*, sv. L41, pp. 6-12, 2018.

- [9] Y. Li, Y. Li, B. Jin; K. Zhang, L. Wang. Effects of 2,4,6-trichlorophenol and its intermediates on acute toxicity of sludge from wastewater treatment and functional gene expression. *Bioresource Technology*, sv. 323, pp. 45-52, 2021.
- [10] B.H. Hameed. Equilibrium and kinetics studies of 2,4,6-trichlorophenol adsorption onto activated clay. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, sv. 307, pp. 45-52, 2007.
- [11] J. Huff. Long-term toxicology and carcinogenicity of 2,4,6-trichlorophenol. *Chemosphere*, sv. 89, pp. 521-525, 2012.
- [12] A. Soares, B. Guieysse, B. Jefferson, E. Cartmell, J.N. Lester. Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewaters. *Environment International*, sv. 34., pp. 1033-1049, 2008.
- [13] Z. Mao, X. Zheng, Y. Zhang. X. Tao, Y. Li. Occurrence and Biodegradation of Nonylphenol in the Environment. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012, sv. 13, pp. 491-505, 2021.
- [14] Integrovaný registr znečišťování. Ministerstvo životního prostředí. Dostupné z: [https://www.irz.cz/sites/irz.env.cz/files/latky/Nonylfenol\\_Karta\\_latky\\_11012019.pdf](https://www.irz.cz/sites/irz.env.cz/files/latky/Nonylfenol_Karta_latky_11012019.pdf).  
[citováno 2024-03-20]
- [15] Directive 2008/105/EC of the European Parliament and of the Council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council. Dostupné z: <http://data.europa.eu/eli/dir/2008/105/oj>.
- [16] S. Ullah, A. Zuberi, M. Alagawany, M.R. Farag, M. Dadar. Cypermethrin induced toxicities in fish and adverse health outcomes: Its prevention and control measure adaptation. *Journal of Environmental Management*, sv. 206, pp. 863-871, 2018.
- [17] B. K. Das, S. C. Mukherjee, M. Alagawany; M. R. Farag, M. Dadar. Toxicity of cypermethrin in *Labeo rohita* fingerlings: biochemical, enzymatic and haematological consequences. *Journal of Environmental Management*, sv. 134, pp. 109-121, 2003.

- [18] Q. Lu, Y. Sun, I. Ares, A. Anadón, M. Martínez. Deltamethrin toxicity: A review of oxidative stress and metabolism. *Environmental Research*, sv. 170, pp. 260-281, 2017.
- [19] E. M. Pitzer, M. T. Williams, C. V. Vorhees. Effects of pyrethroids on brain development and behavior: Deltamethrin. *Neurotoxicology and Teratology*, sv. 87, pp. 106983, 2021.
- [20] M. R. Farag, M. Alagawany, R. M. Bilal, A. G. Gewida, M. Dhama. Toxicity of cypermethrin in *Labeo rohita* fingerlings: biochemical, enzymatic and haematological consequences. *Animals*, rv. 11, pp. 109-121, 2021.
- [21] B. Seven, M. Kültiğın, R. M. Çavuşoğlu, E. Yalçın, A. Acar. Investigation of cypermethrin toxicity in Swiss albino mice with physiological, genetic and biochemical approaches: biochemical, enzymatic and haematological consequences. *Scientific Reports*, rv. 12, pp. 109-121, 2022.
- [22] L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. L. Glajch. *Practical HPLC method development*. 2nd ed. New York: Wiley, 1997.
- [23] L. Nováková, M. Douša, P. Česla. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 2. přepracované a rozšířené vydání. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, 2021.
- [24] R. Hayes, A. Ahmed, T. Edge, H. Zhang. Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, sv. 1357, pp. 36-52, 2017.
- [25] M. Gumustas, P. Zalewski, S. A. Ozkan, B. Uslu. The History of the Core-Shell Particles and Applications in Active Pharmaceutical Ingredients Via Liquid Chromatography: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *Chromatographia*, rv. 82, pp. 17-48, 2019.
- [26] M. E. I. Badawy, M. A. M. El-Nouby, P. K. Kimani. A review of the modern principles and applications of solid-phase extraction techniques in chromatographic analysis. *Anal Sci*, sv. 38, pp. 1457-1487, 2022.
- [27] S. Ötles, K. Canan. Solid-Phase Extraction (SPE): Principles and Applications in Food Samples. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment*, sv. 15.1, pp. 5-15, 2016.
- [28] L. Nováková, M. Douša. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Europrint. Praha, 2013.

- [29] P. Sadílek, D. Šatínský, P. Solich. Using restricted-access materials and column switching in high-performance liquid chromatography for direct analysis of biologically active compounds in complex matrices. *Trends Anal. Chem.*, sv. 26, pp. 375, 2007.
- [30] C. Fernandez-Ramos, D. Šatínský, B. Šmídová, P. Solich. Analysis of trace organic compounds in environmental, food and biological matrices using large-volume sample injection in column-switching liquid chromatography. *Trends Anal. Chem.*, sv. 62, pp. 69–85, 2014.
- [31] I. Lhotská, D. Šatínský, L. Havlíková, P. Solich. A fully automated and fast method using direct sample injection combined with fused-core column on-line SPE–HPLC for determination of ochratoxin A and citrinin in lager beers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, sv. 408, pp. 3319-3329, 2016.
- [32] H. Raabová. Nanovlákná jako potenciální sorbent pro extrakci na tuhou fázi. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2017.
- [33] S. Chigome. Electrospun nanofibers as sorbent material for solid phase extraction. *Analyst*, sv. 136, s. 2879-2889, 2011.
- [34] M. Háková. Využití nanovláknenných sorbentů pro on-line extrakce v kapalinové chromatografii. Disertační práce. Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2020.
- [35] 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*, rv. 48 2007, pp. 3306-3316, 2008.
- [36] D. H. Tan, C. Zhou, C. J. Ellison, S. Kumar, C. W. Macosko. Meltblown fibers: Influence of viscosity and elasticity on diameter distribution. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, rv. 165, pp. 892-900, 2010.
- [37] S. Sinha-Ray, A. L. Yarin, B. Pourdeyhimi. Meltblown fiber mats and their tensile strength. *Polymer*, rv. 55, pp. 4241-4247, 2014.
- [38] J. Růžičková, Y. Wang. Elektrostatické zvlákňování nanovláken: An integrated approach to the theory and applications of fibrous filters. Vyd. 2., nezměn. Technická univerzita v Liberci, 2006.

- [39] T. Subbiah, G. S. Bhat, R. W. Tock, S. Parameswaran, S. S. Ramkumar. Electrospinning of nanofibers. *Journal of Applied Polymer Science*, rv. 96, pp. 557-569, 2005.
- [40] Z. Khamurova. Nanovlákná v analytické chemii. Diplomová práce. Technická univerzita v Liberci, 2014.
- [41] R. Jirkovec, J. Erben, A. Samkova, J. Chaloupek a J. Chvojka. The effect of the electrospinning setup on the surface energy of polycaprolactone nanofibre layers. *Journal of Industrial Textiles*, sv. 51, pp. 8517S-8527S, 2022.
- [42] J. Puiggali. Aliphatic polyamides (nylons): Interplay between hydrogen bonds and crystalline structures, polymorphic transitions and crystallization. *Polym. Cryst.*, rv. 4, pp. 10199, 2021.
- [43] P. Holec, R. Jirkovec, T. Kalous, O. Bařka, J. Brořek. The Potential for the Direct and Alternating Current-Driven Electrospinning of Polyamides. *Nanomaterials*, rv. 12., pp. 665 2022.
- [44] Y. Guibo, Z. Qing, Z. Yahong, Y. Yin. Y. Yumin. The electrospun polyamide 6 nanofiber membranes used as high efficiency filter materials: Filtration potential, thermal treatment, and their continuous production. *Journal of Applied Polymer Science*, rv. 128., pp. 1061-1069, 2013.
- [45] M. Beneř. Nanovláknenné membrány jako nosiče léčiv 1. chitosan, polyamid 6, polyurethan. Diplomová práce. Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2009.
- [46] I. Vejražková. Plasty pro stavebnictví a architekturu 11 – Polyamidy. iMaterialy.cz, 2008. Dostupné z: [http://www.happymaterials.com/imgs/articles/153-12\\_11\\_PA.pdf](http://www.happymaterials.com/imgs/articles/153-12_11_PA.pdf). [citováno 2024-02-15]
- [47] A. S. Nectoux, L. F. Medeiros, R. S. Bussamara Rodrigues, R. M. Duarte Soares, A. N. Fernandes. Electrospun nanofibrous membranes for solid-phase extraction of estriol from aqueous solution. *Journal of Applied Polymer Science*, rv. 136, pp. 47186, 2019.
- [48] Q. Xu. S. Wu, M. Wang, X. Yin, Z. Wen. Electrospun Nylon 6 Nanofibrous Membrane as SPE Adsorbent for the Enrichment and Determination of Three Estrogens in Environmental Water Samples. *Chromatographia*, rv. 71, pp. 487-492, 2010.

- [49] Q. Xu, S. Wu, M. Wang, X. Yin, Z. Wen. Determination of phthalate esters in water samples using Nylon 6 nanofibers mat-based solid-phase extraction coupled to liquid chromatography. *Microchimica Acta*, rv. 168, pp. 267-275, 2010.
- [50] I. Saeidi, M. R. Hadjmohammadi, M. Peyrovi, M. Iranshahi, B. Barfi. HPLC determination of hesperidin, diosmin and eriocitrin in Iranian lime juice using polyamide as an adsorbent for solid phase extraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, rv. 56, pp. 419-422. 2011.
- [51] U. Meister, M. R. Hadjmohammadi, M. Peyrovi, M. Iranshahi, B. Barfi. New method of citrinin determination by HPLC after polyamide column clean-up. *European Food Research and Technology*, rv. 218, pp. 394-399, 2004.
- [52] H. Bagheri, S. Asgari, H. Piri-Moghadam, M. Iranshahi, B. Barfi. On-line Micro Solid-Phase Extraction of Clodinafop Propargyl from Water, Soil and Wheat Samples Using Electrospun Polyamide Nanofibers. *Chromatographia*, rv. 77, pp. 723-728, 2014.
- [53] Q. Xu, N. Zhang, X. Yin, M. Wang, Y. Shen. Development and validation of a nylon 6 nanofibers mat-based SPE coupled with HPLC method for the determination of docetaxel in rabbit plasma and its application to the relative bioavailability study. *Journal of Chromatography B.*, rv. 878, pp. 2403-2408, 2010.
- [54] M. Asadollahi-Baboli, A. Aghakhani, V. Bikdeloo, M. Wang, Y. Shen. Application of Polyamide Nanofibers, SPME/GC-MS, and Chemometrics for Comprehensive Analysis of Volatiles in *Thymus vulgaris* L. and *Thymus serpyllum* L. *Food Analytical Methods*, rv. 9, pp. 528-536, 2016.
- [55] M. Háková, H. Raabová, L. Havlíková, L. Chocholoušová; P. Chocholouš, J. Chvojka. Testing of nylon 6 nanofibers with different surface densities as sorbents for solid phase extraction and their selectivity comparison with commercial sorbent. *Talanta*, rv. 181, pp. 326-332, 2018.
- [56] P. Kastner, „Validace analytických metod, Farmaceutická analýza II, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy,“. [Online] [citováno 2024-04-18]
- [57] L. Matysová. „Validace bioanalytických metod v klinické praxi, Bioanalytické metody v klinické praxi, katedra analytické chemie, Farmaceutická fakulta Univerzity Karlovy,“. [Online] [citováno 2024-04-18]