Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vývoj HPLC metody a testování nového formátu nanovláken pro extrakci polycyklických aromatických uhlovodíků (PAHs)

Bc. Marie Štorková

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Dalibor Šatínský, Ph.D.

Hradec Králové, 2025

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

V Hradci Králové 1.5.2025

…….

Štorková Marie

Poděkování

Ráda bych poděkovala panu prof. RNDr. Daliboru Šatínskému, Ph.D. za možnost pracovat na výzkumném projektu, poskytnutí cenných rad při práci a velmi vřelému a milému přístupu, který mi byl po celou dobu vedení práce věnován. Také bych chtěla poděkovat své rodině, sestře a kamarádům, kteří mě během studia podporovali a motivovali k jeho ukončení. Tato diplomová práce byla podpořena projektem GAČR 23-05586S.

Abstrakt

Univerzita Karlova: Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Kandidát: Bc. Marie Štorková

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

Název diplomové práce: Vývoj HPLC metody a testování nového formátu nanovláken pro extrakci polycyklických aromatických uhlovodíků (PAHs)

Pro vývoj nové metody stanovení významných polycyklických aromatických uhlovodíků a to konkrétně: anthracenu (ANT), acenaftenu (ACP), pyrenu (PYR), chryzénu (CHR), benzo(k)fluranthenu (BkF), benzo(a)pyrenu (BaP), dibenzo(a,h)anthracenu (DaHa), indeno(1,2,3-cd)pyrenu (IcdP) a perylénu (BghiP) byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) ve spojení s off-line extrakcí na tuhé fázi (SPE) pomocí nanovláken umístěných ve spin-filtrech. Metoda HPLC byla optimalizována z hlediska volby mobilní a stacionární fáze, průtoku, teploty, zvoleného gradientu a vlnových délek fluorescenční detekce.

Po nanesení a extrakci pracovního roztoku směsi PAHs na nanovlákenném sorbentu vloženém do spin filtru byl vzorek eluován pomocí acetonitrilu (ACN) a centrifugy při 4000 rpm. Při testování účinnosti extrakce byly použity nanovlákenné sorbenty z polyamidu (PA), polyimidu (PI), polykaprolaktonu (PCL) nebo polybutylen tereftalátu (PBT) a jejich různé modifikace oxidy kovů s reaktivními barvivy. Následně byl extrahovaný vzorek o objemu 10 µl nadávkován na analytickou kolonu Ascentis Express AQ C-18 (150 mm x 4,6 mm, velikost částic 2.7 µm). Samotná separace probíhala za gradientové eluce s mobilní fází A: Acetonitril (70 %), B: destilovaná voda (30 %) s průtokovou rychlostí 1,5 ml/min při konstantní teplotě 30 °C. Detekce byla provedena pomocí fluorescenčního detektoru při vlnových délkách excitace a emise 225/315 pro ACP, 260/400 pro ANT; PYR; CHR, 294/300 pro BkF; BaP; DahA, 250/490 pro Icdp a 294/430 pro BghiP. Doba analýzy trvala 11 minut.

V poslední části práce byl proveden test účinnosti extrakce a přečištění na reálném vzorku z řeky Labe odebrané v Hradci Králové na zvolených nejvhodnějších discích z materiálů PA 11, PA 6/10 a „TACR“ PBT 8 mm které vykazovaly nejvyšší hodnotu záchytu PAHs.

Klíčová slova: Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs), HPLC, off-line SPE, nanovlákna, anthracen (ANT), acenaften (ACP), pyren (PYR), chryzén (CHR), benzo(k)fluranthen (BkF), benzo(a)pyren (BaP), dibenzo(a,h)anthracen (DahA), indeno(1,2,3-cd)pyren (IcdP) a perylén (BghiP)

Abstract

Charles University: Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Candidate: Bc. Marie Štorková

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

Title of the diploma thesis: HPLC method development and testing of a new nanofiber format for the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)

For the development of a new method for the determination of important polycyclic aromatic hydrocarbons, namely: Anthracene (ANT), acenaphthene (ACP), pyrene (PYR), chrysene (CHR), benzo(k)fluranthene (BkF), benzo(a)pyrene (BaP), dibenzo(a,h)anthracene (DaHa), indeno(1,2, 3-cd)pyrene (IcdP) and perylene (BghiP), high-performance liquid chromatography (HPLC) coupled with off-line solid-phase extraction (SPE) using nanofibres placed in spin-filters was used. The HPLC method was optimized in terms of choice of the mobile and stationary phases, flow rate, temperature, gradient elution, and wavelengths of fluorescence detection.

After deposition and extraction of a working solution of a mixture of PAHs on a nanofibrous sorbent embedded in the spin filter, the sample was eluted using acetonitrile (ACN) and centrifuged at 4000 rpm. Nanofiber sorbents made of polyamide (PA), polyimide (PI), polycaprolactone (PCL) or polybutylene terephthalate (PBT) and their various modifications with metal oxides and reactive dyes were used to test the extraction efficiency. Subsequently, a volume of 10 µl extracted sample was loaded onto an Ascentis Express AQ C-18 (150 mm x 4.6 mm, 2.7 µm particle size) analytical column. The separation was carried out under gradient elution with mobile phase A: Acetonitrile (70%) , B: distilled water (30%) at a flow rate of 1.5 ml/min at a constant temperature of 30 °C. Detection was performed using a fluorescence detector at excitation and emission wavelengths of 225/315 for ACP, 260/400 for ANT; PYR; CHR, 294/300 for BkF; BaP; DahA, 250/490 for Icdp, and 294/430 for BghiP.

In the last part of the work, the test of extraction and purification efficiency was performed on a real sample from the Elbe River collected in Hradec Kralove on the selected most suitable discs made of PA 11, PA 6/10 and "TACR" PBT 8 mm materials which showed the highest value of PAHs extraction.

Keywords: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), HPLC, off-line SPE, nanofibers, anthracene (ANT), acenaphthene (ACP), pyrene (PYR), chrysene (CHR), benzo(k)fluranthene (BkF), benzo(a)pyrene (BaP), dibenzo(a,h)anthracene (DahA), indeno(1,2,3-cd)pyrene (IcdP)

Obsah

1. Úvod ... 11
2. Cíl a popis práce ... 12
3. Teoretická část ... 13
3.1 Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs) ... 13
3.2 Toxicita PAHs ... 13
3.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) ... 18
3.3.1 Detektory užívané v HPLC ... 18
3.3.1.1 Fluorescenční detektory ... 19
3.3.2 Aplikace HPLC v praxi ... 19
3.4 Extrakce na tuhé fázi (SPE) ... 20
3.5 Polymerní nanovlákna ... 21
3.5.1 Elektrostatické zvlákňování (Electrospinning) ... 22
3.5.2 Meltblown (Zvlákňování z taveniny) ... 23
3.5.3 Template Synthesis (Syntéza ze šablony) ... 23
4. Experimentální část ... 25
4.1 Použité přístroje, laboratorní vybavení a materiál ... 25
4.2 Použité chemikálie, standardy, vzorky a jejich příprava ... 26
4.2.1 Příprava standardů ... 26
4.2.2 Příprava standardního roztoku PAHs (ST PAHs) ... 27
4.2.3 Příprava zásobního a pracovního roztoku ... 27
4.2.4 Příprava kalibračního roztoku a kalibrační řady ... 27
4.3 Příprava spin filtru a vzorku pro analýzu ... 28
4.4 Podmínky měření ... 29
4.5 Optimalizace chromatografických podmínek ... 29
4.5.1 Detekční parametry ... 29
4.5.2 Optimalizace výběru mobilních fází ... 30
4.5.3 Optimalizace gradientové eluce a testování kolon ... 31
4.6 Souhrn podmínek pro optimalizaci HPLC a extrakce ... 38
4.6.1 Optimální chromatografické podmínky pro analýzu PAHs ... 38
4.6.2 Optimální podmínky pro extrakci PAHs ... 38
4.7 Validace – Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs) ... 39
4.7.1 SST – Test způsobilosti systému ... 39
4.7.2 Linearita ... 41
4.7.3 Preciznost (Opakovatelnost) ... 46
5. Výsledky ... 47
5.1 Výsledky extrakcí na různých nanomateriálech ... 47

5.2 Výsledky extrakce reálného vzorku 53
6. Závěr 56
7. Seznam použité literatury 58

Seznam Zkratek

AC	Střídavý proud
ACN	Acetonitril
ACP	Acenaften
ACR	Acid Red (barvivo)
ANT	Anthracen
As	Faktor asymetrie
AUC	Plocha pod píkem
BaP	Benzo(a)pyren
BghiP	Perylén
BkF	Benzo(k)fluranthen
CHR	Chryzén
DA – APPI – HRMS	Dopantem asistovaná fotoionizace za atmosférického tlaku ve spojení s hmotnostní spektroskopií s vysokým rozlišením
DAD	Detektor diodového pole
DahA	Dibenzo(a,h)anthracen
DC	Střídavý proud
EPA	Agentura pro ochranu životního prostředí
EPNFs	Elektrostaticky zvlákňovaná polymerní vlákna
EU	Evropská unie
f	Vzdálenost mezi kolmicí vedoucí z vrcholu píku a sestupné části píku
FLD	Fluorescenční detekce
GC	Plynová chromatografie
GR	Grafen
H_3PO_4	Kyselina trihydrogenfosforečná
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií
IL – HF – LPME	Mikroextrakce iontovými kapalinami s dutým vláknem v kapalné fázi
IcdP	Indeno(1,2,3-cd)pyren
k‘	Kapacitní faktor
LLE	Extrakce z kapaliny do kapaliny
LOD	Limit detekce

LOQ	Limit kvantifikace
MeOH	Methanol
MF	Mobilní fáze
MNP	Magnetické nanočástice
MOF	Kovové organické struktury
MS	Hmotnostní spektrometrie
MSPE	Mikroextrakce na tuhé fázi
PA	Polyamid
PAHs	Polycyklické aromatické uhlovodíky
PBT	Polybutylentereftalát
PCL	Polykaprolakton
PEI	Polyetherimid
PI	Polyimid
PP	Polyethylen
PSE	Extrakce rozpouštědlem za zvýšeného tlaku a teploty
PS	Polystyren
PTFE	Polytetrafluorethylen
PVC	Polyvinylchlorid
PYR	Pyren
QuEChERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe
RPM	Otáčky za minutu
RR	Reactive Red (barvivo)
R_s	Rozlišení
RSD	Relativní směrodatná odchylka
SF	Stacionární fáze
SPE	Extrakce na tuhou fázi
SPME	Mikroextrakce na tuhou fázi
SST	Test způsobilosti systému
ST	Standartní roztok
TACR	Technologická agentura ČR
THF	Tetrahydrofuran
TiO_2	Oxid titaničitý
t_R	Retenční čas
TQ MS	Hmotnostní spektrometrie s trojitým kvadrupólem

USA	Spojené státy americké
UV	Ultrafialové záření
UV/VIS	Ultrafialovo-viditelná spektroskopie
w	Výška píku

1. Úvod

Lidská činnost ovlivňuje kvalitu životního prostředí ať už jde o ovzduší, půdu, podzemní vody, řeky, jezera nebo moře. Jedním z nejrizikovějších environmentálních znečištění je nežádoucí kontaminace vod pocházející z průmyslové činnosti a výrobních procesů z textilního, kosmetického, fotografického, potravinářského, uhelného, a průmyslu z oblasti rafinace ropy. Značné znečištění vod způsobuje také zemědělská činnost (užíváním pesticidů) nebo spotřeba fosilních paliv (automobilový průmysl).

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs) jsou široce rozšířené kontaminanty životního prostředí, z nichž některé jsou zjevně nebezpečné pro lidské zdraví. Jsou to produkty pyrolýzy nebo nedokonalého spalování organického materiálu. Jsou přítomny všude v atmosféře, vodě a půdě. Zdroje PAHs v atmosféře jsou buď přirozené, nebo jsou výsledkem lidské činnosti. Přírodními zdroji jsou například lesní požáry a erupce sopek. Lidskými zdroji jsou především spalování uhlí, průmyslové podniky (chemičky, hutě, elektrárny, teplárny), ale také spalovací motory dopravních prostředků nebo lokální topeniště. Z těchto zdrojů se PAHs také často dostávají do povrchových a pitných vod.

Aby se těmto problémům zamezilo, je potřeba odpadní vody související s průmyslovou činností patřičně upravit před jejím vypuštěním do přírodního oběhu a stopové koncentrace PAHs monitorovat. Proto se environmentální výzkum v této oblasti zaměřuje na vývoj různých technik, které umožní odstranit PAHs ale i jiné další kontaminující látky z odpadních vod. Mezi takové techniky patří koagulace, fotodegradace, chemická oxidace, membránová separace, biodegradace, ultrazvuková degradace, adsorpce ale také např. i bioremediace. S příchodem nanotechnologií se začaly používat různé nanomateriály pro výrobu účinných adsorbentů jako alternativa k adsorbentům konvenčním, i kvůli ceně. Nejvíce pozornosti bylo také věnováno elektrostaticky zvlákňovaným polymerním vláknům (EPNFs), využívaných k úpravě vod, ale i v jiných oborech (1).

Tato diplomová práce je zaměřena na vývoj metody HPLC pro separaci PAHs s fluorescenční detekcí a testování účinnosti retence různých nanovlákenných materiálů na bázi polyamidu (PA), polykaprolaktonu (PCL), polyimidu (PI), polybutylentereftalátu (PBT) a jejich modifikací barvivy a oxidy kovů pro extrakci PAHs. Jelikož jsou PAHs toxické i v nízkých koncentracích je třeba vyvíjet dostatečně citlivé analytické techniky pro jejich stanovení a extrakční metody pro jejich zakoncentrování.

2. Cíl a popis práce

Diplomová práce se zabývá vývojem nové HPLC metody ve spojení s off-line extrakční SPE metodou, vhodnou pro stanovení vybraných významných PAHs – konkrétně – anthracenu (ANT), acenaftenu (ACP), pyrenu (PYR), chryzénu (CHR), benzo(k)fluranthenu (BkF), benzo(a)pyrenu (BaP), dibenzo(a,h)anthracenu (DahA), indeno(1,2,3-cd)pyrenu (IcdP) a perylénu (BghiP).

Cílem pro vývoj a optimalizaci HPLC metody je vybrat vhodné chromatografické podmínky pro separaci všech analytů, typ kolony, zvolit složení mobilní fáze (MF), vyhodnotit důležité parametry jako je opakovatelnost, linearita, kalibrace, a nakonec provést test vhodnosti chromatografického systému.

Po zvolení vhodných podmínek je cílem práce testování extrakční účinnosti nanovláken z různých polymerních a modifikovaných materiálů ve formě disků vložených do speciálních „zkumavek“ spin-filtrů, na kterých se provede extrakce.

V závěru práce budou porovnány jednotlivé výsledky účinnosti extrakce pro každý nanomateriál a bude vybrán nejvhodnější sorbent pro extrakci PAHs, na němž bude provedena analýza reálného vzorku říční vody.

3. Teoretická část

3.1 Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs)

Jedná se převážně o kontaminanty životního prostředí s karcinogenním, mutagenním a genotoxickým účinkem (2). Zdroje PAHs můžou být přírodního (syntetizovány některými bakteriemi, rostlinami a houbami) nebo antropogenního původu. Ten je klasifikován do čtyř základních skupin, kam patří: průmyslová, domácí, zemědělská a automobilová kontaminace (3).

Mimo jiné mohou PAHs vznikat pyrolýzou nebo nedokonalým spalováním organických materiálů, které vedou k jejich uvolňování do ovzduší, vody, půdy a sedimentů nebo při tepelném zpracovávaní masných výrobků jako je uzení a grilování (4);(2).

Polycyklické aromatické uhlovodíky patří mezi organické sloučeniny, jejichž struktura je složena z atomu uhlíku a vodíku uspořádaných do 2 nebo více kondenzovaných aromatických kruhů bez přítomnosti heteroatomů nebo jiných substituentů. Podle počtu benzenových kruhů je můžeme rozlišit na lehké (nízkomolekulární LMW, 2-3 kruhy) a těžké (vysokomolekulární HMW, 4-6 kruhů), které jsou více stabilní a toxické (5).

LMW jsou polotěkavé a za běžných podmínek se ukládají v půdách i povrchových vodách. Tam často přetrvávají nebo se mohou odpařit nazpět do atmosféry (3).

Fyzikální a chemické vlastnosti PAHs závisí jak na zmíněném počtu, tak poloze aromatických kruhů. Tyto sloučeniny charakterizuje vysoký bod varu, nízký tlak par, špatná rozpustnost ve vodě a vysoká lipofilita. Díky vysoké hodnotě log P mají PAHs vysokou afinitu k organickým frakcím a nízkou biologickou rozložitelnost, jejímž následkem je akumulace a perzistence PAHs v živých organismech (6);(7).

Míra absorpce PAHs závisí na jejich biologické dostupnosti a také fyziologii samotného organismu. Například mořské organismy absorbují tyto látky z rozpustných a částicových frakcí kontaktem se žábrami nebo potravou (6).

Nejčastěji užívanými metodami pro identifikaci a kvantifikaci PAHs jsou: vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) spojená s hmotnostním spektrometrem (MS) nebo fluorescenční detekcí a plynová chromatografie (GC) spřažená s MS nebo trojitou kvadrupólovou hmotnostní spektrometrií (TQ-MS) (6).

3.2 Toxicita PAHs

Benzo-a-pyren

Patří mezi pyrogenní PAHs, vznikající procesem zvaný pyrolýza. Ta nastává

v momentě, kdy jsou organické látky za nízkého obsahu nebo za absolutní nepřítomnosti kyslíku vystaveny vysokým teplotám. Výsledkem jsou pyrolytické procesy nazývané „nedokonalé spalování“, vznikající spalováním motorových paliv v nákladních či osobních automobilech a spalováním dřeva v krbech nebo při lesních požárech. Tyto procesy probíhají při teplotách cca od 350 °C do více než 1200 °C (8).

Ze všech PAHs se nejlépe rozpouští v tucích. Je schopný asociace s molekulami distribuující lipidy (např. chylomikrony), čímž proniká BaP do systémů zodpovědných za absorpci a distribuci lipidů, způsobující jejich bioakumulaci ve tkáních a orgánech. Působí jako senzibilizátor kůže a může vyvolávat alergické reakce. Tvoří se také během kouření cigaret, a proto patří mezi faktory vedoucí ke vzniku rakoviny plic u jejich uživatelů. Je tedy karcinogenní a genotoxický (9).

V následující tabulce jsou shrnuty povolené limity týkající se množství BaP v potravě a v životním prostředí. Limity BaP zahrnuté v tabulce pro potraviny jsou dané legislativou EU. Limity pro životní prostředí jsou vztaženy na legislativu ČR. V některých zemích se legislativně přijatelné úrovně PAHs v potravinách, ale i v jiných kategoriích liší, nebo naopak žádné předpisy pro množství PAHs v potravinách nemají (USA). Příkladem je množství BaP v pitné vodě v Brazílii, kde limit činí 0,7 µg/l. Podle EPA je limit BaP stanoven na 0,2 µg/l a v ČR na 0,1 µg/l (9).

Tabulka 1 *- Limity pro BaP*

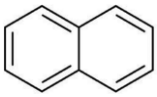
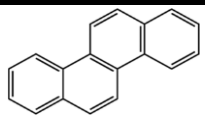
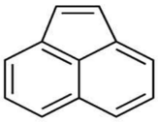
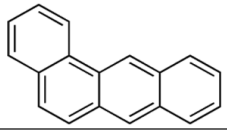
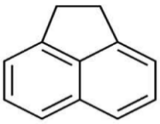
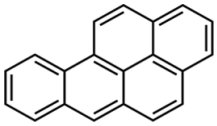
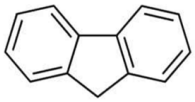
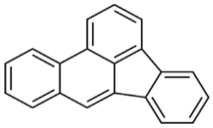
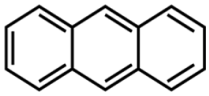
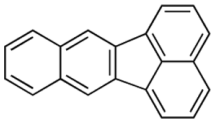
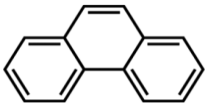
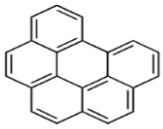
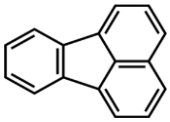
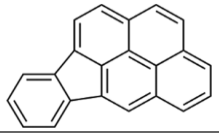
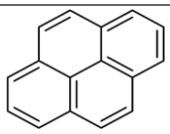
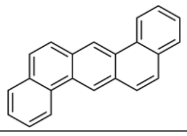
Potraviny (dle EU)	BaP (µg/kg)	Citace	Životní prostředí (dle ČR)	BaP	Citace
Uzené maso; ryby; rybí výrobky	2,0	(10)	**Imise**	1 ng/m^3	(11)
Tuky a oleje	2,0		**Pitná voda**	0,1 µg/l	
Sušené byliny, koření, doplňky stravy, prášky pro přípravu nápojů	10		**Podzemní voda**	0,0029 µg/l	
Kojenecká výživa	1,0				

Anthracen

Je tvořen třemi kondenzovanými aromatickými kruhy a patří mezi nejjednodušší PAHs společně s fenanthrenem. Komerčně se využívá při výrobě barviv nebo ředidel, které slouží jako konzervační prostředky na dřevo. Anthracen řadíme mezi petrogenní PAHs. Vzniká během zrání ropy, nedokonalým spalováním paliv, nebo je uvolňován do ovzduší při jeho samotné výrobě. Díky používání, přepravě a skladování ropy nebo ropných produktů je jeho výskyt v životním prostředí běžný. Důvodem výskytu může být např. i samotný únik ropy, způsobující

znečištění oceánů a sladkovodních vod. Jeho toxicita představuje nejvyšší riziko pro vodní organismy, ale působí také jako potencionální karcinogen pro člověka i zvířata. Do organismu se nejčastěji dostává během inhalace znečištěným vzduchem, kontaktem s pokožkou (může vyvolat alergickou reakci), příjmem kontaminované potravy a pité vody. Při opakované expozici může u člověka docházet ke ztrátě pigmentu v kůži, lokálnímu zesílení nebo zeslabení kůže, vzniku bradavic atd. Při chronické expozici může vyvolat mutaci živých buněk (8).

Tabulka 2 - Nejčastější a významné PAHs znečišťující životní prostřední podle EPA

Název sloučeniny	Chemická struktura	Molekulová hmotnost	Název sloučeniny	Chemická struktura	Molekulová hmotnost
Naftalen		128	**Chrysen**		228
Acenaftylen		152	**Benzo(a)antracen**		228
Acenaften		154	**Benzo(a)pyren**		252
Fluoren		166	**Benzo(b)fluoranthen**		252
Antracen		178	**Benzo(k)fluoranthen**		252
Fenanthren		178	**Benzo(g,h,i)perylen**		276
Fluoranthen		202	**Inden(1,2,3-cd)pyren**		276
Pyren		202	**Dibenzo(a,h)antracen**		278

Převzato z: Taylor&Francis – Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Updated aspects of their determination, kinetics in the human body, and toxicity, 8.1.2023. Dostupné z: https://doi.org/10.1080/10937404.2022.2164390

Tabulka 3 - Možnosti stanovení PAHs

Analyt	Vzorek	Úprava vzorku	Separace – HPLC	Detekce	LOD, LOQ	Citace
15 PAHs	Olivová olej, rafinovaný olivový olej, olej z pokrutinu	LLE za pomocí ultrazvuku	Kolona Agilent ZORBAX Eclipse PAH C_{18} (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) MF: ACN/ACN:H_2O (50:50) Průtok: 1,2 ml/min	FLD	LOD: 0,16 -0,97 a 0,09-1,97 µg kg^{-1} LOQ: 0,5–2,93 a 0,29–5,99 µg kg^{-1}	(12)
6 PAHs	Rybí tkáň; krevety	Soxhletova extrakční metoda Etanolická alkalická extrakce	Kolona Nucleosil LC-PAH (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) MF: ACN/H_2O Průtok: 1 ml/min	FLD	LOD: 0,27–0,64 ng/g LOQ: 0,94–2,12 ng/g	(7)
4 PAHs	Hovězí tkáň	SPE	Nerezová kolona Spheri-5 ODS (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) MF: MeOH/H_2O (91:9) Průtok: 1 ml/min	FLD	LOD: 0,012 ng/g LOQ: 0,04 ng/g	(13)
4 PAHs	Mléko	Mikroextrakce iontovými kapalinami s dutým vláknem v kapalné fázi (IL – HF – LPME)	Kolona TC-C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) MF: ACN/H_2O (85:15), isokratická eluce Průtok: 1 ml/min	DAD	LOD: 0,14–0,71 ng/ml LOQ: 0,4–1,8 ng/ml	(14)
15 PAHs	Vepřové maso (uzené), divoké ryby, grilované ryby, uzená slanina, káva, voda	MSPE	Kolona RP-18 (150 mm × 4,6 mm, 3 µm) MF: 5 % ACN-H_2O/ACN Průtok: 1 ml/min	DAD	LOD: 0,83–11,7 ng/L LOQ: 2,76–39,0 ng/L	(15)
4 PAHs	Čaj	QuEChERS	Kolona Vydac 201 TP54C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) MF: ACN/H_2O Průtok: 1 ml/min	FLD	LOD: 0,03–0,3 ng/g LOQ: 0,1–0,5 ng/g	(2)

15 PAHs	Jablečné slupky	Mikroextrakce supramolekulárním rozpouštědlem s metodou superkritické kapalinové extrakce	Kolona PAH C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm) MF: H_2O-ACN (35:65) /ACN Průtok: 1 ml/min	FLD	LOD: 0,34–1,27 ng/g LOQ: 1,03–3,82 ng/g	(16)
4 PAHs	26ks hořké čokolády (obsah kakaa 41–77 %)	SPE	Kolona Pinnacle DB PAH (50 mm × 2,1 mm, 1.9 µm) MF: H_2O/ACN Průtok: 0,4 ml/min	DA-APPI-HRMS	LOD: 0,016–0,024 ng/g LOQ: 0,054–0,081 ng/g	(5)
16 PAH	Kuřecí paličky s kůží i bez (grilované na dřevěném uhlí)	QuEChERS	Pinnacle II PAH kolona (150 mm × 3 mm, 4 µm) MF: H_2O/4 % THF-ACN Průtok: 1,4–2 ml/min	FLD	LOD: 0,004–0,25 ng/g LOQ: 0,01–0,75 ng/g	(17)
8 PAH	Mořské plody (ryby, krevety, humři, mušle, ústřice, chobotnice)	PSE	Kolona Agilent Zorbax Eclipse PAH (100 mm × 2,1 mm, 1.8 µm) MF: H_2O/ACN Průtok: 0,5 ml/min	APCI-MS/MS	LOD: 0,90–1,25 ng/g LOQ: 1,25–5,00 ng/g	(18)
6 PAH	Ryby (losos, okoun), hovězí a vepřové maso (uzené a grilované)	SPE	Zorbax Eclipse PAH (150 mm × 4,6 mm, 3.5 µm) MF: H_2O/ACN Průtok: 1,3 ml/min	FLD	LOD: 0,05–0,10 ng/g LOQ: 0,25 ng/g	(4)

3.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Základem chromatografických metod je interakce jednotlivých složek směsi mezi dvěma navzájem nemísitelnými fázemi. Jde o pohyblivou fázi, nazývající se mobilní (MF) a fázi nepohyblivou – stacionární (SF). Nanesený vzorek putuje do chromatografického systému díky MF, přičemž interaguje i s fází stacionární, která zapříčiní dělení jednotlivých složek ve vzorku. Pokud jsou látky více afinitní ke SF, jsou více zadržovány na chromatografické koloně, a tudíž se prodlouží jejich retenční čas (t_R) a naopak. Výsledkem měření je grafické znázornění závislosti signálu na retenčním čase nazývající se chromatogram. Za definovaných podmínek slouží retenční čas k identifikaci daného analytu a pro vyjádření jeho koncentrace se určuje plocha/výška píku (19).

Proces samotné separace probíhá v několika krocích. Pomocí vysokotlaké pumpy jsou jednotlivé roztoky (1-4) MF čerpány do degasseru, kde dochází k jejich odplynění a následnému smíchání ve směšovacím ventilu. Dále MF protéká přes vstupní ventil za pomocí prvního pístu, až do výstupního ventilu, kde se nachází tlumič rázů a tlakový senzor. Zde se nachází druhý píst, díky němuž protéká MF do promývacího ventilu. Ten v případě otevření slouží k promývání pumpy (MF teče do odpadu), naopak zavřený vede MF dále do dávkovacího ventilu, kde probíhá samotné nadávkování vzorku. Následně společně proudí na chromatografickou kolonu, kde dojde k separaci jednotlivých složek vzorku a ty jsou poté unášeny do detektoru. Ten je spojen s chromatografickým softwarem, který umožňuje interpretaci výsledků (20).

Během separace je možné využít isokratickou nebo gradientovou eluci. Při isokratické eluci se nemění složení MF a její použití je možné pro řadu detektorů. Další výhodou je stabilita základní chromatografické linie a možnost nástřiku dalšího vzorku neprodleně po skončení analýzy. Při gradientové eluci je možné měnit složení MF během separace, většinou za účelem zvýšení eluční síly. Pro některé analyty je použití gradientová eluce nutností, jelikož by docházelo u lipofilních látek k nežádoucímu prodlužování separace. Výhodou je i vysoká citlivost měření, protože zvýšený obsah organického rozpouštědla s narůstajícím časem umožňuje získat úzké a ostré píky pro látky které by se jinak při použití isokratické eluce značně rozmývaly (19).

3.3.1 Detektory užívané v HPLC

Abychom mohli jednotlivé detektory v HPLC používat, musí splňovat určité podmínky. Je potřeba, aby vykazovali lineární odezvu vůči koncentraci analytu a odezvu pro

všechny složky, které se ve směsi nachází. Detektor by měl být nedestruktivní, vydávat stabilní a reprodukovatelný signál (i v případě změny teploty), nesmí být závislý na složení eluentu a naopak musí umět detekovat i nižší koncentrace analytu. Poslední podmínkou je, že detektory nesmí poskytovat rozmyté píky na chromatogramu, což je však spíše otázkou vhodných separačních podmínek a rozměrů detekční cely. Dnešní detektory mají nízko-objemové průtokové cely a k rozmývání zón tudíž nedochází. Mezi nejpoužívanější detektory v HPLC analýze patří UV/VIS detektory, fluorescenční detektory (FLD), elektrochemické detektory, vodivostní detektory, hmotnostní spektrofotometrické detektory (MS) a detektory diodového pole (DAD) (21).

3.3.1.1 Fluorescenční detektory

Fluorescenční detektory slouží k měření optické emise světla molekulami v roztoku rozpuštěné látky neprodleně po jejich excitaci při vlnové délce s vyšší energií. Citlivost detektorů se zvyšuje u látek, které jsou schopny nativní fluorescence nebo fluoreskují po proběhlé derivatizační reakci. Zdrojem světla bývá širokospektrální deuteriová nebo xenonová výbojka. FLD jsou až 1000x citlivější než UV detektory, a proto se využívají hlavně ve stopové analýze, nebo při analýze omezeného či nízkého množství vzorku. Při analýze je důležité dbát na správný výběr MF, jelikož některé složky mohou způsobit fluorescenci na pozadí, nebo špatně odplyněná rozpouštědla mohou vést ke zhášení fluorescence a ovlivnit tak citlivost měření (22).

3.3.2 Aplikace HPLC v praxi

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je základem moderní analytické chemie. Je využívána v kontrole kvality pro stanovení účinných látek a kvantitativní analýze nečistot. Může být využita pro studium stability, studium nucené degradace, kvantifikaci degradujících látek nebo při analýze dlouhodobé stability. Dále je důležitá pro studium bioekvivalence a terapeutického monitorování léčiv (23).

V medicíně lze pomocí HPLC-MS technik stanovovat např. biomarkery pro diagnostické účely. Nejčastěji zjišťujeme hladinu katecholaminů, steroidů, glykovaného hemoglobinu, vitaminů a aminokyselin. Také je možné analyzovat látky vznikající za patologických stavů jako jsou puriny nebo produkty působení volných radikálů (19).

3.4 Extrakce na tuhé fázi (SPE)

Jedná se o metodu užívanou k přípravě vzorků v enviromentální, farmaceutické a biomedicínské analýze. Samotná příprava vzorku zahrnuje velmi časově náročné a komplikované postupy, mezi které řadíme i procesy filtrace, srážení, ředění nebo odstřeďování. Před použitím chromatografických metod je nutné provedení extrakce pro odstranění interferujících složek matrice, předkoncentrování a stabilizování cílových analytů (24).

Principem SPE je extrakce analytů nacházející se mezi pevnou a kapalnou fází, jejichž afinita k pevné fázi musí být vyšší než k matrici (24). Probíhá v několika krocích, a to aktivací sorbentu organickým rozpouštědlem, kondicionací, nanesením vzorku, promytím a elucí (25).

Zprvu byla vyvinuta jako doplněk extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE), ale později se stala používanější technikou. Mezi výhody oproti LLE patří: nižší náklady, menší spotřeba rozpouštědel, kratší doba zpracování, jednodušší manipulace a snadná automatizace (26).

SPE může být prováděna off-line, kdy příprava vzorku probíhá mimo chromatografický systém. Nebo on-line, kdy není potřeba jakékoliv manipulace se vzorkem, jelikož SPE je přímo propojená s chromatografickým systémem a celý proces může probíhat za plné automatizace (27).

V minulých letech byly nejvíce využívanými sorbenty v SPE především: chemicky vázaný oxid křemičitý s různými funkčními skupinami, sorbenty na polymerní bázi a materiály na bázi uhlíku. Jelikož se u některých z nich začala postupně ukazovat různá omezení jako jsou: fyzikální a chemická nestabilita při nízkém či vysokém pH, nízká kapacita a nemožnost opakovaného použití, bylo potřeba zajistit nové stabilní sorbenty, které usnadní extrakční proces v komplikovaných matricích. Proto se později začalo pracovat na vývoji nových materiálů, jako jsou molekulárně/iontově vtištěné polymery (MIP/IIP), magnetické nanočástice (MNP), kovové nanočástice, kovové organické struktury (MOF) nebo materiály složené ze samotného grafenu či jeho oxidu (28).

3.5 Polymerní nanovlákna

Jako polymer můžeme označit molekulu s mimořádně velkým objemem, skládající se až z 1000 molekul. Je tvořen základními monomerními jednotkami, které se opakují a podle jejich uspořádání a působením mezimolekulárních interakcí se odvíjí jeho vlastnosti (29).

Abychom mohli vlákno nazvat polymerním, musí obsahovat alespoň jeden polymer, přičemž velikost jeho molekuly se typicky pohybuje na desetinách nanometrů. Polymerní vlákno mající průměr 50 nm obsahuje cca 10 000 molekul, nacházející se v různých úsecích vlákna (na povrchu asi jen 3 %) a mají prodlouženou délku na 1-100 μm. Délka molekul je závislá na způsobu výroby nanovlákna (30).

Obecně se délka komerčně vyráběných nanovláken pohybuje okolo 50–100 nm a mohou být vyrobena jak z přírodních, tak syntetických polymerů (31).

Mezi nejvíce rozšířené techniky, kterými lze nanovlákna vytvářet patří metody zvlákňování, tedy elektrostatické zvlákňovaní (Electrospinning), odstředivé tryskové zvlákňování, mokré zvlákňování, bublinkové zvlákňování a tažení vláken. Dále sem řadíme metody rozfukování taveniny (Melt – blown), syntézu ze šablony (Template Synthesis) nebo specifičtější metody mokré chemické techniky výroby, jako je sol-gelová metoda pro nanovlákna oxidu kovů, chemická depozice z par a samoskladba peptidů (32).

Jedinečnými vlastnostmi nanovláken jsou malá velikost pórů, nízká hustota, vysoká specifická plocha povrchu, vysoká poréznost a propojení pórů, zlepšující adsorpční, filtrační a smáčecí vlastnosti nanovlákna (33).

Polymerní vlákna vynikají mechanickou stabilitou, díky které jsou odolné vůči teplu, opotřebení a korozi. Důležitá je také přítomnost povrchových funkčních skupin (hydroxylové a karboxylové) způsobující větší chemickou stabilitu a chemickou modifikovatelnost, umožňující tvorbu kompozitních materiálů (33).

Podle chemického složení je můžeme řadit do 4 kategorií – kompozitní, uhlíková a nanovlákna vzniklá na anorganické nebo organické bázi (34).

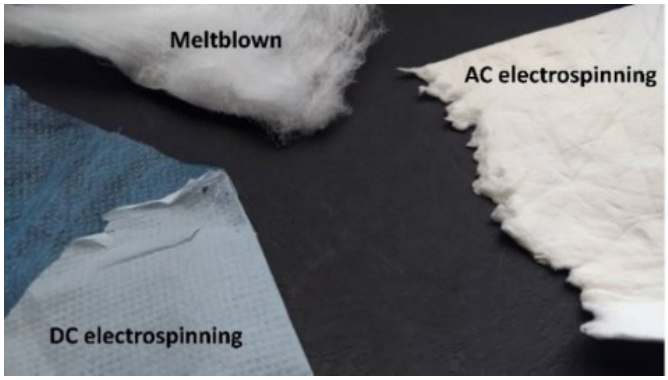
Nejvíce používanými polymery jsou polyamid (PA), polystyren (PS), polypropylen (PP), polyethylen (PE), polykaprolakton (PCL), a polyetherimid (PEI) (35).

S nanovlákny se můžeme setkat v mnoha oblastech, ať již jde o biomedicínské inženýrství, ochranu životního prostředí, lékařství, biotechnologie, automobilový průmysl, elektroniku apod. (31).

3.5.1 Elektrostatické zvlákňování (Electrospinning)

Jedná se o proces výroby polymerního nanovlákna za pomoci elektrostaticky poháněného paprsku roztoku nebo taveniny polymeru. Oproti jiným konvenčním technikám zvlákňování, které jsou schopny vytvořit nanovlákno s průměry v mikrometrovém rozsahu, je schopna produkovat polymerní vlákna s průměry v rozsahu nanometrů (36).

Hlavní součásti pro výrobu je vysokonapěťový napájecí zdroj, zvlákňovací tryska, injekční pumpa a vodivý kolektor. Při napájení může být využito jak stejnosměrného, tak střídavého napětí. Při procesu dochází k vytlačování kapaliny ze zvlákňující trysky za vzniku kapičky působením povrchového napětí. Při následné elektrifikaci dochází k elektrostatickému odpuzování mezi povrchovými náboji způsobující deformaci kapičky do Taylorova kužele, přičemž je vyzářen nabitý paprsek. Ten se nejprve prodlužuje podél přímky, dochází ke ztenčení paprsku a s narůstající elektrickou nestabilitou ohybu, dochází ke vzniku šlehacích pohybů. Následně dochází k natahováním paprsku, způsobující jeho tuhnutí a usazování na kolektor (37). Zvlákňování elektrospinningem je možné provádět za použití stejnosměrného (DC) i střídavého proudu (AC). Rozdíly v jednotlivých materiálech jsou pak v porozitě (tloušťce) zvlákněné vrstvy, jak je zřejmé z obrázku č.1.



Obrázek 1 - Vliv zvláknění na 3D strukturu materiálu
(převzato z: https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117912, 2024)

Nejčastěji užívanými materiály pro výrobu nanovláken pomocí elektrostatického zvlákňování jsou organické polymery ve formě roztoku nebo taveniny. Elektrostatické zvlákňování roztoku je častěji užívané a lépe charakterizované než elektrostatické zvlákňování taveniny, jelikož bylo pro tuto metodu prozkoumáno již více než 100 typů syntetických i přírodních polymerů pro přímou výrobu nanovláken. Pro komerční aplikace související s ochranou životního prostředí byly elektricky zvlákňovány syntetické polymery – polystyren a polyvinylchlorid. Později se pomocí dodatečné úpravy nanovláken získaly nové nanomateriály vyrobené z uhlíku, kovů a keramiky (37).

Pro úspěšné zvlákňování je potřeba, aby měl polymer vysokou molekulovou hmotnost a byla pro něj dostupná vhodná rozpouštědla. Nízká molekulová hmotnost ovlivňuje reologické chování a elektrické vlastnosti roztoku, což způsobuje tvorbu kuliček než vláken. U rozpouštědla je důležitá těkavost a tlak par. Pokud je těkavost příliš nízká, vlákna ukládající se na kolektor budou mokrá. Naopak příliš vysoká těkavost způsobuje rychlé zatuhnutí paprsku, ihned po výstupu ze zvlákňovací trysky. Běžně užívanými rozpouštědly jsou alkoholy, dichlormethan, chloroform, tetrahydrofuran, dimethylformamid, dimethylsulfoxid, hexafluorisopropanol a trifluorethanol (37).

V této diplomové práci byla využívána především vlákna z polyamidu zvlákněná pomocí AC spinningu.

3.5.2 Meltblown (Zvlákňování z taveniny)

Pomocí metody meltblown je možné vyrobit vlákna z termoplastických polymerů o velikosti 1-5 µm. Jedná se tedy spíše o výrobu mikrovláken než nanovláken, která jsou přítomná ve velmi nízkém poměru (38).

Celý proces začíná tavením pevného polymeru ve formě pelet, granul, prášku nebo štěpků. Vzniklá tavenina je vytlačována přes malé otvory vytvářející jemná vlákna. Ty jsou působením horkého vzduchu natahována a následně ochlazována, což zapříčiní jejich zpevnění. Nakonec jsou shromažďována na kolektorové desce, kde vytváří konečný produkt náhodně orientovaných vláken nazývaný „netkaná textilie“ (39).

Nejvíce užívanými polymery pro výrobu netkaných textiliích metodou meltblown jsou polypropylen, polystyren, polyethylen, polykaprolakton, kyseliny mléčná a polymléčná, polyethylentereftalát a polybutylentereftalát (38).

Získaná vlákna se využívají pro výrobu různých produktů v technických, lékařských a hygienických aplikacích jako jsou plenky, dýchací masky, respirátory, jednorázové utěrky, sorpční vložky apod. (38).

3.5.3 Template Synthesis (Syntéza ze šablony)

Využívá již existující nanostrukturovaný templát „šablonu“ pro vytvoření nanomateriálu v jiné formě, který je obtížný získat. Výsledkem jsou nanomateriály s definovanou velikostí, tvarem a konfigurací. Templátová syntéza probíhá obecně ve 3 krocích, a to vstřikováním roztoku polymeru do póru templátu, sušením při vysoké teplotě a odstraněním templátu. Pro odstranění může být využito jak fyzikálních, tak chemických metod, podle povahy templátu. Syntézou ze šablony lze získat nanovlákna o průměru desítek až stovek nanometrů (40, 33).

Od této metody je odvozeno několik technik sloužící k syntéze porézních polymerů např.: molekulární imprinting, šablonování koloidních krystalů a micelární imprinting (41).

4. Experimentální část

4.1 Použité přístroje, laboratorní vybavení a materiál

• Vysokoúčinný kapalinový chromatograf: Shimadzu Prominence

- Odplyňovač – Shimadzu DGU-20A5
- Autosampler – Shimadzu SIL-20AC
- Čerpadlo – Shimadzu LC-20AD
- Kolonový termostat – Shimadzu CTO-20AC
- Komunikační modul – Shimadzu CBM-20A

• PDA detektor – Shimadzu SPD-M20A

• Fluorescenční detektor – Shimadzu RF-10A XL

• Analytické kolony:

- ACE Excel 2 C18-Amide – 150 x 4,6 mm, 2 µm
- ACE Excel 2 CN-ES – 150 x 4,6 mm, 2 µm
- ACE Excel 2 Super C18 – 150 x 4,6 mm, 2 µm
- Ascentis Express AQ-C18 – 150 x 4,6 mm, 2.7 µm
- Ascentis Express RP-Amide – 150 x 4,6 mm, 2.7 µm
- ASTRA C18-AQ – 150 x 3,0 mm, 3 µm
- CHROMSHELL C18-AB – 150 x 4,6 mm, 2.6 µm
- CHROMSHELL C18 Plus – 150 x 4,6 mm, 2.6 µm
- Kinetex Biphenyl – 150 x 4,6 mm, 5 µm
- Kinetex EVO C18 – 150 x 4,6 mm, 2.6 µm
- Kinetex XB-C18 – 150 x 4,6 mm, 2.6 µm
- Luna Omega 5 Polar C18 – 150 x 4,6 mm, 5 µm
- YMC-Triart PFP – 150 x 4,6 mm, 3 µm
- YMC-Triart C18 – 150 x 4,6 mm, 3 µm

• Software – LabSolution

• Centrifuga – Hettich Mikro 220R

• Extrakční sorbenty: název + tloušťka disku

- PA 6 zelená Ø7,28 mm – 1 %, 2 %, 3 % obsah barviva
- PA 6 Blank
- PA 6 – RR 198, RR 120, ACR
- PA 6 – 1 % TiO_2, 2 % TiO_2, 3 % TiO_2
- PA 6 – Acid Green, Acid Black 2%

- PA 4, 4/6, 11, 6/10
- PCL:GR (10:5)
- PCL + 1 % GR
- Polyimid AC – 2 mm
- TAČR PCL Ø7,28 mm – 1 mm, 2 mm, 2.5 mm, 3 mm
- TAČR PBT Ø7,28 mm – 3 mm, (2+) 4-5 mm, (2-) 4-5 mm, 8 mm
- TAČR PA 6 Ø7,28 mm – 2 mm, 3 mm

• Centrifugační filtry – Micro Spin Filters, 0.2 CA

• Ostatní laboratorní sklo a pomůcky: eppendorf mikrozkumavky, pinzeta, skleněná tyčinka, kádinka, odměrná baňka, Pasteurova pipeta, zátka, automatická pipeta, stojánek

4.2 Použité chemikálie, standardy, vzorky a jejich příprava

• Chemikálie

Voda – přečištěná Mili-Q systémem

- Methanol – pro HPLC o čistotě ≥ 99,9%
- Acetonitril – pro HPLC o čistotě ≥ 99,9%
- Tetrahydrofuran (THF) pro HPLC o čistotě ≥ 99,9%

• Standardy – PAHs /roztoky připraveny v rámci předchozí studie/

- ACP – 1,00 mg/1ml ACN
- ANT – 0,99 mg/1ml ACN
- BkF – 1,01 mg/1ml ACN
- PYR – 1,01 mg/1ml ACN
- BaP – 1,00 mg/4ml ACN
- BghiP – 1,00 mg/4ml ACN
- CHR – 1,01 mg/4ml ACN
- IcdP – 1,00 mg/4ml ACN
- DahA – 1,00 mg/4ml ACN

• Vzorky

- Vzorky získané extrakcí na různých nanomateriálech
- Voda odebraná 8.1.2025 z řeky Labe v Hradci Králové, přefiltrovaná přes PTFE filtr 0,22 µm

4.2.1 Příprava standardů

Jednotlivé standardy (pro ACP, ANT, BkF a PYR) byli připraveny rozpuštěním 0,99 - 1,01 mg dané látky v 1 ml ACN o koncentraci 990–1010 mg/l. U ostatních PAHs byl postup stejný, jen se dané látky rozpouštěly ve 4 ml ACN z důvodu nižší rozpustnosti.

4.2.2 Příprava standardního roztoku PAHs (ST PAHs)

Pro optimalizaci podmínek separace byl připraven pracovní roztok obsahující směs PAHs o koncentraci 10 mg/l. Standardy, které byli připraveny rozpuštěním v 1 ml ACN byly pipetovány po 10 µl a standardy připravené rozpuštěním ve 4 ml ACN byly pipetovány po 40 µl. Objem byl doplněn 760 µl ACN do celkového objemu 1 ml.

4.2.3 Příprava zásobního a pracovního roztoku

Pro extrakci byl připraven nový zásobní roztok o koncentraci 5 až 80 mg/l, ve kterém bylo upraveno množství pipetovaných standardů z důvodu zvýšení odezvy fluorescence pro BghiP a IcdP, které byly pipetovány po 80 µl. ACP, ANT, BkF a PYR byly pipetovány po 5 µl a ostatní PAHs po 20 µl. Objem byl opět doplněn 760 µl pomocí ACN do 1 ml. Tento roztok byl následně 1000x zředěn (do 50 ml odměrné baňky bylo odpipetováno 50 µl), aby bylo dosaženo požadující koncentrace v pracovním roztoku využívaného během off-line SPE. Dále bylo přidáno 5 ml ACN pro zvýšení rozpustnosti PAHs a objem se doplnil vodou do 50 ml.

4.2.4 Příprava kalibračního roztoku a kalibrační řady

Kalibrační roztok o koncentraci 1000 ppb = 1 mg/l byl připraven smísením 100 µl ST PAHs, 100 µl BghiP, 100 µl DahA, 100 µl IcdP a 600 µl ACN. Z něho bylo následně připraveno 14. pracovních roztoků v rozmezí koncentrace od 0,0625-100 µg/l. Stejně byly připraveny roztoky pro měření opakovatelnosti o koncentraci 20, 5 a 0,5 µg/l.

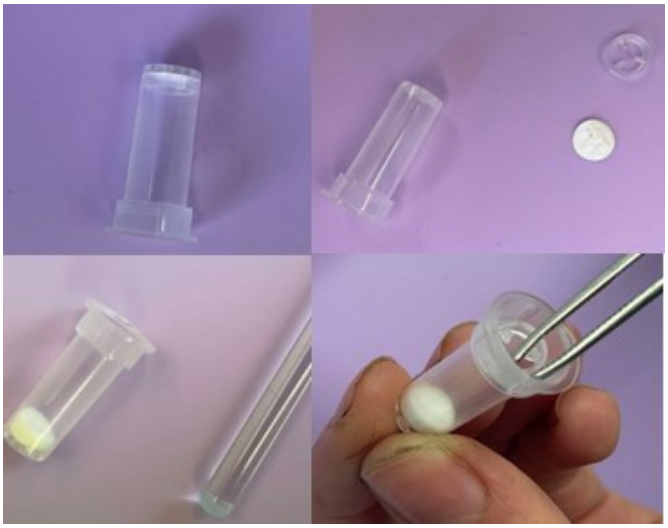
Tabulka 4 - Příprava kalibrační řady

	Koncentrace PAHs (µg/l)	Objem kalibračního roztoku (µl)	Objem Acetonitrilu (µl)
1.	100	100	900
2.	75	75	925
3.	50	50	950
4.	40	40	960
5.	30	30	970
6.	20	20	980
7.	10	10	990
8.	5	5	995
9.	2	2	998
10.	1	1	999
11.	0,5	0,5	*
12.	0,25	0,25	*
13.	0,125	0,125	*
14.	0,0625	0,0625	*

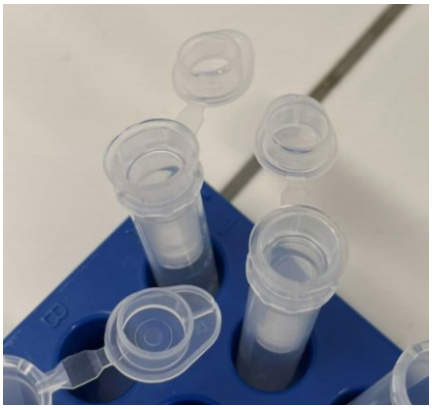
* získáno sériovým ředěním z předchozího roztoku (500 µl kalib. roztoku + 500 µl ACN)

4.3 Příprava spin filtru a vzorku pro analýzu

Před každou extrakcí bylo nutné naplnit spin filtry nanovlákennými disky, které byly již vysekané a předpřipravené ve zkumavkách. Nejprve se pomocí pinzety vytáhl ze spinfiltru těsnící plastový kroužek a PP filtr. Následně se do spin flitru opatrně vložil nanovlákenný disk za pomocí pinzety a skleněné tyčinky, který se upevnil plastovým kroužkem tak aby pokrýval celou plochu dna. Nakonec se takto připravený spin filtr vložil do Eppendrof zkumavky. Pro každý materiál, bylo připraveno 6 spin filtrů k zajištění opakovatelnosti výsledků z extrakce. Během přípravy bylo potřeba pracovat s vysokou opatrností, aby nedošlo k poškození vláken.



Obrázek 2 - Plnění spinflitru nanodiskem



Obrázek 3 - Eppendorf zkumavka s naplněným spinflitrem

Samotná extrakce probíhala v několika krocích. V první řadě bylo potřeba aktivovat disk a promýt ho od případných nečistot z výroby pomocí 200 µl ACN. Poté se zkumavky se spin flitry stočily při 4000 RPM po dobu 2 minut, napipetovalo se do nich 600 µl již připraveného pracovního roztoku PAHs a provedla se znovu centrifugace. Dalším důležitým krokem bylo vyměnit Eppendrof zkumavky za nové, do kterých byl sbírán eluent z disku. Eluce

proběhla po přídavku 600 µl ACN a následné centrifugaci za stejných podmínek. ACN byl zvolen z důvodů vyšší eluční síly pro PAHs. Po proběhlé extrakci byl získán vzorek vhodný k HPLC analýze, který se přepipetoval do 1 ml vialek.

4.4 Podmínky měření

K analýze polycyklických aromatických uhlovodíků byl využit kapalinový chromatograf Shimadzu Prominence LC-20AD s fluorescenční detekcí (vlnové délky excitace a emise jsou pro ACP 225/315, pro ANT; PYR; CHR 260/400, pro BkF; BaP; DahA, 294/300 pro Icdp 250/490 a pro BghiP 294/430). Vzorek o objemu 10 µl byl nadávkován na analytickou kolonu Ascentis Express AQ C-18 (150 x 4,6 mm, 2,7 µm částice). Separace probíhala při 30 °C za gradientové eluce s mobilní fází obsahující v počáteční fázi na pumpě A: Acetonitril (70 %) a na pumpě B vodu (30 %). Průtoková rychlost MF byla 1,5 ml/min. Vyhodnocování dat bylo možné díky chromatografickému softwaru – LabSolutions.

4.5 Optimalizace chromatografických podmínek

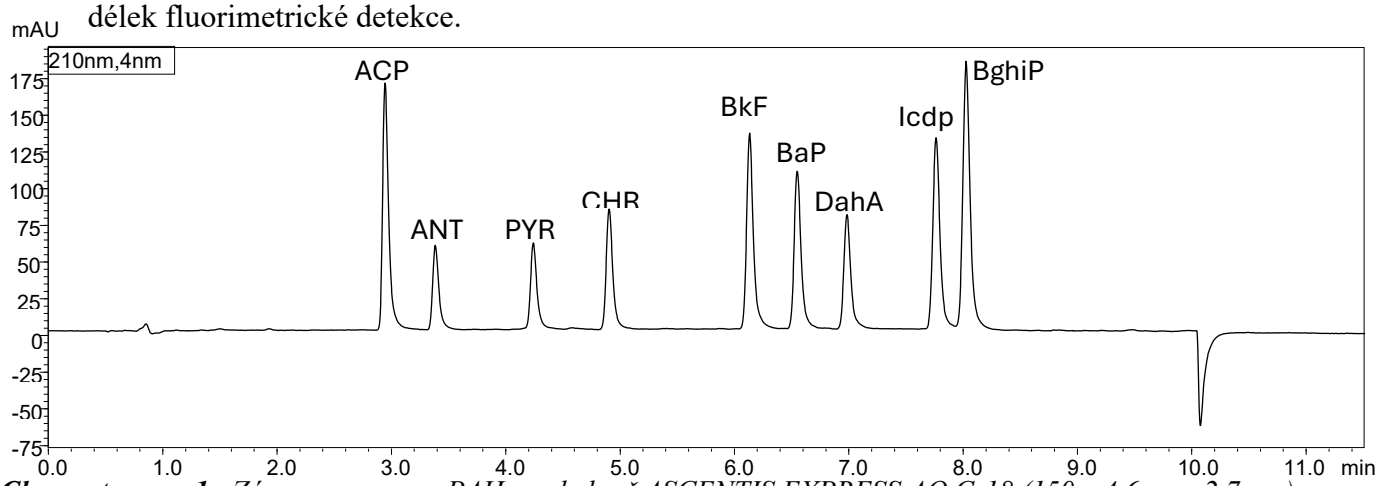
K vývoji nové metody zaměřené na stanovení obsahu PAHs v povrchových vodách, bylo potřeba zajistit, aby se jednotlivé analyty separovaly vzájemně od sebe a případně od ostatních složek matrice. Proto se optimalizace zaměřila na výběr vhodné analytické kolony, složení mobilní fáze a na výběr vhodného průběhu gradientové eluce. Součástí byla také identifikace jednotlivých sloučenin. Nejprve byla změřena směs PAHs a poté jednotlivé standardy. Do chromatogramu se směsí PAHs se postupně vkládaly chromatogramy získané měřením samotných standardů a podle retenčních časů a polohy píku standardu se určilo pořadí analytů.

4.5.1 Detekční parametry

Vzhledem k tomu, že se PAHs vyskytují ve vodách, ale i v jiném prostředí ve velmi nízkých koncentracích, je potřeba pro jejich analýzu velmi citlivé detekce, a proto byl využit fluorescenční detektor. Jelikož je většina našich látek detekovatelná pod různými excitačními a emisními vlnovými délkami, bylo potřeba nastavit jejich automatické přepínání pro zlepšení odezvy detektoru. Problém nastal u posledních dvou látek, tedy BghiP a Icdp, kdy tyto látky mají rozdílnou vlnovou délku detekce, ale separují blízko sebe. Tudíž se detektor nestihl přepnout, aby změřil BghiP, a proto se musela zvolit univerzální vlnová délka (Ex/Em) pro obě látky a to 460/250. Pro ostatní látky byly také nakonec zvoleny univerzální vlnové délky Ex/Em na 260/400 (ACP, ANT, PYR, CHR) a 294/430 (BkF, BaP, DahA).

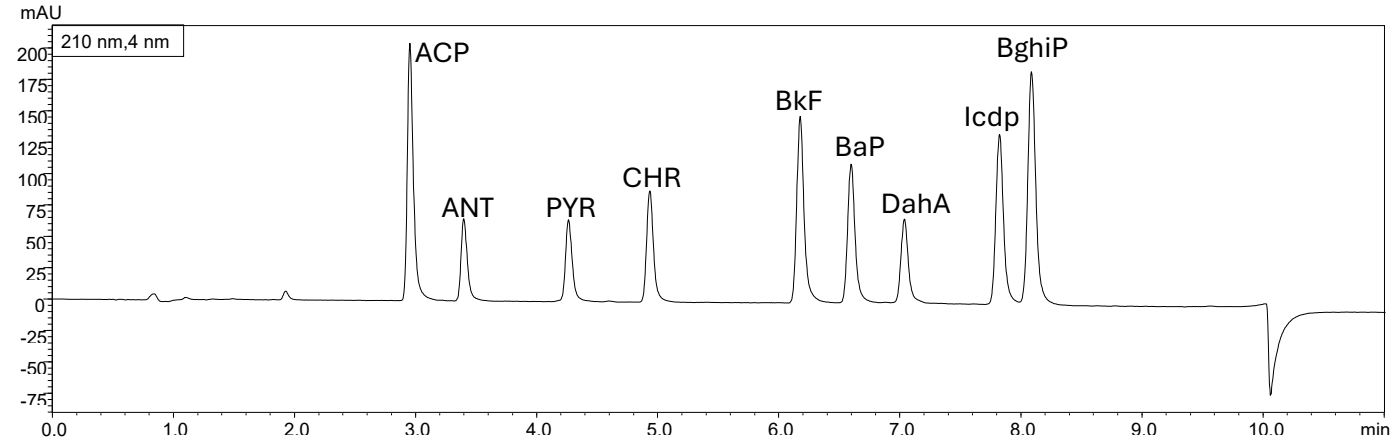
4.5.2 Optimalizace výběru mobilních fází

Během testování mobilní fáze byla vyzkoušena směs třech různých složení. První MF obsahovala acetonitril s vodou, druhá acetonitril s vodou okyselenou 0,1 % H_3PO_4 a poslední acetonitril s vodou smísenou s methanolem. Nejlepší výsledky vykazovala první MF, jelikož při měření za stejných podmínek, jsme získali chromatogram s ostrými, dobře rozdělenými píky a kratší dobou eluce všech analytů oproti druhé MF. Při použití poslední mobilní fáze se nepodařilo eluovat všechny analyty. Také byly zkoušeny 3 různé průtoky MF – 0,5; 1 a 1,5 ml/min, a to vzhledem k různému průměru chromatografických kolon a velikosti jejich částic. Při použití nižších průtoků se většinou prodloužil čas eluce analytů, a proto se jako závěrečný průtok zvolil 1,5 ml/min a kolona s nízkým zpětný tlakem, tedy s core-shell technologií výroby částic, jak je prezentováno níže. V první části optimalizace separačních podmínek byla pro zjednodušení zvolená spektrofotometrická detekce při univerzální vlnové délce 210 nm. Teprve po nalezení vhodných podmínek separace byl optimalizován výběr excitačních a emisních délek fluorimetrické detekce.



Chromatogram 1 *- Záznam separace PAHs na koloně ASCENTIS EXPRESS AQ C-18 (150 x 4,6 mm, 2.7 µm) Gradient A, MF – ACN + voda*

Pozn.: Na chromatogramu je znázorněna separace 9 píků, které jsou symetrické a úzké. Kromě posledních dvou píků, jsou ostatní od sebe dobře odděleny, tudíž je jejich rozlišení vysoké. U posledních dvou látek je rozlišení o něco nižší. Základní linie je rovná s minimálním výskytem šumu až na jeho výskyt v první minutě.



Chromatogram 2 *- Záznam separace PAHs na koloně ASCENTIS EXPRESS AQ C-18 (150 x 4,6 mm, 2.7 µm) Gradient A, MF – ACN + voda okyselená 0,1 % H_3PO_4*

Pozn.: Chromatogram obsahuje 9 symetrických a úzkých píků. Jejich rozlišení je vysoké, ale u posledních dvou látek není zcela dostatečné. Základní linie je rovná s výskytem šumu v první minutě a ve druhé s detekcí nečistoty.

4.5.3 Optimalizace gradientové eluce a testování kolon

Pro výběr nejvhodnějších podmínek pro separaci PAHs bylo testováno celkem 14 kolon se stejnými rozměry, ale různou velikostí částic. Pracovní roztok standardů směsi PAHs o koncentraci 10 mg/l byl analyzován při různých gradientech. Každá kolona byla testována s 2-3 vybranými gradienty (A-F) dle míry retence analytů. První byl vždy testován Gradient A a podle výsledného chromatogramu se měřily další gradienty s méně či více polární MF. Průtok MF se nejprve nastavoval na 1 ml/min a byl sledován jaký vytváří kolona zpětný tlak v HPLC systému. Pokud se blížil k hraničním hodnotám 25 MPa byl použit gradient s nižší průtokovou rychlostí MF. Cílem bylo zjistit, která z kolon nejlépe separuje jednotlivé analyty a zároveň k ní přiřadit nejvhodnější podmínky pro gradientovou eluci. Hodnotil se počet, rozlišení, symetrie a šířka jednotlivých píků.

V přiřazených tabulkách budou popsány všechny gradienty, které následují stručně okomentované ukázky různých chromatogramů získaných měřením pracovního roztoku standardu PAHs na jednotlivých kolonách s nejvhodnějším gradientem.

Tabulka 5 *- Podmínky pro gradient A*

A	**Složení mobilní fáze (%)**	
Čas (min)	Vodná fáze	Organická fáze
0,01	30	70
7	10	90
7-9	10	90
9,01	30	70
11.0	30	70

Tabulka 6 *- Podmínky pro gradient B*

B	**Složení mobilní fáze (%)**	
Čas (min)	Vodná fáze	Organická fáze
0,01	35	65
7	10	90
7-9	10	90
9,01	35	65
11.0	35	65

Tabulka 7 *- Podmínky pro gradient C*

C	**Složení mobilní fáze (%)**	
Čas (min)	Vodná fáze	Organická fáze
0,01	40	60
7	10	90
7-9	10	90
9,01	40	60
11.0	40	60

Tabulka 8 *- Podmínky pro gradient D*

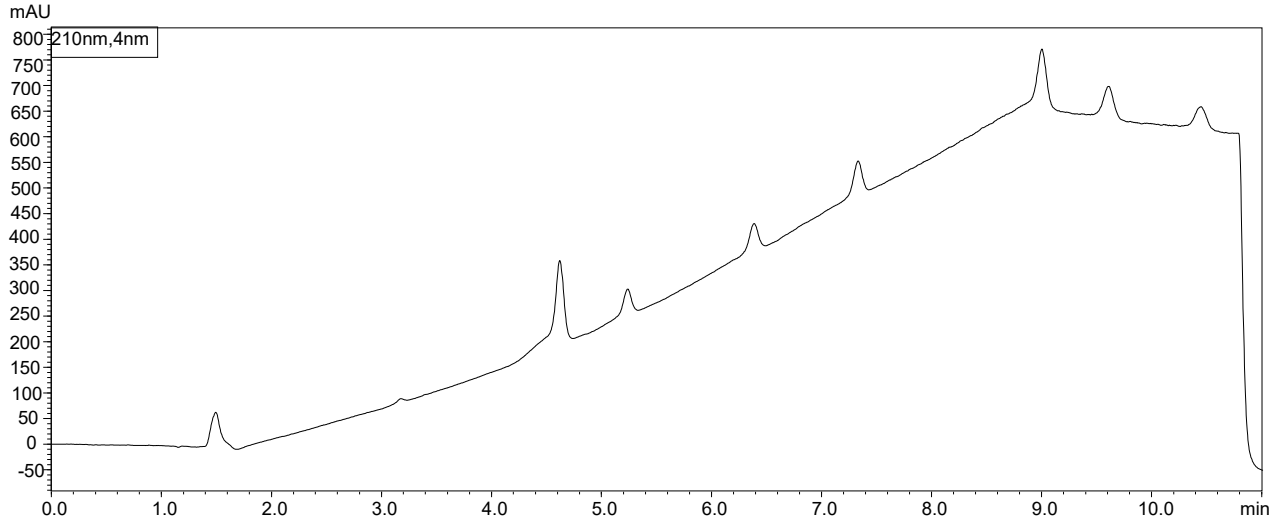
D	**Složení mobilní fáze (%)**	
Čas (min)	Vodná fáze	Organická fáze
0,01	50	50
7	10	90
7-9	10	90
9,01	50	50
11,0	50	50

Tabulka 9 *- Podmínky pro gradient E*

E	**Složení mobilní fáze (%)**	
Čas (min)	Vodná fáze	Organická fáze
0,01	60	40
7	10	90
7-9	10	90
9,01	60	40
11,0	60	40

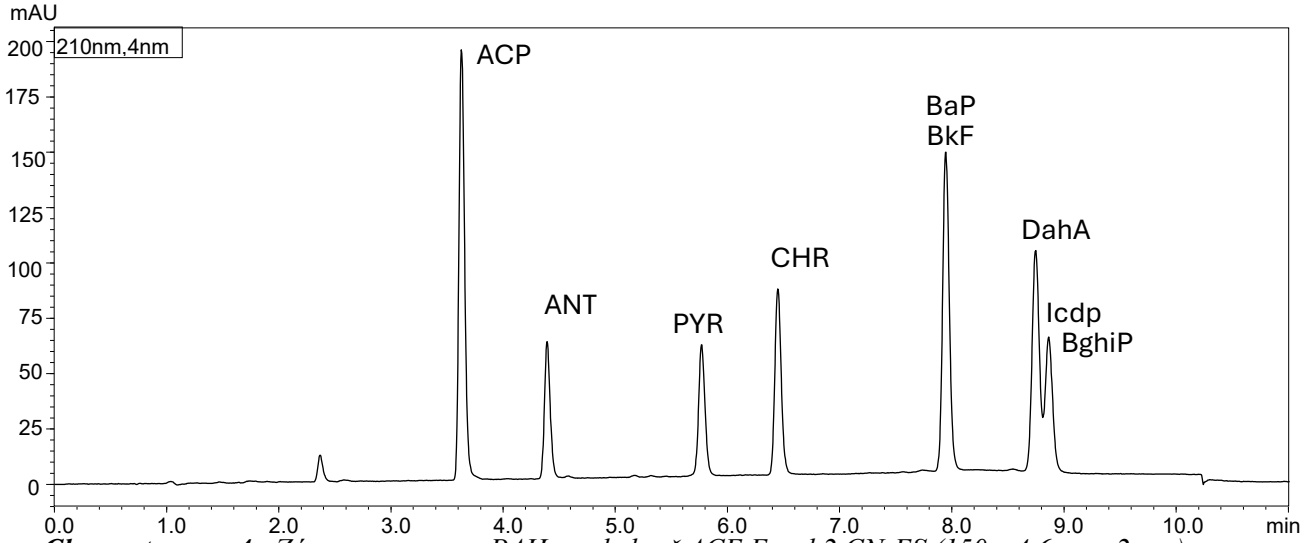
Tabulka 10 *- Podmínky pro gradient F*

F	**Složení mobilní fáze (%)**	
Čas (min)	Vodná fáze	Organická fáze
0,01	20	80
7	0	100
7-9	0	100
9,01	20	80
11,0	20	80



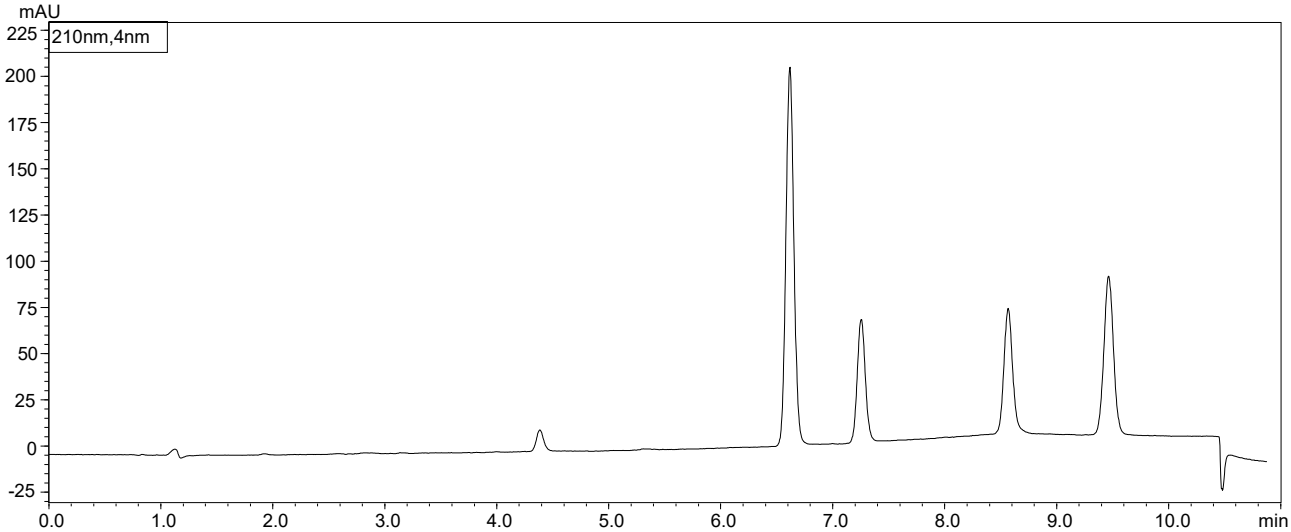
Chromatogram 3 *- Záznam separace PAHs na koloně ACE Excel 2 C18 Amide (150 x 4,6 mm, 2 µm) Gradient C, průtok MF 1.0 ml/min*

Pozn.: Na chromatogramu není možné určit pořadí analytů, nebyly separovány jednotlivé látky od sebe. Mezi 1-2 minutou je detekovaná další neznámá látka. Základní linie není rovná. Kolona je nevhodná pro analýzu PAHs.



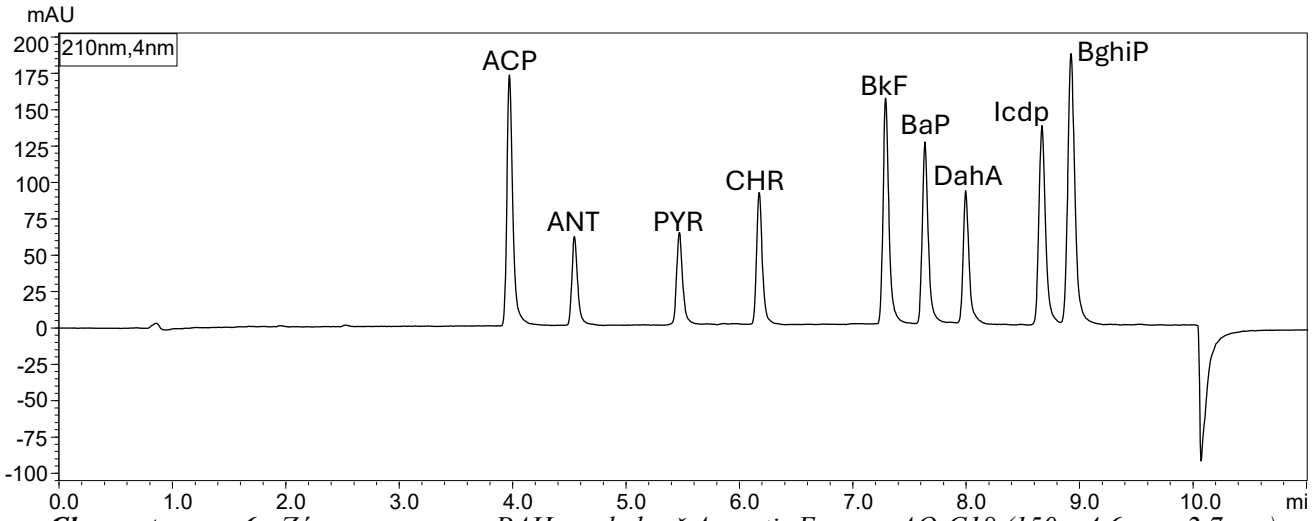
Chromatogram 4 *- Záznam separace PAHs na koloně ACE Excel 2 CN-ES (150 x 4,6 mm, 2 µm) Gradient A, průtok MF 1,5 ml/min*

Pozn.: Nebyly separovány všechny analyty od sebe. Píky s látkami BaP + BkF a IcdP + BghiP se překrývají. Rozlišení je nízké. Mezi 2-3 minutou je detekována další neznámá látka.



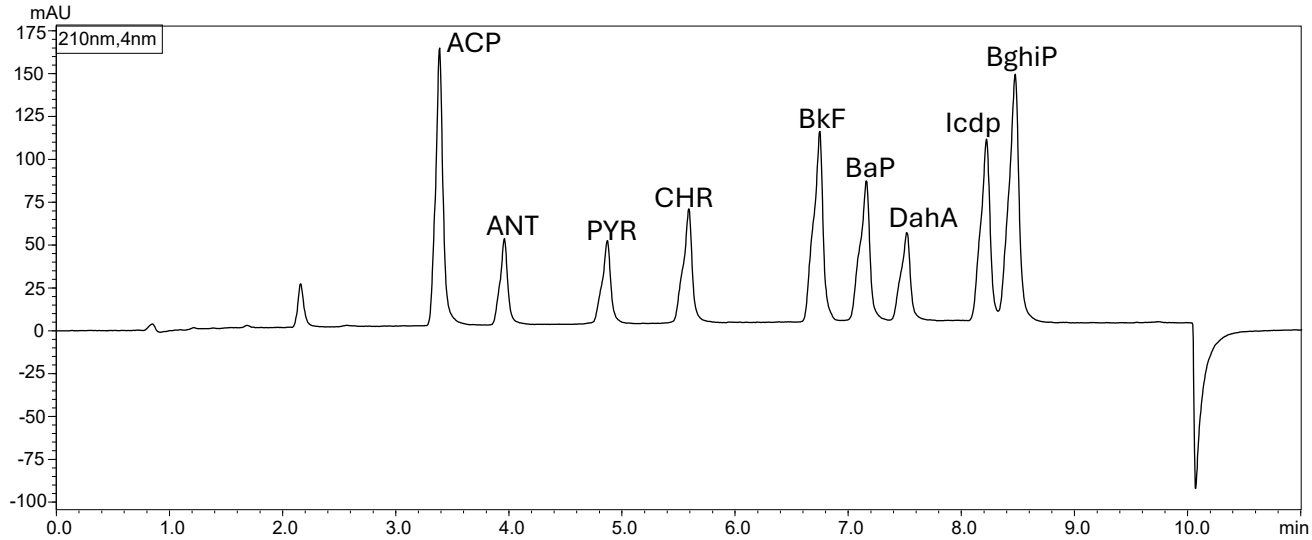
Chromatogram 5 *- Záznam separace PAHs na koloně ACE Excel 2 SuperC18 (150 x 4,6 mm, 2 µm) Gradient A, průtok MF 1,0 ml/min*

Pozn.: Základní linie je rovná. Mezi 4-5 minutou se objevuje neznámá látka. Nedošlo k separaci jednotlivých analytů. Píky jsou symetrické.



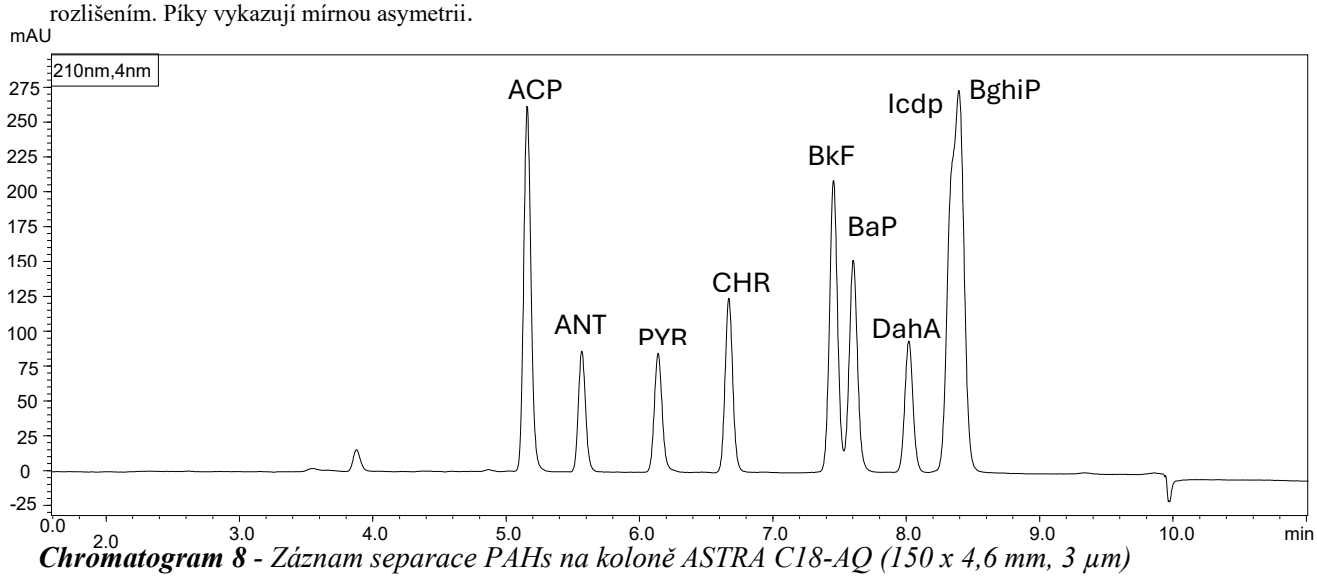
***Chromatogram 6** - Záznam separace PAHs na koloně Ascentis Express AQ-C18 (150 x 4,6 mm, 2.7 µm) Gradient C, průtok MF 1,5 ml/min*

Pozn.: Tato kolona byla vybrána jako nejvhodnější díky nejlepší separaci jednotlivých píků. Pro ukázku byl vybrán Gradient C. Gradient A využitý v analýze (str. 29) byl vybrán kvůli rychlejší eluci látek.



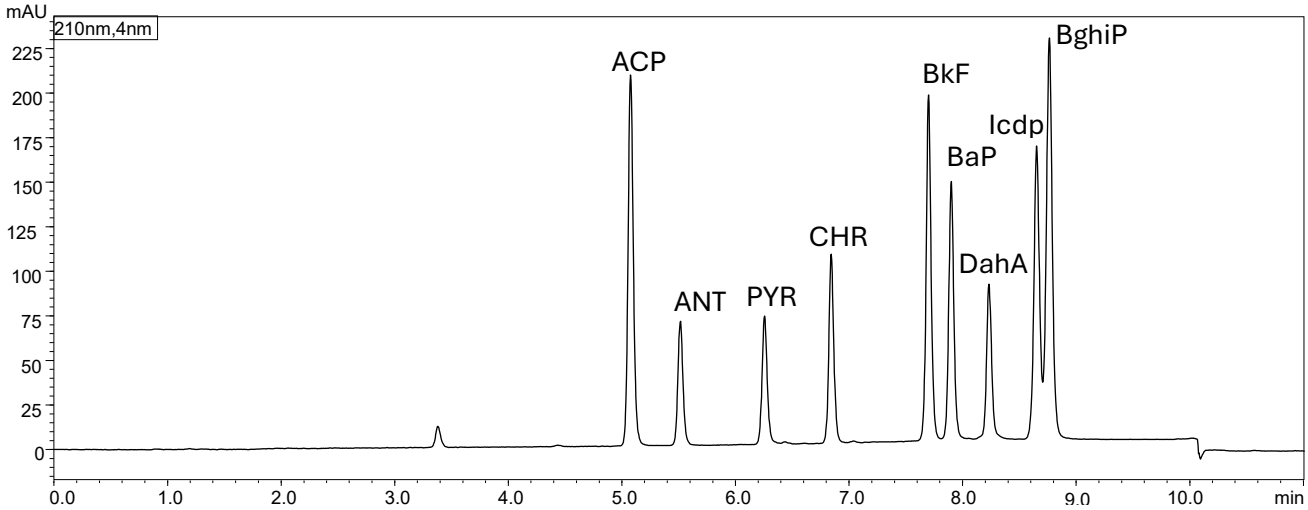
***Chromatogram 7** - Záznam separace PAHs na koloně Ascentis Express RP-Amide (150 x 4,6 mm, 2.7 µm) Gradient C, průtok MF 1.0 ml/min*

Pozn.: Kolem druhé minuty lze vidět detekci neznámé látky. Jednotlivé látky byly od sebe separovány, ale ne s dostatečným rozlišením. Píky vykazují mírnou asymetrii.



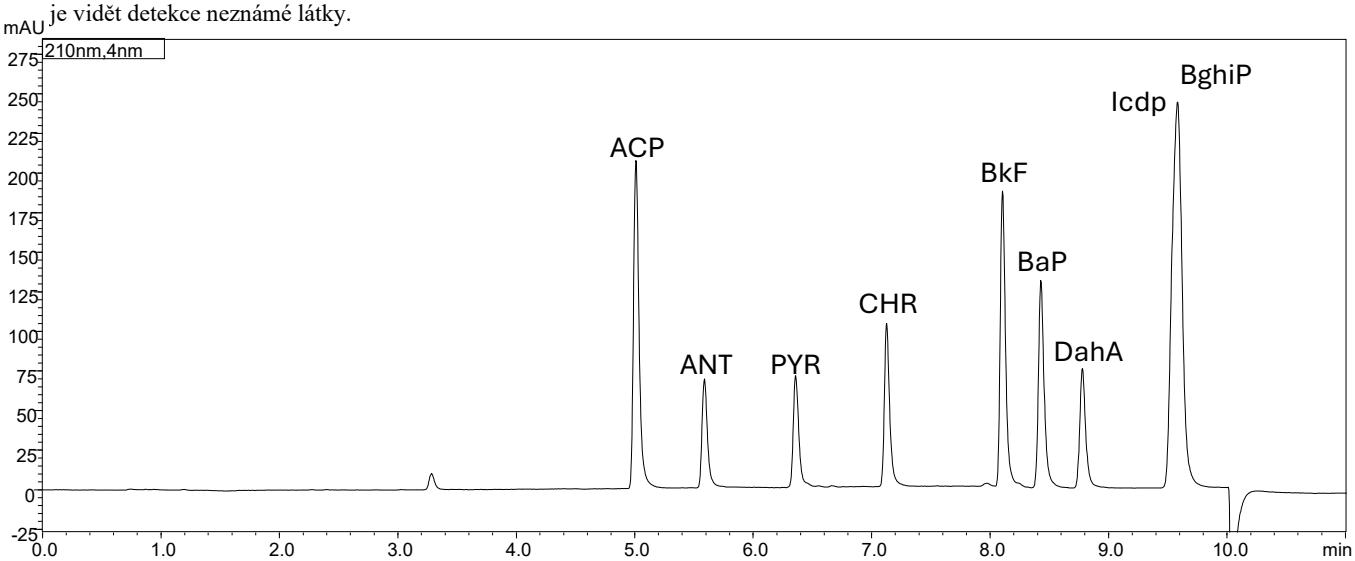
***Chromatogram 8** - Záznam separace PAHs na koloně ASTRA C18-AQ (150 x 4,6 mm, 3 µm) Gradient C, průtok MF 1.0 ml/min*

Pozn.: Nepodařilo se separovat IcdP a BghiP. Rozlišení je nízké. Základní linie je rovná, bez šumu. Látky BkF a BaP eluují také příliš blízko u sebe. Ostatní píky jsou ostré a symetrické.



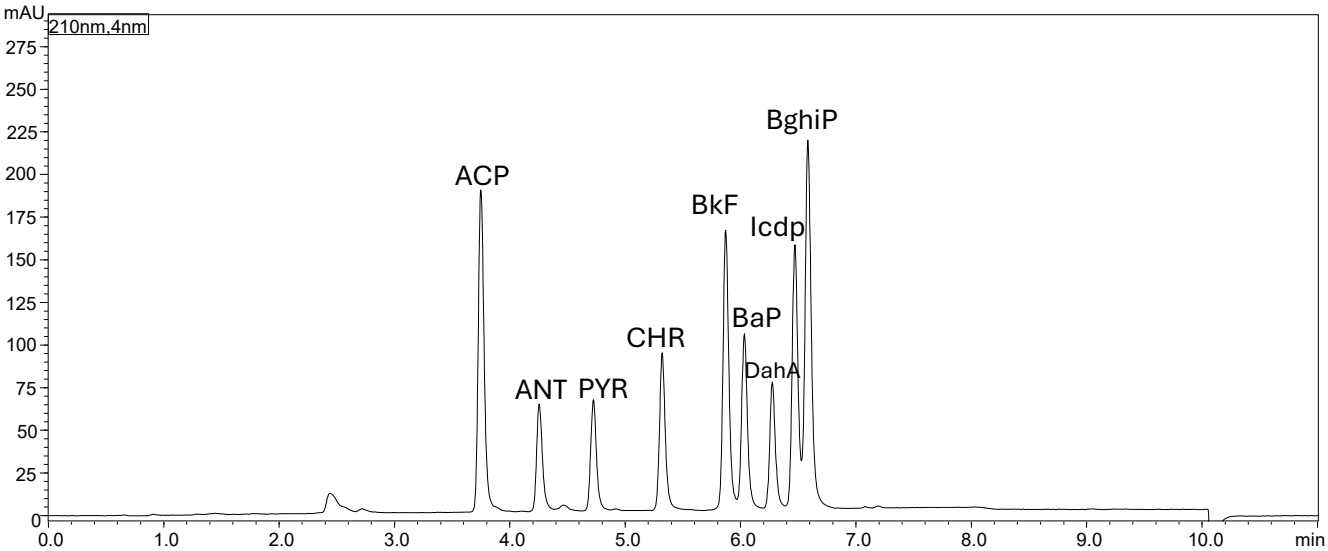
Chromatogram 9 *- Záznam separace PAHs na koloně CHROMSHELL C18-AB (150 x 4,6 mm, 2.6 µm) Gradient D, průtok MF 1.0 ml/min*

Pozn.: Nepodařilo se odseparovat IcdP a BghiP. Látky BkF a BaP mají nízké rozlišení. Základní linie je rovná. Mezi 3-4 minutou je vidět detekce neznámé látky.



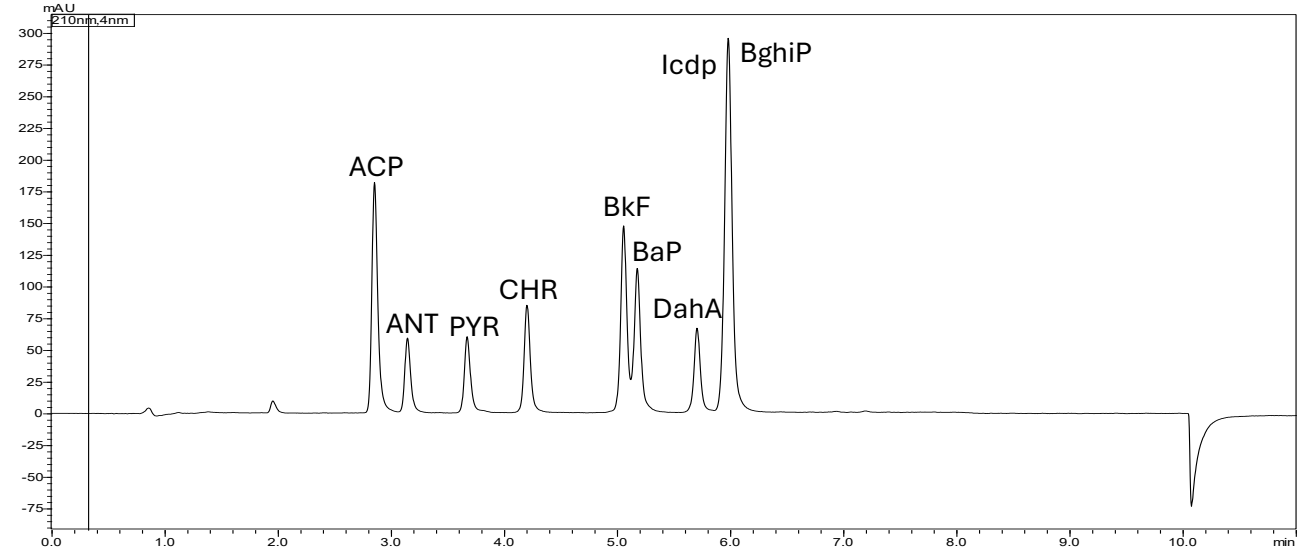
Chromatogram 10 *- Záznam separace PAHs na koloně CHROMSHELL C18 Plus (150 x 4,6 mm, 2.6 µm) Gradient D, průtok MF 1.0 ml/min*

Pozn.: Nepodařilo se odseparovat analyty IcdP a BghiP. Základní linie je rovná a píky jsou symetrické.



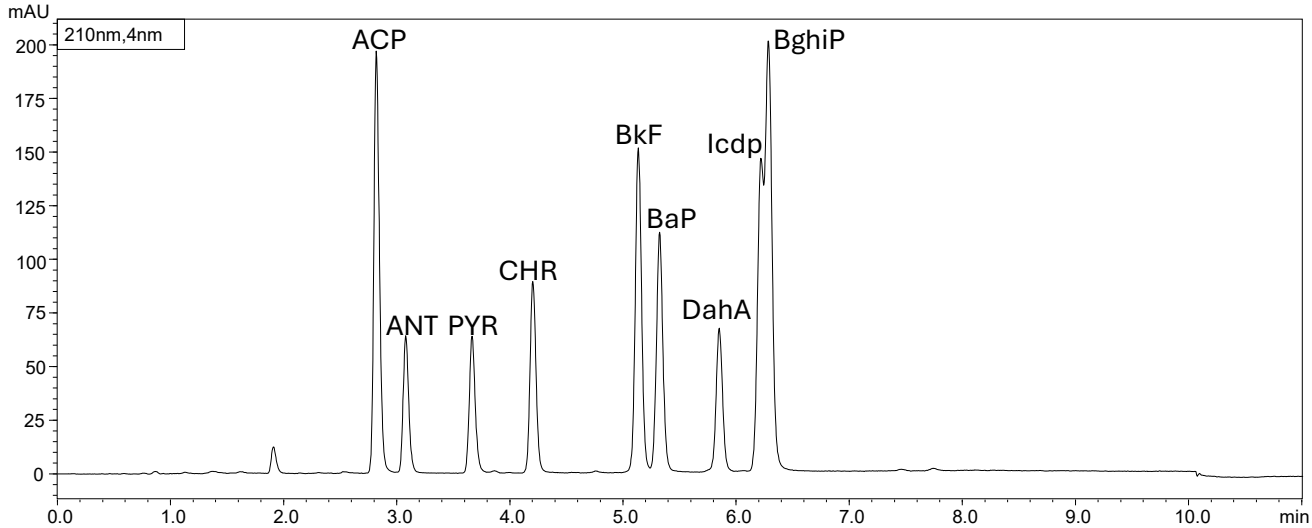
Chromatogram 11 *- Záznam separace PAHs na koloně Kinetex Biphenyl (150 x 4,6 mm, 5 µm) Gradient D, průtok MF 1.0 ml/min*

Pozn.: Podařilo se separovat všechny látky, ale pouze s nízkým rozlišením pro lipofilnější PAHs. To je pro analýzu nevhodné, jak kvůli přepínání detektoru, tak možné koeluce píků při vysokých koncentracích jednotlivých látek.



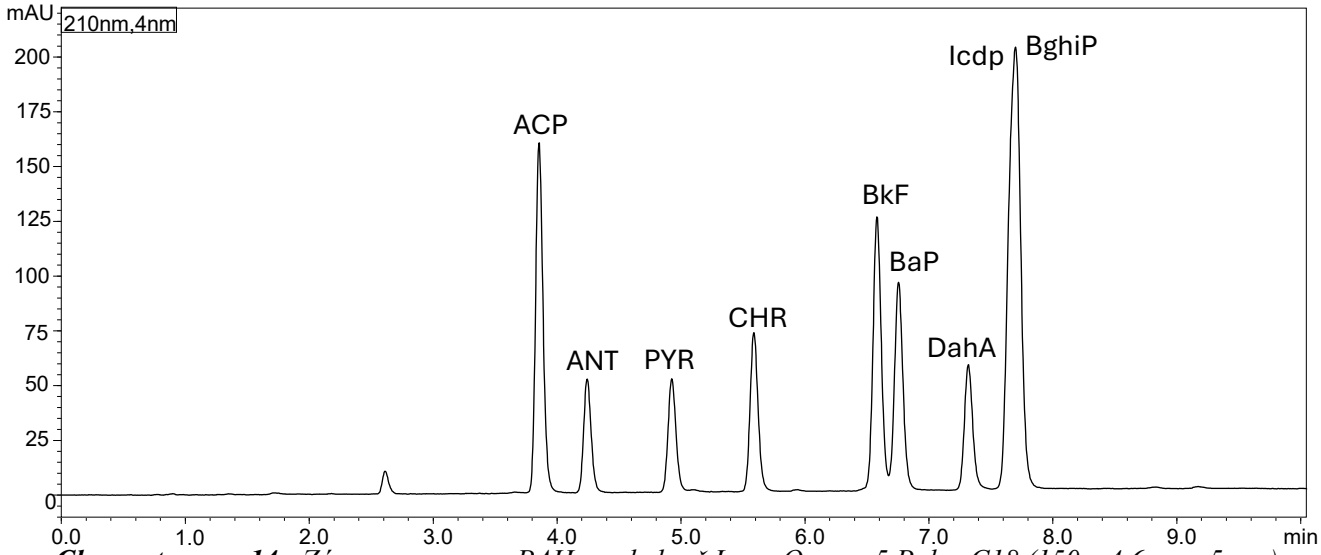
Chromatogram 12 *- Záznam separace PAHs na koloně Kinetex EVO C18 (150 x 4,6 mm, 2.6 µm) Gradient B, průtok MF 1.0 ml/min*

Pozn.: Základní linie je rovná s minimálním výskytem šumu. Rozlišení je celkově nízké. Všechny analyty nebyly řádně separovány. V druhé minutě je detekována neznámá látka.



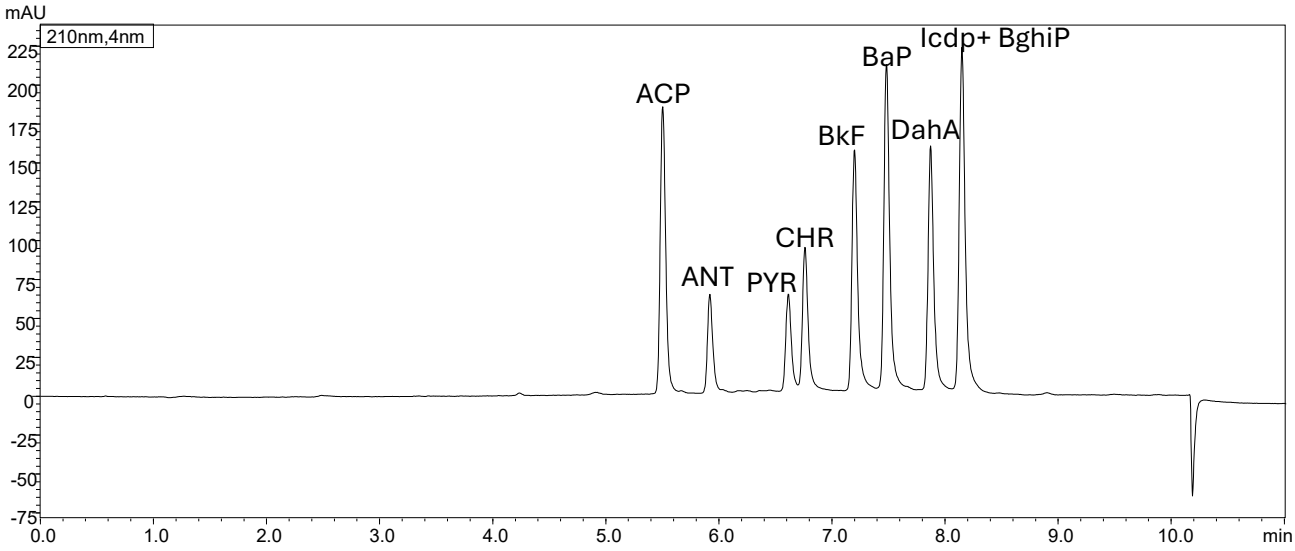
Chromatogram 13 *- Záznam separace PAHs na koloně Kinetex XB-C18 (150 x 4,6 mm, 2.6 µm) Gradient A, průtok MF 1.0 ml/min*

Pozn.: Nedošlo k separaci všech analytů, rozlišení je nízké. Ostatní píky jsou symetrické. Základní linie je rovná s minimem šumu.



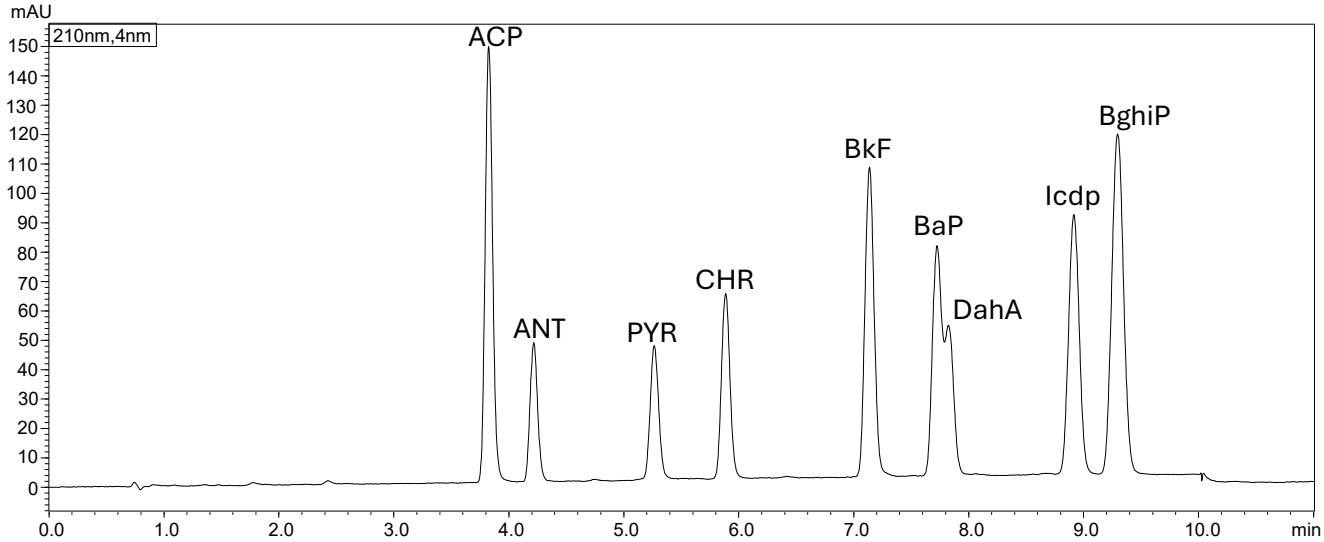
Chromatogram 14 *- Záznam separace PAHs na koloně Luna Omega 5 Polar C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) Gradient B, Průtok MF 1.0 ml/min*

Pozn.: Separace je podobná jako u chromatogramu č.13.



Chromatogram 15 *- Záznam separace PAHs na koloně YMC-Triart PFP (150 x 4,6 mm, 3 µm) Gradient E, průtok MF 1.0 ml/min*

Pozn.: Na této koloně nedošlo k separaci všech analytů. Některé píky 2 látek jsou překryty. Pořadí je odhadované. Eluce analytů proběhla ve velké blízkosti, rozlišení je nízké.



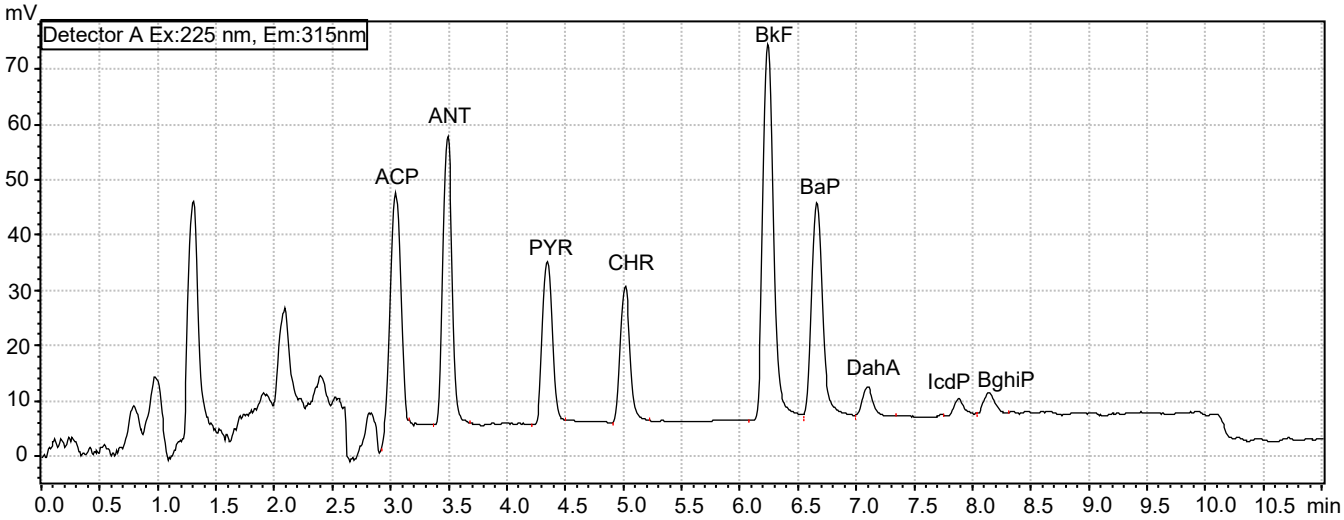
Chromatogram 16 *- Záznam separace PAHs na koloně YMC-Triart C18 (150 x 4,6 mm, 3 µm) Gradient F, průtok MF 1.0 ml/min*

Pozn.: Základní linie je rovná s minimálním výskytem šumu. Kolem osmé minuty můžeme vidět spojení 2 píků. Pravděpodobně se jedná o BaP a DahA. Tyto píky se nepodařilo separovat. Ostatní píky jsou symetrické.

Shrnutí:

Pro analýzu PAHs bylo testováno velké množství kolon s velikostí částic 2 µm, 2.6 µm, 2.7 µm, 3 µm a 5 µm. Všechny kolony byly testovány při různých gradientech MF. K práci byl využit standartní roztok obsahující PAHs o koncentraci 10 mg/l, jehož dávkovaný objem byl 5 µl. Nejlepší výsledky vykazovala kolona Ascentis Express AQ-C18 s podmínkami gradientové eluce A, která byla vybrána pro experimentální měření. Ostatní kolony nebyly většinou schopné separovat všechny analyty, nebo se eluovaly příliš blízko sebe. Je možné, že v kombinaci s jinými podmínkami MF by byly schopny analyty separovat, což může být dalším tématem zkoumání. Pro analýzu bylo využito fluorescenční detekce, kvůli vyšší citlivosti stanovení.

Zároveň bylo potřeba optimalizovat přepínání vlnových délek Ex/Em jednotlivých analytů pro lepší odezvu detektoru.



Chromatogram 17 *- Záznam separace PAHs na koloně ASCENTIS EXPRESS AQ C-18 (150 x 4,6 mm 2.7 µm), Gradient A, MF – ACN + voda, měřené fluorescenčním detektorem, Nanomateriál – PA 6 – 3 % TiO_2*

Pozn.: Na začátku vidíme tvorbu šumu po ustálení detektoru. Později je základní linie rovná. Píky patřící PAHs jsou úzké a symetrické s vysokým rozlišením.

4.6 Souhrn podmínek pro optimalizaci HPLC a extrakce

4.6.1 Optimální chromatografické podmínky pro analýzu PAHs

Chromatograf:	Shimadzu Prominence LC-20AD
Detektor:	Shimadzu RF-10A XL (Ex, Em)
	BghiP; Icdp – Ex 460 nm, Em 250nm
	ACP; ANT; PYR; CHR – Ex 260 nm, Em 400
	BkF; BaP; DahA – Ex 294 nm, Em 430 nm
Kolona:	Ascentis Express AQ-C18 (150 x 4,6 mm; 2,7 µm)
Mobilní fáze:	Pumpa A: Acetonitril (70 %)
	Pumpa B: Voda (30 %)
Průtok MF:	1,5 ml/min
Dávkovaný objem:	10 µl
Typ eluce:	Gradientová eluce
Průběh gradientu:	0 min (70:30)
	7 min – lineární pokles (90:10)
	7-9 min – isokratická část (90:10)
	9-11 min – rychlý vzestup (70:30)
Čas analýzy:	11 minut
Teplota:	30 °C
Vyhodnocení dat:	Software LabSolution

4.6.2 Optimální podmínky pro extrakci PAHs

Počet disků:	6
Aktivace:	200 µl ACN
Objem vzorku:	600 µl
Eluce:	600 µl ACN
Otáčky:	4000 RPM
Doba odstřeďování:	2 minuty

4.7 Validace – Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs)

4.7.1 SST – Test způsobilosti systému

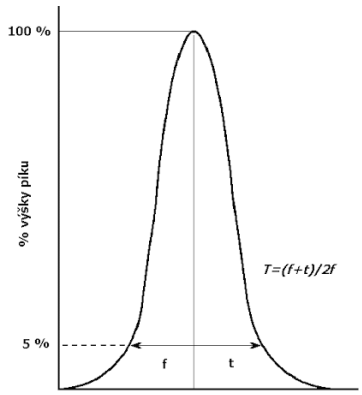
Výsledky analýzy mohou být ovlivněny několika faktory, které souvisí s chromatografickým systémem. Aby se snížilo riziko vlivu těchto faktorů, bylo zavedeno několik požadavků na testování způsobilosti systému (SST) (42).

V STT bylo vyhodnoceno sedm různých parametrů pro všech 9 standardů PAHs. Prvním je *retenční čas (t_r)*, sloužící k identifikaci sloučeniny a je zaznamenán v momentě, kdy analyzovaná látka projde kolonou a následně doje k její detekci. Z něho byla následně vypočítána relativní směrodatná odchylka vyjadřující míru opakovatelnosti retenčních časů pro každý analyt – *RSD t_r*.

Třetím parametrem je *faktor asymetrie značený As*, udávající symetrii píku. Ten je vypočítán pomocí rovnice:

$$As = \frac{W_{0,05}}{2f}$$

kde, $W_{0,05}$ označuje šířku píku při 5 % jeho výšky (neboli 1/20 jeho výšky) a *f* označuje vzdálenost mezi kolmicí vedoucí z vrcholu píku a sestupné části píku v 5 % jeho výšky. Hodnota symetrického píku by měla být rovna 1. Pokud je As <1, dochází k tzv. frontování píku. Při As> 1 píky chvostují. Chvostování píku může být určeno také pomocí „tailing“ faktoru (T). V praxi je u validovaných metod požadováno, aby se faktor asymetrie A_s nacházel v rozmezí 0,75 – 2,0 (42).



Obrázek 4 - Chromatografický pík s kolmicemi asymetrie
(Převzato z: http://www.hplc.cz/tip/asymm_factor.htm)

Čtvrtým parametrem je *rozlišení (Rs)* udávající vzdálenost mezi dvěma blízkými píky. Čím vyšší je hodnota Rs, tím více jsou od sebe píky separovány. Pro užití v praxi by hodnota $R_s \geq 1,5$ (42).

K vyhodnocení účinnosti separace posloužila veličina značená n_P – *peak capacity* neboli *kapacita separace*, jejíž výhodou je možnost využití při gradientové i isokratické eluci. Je

vyjádřena jako počet píků rozdělených na základní linii v daném časovém úseku s rozlišením R = 1 jednotlivých látek. Vypočítat ji můžeme je podle rovnice:

$$n_P = 1 + \frac{t_g}{4\,.\,w_h}$$

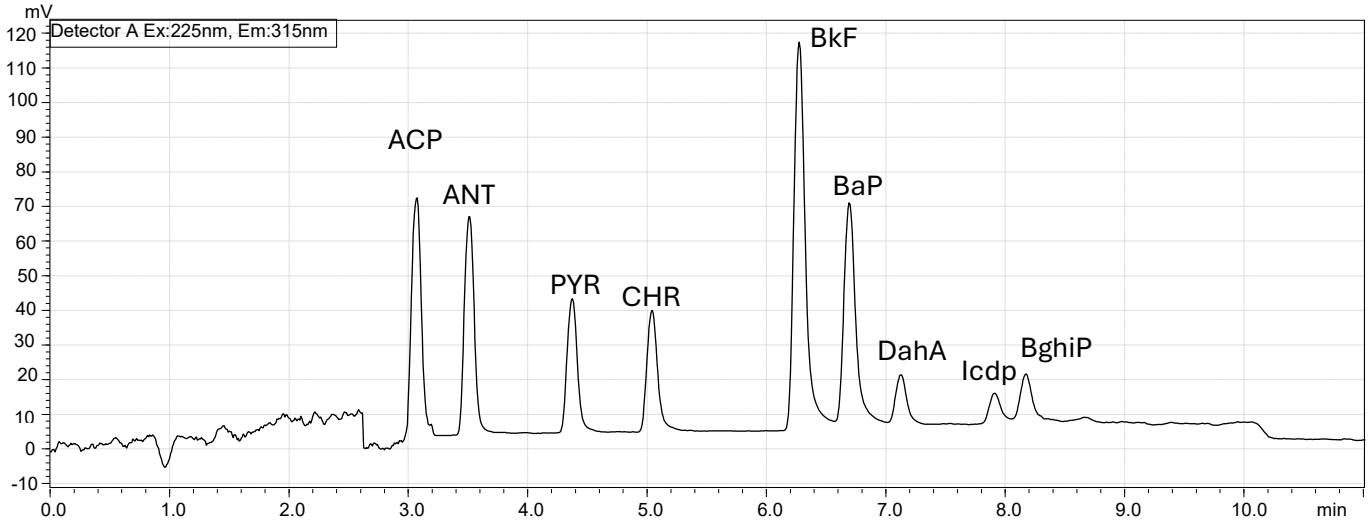
kde, w_h označuje šíři píku v polovině jeho výšky a t_g délku gradientu.

Šestým parametrem je *kapacitní faktor (k')* popisující, jak dlouho je analyt zadržován na koloně ve stacionární fázi v porovnání s fází mobilní. Ideální hodnota k' se nachází v rozmezí1 1-10. Pokud je k'> 10, analyt je více zadržován na koloně a čas analýzy bude prodloužen. V případě, že je hodnota k' <1, analyt je málo zadržován na koloně, doba analýzy bude zkrácena, ale zároveň může dojít k překrytí píků (42).

Poslední parametr, využívaný k vyhodnocení SST je relativní směrodatná odchylka vyjadřující míru opakovatelnosti ploch píků (AUC) jednotlivých látek v % - *RSD*.

Tabulka 11 *- Výsledné hodnoty SST při měření roztoku PAHs o koncentraci 5 µg/l*

Analyzované PAHs	t_r [min]	RSD t_r [%]	As	Rs	n_P	k'	RSD AUC [%]
ACP	3,045	0,001	1,011	-	30,89	1,882	2,01
ANT	3,483	0,000	1,058	2,732	31,55	2,291	0,54
PYR	4,336	0,001	1,090	5,320	30,89	3,102	0,40
CHR	4,999	0,000	1,105	4,089	30,89	3,724	1,06
BkF	6,225	0,000	1,174	7,395	29,95	4,882	0,45
BaP	6,643	0,000	1,230	2,444	29,64	5,276	0,41
DahA	7,078	0,001	1,193	2,531	29,64	5,693	0,25
IcdP	7,859	0,000	1,152	4,535	28,78	6,425	4,37
BghiP	8,123	0,000	1,257	1,516	29,06	6,677	2,89



Chromatogram 18 *- Záznam separace extrakčního roztoku PAHs o koncentraci 5 ppb na koloně ASCENTIS EXPRESS AQ C-18 (150 x 4,6 mm, 2.7 µm) za podmínek validace.*

4.7.2 Linearita

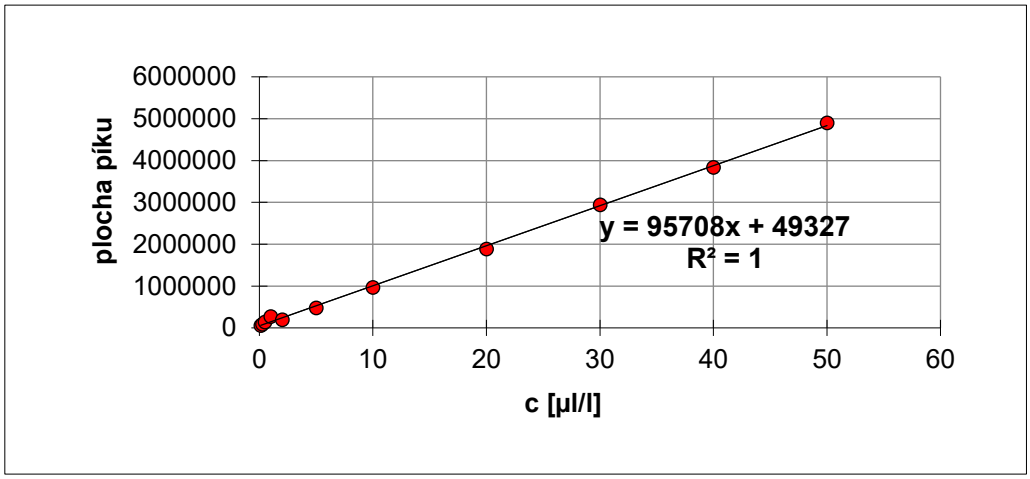
Jedná se o schopnost analytického postupu získat odezvu přímo úměrnou koncentraci analytu ve vzorku v daném rozsahu (43). Ke stanovení linearity byly využity kalibrační roztoky o koncentraci 0,0625 – 100 (200) µg/l. Připraveny byly stejným postupem jako v kapitole 4.2.4. Protože DahA, IcdP a BghiP byly pipetovány ve dvojnásobném množství, jejich plochy odpovídaly dvojnásobné koncentraci oproti ostatním PAHs. Každý analyt byl proměřen na všech koncentračních hladinách po třech nástřicích, které se zprůměrovaly. Následně byla vytvořena regresní přímka pro jednotlivé analyty z vybraných 9-12 bodů. K vyjádření výsledné linearity sloužil determinační koeficient (R^2), jehož hodnota by měla být blízká 1.

Tabulka 12 *- Hodnoty vynesené do grafu lin. reg. pro ACP*

ACP			
c [µl/l]	plocha píku	**c [µl/l]**	plocha píku
0,125	58710	**10**	968732
0,25	83280	**20**	1881228
0,50	139263	**30**	2941847
1	268682	**40**	3833468
2	197281	**50**	4901924
5	473750		

Tabulka 13 *- Parametry pro ACP*

Statistické parametry pro lineární regresi: y = k x + q			
Počet bodů	n =	11	Odhad chyby
Směrnice	k =	95707,72	± 1128,57
Absolutní člen	q =	49327,35	± 25304,97
Korelační koeficient	r =	0,999375	
Reziduální odchylka	s =	64196,11	



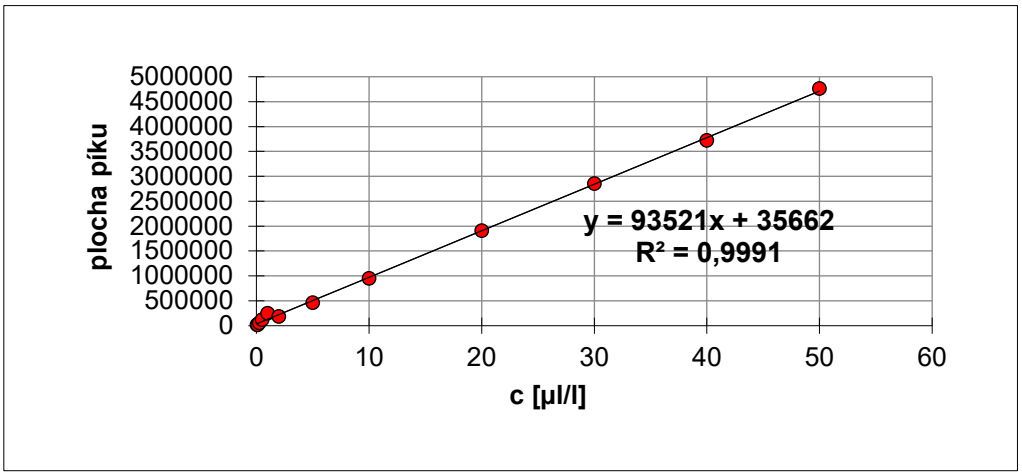
Graf 1 *- Stanovení linearity ACP*

Tabulka 14 *- Hodnoty vynesené do grafu lin. reg. pro ANT*

ANT			
c [µl/l]	plocha píku	**c [µl/l]**	plocha píku
0,625	15837	**5**	459194
0,125	20091	**10**	946955
0,25	57993	**20**	1905575
0,50	123252	**30**	2850353
1	246813	**40**	3717912
2	186658	**50**	4761377

Tabulka 15 *- Parametry pro ANT*

Statistické parametry pro lineární regresi: y = k x + q			
Počet bodů	n =	12	Odhad chyby
Směrnice	k =	93521,45	± 882,9408
Absolutní člen	q =	35662,14	± 18954,68
Korelační koeficient	r =	0,999555	
Reziduální odchylka	s =	51674,58	



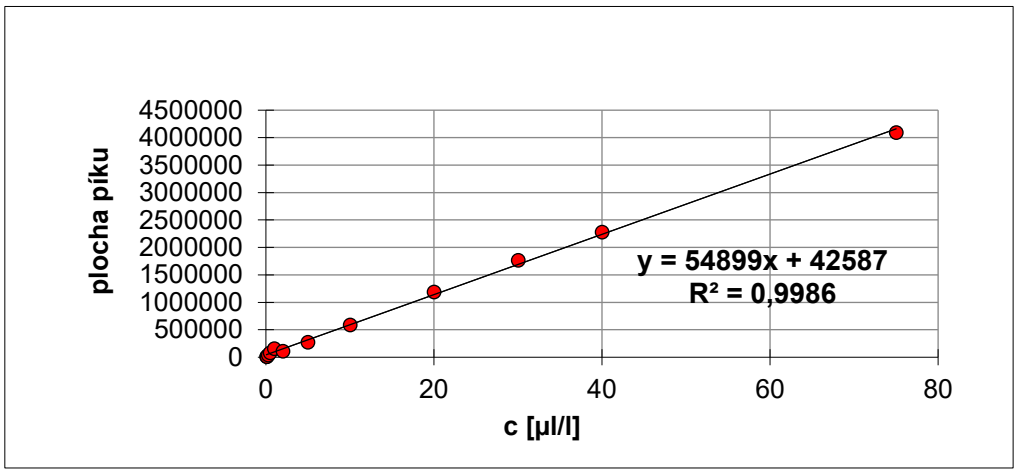
Graf 2 *- Stanovení linearity ANT*

Tabulka 16 *- Hodnoty vynesené do grafu lin. reg. pro PYR*

PYR			
c [µl/l]	plocha píku	**c [µl/l]**	plocha píku
0,625	10280	**5**	273389
0,125	12144	**10**	590004
0,25	40948	**20**	1189526
0,50	79907	**30**	1768437
1	156810	**40**	2282734
2	109489	**70**	4095440

Tabulka 17 *- Parametry pro PYR*

Statistické parametry pro lineární regresi: y = k x + q			
Počet bodů	n =	12	Odhad chyby
Směrnice	k =	54899,43	± 654,697
Absolutní člen	q =	42587,08	± 17583
Korelační koeficient	r =	0,99929	
Reziduální odchylka	s =	50014,41	



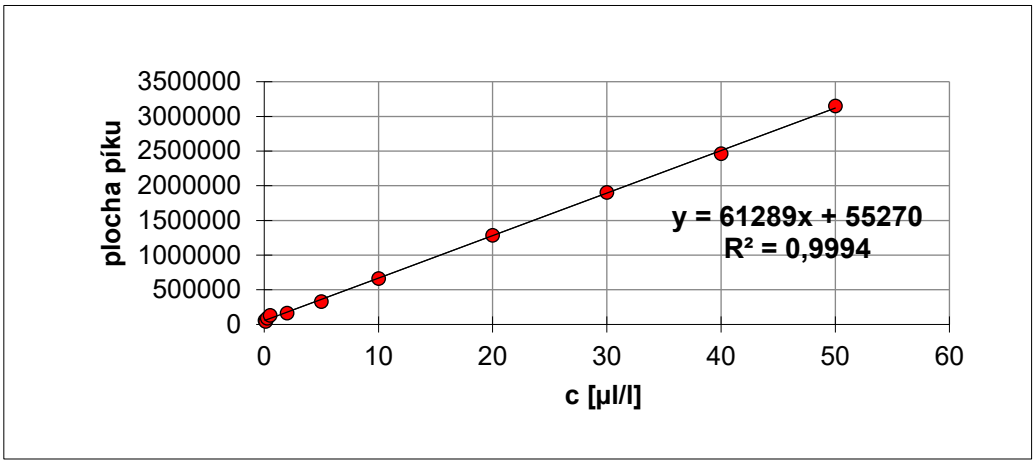
Graf 3 *- Stanovení linearity PYR*

***Tabulka 18** - Hodnoty vynesené do grafu lin. reg. pro CHR*

CHR			
c [µl/l]	plocha píku	**c [µl/l]**	plocha píku
0,625	58515	**10**	660651
0,125	46592	**20**	1286506
0,25	92048	**30**	1906482
0,50	131594	**40**	2460711
2	162158	**50**	3151576
5	330945		

***Tabulka 19** - Parametry pro CHR*

Statistické parametry pro lineární regresi: y = k x + q			
Počet bodů	n =	11	Odhad chyby
Směrnice	k =	61288,87	± 501,8261
Absolutní člen	q =	55269,8	± 11251,05
Korelační koeficient	r =	0,999698	
Reziduální odchylka	s =	28659,82	



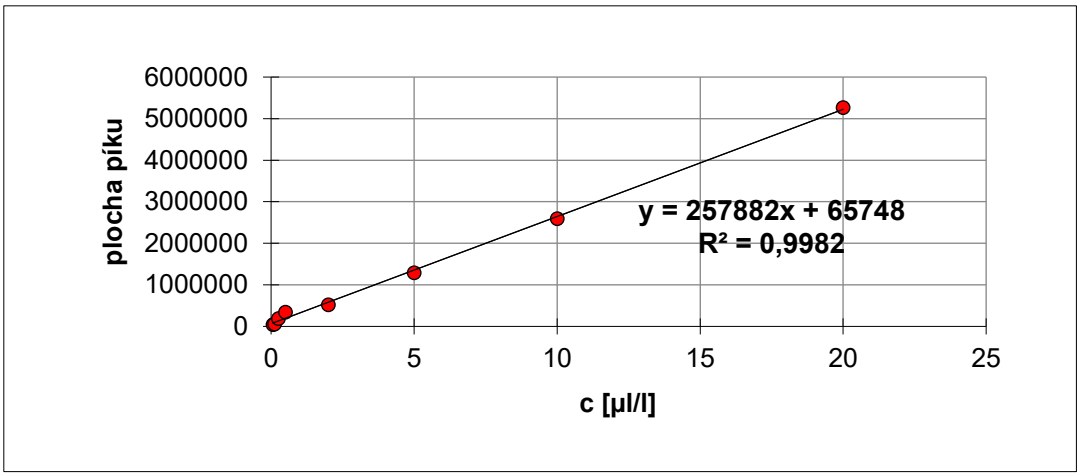
***Graf 4** - Stanovení linearity CHR*

***Tabulka 20** - Hodnoty vynesené do grafu lin. reg. pro BkF*

BkF			
c [µl/l]	plocha píku	**c [µl/l]**	plocha píku
0,625	46706	**2**	518618
0,125	59818	**5**	1292051
0,25	191354	**10**	2590792
0,50	341794	**20**	5268248

***Tabulka 21** - Parametry BkF*

Statistické parametry pro lineární regresi: y = k x + q			
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby
Směrnice	k =	257882	± 4417,494
Absolutní člen	q =	65747,94	± 35933,13
Korelační koeficient	r =	0,999121	
Reziduální odchylka	s =	82575,87	



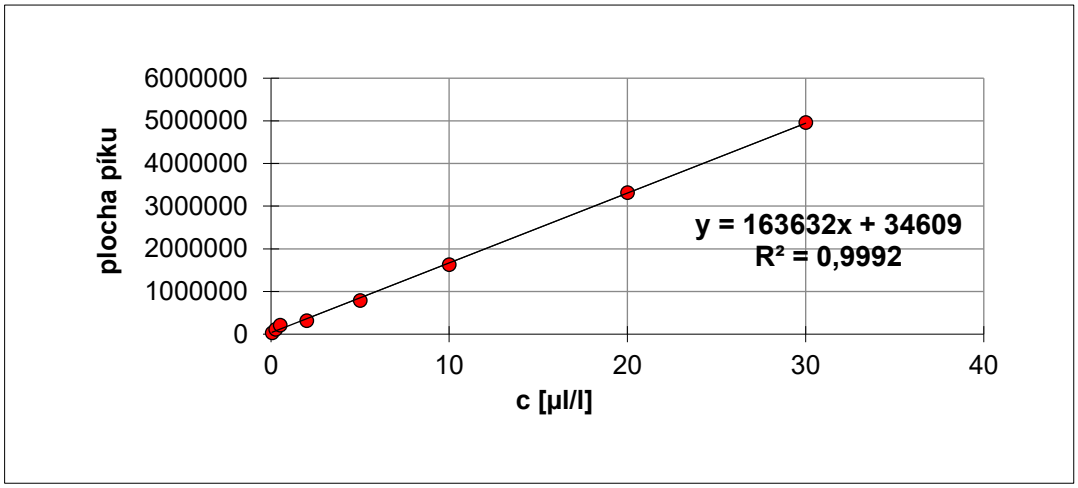
***Graf 5** - Stanovení linearity BkF*

***Tabulka 22** - Hodnoty vynesené do grafu lin. reg pro BaP*

BaP			
c [µl/l]	plocha píku	**c [µl/l]**	plocha píku
0,625	28195	**5**	791442
0,25	110818	**10**	1633427
0,50	213585	**20**	3316862
2	317915	**30**	4960954

***Tabulka 23** - Parametry BaP*

Statistické parametry pro lineární regresi: y = k x + q			
Počet bodů	n =	8	Odhad chyby
Směrnice	k =	163632,4	± 1897,383
Absolutní člen	q =	34609,49	± 25361,45
Korelační koeficient	r =	0,999597	
Reziduální odchylka	s =	55463,96	



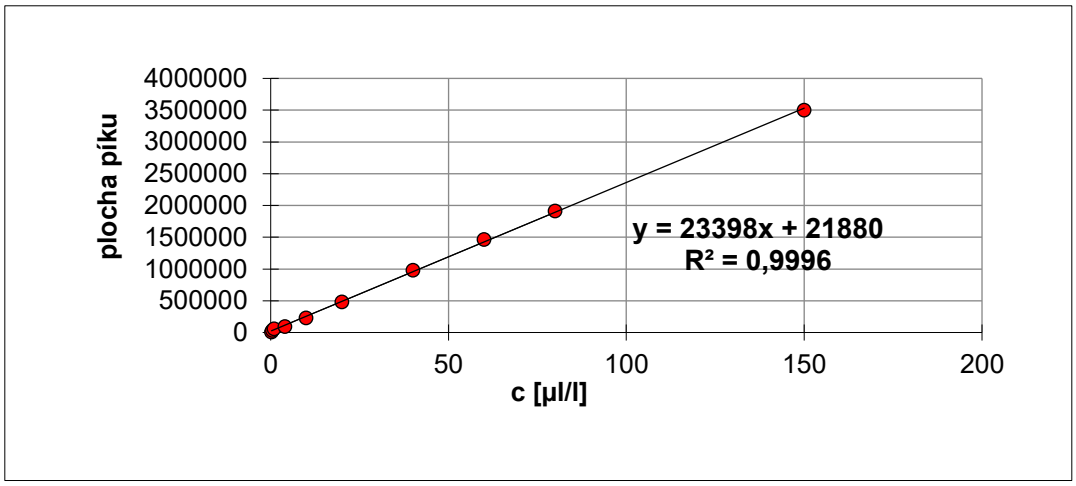
***Graf 6** - Stanovení linearity BaP*

***Tabulka 24** - Hodnoty vynesené do grafu lin. reg pro DahA*

DahA			
c [µl/l]	plocha píku	**c [µl/l]**	plocha píku
0,25	10362	**20**	481897
0,50	33562	**40**	980337
1	60752	**60**	1465041
4	93579	**80**	1916898
10	233597	**150**	3500474

***Tabulka 25** - Parametry DahA*

Statistické parametry pro lineární regresi: y = k x + q			
Počet bodů	n =	10	Odhad chyby
Směrnice	k =	23397,68	± 173,8363
Absolutní člen	q =	21879,91	± 10227,92
Korelační koeficient	r =	0,999779	
Reziduální odchylka	s =	25334,82	



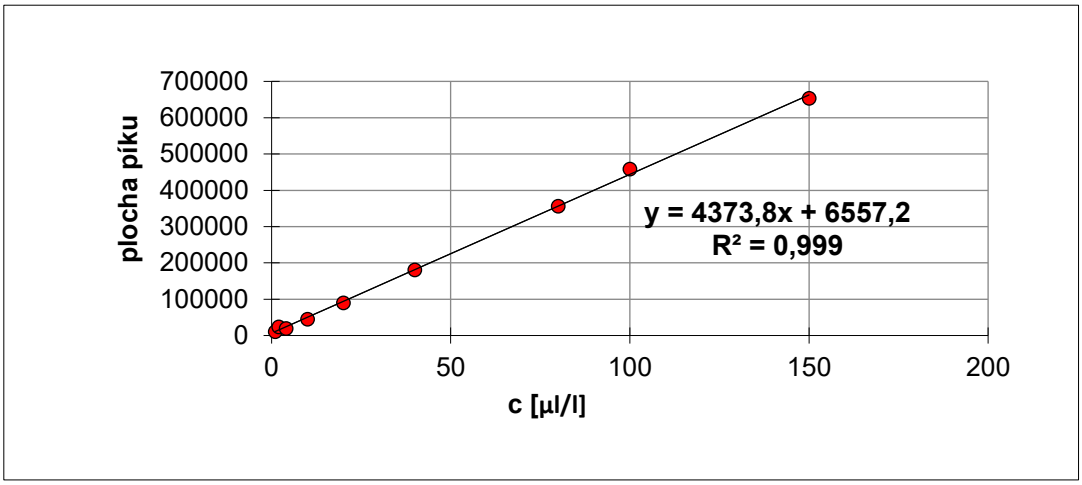
***Graf 7** - Stanovení linearity DahA*

***Tabulka 26** - Hodnoty vynesené do grafu lineární regrese*

IcdP			
c [µl/l]	plocha píku	**c [µl/l]**	plocha píku
1	11034	**40**	181220
2	23725	**80**	356030
4	19550	**100**	458963
10	44692	**150**	653817
20	90116		

***Tabulka 27** - Parametry IcdP*

Statistické parametry pro lineární regresi: y = k x + q			
Počet bodů	n =	9	Odhad chyby
Směrnice	k =	4373,789	± 52,81473
Absolutní člen	q =	6557,225	± 3565,635
Korelační koeficient	r =	0,99949	
Reziduální odchylka	s =	7942,527	



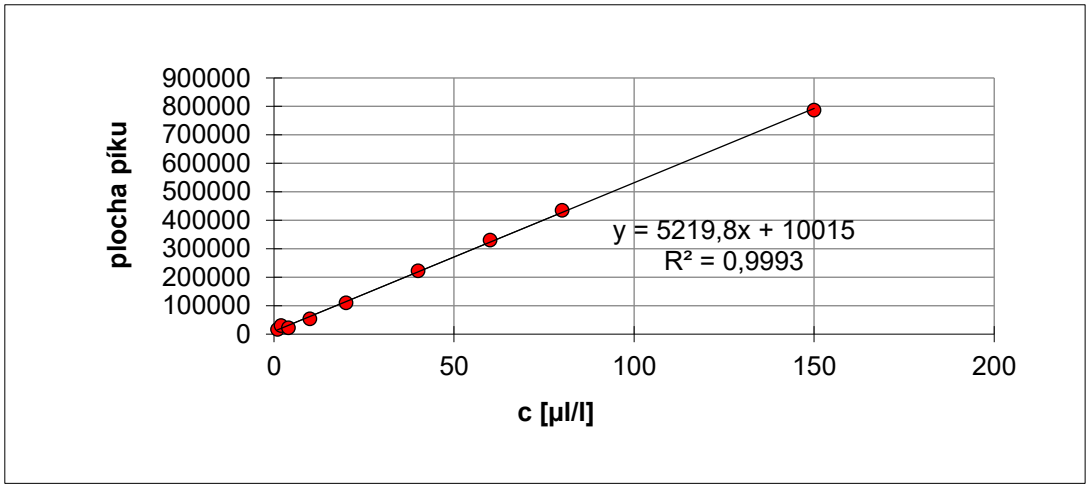
***Graf 8** - Stanovení linearity IcdP*

***Tabulka 28** - Hodnoty vensené do grafu lin. reg pro BghiP*

BghiP			
c [µl/l]	plocha píku	**c [µl/l]**	plocha píku
1	16349	**40**	222049
2	29651	**60**	329837
4	22491	**80**	434486
10	53625	**150**	787017
20	110315		

***Tabulka 29** - Parametry BghiP*

Statistické parametry pro lineární regresi: y = k x + q			
Počet bodů	n =	9	Odhad chyby
Směrnice	k =	5219,842	± 52,86551
Absolutní člen	q =	10015,34	± 3278,846
Korelační koeficient	r =	0,999641	
Reziduální odchylka	s =	7411,653	



***Graf 9** - Stanovení linearity BghiP*

4.7.3 Preciznost (Opakovatelnost)

Preciznost je schopnost metody poskytovat podobné výsledky měřením stejného vzorku za stejných podmínek.

Hodnocení preciznosti bylo provedeno opakovaným měřením pracovního roztoku PAHs o koncentraci 5 µg/l po osmi nástřicích. Všechny průměry ploch byly zapsány a zprůměrovány. Z nich byla následně vypočítána směrodatná odchylka a relativní směrodatná odchylka, která se pohybuje v rozmezí 0,5 – 4,4 %. Vyšší směrodatná odchylka u tří analytů (ACP, IcdP a BghiP) souvisí především s přepínám vlnových délek Ex/Em FD detektoru a s nestabilitou nulové linie v čase přepnutí. Správná integrace píků je tak v těchto oblastech ztížená i vzhledem k nízké koncentraci analytů.

Tabulka 30 *- Stanovení preciznosti metody*

Analyt	Průměr plochy pod píkem	SD	RSD [%]
ACP	489971	9846	2,01
ANT	456956	2468	0,54
PYR	272156	1081	0,40
CHR	332695	3531	1,06
BkF	1286839	5739	0,45
BaP	788064	3259	0,41
DahA	231865	572	0,25
IcdP	42735	1870	4,37
BghiP	49985	1446	2,89

5. Výsledky

5.1 Výsledky extrakcí na různých nanomateriálech

Po provedení validace metody, bylo možné začít s testováním jednotlivých nanomateriálů, které mají za úkol zadržet v co nejvyšším možném množství všech 9 sledovaných PAHs. Pro každý nanomateriál bylo připraveno 6 extrakčních spin filtrů s vybranými nanovlákny pro následnou off-line extrakci a každý získaný vzorek byl poté měřen 2x, jehož výsledek se zprůměroval (celkem 12 nástřiků na kolonu pro jeden typ nanovlákna). V případě, že došlo k chybě a výsledky některé extrakce se výrazně lišily od ostatních, bylo možné jej z výpočtu vyřadit. Nakonec se zprůměrovaly hodnoty získané měřením všech validních vzorků, ke zjištění celkové průměrné extrakce příslušných analytů (v procentech) na daném nanovlákně. V závěru se provedl výpočet relativní směrodatné odchylky a obě tyto hodnoty byly zapsány v následujících tabulkách.

Tabulka 31 *- Výsledky výtěžnosti extrakcí provedených na nanomateriálech PA 6 – 1 %, 2 % a 3 % TiO_2*

Použitý nanomateriál → **PA6 - 1 %TiO_2**			Použitý nanomateriál → **PA6 - 2 %TiO_2**			Použitý nanomateriál → **PA6 - 3 %TiO_2**		
Analyt	**Průměr [%]**	**RSD [%]**	**Analyt**	**Průměr [%]**	**RSD [%]**	**Analyt**	**Průměr [%]**	**RSD [%]**
ACP	69,50	6,69	**ACP**	90,86	16,31	**ACP**	32,21	6,27
ANT	75,27	6,80	**ANT**	47,58	17,81	**ANT**	38,84	14,76
PYR	65,00	7,91	**PYR**	43,18	21,51	**PYR**	38,49	15,75
CHR	53,86	5,82	**CHR**	37,84	22,01	**CHR**	27,50	13,68
BkF	45,82	5,34	**BkF**	32,47	21,24	**BkF**	22,38	11,54
BaP	50,15	4,91	**BaP**	34,89	19,50	**BaP**	25,96	10,54
DahA	33,75	7,06	**DahA**	24,48	20,06	**DahA**	15,32	9,75
IcdP	39,65	9,02	**IcdP**	29,48	17,90	**IcdP**	18,39	6,12
BghiP	44,82	11,80	**BghiP**	54,62	11,77	**BghiP**	28,28	10,57

Tabulka 32 *- Výsledky výtěžnosti extrakcí provedených na nanomateriálech PLC TACR – 1 mm, 2 mm a 2,5 mm*

Použitý nanomateriál → **PLC TACR 1 mm**			**Použitý nanomateriál → PLC TACR 2 mm**			**Použitý nanomateriál → PLC TACR 2,5 mm**		
Analyt	**Průměr [%]**	**RSD [%]**	**Analyt**	**Průměr [%]**	**RSD [%]**	**Analyt**	**Průměr [%]**	**RSD [%]**
ACP	86,79	6,26	**ACP**	123,69	7,74	**ACP**	130,88	11,55
ANT	56,85	1,44	**ANT**	70,94	7,72	**ANT**	85,12	8,77
PYR	58,09	2,59	**PYR**	73,09	8,84	**PYR**	88,49	8,68
CHR	40,80	2,79	**CHR**	49,71	2,83	**CHR**	59,40	4,01
BkF	33,39	3,37	**BkF**	39,88	2,21	**BkF**	47,56	5,05
BaP	34,80	2,58	**BaP**	41,51	8,92	**BaP**	52,82	14,26
DahA	23,53	4,65	**DahA**	28,16	2,21	**DahA**	33,63	6,02
IcdP	22,69	5,44	**IcdP**	30,32	9,81	**IcdP**	39,13	16,48
BghiP	21,42	5,26	**BghiP**	34,10	9,10	**BghiP**	40,85	11,50

Tabulka 33 *- Výsledky výtěžnosti extrakcí provedených na nanomateriálech PLCT TACR 3 mm, TACR PBT 4-5 mm (-) a (+)*

Použitý nanomateriál → **PLC TACR 3 mm**			Použitý nanomateriál → **TACR PBT 4-5 mm (-)**			Použitý nanomateriál → **TACR PBT 4-5 mm (+)**		
Analyt	**Průměr [%]**	**RSD [%]**	**Analyt**	**Průměr [%]**	**RSD [%]**	**Analyt**	**Průměr [%]**	**RSD [%]**
ACP	120,79	7,08	**ACP**	95,44	2,36	**ACP**	93,58	2,23
ANT	87,30	2,45	**ANT**	92,21	2,28	**ANT**	92,24	0,37
PYR	91,26	3,09	**PYR**	98,13	1,74	**PYR**	97,86	0,57
CHR	68,89	2,04	**CHR**	93,86	2,61	**CHR**	92,92	1,09
BkF	56,63	1,51	**BkF**	98,94	3,16	**BkF**	97,32	3,15
BaP	54,48	2,90	**BaP**	94,97	2,66	**BaP**	92,37	1,37
DahA	41,99	1,91	**DahA**	92,74	3,14	**DahA**	89,29	1,97
IcdP	39,30	8,57	**IcdP**	103,34	1,04	**IcdP**	99,50	1,91
BghiP	51,61	5,23	**BghiP**	58,61	1,54	**BghiP**	56,71	5,56

Tabulka 34 *- Výsledky výtěžnosti extrakcí provedených na nanomateriálech TACR PBT – 3 mm, 8 mm a PA 6 (2 mm)*

Použitý nanomateriál → **TACR PBT 3 mm**			**Použitý nanomateriál → TACR PBT 8 mm**			**Použitý nanomateriál → PA 6 (2 mm)**		
Analyt	**Průměr [%]**	**RSD [%]**	**Analyt**	**Průměr [%]**	**RSD [%]**	**Analyt**	**Průměr [%]**	**RSD [%]**
ACP	101,62	3,39	**ACP**	99,12	2,37	**ACP**	239,61	6,70
ANT	91,21	1,50	**ANT**	94,18	1,33	**ANT**	34,99	27,29
PYR	95,88	1,38	**PYR**	100,64	1,01	**PYR**	35,20	24,74
CHR	93,28	1,44	**CHR**	94,38	1,68	**CHR**	41,64	21,05
BkF	102,87	2,70	**BkF**	94,97	2,52	**BkF**	43,42	17,47
BaP	96,19	1,55	**BaP**	90,82	2,81	**BaP**	41,96	14,50
DahA	95,45	1,71	**DahA**	85,98	4,35	**DahA**	66,01	8,75
IcdP	104,84	1,90	**IcdP**	94,55	5,48	**IcdP**	46,97	19,22
BghiP	38,47	4,81	**BghiP**	60,51	3,72	**BghiP**	59,12	15,59

Tabulka 35 *- Výsledky výtěžnosti extrakcí provedených na nanomateriálech PA 6 – 3 mm, 1 % a 2% zel. barvivo*

Použitý nanomateriál → PA 6 (3 mm)			**Použitý nanomateriál → PA 6 (1 %)**			**Použitý nanomateriál → PA 6 (2 %)**		
Analyt	**Průměr [%]**	**RSD [%]**	**Analyt**	**Průměr [%]**	**RSD [%]**	**Analyt**	**Průměr [%]**	**RSD [%]**
ACP	361,29	36,84	**ACP**	422,97	22,24	**ACP**	249,20	5,30
ANT	45,27	33,74	**ANT**	92,87	0,97	**ANT**	71,42	9,58
PYR	46,02	38,50	**PYR**	82,71	4,24	**PYR**	68,46	9,62
CHR	52,46	35,19	**CHR**	98,28	4,30	**CHR**	84,91	7,42
BkF	50,74	32,25	**BkF**	108,60	5,42	**BkF**	92,48	5,80
BaP	49,29	32,44	**BaP**	106,51	5,28	**BaP**	89,24	6,24
DahA	68,31	8,97	**DahA**	91,82	2,51	**DahA**	70,37	4,08
IcdP	52,31	20,67	**IcdP**	111,65	5,13	**IcdP**	96,51	8,10
BghiP	62,60	5,50	**BghiP**	68,40	4,766	**BghiP**	38,34	7,38

Tabulka 36 *- Výsledky výtěžnosti extrakcí provedených na nanomateriálech PA 6 – 3 % zel. bavivo, RR 198 a RR 120*

Použitý nanomateriál → PA 6 (3 %)			Použitý nanomateriál → PA 6 (RR 198)			Použitý nanomateriál → PA 6 (RR 120)		
Analyt	**Průměr [%]**	**RSD [%]**	**Analyt**	**Průměr [%]**	**RSD [%]**	**Analyt**	**Průměr [%]**	**RSD [%]**
ACP	239,81	7,36	**ACP**	132,43	11,38	**ACP**	126,59	4,48
ANT	69,75	3,94	**ANT**	57,03	2,50	**ANT**	52,17	6,53
PYR	68,28	3,60	**PYR**	57,99	0,18	**PYR**	49,46	5,00
CHR	83,17	4,27	**CHR**	56,83	2,05	**CHR**	50,26	7,48
BkF	86,31	3,84	**BkF**	54,62	2,49	**BkF**	47,71	5,15
BaP	82,43	5,23	**BaP**	50,70	2,67	**BaP**	44,27	5,57
DahA	67,02	5,49	**DahA**	34,73	4,61	**DahA**	30,42	5,33
IcdP	78,50	15,08	**IcdP**	45,00	2,31	**IcdP**	37,60	2,50
BghiP	37,97	7,19	**BghiP**	12,34	3,86	**BghiP**	9,53	36,43

Tabulka 37 *- Výsledky výtěžnosti extrakcí provedených na nanomateriálech PA 6 – ACR, Blank a Acid Black*

Použitý nanomateriál → PA 6 (ACR)			Použitý nanomateriál → PA 6 (Blank)			Použitý nanomateriál → PA 6 (Acid Black)		
Analyt	**Průměr [%]**	**RSD [%]**	**Analyt**	**Průměr [%]**	**RSD [%]**	**Analyt**	**Průměr [%]**	**RSD [%]**
ACP	98,34	3,22	**ACP**	49,47	15,34	**ACP**	77,73	2,74
ANT	54,06	2,71	**ANT**	54,46	6,68	**ANT**	43,42	3,65
PYR	55,36	1,66	**PYR**	49,35	6,70	**PYR**	40,09	2,75
CHR	54,62	1,34	**CHR**	52,50	6,64	**CHR**	44,13	2,99
BkF	50,65	0,93	**BkF**	52,64	7,28	**BkF**	53,42	7,36
BaP	47,72	1,19	**BaP**	48,81	7,43	**BaP**	50,21	9,64
DahA	48,34	1,74	**DahA**	37,99	8,77	**DahA**	62,18	12,05
IcdP	45,12	3,85	**IcdP**	40,02	12,15	**IcdP**	51,52	12,58

Tabulka 38 *- Výsledky výtěžnosti extrakcí provedených na nanomateriálech PA 6 (Acid Green), PA 4/6 a PA 4*

Použitý nanomateriál → PA 6 (Acid Green)			Použitý nanomateriál → PA 4/6			Použitý nanomateriál → PA 4		
Analyt	**Průměr [%]**	**RSD [%]**	**Analyt**	**Průměr [%]**	**RSD [%]**	**Analyt**	**Průměr [%]**	**RSD [%]**
ACP	80,57	7,04	**ACP**	20,46	16,00	**ACP**	53,33	9,17
ANT	33,45	14,29	**ANT**	91,14	1,58	**ANT**	91,55	4,82
PYR	35,88	14,09	**PYR**	109,49	1,14	**PYR**	124,36	6,42
CHR	42,75	12,52	**CHR**	107,10	1,68	**CHR**	99,41	4,40
BkF	49,78	9,04	**BkF**	112,68	3,17	**BkF**	98,90	4,26
BaP	45,99	10,83	**BaP**	108,79	3,89	**BaP**	91,84	4,79
DahA	59,54	3,34	**DahA**	104,35	2,23	**DahA**	86,66	7,31
IcdP	52,38	7,00	**IcdP**	124,15	6,32	**IcdP**	95,28	7,59
BghiP	32,23	7,11	**BghiP**	104,77	2,95	**BghiP**	65,24	11,42

Tabulka 39 - Výsledky výtěžnosti extrakcí provedených na nanomateriálech PA 11, PA 6/10 a Polyimid AC

Použitý nanomateriál → PA 11			Použitý nanomateriál → PA 6/10			Použitý nanomateriál → Polyimid AC		
Analyt	**Průměr [%]**	**RSD [%]**	**Analyt**	**Průměr [%]**	**RSD [%]**	**Analyt**	**Průměr [%]**	**RSD [%]**
ACP	112,12	4,02	**ACP**	93,65	3,64	**ACP**	93,28	5,35
ANT	93,51	1,88	**ANT**	99,43	3,97	**ANT**	88,51	8,23
PYR	99,64	4,54	**PYR**	109,14	3,53	**PYR**	91,71	10,86
CHR	88,85	5,63	**CHR**	107,31	3,34	**CHR**	83,13	11,86
BkF	76,56	6,45	**BkF**	105,00	3,42	**BkF**	51,63	13,51
BaP	68,44	7,48	**BaP**	101,73	3,35	**BaP**	65,01	11,32
DahA	74,58	9,31	**DahA**	107,25	4,06	**DahA**	33,23	15,31
IcdP	77,93	10,96	**IcdP**	106,04	4,37	**IcdP**	56,58	11,18
BghiP	50,10	16,02	**BghiP**	95,86	4,46	**BghiP**	22,30	20,0

Zhodnocení a diskuse:

Pro extrakci PAHs bylo vyzkoušeno 29 různých nanomateriálů. Jedny z nejhorších výsledků vykazovaly materiály PA 6 (TiO_2) a PLC TACR, kde u většiny analytů byla extrakce nižší než 60 %. Konkrétně u prvního typu materiálu byly zaznamenány vysoké hodnoty RSD, což znamenalo, že jednotlivé hodnoty se v daném měření značně lišily.

U materiálu TACR PBT vycházely extrakce pro téměř všechny analyty velmi dobře, až na látku BghiP, pro kterou vždy byla hodnota extrakce poměrné nízká. Jako nejlepší materiál pro extrakci se zde ukázalo nanovlákno s tloušťkou 8 mm, a proto bylo zařazeno do finální analýzy reálného vzorku.

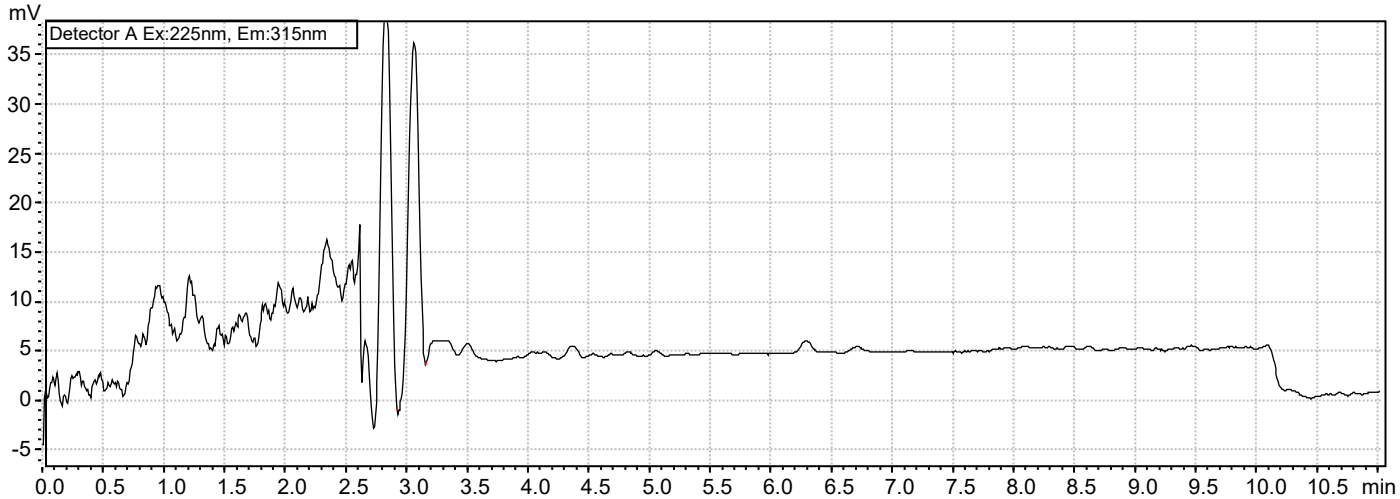
Při extrakci na materiálech PA 6 (2-3 mm a 1-3 % zel. barvivo), detektor vykazoval příliš vysokou odezvu pro analyt ACP, která ve výsledku udávala extrakci ≥ 200 %. Problém nejspíše zapříčinila špatná odezva detektoru, kdy při změně vlnové délky dochází zároveň ke změně citlivosti detektoru a ta mohla způsobit zvětšení plochy píku. Celkově u těchto materiálů byly opět velmi vysoké hodnoty RSD a ukázaly se jako nevhodné materiály pro extrakci PAHs.

U materiálu PA6 (ACR) se snižovala extrakce analytů s jejich snižující se polaritou. Pro PA6 (Blank, Acid Black a Acid Green) byly hodnoty extrakce pro většinu analytu nižší než 60 %.

V závěru byl vyzkoušen polyimid připravený metodou AC spinningu, PA 11 a PA 6/10. Polyimid AC nevykazoval příliš dobré výsledky extrakce pro méně polární analyty a také se jednotlivé výsledky od sebe velmi lišily. Naopak PA 11 a PA 6/10 se ukázaly jako vhodnější materiály pro extrakci PAHs, a proto byly také zařazeny k analýze reálného vzorku. Přesto u PA 11 docházelo ke snižování extrakce se snižující se polaritou látek. U PA 6/10 naopak vycházely extrakce vyšší než 100 %. Důvodem může být přítomnost interferující látky nebo

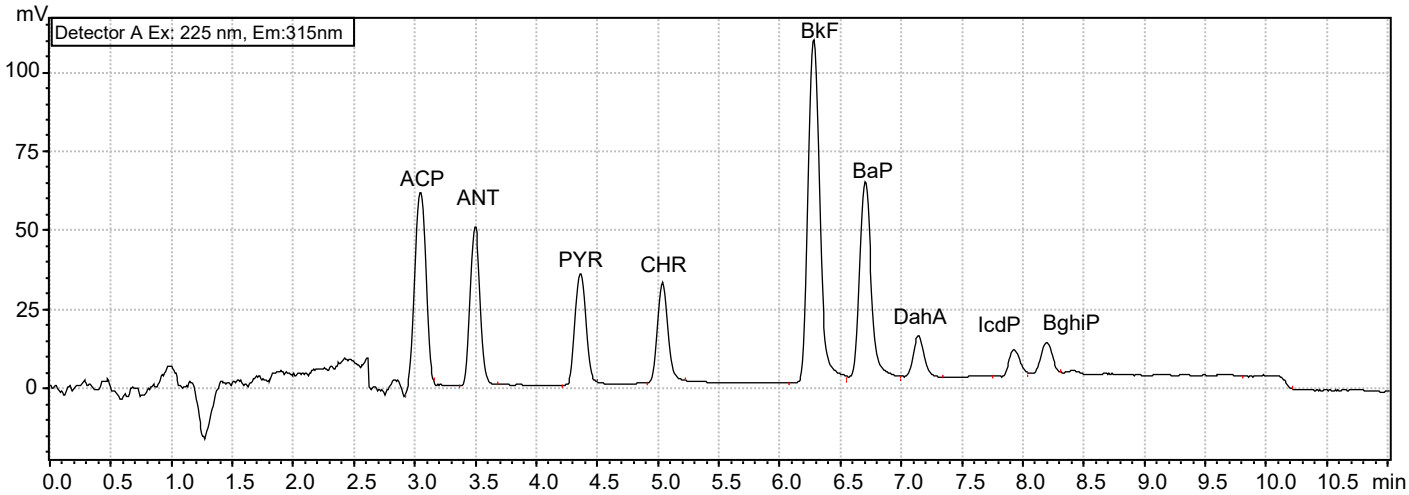
nečistoty.

Během testování nanovláken byly vyzkoušeny také PCL:GR (10:5) a PCL s 1 % GR, kdy po analýze jejich vzorků nebyly na chromatogramu zobrazeny téměř žádné píky, vyznačující přítomnost analytů. Důvodem mohla být přítomnost vody ve vzorku standardu ovlivňující smáčivost vlákna, způsobující neschopnost PAHs se zadržet. Níže jsou přiloženy ukázky chromatogramů po extrakci na některých materiálech, kde prvním z nich je záznam z nevyhovujícího materiálu PCL GR 1 % a separace roztoku PAHs o koncentraci 5 ppb.



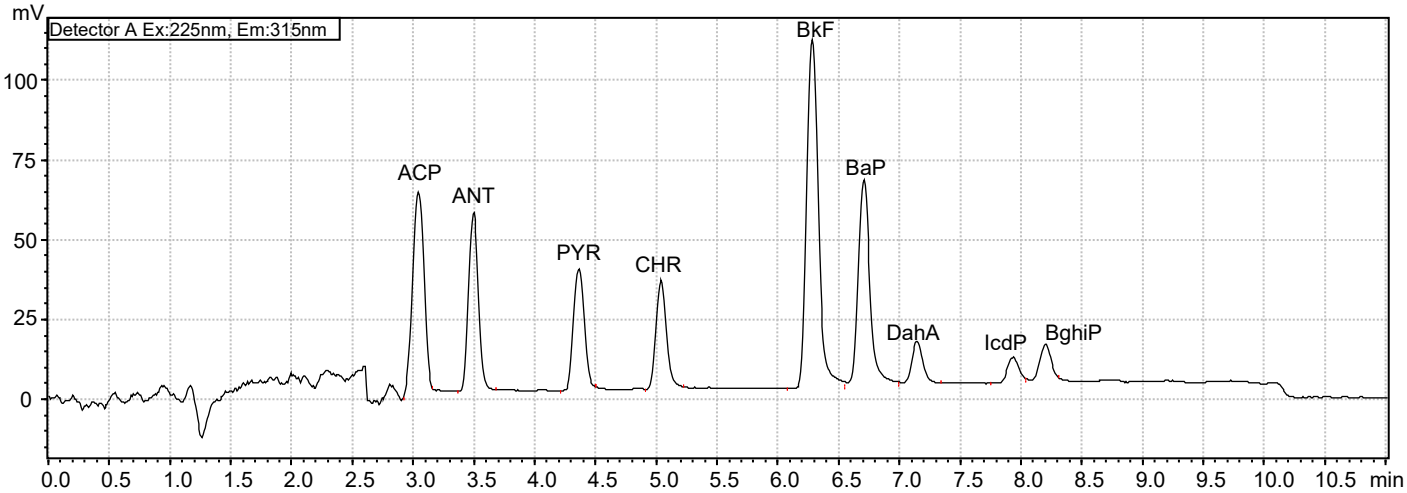
Chromatogram 19 *- Záznam extrakce PAHs (5 ppb) na koloně ASCENTIS EXPRESS AQ C-18 (150 x 4,6 mm, 2.7 µm), Gradient A, MF – ACN + voda, měřené fluorescenčním detektorem,* ***Nanomateriál – PCL Grafen 1 %***

Pozn.: Na začátku je vidět tvorba šumu a detekce dvou látek, z něhož druhý pík patří pravděpodobně ACP. Mezi 6-7 minutou můžeme vidět pravděpodobnou detekci BkF a BaP. Ostatní látky nebyly detekovány z již popsaného důvodu.



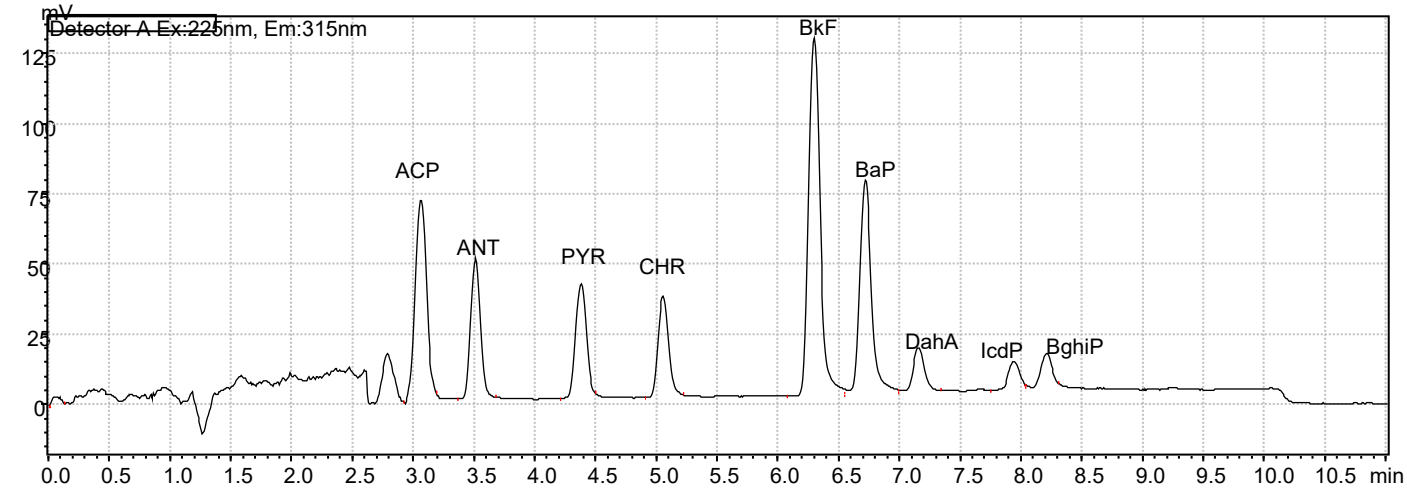
Chromatogram 20 *- Záznam extrakce PAHs (5 ppb) na koloně ASCENTIS EXPRESS AQ C-18 (150 x 4,6 mm, 2.7 µm), Gradient A, MF – ACN + voda, měřené fluorescenčním detektorem,* ***Nanomateriál – PA 11***

Pozn.: V první části vidíme tvorbu šumu, dále je základní linie rovná. Píky jsou symetrické s vysokým rozlišením.



Chromatogram 21 *- Záznam extrakce PAHs (5 ppb) na koloně ASCENTIS EXPRESS AQ C-18 (150 x 4,6 mm, 2.7 µm), Gradient A, MF – ACN + voda, měřené fluorescenčním detektorem,* ***Nanomateriál – PA 6/10***

Pozn.: V počátku vidíme tvorbu šumu, poté je základní linie rovná. Píky jsou rovné, úzké a symetrické. Jejich rozlišení je vysoké.



Chromatogram 22 *- Záznam extrakce PAHs (5 ppb) na koloně ASCENTIS EXPRESS AQ C-18 (150 x 4,6 mm, 2.7 µm), Gradient A, MF – ACN + voda, měřené fluorescenčním detektorem,* ***Nanomateriál – PBT 8 mm***

Pozn.: První část chromatogramu tvoří šum, později je základní linie rovná. Mezi 2,5 – 3 minutou je detekována neznámá látka. Píky jednotlivých PAHs jsou symetrické s vysokým rozlišením.

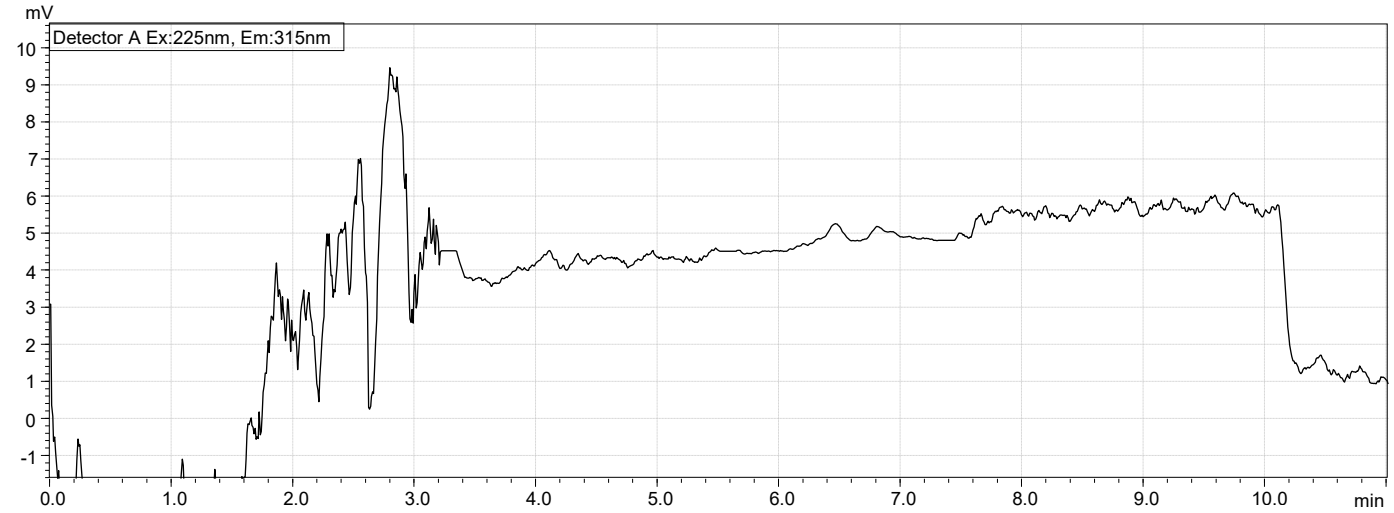
5.2 Výsledky extrakce reálného vzorku

Pro analýzu reálného vzorku byly vybrány 3 nanomateriály a to PA 11, PA 6/10 a TACR PBT – 8 mm. Jako vzorek byla odebraná voda z řeky Labe dne 8.1.2025 v Hradci Králové, která se přefiltrovala pomocí PTFE filtru s velkostí pórů 0,22 µm, aby nedošlo k poškození HPLC kolony. Pro analýzu byl připraven roztok vody z Labe s přídavkem obsahujícím koncentraci 5 µg/l standardů PAHs a 5 ml ACN kvůli zajištění rozpustnosti PAHs, doplněný říční vodou do 50 ml odměrné baňky. Následně byla provedena extrakce na 3 vybraných discích stejným postupem, jako u předchozích vzorků, jen pro aktivaci a eluci byl použit ACN + THF (1:1). Důvodem, použití této směsi k analýze, bylo zvýšení eluční síly pro méně polární látky zejména BghiP. Zvýšení výtěžnosti po promytí touto směsí se však nepotvrdilo. Výsledky analýzy jsou uvedeny v následující tabulce 32, kde můžeme vidět, že podle hodnoty RSD nejlépe vycházelo nanovlákno z materiálu PA 11. Nejhůře naopak PA 6/10. Co se týče výsledků extrakce, hodnoty se většinou pohybují kolem nebo více než 100 % až na BghiP. Pro zlepšení odezvy této láky by mohlo pomoct další snížení polarity extrakčního činidla či zvýšení její rozpustnosti ve vzorku přídavkem vyššího procenta organického rozpouštědla. Hodnoty nad 100 % mohou být způsobeny přítomností interference, nečistot, špatnou odezvou detektoru či nativní přítomností PAHs.

Tabulka 40 *- Výsledky extrakce PAHs na reálném vzorku a vybraných nanomateriálech*

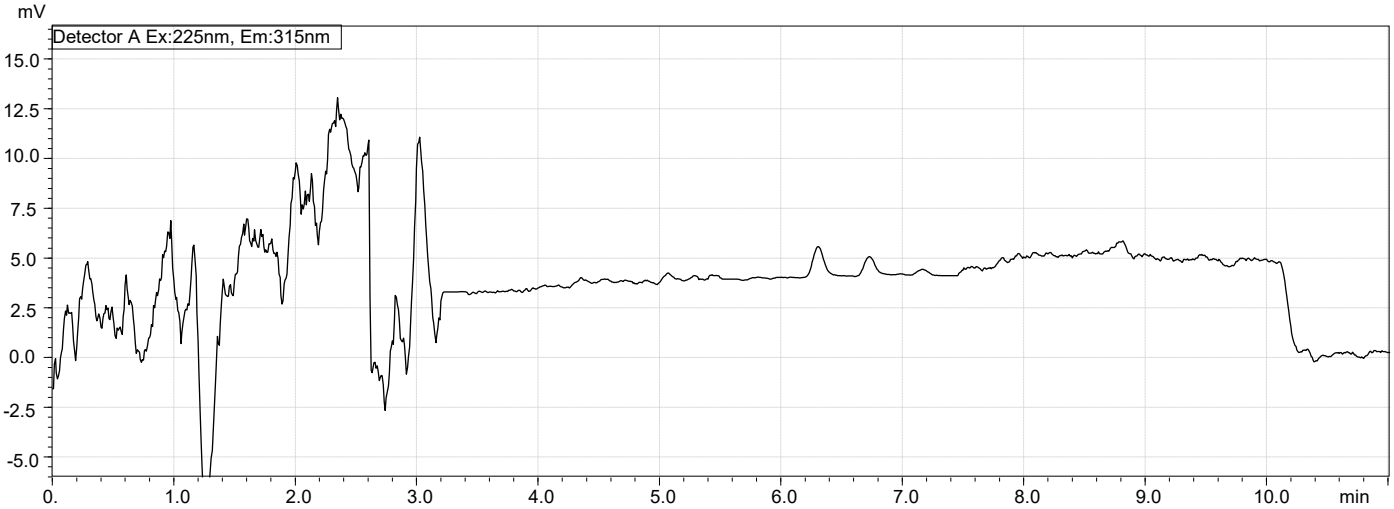
Použitý nanomateriál → PA 11			**Použitý nanomateriál → PA 6/10**			**Použitý nanomateriál → TACR PBT - 8 mm**		
Analyt	**Průměr [%]**	**RSD [%]**	**Analyt**	**Průměr [%]**	**RSD [%]**	**Analyt**	**Průměr [%]**	**RSD [%]**
ACP	118,41	1,49	**ACP**	87,14	15,97	**ACP**	132,12	13,84
ANT	101,24	1,98	**ANT**	90,96	20,51	**ANT**	106,18	4,03
PYR	109,81	1,01	**PYR**	99,01	19,84	**PYR**	117,66	4,01
CHR	114,19	0,94	**CHR**	103,89	19,63	**CHR**	120,37	3,66
BkF	123,47	1,10	**BkF**	113,33	18,37	**BkF**	132,91	3,84
BaP	158,66	0,91	**BaP**	148,33	18,34	**BaP**	173,24	3,89
DahA	115,22	1,24	**DahA**	100,80	17,11	**DahA**	132,34	4,47
IcdP	107,53	3,72	**IcdP**	95,71	17,73	**IcdP**	118,44	4,41
BghiP	71,67	4,30	**BghiP**	64,92	17,69	**BghiP**	78,93	4,51

Pro vyhodnocení přítomnosti PAHs byla provedena analýza čisté vody z Labe a jejích extrahovaných vzorků na 3 vybraných discích. Na další stránce můžeme vidět výsledné chromatogramy.



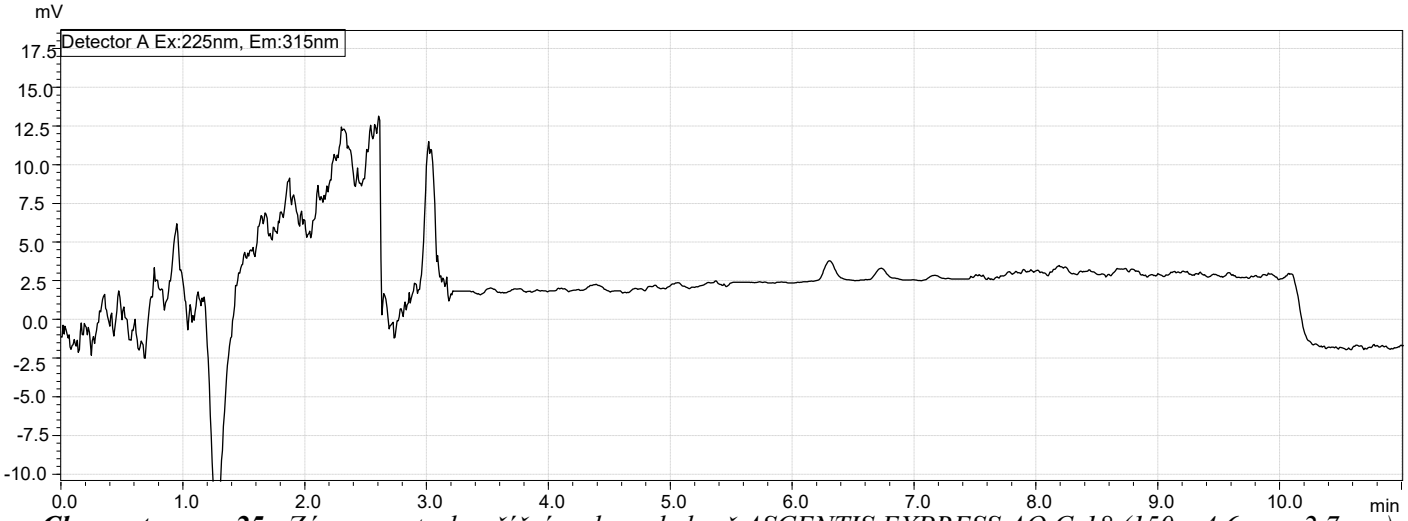
Chromatogram 23 *- Záznam z analýzy vzorku Labe bez extrakce na koloně ASCENTIS EXPRESS AQ C-18 (150 x 4,6 mm, 2.7 µm), Gradient A, MF – ACN + THF (1:1), FD*

Pozn.: Mezi šestou a sedmou minutou můžeme vidět detekci dvou píků. Pravděpodobně se jedná o BkF a BaP. Ostatní látky není možné detekovat.



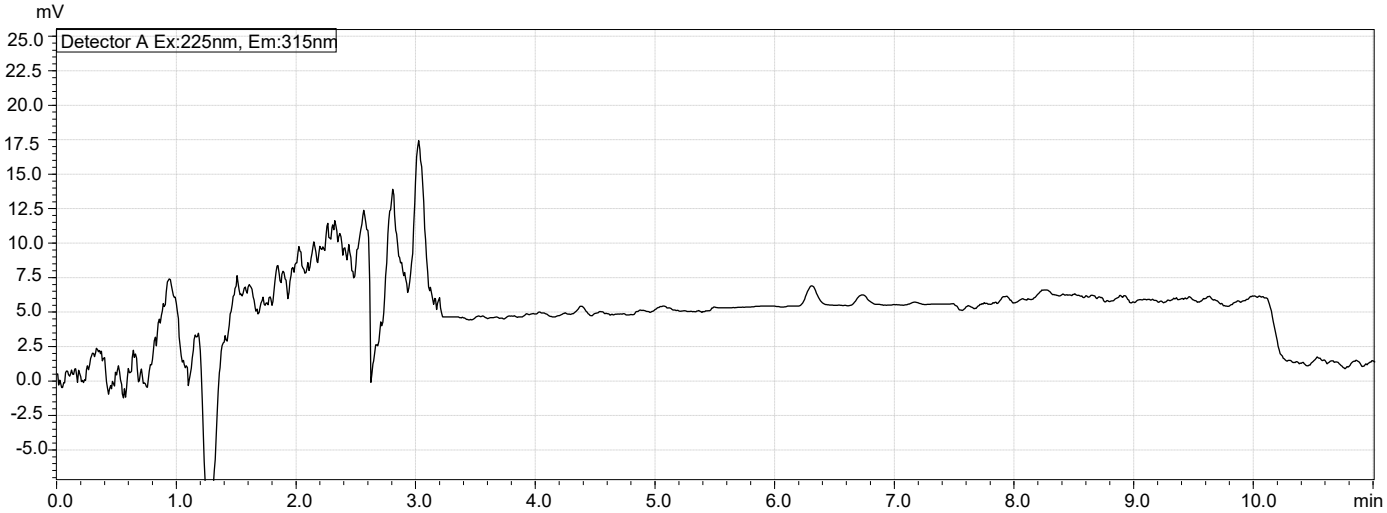
Chromatogram 24 *- Záznam extrakce říční vody na koloně ASCENTIS EXPRESS AQ C-18 (150 x 4,6 mm, 2.7 µm) Gradient A, MF – ACN + THF (1:1),* ***Nanomateriál – PA 11***

Pozn.: Ve třetí minutě vidíme ostrý pík, který odpovídá retenčnímu času ACP. Mezi 6-7 minutou se nachází tři píky, odpovídající retenčním časům BkF, BaP a DahA. Plocha těchto píků je velmi malá v porovnání se standardy.



Chromatogram 25 *- Záznam extrakce říční vody na koloně ASCENTIS EXPRESS AQ C-18 (150 x 4,6 mm, 2.7 µm) Gradient A, MF – ACN + THF (1:1),* ***Nanomateriál – PA 6/10****, FD*

Pozn.: Ve třetí minuté je pík odpovídající retenčnímu času ACP. Mezi 6-7 minutou vidíme píky odpovídající retenčním časům BkF a BaP. Základní linie je rušena šumem, píky nejsou symetrické. Další látky nelze detekovat.



Chromatogram 26 *– Záznam extrakce říční vody na koloně ASCENTIS EXPRESS AQ C-18 (150 x 4,6 mm 2.7 µm) Gradient A, MF – ACN + THF (1:1),* ***Nanomateriál – TACR PBT – 8 mm****, FD*

Pozn.: Ve třetí minutě opět vidíme pík, který nejspíše odpovídá retenčnímu času ACP. Základní linie náhodně kolísá. Mezi 6-7 minutou vidíme dva malé píky odpovídající BaP a BkF.

Shrnutí:

I přestože byly na chromatogramech detekované některé látky, jejich plochy píků odpovídaly zanedbatelným koncentracím. Tudíž je možné vyloučit přítomnost škodlivého množství PAHs v řece Labe, které by mohlo způsobit několik problémů ať už lidem nebo živým organismům žijící v ní.

6. Závěr

Tato diplomová práce byla zaměřena na vývoj HPLC metody spojenou s off-line extrakcí PAHs a testováním nových formátů nanomateriálů. V první části byla provedena optimalizace metody volbou vhodné mobilní fáze, analytické kolony, podmínek pro gradientovou eluci a detekce. Poté následovala validace HPLC metody, pro níž byl proveden test způsobilosti systému, linearita a opakovatelnost metody. Stejně tak byla provedena optimalizace podmínek pro off-line extrakci PAHs.

V další části práce se testovalo několik druhů nanovlákenných materiálů, konkrétně jich bylo vyzkoušeno 29, s cílem vybrat ty nejúčinnější pro extrakci PAHs. Mezi ně patřily nanovlákna PA 11, PA 6/10 a TACR PBT – 8 mm. Jako úplně nejvhodnější se ukázal materiál PA 6/10 který extrahoval všechny PAHs v rozmezí 93,7 – 107,3 %. Podobných výsledků přesahujících 90 % výtěžnost dosahoval i PBT, avšak pro analyt BghiP byla jeho extrakční účinnost pouze 38 %. PA 11 vykazoval dobrou extrakční účinnost pro polárnější PAHs (ACP, ANT, PYR, a CHR) avšak pro lipofilnější analyty vykazoval klesající tendenci extrakce k 50 % výtěžnosti. Tato klesající tendence naznačující jejich případnou silnou retenci při první eluci však nebyla pomocí druhého promývacího kroku a zvýšení eluční síly rozpouštědla potvrzena.

Jako překvapivý se jevil výsledek nízké extrakční účinnosti nanovláken s obsahem lipofilního grafenu a také s obsahem TiO_2, který se běžně jako sorpční materiály využívá. Vzhledem k vysoké lipofilitě PAHs jsme předpokládali jejich silný záchyt. Ten však nebyl potvrzen, pravděpodobně z důvodu nízké smáčivosti vláken s grafenem ve vodném prostředí, a tudíž horšímu kontaktu se vzorkem. Přítomnost reaktivních barviv na PA6 materiálu také nevedla ke zvýšení extrakční účinnosti PAHs, spíše naopak byla pozorována klesající tendence.

Na třech vybraných nejvhodnějších nanovláknech PA 11, PA 6/10 a TACR PBT – 8 mm byla v poslední řadě provedena analýza reálného vzorku – vody z řeky Labe odebrané v Hradci Králové. Na všech 3 chromatogramech se ukázaly téměř zanedbatelné píky odpovídající retenčním časům ACP, BaP a BkF. V porovnání s chromatogram získaným analýzou čisté vody je patrné, že pík pro ACP se v tomto chromatogramu nenachází a jeho přítomnost na ostatních chromatogramech může být způsobena nežádoucí interferencí. U píků odpovídající BaP a BkF, je možný výskyt těchto látek, ale plocha píků je natolik malá, že odpovídající koncentrace těchto látek je zanedbatelná. Tudíž lze potvrdit, že v řece Labe se nenachází žádné nebezpečné množství PAHs.

Cílem diplomové práce bylo získat validní HPLC a extrakční metodu pro testování extrakce PAHs na nanovláknech. Tato práce může sloužit jako podklad pro zkoumání dalších

druhů polymerních materiálů nebo podklad pro testování dalších extrakčních rozpouštědel, která by zlepšila extrakci některých vysoce lipofilních analytů.

7. Seznam použité literatury

(1) THAMER, Badr M.; ALDALBAHI, Ali; MOYDEEN A, Meera; RAHAMAN, Mostafizur a EL-NEWEHY, Mohamed H. Modified Electrospun Polymeric Nanofibers and Their Nanocomposites as Nanoadsorbents for Toxic Dye Removal from Contaminated Waters: A Review. Online. *Polymers*. 2021, roč. 13, č. 1. ISSN 2073-4360. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/polym13010020. [cit. 2025-03-25].

(2) TFOUNI, Silvia A. V.; REIS, Raquel M.; KAMIKATA, Kamille; GOMES, Fernanda M. L.; MORGANO, Marcelo A. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in teas using QuEChERS and HPLC-FLD. Online. 2018, roč. 11, č. 2, s. 146-152. ISSN 1939-3210. Dostupné z: https://doi.org/10.1080/19393210.2018.1440638. [cit. 2025-02-25].

(3) BARBOSA, Fernando; ROCHA, Bruno A.; SOUZA, Marília C. O.; BOCATO, Mariana Z.; AZEVEDO, Lara F. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): Updated aspects of their determination, kinetics in the human body, and toxicity. Online. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*. 2023, roč. 26, č. 1, s. 28-65. ISSN 1093-7404. Dostupné z: https://doi.org/10.1080/10937404.2022.2164390. [cit. 2025-02-26].

(4) ONOPIUK, Anna; KOŁODZIEJCZAK, Klaudia; MARCINKOWSKA-LESIAK, Monika a POLTORAK, Andrzej. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons using different extraction methods and HPLC-FLD detection in smoked and grilled meat products. Online. *Food Chemistry*. 2022, roč. 373. ISSN 03088146. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131506. [cit. 2025-02-25].

(5) ROZENTALE, Irina; ZACS, Dzintars a BARTKEVICS, Vadims. Application of Dopant-Assisted Atmospheric Pressure Photoionisation HPLC–MS Method for the Sensitive Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Dark Chocolate. Online. *Journal of Chromatographic Science*. 2019, roč. 57, č. 3, s. 220-229. ISSN 0021-9665. Dostupné z: https://doi.org/10.1093/chromsci/bmy103. [cit. 2025-02-25].

(6) LOURENÇO, Rafael André; TANIGUCHI, Satie; DA SILVA, Josilene; GALLOTTA, Fabiana Dias Costa a BÍCEGO, Márcia Caruso. Polycyclic aromatic hydrocarbons in marine mammals: A review and synthesis. Online. *Marine Pollution Bulletin*. 2021, roč. 171. ISSN 0025326X. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2021.112699. [cit. 2025-02-26].

(7) MOHAMMAD, Sedigheh Ale; GHANEMI, Kamal a LARKI, Arash. Simultaneous extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons through the complete dissolution of solid biological samples in sodium hydroxide/urea/thiourea aqueous solution. Online. *Journal of Chromatography A*. 2016, roč. 1476, s. 9-18. ISSN 00219673. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.11.022. [cit. 2025-02-25].

(8) ABDEL-SHAFY, Hussein I. a MANSOUR, Mona S.M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. Online. *Egyptian Journal of Petroleum*. 2016, roč. 25, č. 1, s. 107-123. ISSN 11100621. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2015.03.011. [cit. 2025-04-07].

(9) SAMPAIO, Geni Rodrigues; GUIZELLINI, Glória Maria; DA SILVA, Simone Alves; DE ALMEIDA, Adriana Palma; PINAFFI-LANGLEY, Ana Clara C. et al. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Foods: Biological Effects, Legislation, Occurrence, Analytical Methods, and Strategies to Reduce Their Formation. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, roč. 22, č. 11. ISSN 1422-0067. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/ijms22116010. [cit. 2025-04-07].

(10) HAVEL, Milan a VÁLEK, Petr. *Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs)*. Online. Arnika. 2010, 16.05.2022. Dostupné z: https://arnika.org/toxicke-latky/databaze-latek/polycyklicke-aromaticke-uhlovodiky-pahs?utm_source=chatgpt.com&fbclid=IwY2xjawJeiv9leHRuA2FlbQIxMAABHrgSz0QBCMDfDRkaIPIT9byKybsQjOJ3m4b8dwO_eMt_f02YIfkLqijmDKIC_aem_avvxltdITCacHwqXG2aOmA. [cit. 2025-04-06].

(11) LINHART, Igor. *Toxikologie: interakce škodlivých látek s živými organismy, jejich mechanismy, projevy a důsledky*. 3. upravené a rozšířené vydání. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2022. ISBN 978-80-7592-103-1.

(12) TAGHVAEE, Zohreh; PIRAVIVANAK, Zahra; REZAEI, Karamatollah a FARAJI, Mohammad. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Olive and Refined Pomace Olive Oils with Modified Low Temperature and Ultrasound-Assisted Liquid–Liquid Extraction Method Followed by the HPLC/FLD. Online. *Food Analytical Methods*. 2016, roč. 9, č. 5, s. 1220-1227. ISSN 1936-9751. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s12161-015-0297-1. [cit. 2025-02-25].

(13) GUTIÉRREZ-VALENCIA, Tania M. a GARCÍA DE LLASERA, Martha P. On-line MSPD-SPE-HPLC/FLD analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in bovine tissues. Online. *Food Chemistry*. 2017, roč. 223, s. 82-88. ISSN 03088146. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.099. [cit. 2025-02-25].

(14) WANG, Meng; CHENG, Chunsheng; LIU, Chunbo a YANG, Yaling. Hollow Fiber Supported Ionic Liquids Liquid-Phase Micro-extraction Followed by High-Performance Liquid Chromatography for the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Milk Samples. Online. *Journal of Chromatographic Science*. 2018, roč. 56, č. 1, s. 74-80. ISSN 0021-9665. Dostupné z: https://doi.org/10.1093/chromsci/bmx075. [cit. 2025-02-25].

(15) LI, Ning; WU, Di; HU, Na; FAN, Guangsen; LI, Xiuting et al. Effective Enrichment and Detection of Trace Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food Samples based on Magnetic Covalent Organic Framework Hybrid Microspheres. Online. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2018, roč. 66, č. 13, s. 3572-3580. ISSN 0021-8561. Dostupné z: https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00869. [cit. 2025-02-25].

(16) FALSAFI, Zohreh; RAOFIE, Farhad a ARIYA, Parisa A. Supercritical fluid extraction followed by supramolecular solvent microextraction as a fast and efficient preconcentration method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in apple peels. Online. *Journal of Separation Science*. 2020, roč. 43, č. 6, s. 1154-1163. ISSN 1615-9306. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/jssc.201900886. [cit. 2025-02-25].

(17) CHIANG, Chow-Feng; HSU, Kuo-Chiang; CHO, Chih-Yun; TSAI, Tseng-Yu; HSU, Chuan-Hsiang et al. Comparison and establishment of appropriate methods to determine EU priority PAHs in charcoal-grilled chicken drumsticks with different treatments and their dietary risk assessments. Online. *Food and Chemical Toxicology*. 2020, roč. 142. ISSN 02786915. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111400. [cit. 2025-02-25].

(18) DE MELO, Ana Paula Zapelini; HOFF, Rodrigo Barcellos; MOLOGNONI, Luciano; KLEEMANN, Cristian Rafael; DE OLIVEIRA, Thais et al. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Seafood by PLE-LC-APCI-MS/MS and Preliminary Risk Assessment of the Northeast Brazil Oil Spill. Online. *Food Analytical Methods*. 2022, roč. 15, č. 7, s. 1826-1842. ISSN 1936-9751. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s12161-022-02252-z. [cit. 2025-02-25].

(19) VACEK, Jan a CIBEČEK, Norbert. *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně*. Online. Univerzita Palackého v Olomouci, 2020. ISBN 978-80-244-5795-6. Dostupné z: https://www.bookport.cz/kniha/principy-a-vyuziti-vybranych-analytickych-metod-v-laboratorni-medicine-12625/. [cit. 2025-02-27].

(20) *ChromAtoMol - Životní prostředí - časopis nejen pro analytické laboratoře*. 2018, č. 6. 2018.

(21) SUNIL, Ashrani. HPLC Detectors, Their Types and Use: A Review. Online. 2018, roč. 6, č. 5. ISSN 24747610. Dostupné z: https://doi.org/10.19080/OMCIJ.2018.06.555700. [cit. 2025-03-03].

(22) SWARTZ, Michael. HPLC DETECTORS: A BRIEF REVIEW. Online. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2010, roč. 33, č. 9-12, s. 1130-1150. ISSN 1082-6076. Dostupné z: https://doi.org/10.1080/10826076.2010.484356. [cit. 2025-03-03].

(23) LAWRENCE, J. F. Advantages and limitations of HPLC in environmental analysis. Online. *Chromatographia*. 1987, roč. 24, č. 1, s. 45-50. ISSN 0009-5893. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/BF02688466. [cit. 2025-03-03].

(24) BUSZEWSKI, Boguslaw a SZULTKA, Malgorzata. Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. Online. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2012, roč. 42, č. 3, s. 198-213. ISSN 1040-8347. Dostupné z: https://doi.org/10.1080/07373937.2011.645413. [cit. 2025-03-04].

(25) SALVE, Sushmita; BAHIRAM, Yogita; JADHAV, Amol; RATHOD, Rajeshwari a TEKADE, Rakesh Kumar. Nanoplatform-Integrated Miniaturized Solid-Phase Extraction Techniques: A Critical Review. Online. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 2023, roč. 53, č. 1, s. 46-68. ISSN 1040-8347. Dostupné z: https://doi.org/10.1080/10408347.2021.1934651. [cit. 2025-03-04].

(26) POOLE, Colin F. New trends in solid-phase extraction. Online. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2003, roč. 22, č. 6, s. 362-373. ISSN 01659936. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00605-8. [cit. 2025-03-04].

(27) HENNION, Marie-Claire. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. Online. *Journal of Chromatography A*. 1999, roč. 856, č. 1-2, s. 3-54. ISSN 00219673. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00832-8. [cit. 2025-03-05].

(28) HASHEMI, Beshare; ZOHRABI, Parvin a SHAMSIPUR, Mojtaba. Recent developments and applications of different sorbents for SPE and SPME from biological samples. Online. *Talanta*. 2018, roč. 187, s. 337-347. ISSN 00399140. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.05.053. [cit. 2025-03-05].

(29) DAI, Liming a RENEKER, Darrell H. Polymer Nanowires and Nanofibers. Online. *Nanowires and Nanobelts*. 2003, č. 2., s. 269-288. ISBN 978-0-387-28706-5. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-0-387-28747-8_15. [cit. 2025-03-17].

(30) RENEKER, Darrell H a CHUN, Iksoo. Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. Online. *Nanotechnology*. 1996, roč. 7, č. 3, s. 216-223. ISSN 0957-4484. Dostupné z: https://doi.org/10.1088/0957-4484/7/3/009. [cit. 2025-03-17].

(31) HÁKOVÁ, Martina; CHOCHOLOUŠOVÁ, Lucie; SOLICH, Petr; ŠVEC, František a ŠATÍNSKÝ, Dalibor. *Electrospun nanofiber polymers as extraction phases in analytical chemistry - The advances of the last decade*. Online. ScienceDirect. 2018, 17.11.2018. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0165993618303649#preview-section-cited-by. [cit. 2025-02-18].

(32) LHOTSKÁ, Ivona; KHOLOVÁ, Aneta; ŠVEC, František a ŠATÍNSKÝ, Dalibor. Nanofibers prepared from synthetic polymers and biopolymers as advanced extraction materials for sample preparation prior to liquid chromatography. Online. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2024, roč. 180. ISSN 01659936. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117912. [cit. 2025-03-18].

(33) LI, Jinze; LIU, Xin; XI, Jiawei; DENG, Li; YANG, Yanxin et al. Recent Development of Polymer Nanofibers in the Field of Optical Sensing. Online. *Polymers*. 2023, roč. 15, č. 17. ISSN 2073-4360. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/polym15173616. [cit. 2025-03-29].

(34) SHARMA, Navneet a BUTOLA, Bhupendra Singh. *Fiber and Textile Engineering in Drug Delivery Systems*. Online. 2nd Edition. Woodhead Publishing, 2023. ISBN 978-0-323-96117-2. Dostupné z: https://doi.org/https://doi.org/10.1016/C2021-0-01682-5. [cit. 2025-02-18].

(35) HÁKOVÁ, Martina; HAVLÍKOVÁ CHOCHOLOUŠOVÁ, Lucie; CHVOJKA, Jiří; ERBEN, Jakub; SOLICH, Petr et al. *A comparison study of nanofiber, microfiber, and new composite nano/microfiber polymers used as sorbents for on-line solid phase extraction in chromatography system*. Online. ScienceDirect. 2018. Dostupné z: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000326701830504X#bib2. [cit. 2025-02-18].

(36) FRENOT, Audrey a CHRONAKIS, Ioannis S. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. Online. 2003, roč. 8, č. 1, s. 64-75. ISSN 13590294. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/S1359-0294(03)00004-9. [cit. 2025-03-18].

(37) XUE, Jiajia; WU, Tong; DAI, Yunqian a XIA, Younan. Electrospinning and Electrospun Nanofibers: Methods, Materials, and Applications. Online. *Chemical Reviews*. 2019, roč. 119, č. 8, s. 5298-5415. ISSN 0009-2665. Dostupné z: https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00593. [cit. 2025-03-18].

(38) ERBEN, Jakub; PILAROVA, Katerina; SANETRNIK, Filip; CHVOJKA, Jiri; JENCOVA, Vera et al. The combination of meltblown and electrospinning for bone tissue engineering. Online. *Materials Letters*. 2015, roč. 143, s. 172-176. ISSN 0167577X. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.12.100. [cit. 2025-03-22].

(39) SCHMIDT, Joseph; SHENVI USGAONKAR, Saurabh; KUMAR, Satish; LOZANO, Karen a ELLISON, Christopher J. Advances in Melt Blowing Process Simulations. Online. 2022, roč. 61, č. 1, s. 65-85. ISSN 0888-5885. Dostupné z: https://doi.org/10.1021/acs.iecr.1c03444. [cit. 2025-03-22].

(40) LIU, Yiding; GOEBL, James a YIN, Yadong. Templated synthesis of nanostructured materials. Online. *Chem. Soc. Rev*. 2013, roč. 42, č. 7, s. 2610-2653. ISSN 0306-0012. Dostupné z: https://doi.org/10.1039/C2CS35369E. [cit. 2025-03-19].

(41) HENTZE, H. Template synthesis of porous organic polymers. Online. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. 2001, roč. 5, č. 4, s. 343-353. ISSN 13590286. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/S1359-0286(01)00008-0. [cit. 2025-03-22].

(42) EPSHTEIN, N. A. System Suitability Requirements for Liquid Chromatography Methods: Controlled Parameters and their Recommended Values (Review). Online. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2020, roč. 54, č. 5, s. 518-525. ISSN 0091-150X. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s11094-020-02231-w. [cit. 2025-04-21].

(43) TIWARI, Pawan a SINGH, B.K. *HPLC: A MODERN APPROACH OF DEVELOPMENT AND VALIDATION*. Online. 18.6.2016. Department of Pharmaceutical Scinces, Kumaun University Nainital, 263136., 2016. Dostupné z: https://doi.org/10.20959/wjpr20169-7025. [cit. 2025-04-21].