

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

**STUDIUM MOŽNOSTÍ VYUŽITÍ
ALTERNATIVNÍCH SORBENTŮ PRO ÚPRAVU
VZORKU**

Rigorózní práce

Hradec Králové 2014

Mgr. Jana Kresová

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

V Hradci Králové, dne 1.12.2014

.....

Mgr. Jana Kresová

*Na tomto místě bych ráda poděkovala Doc. PharmDr. Petře Kovařikové Ph.D.,
vedoucí mé rigorózní práce, a PharmDr. Jánů Stariatovi, Ph.D., za odborné vedení, cenné
rady, využití při zpracování této práce, a trpělivost, kterou mi věnovali.*

Tato práce byla vypracována za podpory SVV 260062

OBSAH

1	ÚVOD.....	6
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	7
2.2	Úprava vzorku.....	8
2.2.1	Srážení proteinů.....	8
2.2.2	Extrakce z kapaliny do kapaliny.....	9
2.2.3	Extrakce na pevnou fázi.....	9
2.2.4	Mikroextrakce.....	18
2.2.5	On-line techniky.....	18
2.2.6	Techniky s vysokou selektivitou.....	19
2.3	Charakterizace grafenu a grafen-oxidu.....	20
2.3.1	Možnosti přípravy grafenu a grafen-oxidu.....	22
2.3.2	Mechanismus interakce analytů s grafenem a grafen-oxidem.....	23
2.3.3	Aplikace grafenu v SPE.....	25
3	CÍL PRÁCE.....	30
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	31
4.1	Chemikálie a materiál.....	32
4.2	Přístroje.....	34
4.2.1	Chromatografický systém.....	34
4.2.2	Další přístroje.....	34
4.2.3	Pomůcky.....	34
4.3	Extrakce na pevné fázi.....	35
4.3.1	Sorbenty.....	35
4.3.2	Cyklus operací s SPE kolonkou.....	35
4.3.3	Příprava vzorků.....	36

4.4	Optimalizace chromatografických podmínek.....	38
4.4.1	Stacionární fáze a další chromatografické podmínky	38
4.4.2	Mobilní fáze.....	39
4.4.3	Příprava zásobních roztoků a vzorků.....	39
5	VÝSLEDKY A DISKUSE.....	40
5.1	Úprava chromatografických podmínek pro HPLC analýzu	41
5.2	Hodnocení vlivu experimentálních podmínek na extrakční výtěžnost	45
6	ZÁVĚR.....	54
	ABSTRAKT	56
	ABSTRACT	58
	LITERATURA	60
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	62
	SEZNAM TABULEK.....	63

1 ÚVOD

Úprava vzorku patří k základním úkonům při chromatografické analýze biologických vzorků. Na jejím provedení záleží celkový úspěch analytického stanovení a to jak z kvalitativního, tak i z kvantitativního hlediska. Úprava vzorku je požadována zejména v případě, kdy je potřeba zvýšit koncentraci analytu, vzorek není kompatibilní s chromatografickým systémem, nebo hrozí riziko interference matrice se stanovením..

Extrakce na pevnou fázi (Solid Phase Extraction – SPE) patří mezi základní techniky úpravy biologických vzorků před chromatografickou analýzou. Mezi její hlavní výhody patří vysoká selektivita, čistota vzorků, možnost účinného zakoncentrování vzorků a široká oblast využití. Navíc může být celý proces snadno automatizován.

Grafen patří mezi nové alotropní formy uhlíku. Od jeho přímého objevu a charakterizaci skupinou vědců Novoselov a spol. v roce 2004 došlo k exponenciálnímu růstu výzkumů v oblastech vědy a techniky. V analytické přípravě vzorků se stal vhodným adsorbentem díky výjimečným vlastnostem (např. velký povrch, struktura bohatá na π -elektrony, dobrá tepelná a chemická stabilita).

Teoretická část této práce nejprve popisuje techniky úpravy biologických vzorků. Poté se zabývá charakteristikou grafenu a grafen-oxidu.

Experimentální část práce je zaměřena na testování výtěžnosti extrakce vybraných modelových analytů na různých sorbentech na bázi grafenu a výsledky jsou porovnávány se sorbenty, které grafen neobsahují. Vzorky jsou po extrakci analyzovány s využitím HPLC.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.2 Úprava vzorku

Ve farmaceutické analýze je potřeba analyzovat složené léčivé přípravky nebo léčiva v biologickém materiálu. Lékové formy jsou složeny z účinné léčivé látky spolu s různými pomocnými látkami, což může komplikovat kvantitativní analýzu. Krev, plazma a moč jsou směsi stovek látek a obsahují většinou velmi malou koncentraci stanovovaného analytu.(1)

Analýza léčiv a léčivých přípravků je náročná z několika důvodů:

- mohou obsahovat jednu nebo více látek, které narušují analytické měření,
- mohou obsahovat látky, které znečistí nebo zničí analytický přístroj,
- koncentrace analytů v biologickém materiálu může být pro detekci příliš nízká,
- vzorky mohou být nekompatibilní s analytickým přístrojem.(1)

Hlavními cíli úpravy vzorku jsou izolace a zakoncentrování analytů, přečištění extraktů za účelem odstranění co největšího množství balastních látek. (2) Úprava vzorku před vlastní analýzou ovlivňuje všechny následující kroky práce se vzorkem a je kritickým a zároveň časově nejnáročnějším krokem manipulace se vzorkem. Ovlivňuje ve vysoké míře výslednou přesnost a správnost stanovení.(3)

Existuje mnoho technik úpravy vzorku, které mohou být rozděleny na dvě skupiny z hlediska četnosti využití: konvenční metody a moderní techniky úpravy vzorků.(3)

Klasickými konvenčními způsoby přípravy vzorků jsou:

- srážení proteinů (PP, protein precipitation)
- extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE, liquid-liquid extraction)
- extrakce na pevnou fázi (SPE, solid phase extraction).(3)

2.2.1 Srážení proteinů

Srážení proteinů je tradiční technikou úpravy vzorků biologických materiálů a je stále velice oblíbeno díky své jednoduchosti a rychlosti jak provedení, tak optimalizace metody. Po vysrážení proteinů a odstředění je supernatant použit k analýze nebo odpařen do sucha.

Odparek je pak rozpuštěn v minimálním objemu mobilní fáze nebo v některé z jejich složek a analyzován.(1) (3)

V ideálním případě by při deproteinaci měly být odstraněny i proteiny o malé molekulové hmotnosti, precipitát by neměl na svůj povrch adsorbovat analyty. Deproteinační činidlo pak nesmí ovlivňovat analyzovanou látku nebo interferovat při detekci a jinak ovlivňovat analytickou výtěžnost. (3)

Precipitace může být provedena přidáním silných kyselin (trifluoroctová, trichloroctová, chloristá, mravenčí, chlorovodíková), organických rozpouštědel mísitelnými s vodou (methanol, ethanol, acetonitril, aceton), přidáním solí vícemocných iontů (síran zinečnatý nebo měďnatý, hydroxid barnatý) nebo zahříváním při teplotě 100 °C po dobu 5-10 min, tato metoda však není příliš účinná a může způsobit rozklad analytů.(1) (3)

2.2.2 Extrakce z kapaliny do kapaliny

Extrakce z kapaliny do kapaliny byla jednou z prvních technik vyvinutých pro úpravu vzorků a neustále patří mezi často využívané postupy, zejména v rutinních laboratořích. Principem je převedení analytu z vodné fáze do organického s vodou nemísitelného rozpouštědla na bázi rozdělovacího koeficientu voda/oktanol. (1)(3)

Extrakt získaný technikou LLE je většinou nekompatibilní s analytickou technikou, a proto je často nutné jej odpařit do sucha a odparek znovu rozpustit ve vhodném rozpouštědle. Její vysoká spotřeba toxických organických rozpouštědel činí metodu ekonomicky nevýhodnou a také nevhodnou z ekologického hlediska. (3)

2.2.3 Extrakce na pevnou fázi

Jednou z dominantních technik na úpravu biologických vzorků před chromatografickou analýzou je extrakce na pevnou fázi (SPE – solid phase extraction). Tato technika přináší mnoho výhod - vysoká výtěžnost, účinné zakoncentrování analytu, nižší spotřeba organických rozpouštědel ve srovnání s extrakcí z kapaliny do kapaliny (LLE - liquid – liquid extraction).(1)(4)(5)

SPE kolonky a disky jsou dostupné se širokou škálou sorbentů a velikostí. Před výběrem vhodného sorbentu je třeba zjistit co nejvíce informací o vzorku. Uvážit vlastnosti matrice a analytu a na základě těchto znalostí potom zvolit typ fáze a velikost kolonky.(6)(7)

2.2.3.1 Teorie SPE

SPE využívá afinitu analytů rozpuštěných v kapalném vzorku k pevnému sorbentu. Vlastnosti sorbentu ovlivňují výtěžnost a selektivitu extrakce. Klasický SPE model se skládá z kolonky se dvěma fritami, mezi kterými je stlačený sorbent. (8) Sorbent má větší zrnitost než je tomu u kapalinové chromatografie, takže lze pracovat při nízkém podtlaku či přetlaku.(6)

Metodou SPE získáme vzorky, které jsou v roztoku, bez nečistot a jsou dostatečně koncentrované pro dosažení potřebné citlivosti detekce. SPE probíhá v pěti krocích:

1. výběr stacionární fáze
2. kondicionace kolonky resp. disku
3. aplikace vzorku
4. promytí sorbentu
5. eluce zkoumaných sloučenin.(6)

Ad 1. Jako náplň SPE kolonek jsou používány sorbenty obdobné sorbentům v HPLC. Při výběru stacionární fáze jsou brány do úvahy především chemické vlastnosti analytu (polarita, disociační konstanta) a vlastnosti použitého rozpouštědla, např. je-li rozpouštědlo nepolární, jsou používány většinou polární sorbenty a naopak.(3)(7)

Ad 2. Před extrakcí vzorku je provedena kondicionace sorbentu pomocí rozpouštědla. Nejčastěji jsou používána organická rozpouštědla mísitelnými s vodou, jako jsou například methanol, po kterém následuje voda nebo vodný pufr. Methanol navlhčí povrch sorbentu a pronikne mezi alkyly navázané na silikagel, čímž dojde k jejich aktivaci. Voda následně odstraní methanol a vytvoří rovnováhu na fázovém rozhraní, která bude co nejvíce odpovídat situaci při aplikaci vzorku. (1)(6)(3)

Ad. 3. Před nanesením vzorku je v některých případech vhodné vzorek přefiltrovat nebo centrifugovat, aby nedošlo k ucpaní frit v kolonce. Pomocí odměrné pipety nebo mikropipety se nanese přesný objem vzorku do kolonky. Celkový objem vzorku se pohybuje v rozmezí od mikrolitrů po litry. Pro umožnění průtoku vzorku SPE kolonkami je potřeba použít přetlak (stříkačkou, vzduchem) nebo podtlak (vakuum, centrifuga). Pomalý průtok zvyšuje retenci extrahovaných analytů. Pokud je aplikován příliš velký objem vzorku, dochází ke snížení účinnosti extrakce a výtěžnosti.(6)(9)

Ad 4. Pokud je testovaná sloučenina zadržena na sorbentu, lze ostatní látky vymýt stejným rozpouštědlem, ve kterém byl vzorek rozpuštěn (rozpuštědlo s nízkou eluční silou). Pokud není analyt naadsorbován na sorbent, získá se rovnou eluát a metoda extrakce je v tomto případě kompletní.(6)

Ad 5. Eluce analytů je dosaženo promytím sorbentu malým množstvím rozpouštědla, které odstraní extrahované analyty, ale případné nečistoty zůstanou na sorbentu.(1)(6)

2.2.3.2 Možnosti využití SPE

Při extrakci pomocí SPE je možné využít tři strategie - selektivní extrakci, selektivní promývání a selektivní eluci. (6)

Selektivní extrakce. Zvolí se takový SPE sorbent, který selektivně naváže složky ze vzorku – buď nečistoty, nebo zkoumané látky. Vybrané složky jsou zadrženy při průchodu vzorku přes SPE kolonku nebo disk. Filtrát pak obsahuje vzorek bez adsorbovaných složek. Poté je možné eluovat zkoumané látky, nebo kolonku obsahující extrahované nečistoty zlikvidovat.(6)

Selektivní promývání. Po aplikaci vzorku na SPE kolonku jsou zkoumané látky a nečistoty zadrženy na sorbentu. Nečistoty jsou vymyty pomocí promývacího roztoku, který je silný natolik, aby je odstranil z kolonky, ale zároveň slabý tak, aby zanechal zkoumané sloučeniny na kolonce.(6)

Selektivní eluce. Adsorbované zkoumané látky jsou selektivně eluovány rozpouštědlem, který nevymyje silně zadržené nečistoty.(6)

Existuje několik způsobů extrakce. Jsou to extrakce na reverzní fázi, normální fázi, iontovou výměnou a adsorpcí.(6)(5)

2.2.3.3 Reverzní fáze pro SPE

Extrakce je založena na hydrofobních interakcích (van der Waalsovy síly) mezi analytem a stacionární fází. Při extrakci na reverzní fázi má sorbent nepolární charakter. Nejčastěji se jedná o alkyl- nebo aryl- navázaný na povrch nosiče (silikagelu, hybridního sorbentu nebo jiných kovových oxidů). Analyty, které je možné účinně extrahovat, jsou většinou středně polární nebo nepolární.(1)(6)(4)

Retence látek na nepolární sorbent je ovlivňována několika způsoby, např. délka alkylu, vliv substituentů. Retence látek roste se zvětšujícím se počtem a délkou alkylů v homologických řadách, dále pak i s větším počtem aromatických jader či v přítomnosti objemných substituentů, zejména halogenů. Nárůst počtu silně polárních a iontových skupin (-NH₂, -OH, -COOH, -SO₃H) a jejich stoupající polarita snižuje retenci látek.(4)(7)

K vymytí naadsorbovaných sloučenin z reverzní fáze SPE kolonky nebo disku je použito nepolární rozpouštědlo, aby došlo ke zrušení hydrofobních interakcí. (5)(6)

Všechny fáze vázané na silikagely mají určité procento zbytkových nezreagovaných silanolů, které hrají roli při sekundárních interakcích. Ty mohou být užitečné při extrakci nebo retenci vysoce polárních analytů nebo nečistot, ale také mohou nevratně vázat analyty, které nás zajímají. (6)

Grafitový uhlík bez pórů, který váže organické polární a nepolární sloučeniny z polárních i nepolárních prostředí je také možným sorbentem pro SPE.. Uhlíkatý povrch je tvořen atomy uspořádanými do šestiúhelníkové kruhové struktury, které jsou propojené a vrstvené do grafitových vrstev. Tato struktura vykazuje silnou selektivitu pro planární aromatické molekuly. Retence analytů je primárně založena na struktuře analytu (velikosti a tvaru), poté na interakcích funkčních skupin analytu s povrchem sorbentu. Eluce je prováděna pomocí středně polárních až nepolárních rozpouštědel. Tyto materiály jsou díky unikátní struktuře a selektivě skvělou alternativou silikagelu s navázanými alkyly.(6)

2.2.3.4 Normální fáze pro SPE

Extrakce na normální fázi probíhá na polárním sorbentu. Nejčastěji se používají na silikagel navázané polární funkční skupiny (-OH, -CN, -NH₂ a -Diol) nebo polární adsorpční nosiče (silikagel, alumina). Analyty, které je možné účinně extrahovat, jsou polární.(1)(6)

K retenci analytů dochází primárně díky interakcím mezi polárními funkčními skupinami analytu a polárními skupinami na povrchu sorbentu (vodíková vazba, π - π interakce, dipol-dipol interakce a dipol-indukovaný dipol interakce). Adsorbované sloučeniny jsou eluovány rozpouštědlem, který zruší tyto polární interakce. Obvykle se jedná o rozpouštědlo, které je polárnější než původní matrix vzorku.(1)(6)

Silikagely obsahující krátké alkylové řetězce s polárními funkčními skupinami jsou hydrofilnější v porovnání se silikagely používanými v reverzní fázi. Silikagely normální fáze adsorbují polární sloučeniny z nepolárních prostředí. Tyto SPE kolonky jsou využívány k adsorpci a selektivní eluci jak sloučenin velmi podobné struktury (například isomerů), tak složitých směsí sloučenin jako jsou léčiva a lipidy. Tyto materiály mohou být také využity v podmínkách reverzní fáze (s vodnými vzorky), kde jsou využity vlastnosti malých alkylových řetězců v navázaných funkčních skupinách.(6)

Čistý silikagel je běžně používán jako základ všech vázaných fází. Tento silikagel je extrémně hydrofilní a musí být udržován suchý. Všechny vzorky musí být relativně bezvodé. Volné hydroxylové skupiny na povrchu částic silikagelu adsorbují sloučeniny z nepolárních prostředí. Ve většině případů je čistý silikagel používán jako adsorpční médium, kde organický extrakt je na silikagel aplikován, analyt se nezadrží a projde kolonkou, a ostatní látky se naadsorbují na silikagel. (5)(6)

Materiály z oxidů hliníku jsou používány při adsorpci i vyčištění vzorků. Mohou mít pH kyselé (Alumina-A, pH ~5), zásadité (Alumina-B, pH ~8,5) nebo neutrální (Alumina-N, pH ~6,5). (6)

2.2.3.5 Iontově výměnná extrakce

Iontově výměnná extrakce se využívá u sloučenin, které jsou v roztoku nabitě (většinou se jedná o vodný roztok, ale někdy i organický). Mechanismus retence sloučenin je založen hlavně na elektrostatických přitažlivých silách nabitých funkčních skupin sloučeniny s nabitými skupinami navázanými na povrchu silikagelu. Pro zadržení analytů z vodného roztoku je potřeba zvolit vhodné pH vzorku, aby jak analyt, tak i funkční skupiny navázané na silikagel měly náboj. Ve vzorku se mohou vyskytovat další látky, které mají stejný náboj jako analyt, a tím může dojít k ovlivnění adsorpce. Při eluci analytů se používá roztok s hodnotami pH, který neutralizuje buď funkční skupiny analytů, nebo funkční skupiny na povrchu sorbentu. V okamžiku, kdy jsou tyto skupiny neutralizovány, jsou elektrostatické síly zrušeny a látka je eluována. K eluci lze využít také roztok s vysokou iontovou silou nebo s obsahem iontů. Iontoměniče je možné členit podle výměnné funkční skupiny na anexy a katexy.(1)(4)(6)

2.2.3.5.1 Aniontově výměnná SPE

Anexy jsou nerozpustné polymerní polyvalentní báze, které uvolňují a vyměňují anionty. Dále jsou děleny na slabé (weak anion exchanger, WAX) a silné (strong anion exchanger, SAX).(4)

SAX se skládá z alifatických kvarterních aminových skupin, které jsou navázány na povrchu silikagelu. Kvarterní aminy jsou silné báze a vyskytují se jako pozitivně nabitě kationty, které přitahují anionty. Hodnota pKa kvarterních aminů je vysoká (vyšší než 14), proto jsou navázané funkční skupiny nabitě při všech hodnotách pH vodného roztoku. SAX je vhodný k izolaci silných (velmi nízké pKa, <1) nebo slabých anionických sloučenin (středně nízké pKa, >2), ve většině případů se jedná o silné nebo slabé kyseliny. Aby byly anionické (kyselé) sloučeniny nabitě, musí být hodnota pH vzorku o 2 jednotky vyšší než je jejich pKa.(1)(6)

Jelikož vazba na SAX je velmi pevná, používá se při extrakci silných aniontů jen v případech, kde není požadována výtěžnost nebo eluce těchto aniontů. Slabé anionty lze snadněji izolovat pomocí jiných aniontů nebo eluovat pomocí kyselého roztoku, který neutralizuje slabé anionty (2 pH jednotky pod jeho pKa). Pokud je vyžadována výtěžnost silných aniontů, je vhodné zvolit LC-NH₂. (6)

WAX obsahuje primární nebo sekundární aminy, které mohou být navázané na povrch silikagelu. Často je používán k izolaci jak silných, tak slabých aniontů. Aminovou funkční skupinu lze neutralizovat (2 pH jednotky pod jeho pKa) v závislosti na eluci silného nebo slabého aniontu. Slabé anionty lze eluovat roztokem, který neutralizuje adsorbovaný anion, nebo přidáním jiného aniontu, který nahradí stanovovanou složku.(6)

2.2.3.5.2 Kationtově výměnná SPE

Katexy jsou nerozpustné polymerní polyvalentní kyseliny, které uvolňují a vyměňují kationty. Dále mohou být rozděleny na slabé (weak cation exchanger, WCX) a silné (strong cation exchanger, SCX). (4)

SCX obsahuje například skupiny sulfonových kyselin, propylsulfonových kyselin, benzensulfonových kyselin nebo trifluorooctových kyselin, které mohou být navázané na povrchu silikagelu. Tyto skupiny jsou silně kyselé ($pK_a < 1$), z roztoku přitahují kationty. Navázané funkční skupiny jsou nabitě přes celý rozsah pH. Využívají se k izolaci silných ($pK_a > 14$) nebo slabých ($pK_a < 12$) kationtových sloučenin. Pro bazické sloučeniny musí být pH vzorku upraveno alespoň o 2 pH jednotky pod jeho pKa, aby měly náboj.(1)(4)(6)

Slabé kationty se snadno eluují pomocí roztoku s hodnotou pH 2 jednotky pod pKa daného kationtu (neutralizace analytu), nebo přidáním jiného kationtu, který nahradí analyt. Pro výtěžnost silných kationtů je vhodnější použít slabý katex.(6)

Slabý katex obsahuje na povrchu silikagelu skupiny fosfonových nebo karboxylových kyselin, což jsou slabé anionty. Tento materiál je využíván k izolaci slabých i silných kationtů.(4) (6)

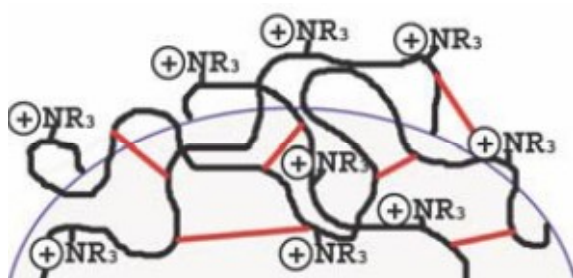
2.2.3.6 Oxid zirkoničitý

Oxid zirkoničitý (ZrO_2) je oxid kovu, který existuje v několika krystalických a amorfních formách. Hlavní výhodou zirkonia oproti tradičním silikagelovým fázím je jeho extrémní chemická a tepelná stabilita. Zirkonium je stabilní přes celý rozsah pH i při teplotách až kolem 200 °C. Na rozdíl od polymerních fází nedochází u zirkonia na základě složení mobilní fáze ke zvětšování nebo zmenšování jeho plochy.(10)

2.2.3.6.1 Iontoměničče na bázi oxidu zirkoničitého

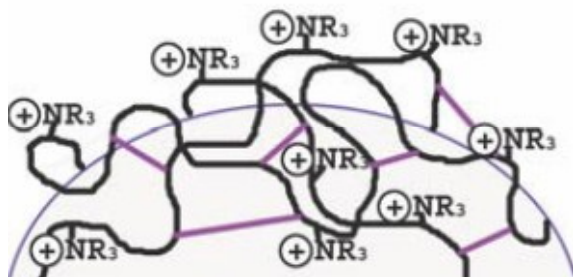
Iontoměniččové fáze na bázi ZrO_2 jsou vytvořeny obalením ultrastabilních zirkoniových částic extrémně tenkou vrstvou iontového polymeru. Touto metodou se vytváří fáze s mnohem větší účinností a často i s větší kapacitou, než je tomu u čisté polymerní fáze. Fáze s označením SAX a SHAX jsou tepelně stabilní až do 80 °C. (10)

ZirChrom[®]-SAX je stabilní v rozmezí pH 1 až 12. Obsahuje zesítěný polyethyleniminový obal schopný silné aniontové výměny. (Obr. 1) Je vhodný pro anorganické a organické anionty, ideální pro separaci ve vodě rozpustných vitaminů.(10)



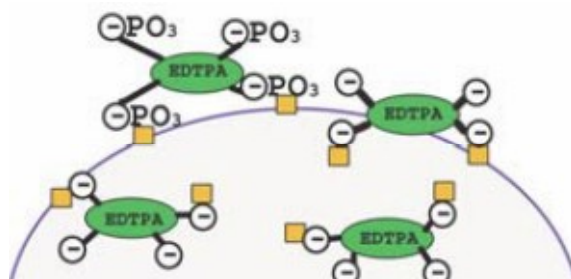
Obr. 1 ZirChrom[®]-SAX

ZirChrom[®]-SHAX je stabilní v rozmezí pH 1 až 12. Obal zirkonia obsahuje kvarternizované polyethyleniminové skupiny pro silnou hydrofilní aniontovou výměnu.(Obr. 2) SHAX má všechny výhody jako SAX, jen je jeho povrch hydrofilnější, čehož lze využít pro analýzu proteinů.(10)



Obr. 2 ZirChrom[®]-SHAX

ZirChrom[®]-PEZ je stabilní v rozmezí pH 1 až 10 a při teplotách do 50 °C. Částice zirkonia jsou obaleny ethylendiamin-N,N,N',N'-tetra(methylenfosforečnou kyselinou) (Obr. 3) a jsou vhodné pro kationtovou výměnu. (10)



Obr. 3 ZirChrom[®]-PEZ

2.2.3.7 Role pH v SPE

Roztoky používané při SPE mají široký rozsah pH. Běžný silikagel používaný i v HPLC kolonách je stabilní v rozmezí pH od 2 až 7,5. Při jiných hodnotách hrozí, že se navázané fáze na silikagelu hydrolyzují a odplaví, nebo se samotný silikagel rozpustí. Nicméně roztok je při SPE v kontaktu se sorbentem pouze krátkou dobu a navíc jsou SPE kolonky většinou jednorázové. To umožňuje jejich použití při jakémkoli pH roztoku. (6)

Pro retenci kyselých nebo zásaditých analytů v kolonce při reverzní fázi je nutné zvolit takové pH roztoku, při kterém jsou sloučeniny neionizované. Retence neutrálních sloučenin jsou nezávislé na pH. Nebo naopak lze využít pH roztoku, při kterém jsou ostatní látky ve vzorku zadrženy na kolonce a požadované analyty jí rovnou projdou. (1)(6)

Při extrakci na normální fázi není hodnota pH důležitá, jelikož jsou většinou používána nepolární organická rozpouštědla. (6)

Retence na iontově výměnné SPE silně závisí na pH vzorku i rozpouštědel. K zadržení analytu je nutné takové pH, při kterém jsou analyt a funkční skupiny na povrchu silikagelu nabity opačně. (6)

Moderní techniky úpravy vzorku:

Hlavními požadavky na moderní techniky pro úpravu vzorku před analýzou jsou zkrácení času potřebného pro přípravu vzorku, snížení spotřeby rozpouštědel použitých pro extrakci, snížení spotřeby samotného vzorku, zvýšení selektivity extrakčního procesu, snížení počtu kroků extrakčního procesu, možnost automatizace.(3)

Moderní techniky lze rozdělit do tří skupin:

- mikroextrakce
- on-line techniky
- techniky s vysokou selektivitou. (3)

2.2.4 Mikroextrakce

Hlavní výhodou mikroextrakcí je většinou minimální spotřeba organických rozpouštědel, jak je tomu např. u mikroextrakce do kapalné fáze (LLME, liquid-liquid microextraction), mikroextrakce na tuhou fázi (SPME, solid-phase microextraction) nebo sorpční extrakce míchadlem (SBSE, stir-bar sorptive extraction). Naopak hlavní nevýhodou je velmi dlouhá doba extrakčního procesu, protože metody vyžadují velmi dlouhý čas pro ustálení rovnováhy během procesu adsorpce a desorpce analytu.(3)(11)(12)(13)

2.2.5 On-line techniky

Mezi moderní on-line techniky pro úpravu vzorků patří metody, které se stanou přímou součástí chromatografického systému a není zde možnost jejich off-line provedení. Patří sem chromatografie s turbulentním průtokem (TFC, turbulent flow chromatography) a kapilární SPME (in-tube SPME). Automatizovat lze i konvenční techniky jako je LLE nebo SPE a některé mikroextrakce jako je SPME.(3)(14)

2.2.6 Techniky s vysokou selektivitou

Selektivita extrakčního kroku je jedním z nejobtížněji prakticky dosažitelných požadavků, proto je vyvinutých selektivních postupů velice málo. Mezi selektivní postupy se řadí molekulárně vtištěné polymery (MIP's, molecularly imprinted polymers) nebo imunoafinitní SPE (IA-SPE, immunoaffinity SPE). (3)

2.3 Charakterizace grafenu a grafen-oxidu

Nové objevy při výzkumu materiálů mohou vést k vývoji sorbentů použitelných v analytické chemii při úpravě vzorků. Skvělým příkladem je široké využití uhlíkových nanomateriálů v extrakci na pevné fázi (SPE) a mikroextrakci na pevné fázi (SPME). Uhlíkové nanomateriály se skládají z široké řady alotropních forem uhlíku, včetně grafitových nanovláken, nanodiamantů, fullerenu a uhlíkových nanotrubiček. Tyto nanomateriály mohou být využity jako nový sorbent pro čištění vzorků a prekoncentraci.(8)

Například fullereny byly objeveny v roce 1985 a od roku 1994 byly využívány jako sorbenty pro on-line SPE různých sloučenin. Díky rozsáhlému povrchu poskytují tyto nanomateriály dobrou selektivitu. Uhlíkové nanotrubičky byly objeveny v roce 1991 a brzy nahradily ve výzkumech fullereny. Hlavní výhodou uhlíkových nanotrubiček jako sorbentu je jejich velký povrch, schopnost tvořit π - π interakce a vynikající chemická, mechanická a termální stabilita. Navíc je možné přizpůsobit selektivitu extrakce přidáním funkčních skupin na povrch uhlíkových nanotrubiček.(8)

Grafen je novou formou uhlíkatého materiálu, který má tloušťku jedné nebo více vrstev uhlíku v sp^2 - hybridizaci a je uspořádán do tvaru šestiúhelníkové mřížky.(15) Díky této struktuře je u grafenu možné pozorovat mnoho zajímavých vlastností (např. velkou plochu, tepelnou a chemickou stabilitu, skvělou optickou průhlednost, vysoké hodnoty Youngova modulu, meze pevnosti a tepelnou konduktivitu). Grafen je považován za nepolární, hydrofobní sorbent se silnou afinitou k uhlíkovým kruhovým strukturám, a tak může být využit jako reverzní fáze při extrakci na pevné fázi. Grafen inspiroval k využití v mnoha různých oborech, včetně elektroniky, biomedicíny aj. (8)

Grafen je zajímavější než uhlíkaté nanotrubičky a další uhlíkové alotropie z několika důvodů. Má velmi rozsáhlý povrch (teoreticky $2630 \text{ m}^2/\text{g}$) a vysokou adsorpční kapacitu. Takto velký povrch je získán díky unikátní morfologii grafenu, kde obě strany planární nanovrstvy jsou přístupné pro adsorpci analytů, zatímco u fullerenu a uhlíkových nanotrubiček je vnitřní strana stericky chráněna. (8)(15)

Další významnou výhodou grafenu je jeho syntéza. Lze ho získat za pomoci jednoduchých chemických metod bez speciálních zařízení a z velmi běžného a levného surového materiálu – grafitu. (8)

Je známo, že uhlíkaté nanotrubičky nevyhnutelně obsahují významné množství reziduálních kovových nečistot z kovových katalyzátorů, které jsou používány při syntéze. Tyto nečistoty je prakticky nemožné odstranit a mohou mít negativní vliv při použití. Grafen může být syntetizován z grafitu bez použití kovových katalyzátorů, a proto je snazší získat čistší materiál (záleží na čistotě použitého grafitu). (8)(15)

Součástí grafenu je mohutný delokalizovaný π -elektronový systém, který poskytuje silnou afinitu ke strukturám s uhlíkovým kruhem, které jsou všudypřítomné u léčiv, látek znečišťujících životní prostředí a biomolekul. Pro ostatní typy analytů je možné grafen modifikovat zavedením funkční skupiny přes grafen oxid, což je prekurzor grafenu v chemické syntéze a vlastní mnoho reaktivních skupin. (8)

Meziprodukt grafen-oxid je velmi cenný materiál. Na rozdíl od grafenu má grafen-oxid na povrchu množství kyslíkových atomů ve formě epoxy, hydroxy nebo karboxy skupin, což vede k vyšší hydrofilite a lepší tvorbě stabilních koloidních suspenzí, ale stále je zachována základní struktura grafenu. Grafen-oxid tvoří vodíkové vazby s organickými sloučeninami nebo ionty. V porovnání s grafenem obsahuje více polárních skupin a může být použit v systému normální fáze při extrakci na pevné fázi. Je vhodný pro stanovení organických sloučenin obsahující kyslíkaté a dusíkaté funkční skupiny a kovové prvky. (15) Grafen-oxid je skvělým mezistupněm při přípravě funkčních grafenových materiálů nebo grafenových kompozitů. (8)

Na rozdíl od uhlíkových nanotrubiček a fullerenu jsou vrstvy grafenu relativně měkké a flexibilní, což je výhodné při přípravě SPME vláken. Avšak jeho měkkost a flexibilita mohou za zhoršení extrakce na pevné fázi kvůli vysokému tlaku na kolonce. (8)(15)

Jak vyplývá z textu výše, grafen by mohl nahradit uhlíkové nanotrubičky jako mimořádný adsorbent nebo by mohl poskytnout lepší složené adsorbenty. (8)

2.3.1 Možnosti přípravy grafenu a grafen-oxidu

První úspěšnou metodou k získání jednovrstevného nebo málovrstevného grafenu bylo mechanické odlupování grafitu pomocí lepicí pásky. Touto metodou lze získat grafen vysoké kvality, ale jeho výnosy jsou extrémně nízké a proces je obtížně kontrolovatelný.(8)

Vědci vyvinuli značné úsilí, aby objevili metodu k syntéze grafenu. Napodobili metody k syntéze uhlíkové nanotrubičky, nicméně tyto metody měly několik nedostatků (vysoká teplota, velmi kvalitní substráty, precizní kontrolu teplot, kovové katalyzátory, hydrofobní grafen je náchylný k tvorbě aglomerátů ..). Proto je chemická syntéza z grafitu nejúčinnější, nejlevnější a je možné její škálování. Zahrnuje oxidaci přírodního grafitu, poté odlupování na individuální vrstvy grafen-oxidu pomocí ultrazvuku a nakonec redukci na tzv. chemicky konvertovaný grafen.(8)

Nejvíce používaným redukčním činidlem pro grafen-oxid je hydrazin. Nicméně se využívají i méně toxická a ekologická redukční činidla (NaBH₄, kyselina askorbová, kovový prášek). Dále je možné využít tepelnou redukci. Tvorbě agregátů lze zabránit přidáním stabilizačních činidel (polymery a surfaktanty) nebo kontrolou experimentálních podmínek.(8)(16)

Chemicky syntetizovaný grafen z grafitu není tak celistvý jako grafen syntetizovaný jinými způsoby. Intenzivní oxidace grafitu vede k porušení konjugace grafenových vrstev a způsobuje v nich trhliny. V elektronice mohou vést tyto trhliny k fatálním závadám. Nicméně při jeho použití jako sorbentu jsou tyto nedokonalosti nepodstatné, protože zde není potřeba specifická plocha.(8)

Jednovrstevný grafen je variabilní na laterální straně, v tloušťce a tvaru. Prodloužením času v ultrazvuku nebo zvýšením jeho síly může dojít k odlupování grafen-oxidu na menší a užší vrstvy. Je známo, že monodisperzní grafenové vrstvy vedou ke stabilním, reprodukovatelným analytickým výsledkům. Bohužel škálovatelný proces k výrobě monodisperzního grafenu je stále velkou výzvou. (8)

V případě, že je grafen používán v práškové formě, je potřeba řádně uvážit metodu jeho sušení. Přímé sušení při pokojové teplotě vede často k aglomeraci grafenových vrstev. Aglomeraci grafenu je možno snížit pomocí lyofilizace.(8)

Specifická plocha grafenového prášku získaného redukcí grafen-oxidu hydrazinem a lyofilizací byla uvedena jako 433,1 m²/g. Na jednu stranu je tato hodnota nižší, než byla jeho teoretická hodnota, což dokazuje aglomeraci grafenu. Na druhou stranu je tato hodnota dvakrát větší než u jednovrstevné uhlíkaté trubičky a přibližně pětkrát vyšší než u vícevrstevné uhlíkaté trubičky.(8)

2.3.2 Mechanismus interakce analytů s grafenem a grafen-oxidem

Organické sloučeniny se mohou adsorbovat na nanočástice nebo nanomateriály pomocí nekovalentních interakcí zahrnující elektrostatické interakce, vodíkové vazby, π - π interakce a hydrofobní interakce. V případě grafenu hraje dominantní roli rozsáhlý systém delokalizovaných π -elektronů, který tvoří silné π - π interakce s aromatickým kruhem v mnoha organických sloučeninách. Také vazba kationtů na π -elektrony může být zodpovědná za adsorpci. Této interakci dominuje polarizace vyvolaná kationtem a elektrostatická síla mezi kationtem a permanentním kvadrupólem aromatické struktury bohaté na π -elektrony. (15)

Grafen-oxid poskytuje funkční skupiny vhodné k tvorbě vodíkových vazeb nebo elektrostatických interakcí s organickými sloučeninami obsahující kyslíkaté nebo dusíkaté funkční skupiny. Pei *et al.* studovali adsorpci aromatických sloučenin různých struktur na grafen a grafen-oxid. Jednalo se o 2,4,6-trichlorofenol (TCP), 2-naftol, 1,2,4-trichlorobenzen (TCB) a naftalen (NAPH). TCP a 2-naftol jsou strukturně podobné TCB a naftalenu, ale obsahují navíc polární hydroxylovou skupinu. Podobná adsorpční kapacita těchto aromátů na grafen, bez ohledu na jejich rozdílné chemické vlastnosti, ukazuje, že kromě hydrofobních interakcí jsou sloučeniny adsorbovány na grafen hlavně pomocí π - π interakcí. Grafen-oxid má v porovnání s grafenem nižší π -elektronovou hustotu a více kyslíkatých funkčních skupin, takže je pozorována vyšší adsorpce TCP a 2-naftolu na grafen-oxid. Dochází tam k tvorbě vodíkových vazeb mezi hydroxylovými skupinami TCP a 2-naftolu a kyslíkatých funkčních skupin na grafen-oxidu. Následkem toho roste afinita aromátů ke grafen-oxidu v řadě NAPH < TCB < TCP < 2-naftol. Adsorpce 1-naftylaminu,

1-naftolu a naftalenu na magnetický kompozit RGO/Fe₃O₄ odhalila, že elektronové interakce donor-akceptor byly primárním adsorpčním mechanismem a vyšší polarita adsorbovaných látek vedla k vyšší adsorpční kapacitě (naftalen < 1-naftol < 1-naftylamin). (15)

Gao *et al.* studovali adsorpci tetracyklinových antibiotik na grafen-oxid. Enormní adsorpční kapacita grafen-oxidu byla vysvětlena π - π interakcí a vazbou kationtů na π -elektrony. Tato vazba může vzniknout mezi snadno protonovatelnými aminoskupinami tetracyklinu a π -elektrony grafenu. Tetracykliny se skládají ze čtyř aromatických kruhů s různými funkčními skupinami na každém kruhu, včetně fenolu, alkoholu, ketonu a aminu, takže elektrostatické interakce a vodíkové vazby mohou přispět k adsorpci. Díky vynikajícím adsorpčním vlastnostem jsou grafen-oxid, redukovaný grafen-oxid a na grafenu založené magnetické kompozity využívány pro odstraňování barviv a organických nečistot z vodných roztoků. (15)

Adsorpce kovových iontů vyžaduje tvorbu hydrofobních komplexů. V mnoha případech je adsorpční kapacita grafen-oxidu vyšší než u ostatních doposud nahlášených sorbentů, včetně nanomateriálů. Je to dáno kromě jeho rozsáhlého povrchu hlavně vysokým obsahem kyslíku (tj. 30 % hmotnosti). Funkční skupiny obsahující kyslíkové atomy mají volný elektronový pár, s jehož pomocí je možné účinně vázat kovový iont tvorbou kovového komplexu. Obsah kyslíku v oxidovaných uhlíkových nanotrubičkách je značně nižší než v grafen-oxidu (tj. obvykle méně než 5 % hmotnosti). Kovové ionty přítomné v hydratované formě nebo jako komplexy s jednoduchými anionty se bohužel na grafen neadsorbují. Maximální adsorpční kapacita redukovaného grafen-oxidu je výrazně nižší než v grafen-oxidu. Protože adsorpce závisí na vlastnostech kovového iontu, jsou pozorovány rozdíly v afinitě různých kovových iontů ke grafen-oxidu. Kompetitivní adsorpční experimenty prokázaly afinitu v pořadí Pb(II) > Cu(II) >> Cd(II) > Zn(II). Toto pořadí se shoduje s elektronegativitou kovů. (15)

Sorpce kovových iontů na grafen-oxid je nezávislá na iontové síle, ale významnou roli hraje pH roztoku. Na jednu stranu je vysoké pH výhodné pro ionizaci funkčních skupin obsahující kyslík na povrchu grafen-oxidu. Hodnota pH, při které je náboj grafenu nulový, je přibližně 3,9, takže při hodnotách pH vyšších než 3,9 je povrch grafen oxidu negativně nabit a elektrostatické interakce mezi kovovými ionty a grafen-oxidem se stávají

silnějšími. Na druhou stranu může dojít u kovových hydroxidů při vysokých hodnotách pH k precipitaci nebo převládnu anionty. Kvůli negativnímu náboji na povrchu grafen-oxidu je obtížná adsorpce aniontů, proto by měly být hodnoty pH zvoleny opatrně, aby se dosáhlo vysoké výtěžnosti.(15)

Madadrang *et al.* napojili chelatační skupiny na grafen-oxid pomocí silanizační reakce mezi N-(trimethoxysilylpropyl)ethylendiamintetraoctovou kyselinou (EDTA-silan) a hydroxylovými skupinami na povrchu grafen-oxidu. Toto zavedení EDTA skupin významně zvýšilo adsorpční kapacitu grafen-oxidu pro olovnaté ionty.(15)

Kompozity založené na grafenu jsou novými sorbenty, které kombinují vlastnosti redukovaného grafen-oxidu a grafen-oxidu s dalšími složkami (např. oxidy kovů nebo polymery). Nedávno byly publikovány články, které se věnovaly kompozitům oxidů kovů zahrnující magnetické kompozity. Nanovrstvy grafenu mohou nejenom podpořit růst nanočástic, ale také zabránit agregaci těchto nanočástic. Navíc oxidy kovů mohou lépe vázat kovové ionty, čímž se dosáhne vyšší adsorpční kapacity u kompozitů z oxidu kovu a redukovaného grafen-oxidu ve srovnání se samotným redukovaným grafen-oxidem. Bohužel má kompozit z oxidu kovu a grafen-oxidu nižší adsorpční kapacitu než samotný grafen-oxid, jelikož oxidy kovu obsadí část povrchu nanovrstev grafen-oxidu.(15)

2.3.3 Aplikace grafenu v SPE

Liu *et al.* publikovali článek s první aplikací grafenu při extrakci na pevné fázi. Pomocí kolonky se stlačeným grafenem extrahovali osm chlorofenolů ze vzorků vody. Kolonka nabídla hned několik výhod: Nízká spotřeba sorbentu (20 mg) a organických rozpouštědel (např. 0,3-0,5 ml methanolu), což je výhodné pro potenciální miniaturizaci; skvělá kompatibilita s různými rozpouštědly, protože grafen je zřídka rozpustný v běžných rozpouštědlech; a uspokojivá reprodukovatelnost, navzdory polydisperzitě grafenu.(8)(15)

Liu *et al.* prokázali, že chlorofenoly adsorbované na grafenu nelze kvantitativně eluovat za použití acetonitrilu, tetrahydrofuranu nebo methanolu, které jsou vhodné pro HPLC s reverzní fázi. Uspokojivých výsledků bylo dosaženo v případě směsi methanolu s hydroxidem sodným, jelikož zásadité prostředí příznivě ionizuje chlorofenoly, což snižuje jejich afinitu ke grafenu a usnadňuje eluci.(15)

Výsledky s grafenem byly porovnávány s modifikovaným silikagelem (C18), grafitem a uhlíkovými nanotrubičkami, u všech bylo použito stejné množství sorbentu. Grafen poskytl nejlepší výsledky. U C18 a grafitu byly zaznamenány nízké výtěžnosti, jelikož tyto sorbenty nezadržely veškeré analyty. (8)

Zajímavější bylo porovnání s uhlíkovými nanotrubičkami. Ty měly dobrou adsorpční kapacitu, bohužel kvůli velmi pevné adsorpci a nedostatečné eluci byly získány nízké výtěžnosti. Autoři to vysvětlují tak, že grafen obsahuje množství polárních skupin v kruhu i po redukci hydrazinem. Tyto residuální polární skupiny by mohly zvýšit smáčivost grafenu vodou a usnadnit retenci a eluci polárních sloučenin. Grafen se během extrakce analytů s širokým rozsahem polaritý chová jako hydrofilně-lipofilní vyvážený sorbent a poskytuje lepší výsledky než uhlíkaté nanotrubičky.(8)

Metoda byla aplikována nejen na chlorofenoly, ale i na další typy analytů. Huang *et al.* použili stejnou metodu pro extrakci glutathionu z lidské plazmy.(15) Analyt byl fluorescenčně derivatizován a detekován spektrofotometricky. Wang *et al.* stanovovali olovo ve vzorkách vody a zelenině pomocí grafenu v SPE kolonce. Použili dithizon jako chelatační agens a výsledky změřili pomocí plamenové atomové adsorpční spektrometrie. V obou studiích byl grafen lepším sorbentem.(8)

Přímé použití grafenu jako sorbentu při SPE může vést k několika problémům. Díky jeho polydisperzitě mohou drobné vrstvy uniknout z kolonky a také ireversibilní agregace jeho vrstev během nanášení vzorku může ovlivnit adsorpční kapacitu, extrakční účinnost a opětovné použití kolonky.(8)(15) (16)

Aby se předešlo těmto problémům, Liu *et al.* vyvinuli grafen a grafen-oxid vázaný na silikagelu (G/silica a GO/silica) jako SPE sorbenty. Karboxyskupiny grafen-oxidu jsou spojeny s koncovými aminoskupinami silikagelu. Tento nový adsorbent (GO/silica) může být použit při SPE s normální fází. K přípravě vhodného adsorbentu pro SPE s reverzní fází byl redukován GO/silica hydrazinem (G/silica). Toto také rozšířilo možnosti aplikace grafenu jako sorbentu od vodných do organických systémů.(8)(15)

Bylo zjištěno, že volný grafen-oxid v reakční směsi přispívá k lepšímu zabalení aminosilikagelu, zatímco v případě, kde byl nenavázaný grafen-oxid před redukcí odstraněn z roztoku, došlo k menšímu obalení částic silikagelu. Byly zkoušeny různé

koncentrace volného grafen-oxidu ve směsi v rozmezí od 0,5 do 2,5 mg/ml, pro dostatečné zakrytí redukovaným grafen-oxidem aminosilikagelu stačila koncentrace 1,0 mg/ml. (16)

Liu *et al.* zkoušeli dva způsoby, jak kovalentně navázat grafen-oxid k silikagelu. Zjistili, že organická syntéza byla účinnější než vodná. Tyto materiály byly testovány při extrakci různých analytů od malých molekul látek znečišťujících životní prostředí po velké biomolekuly. Výsledky byly srovnatelné nebo i lepší v porovnání s komerčně dostupnými materiály. (8)

Luo *et al.* testovali silikagel obalený redukovaným grafen-oxidem. Jako SPE sorbent vykazuje vysokou výtěžnost až 95,1% pro stanovení chlorofenolů. Předpokládá se, že je to díky delokalizovanému π -elektronovému systému, díky kterému je vedle hydrofobních interakcí lépe zadržován chlorofenol s aromatickým kruhem a tím je dosaženo vyšší extrakční účinnosti. U modifikovaného silikagelu (C18) jsou přítomny jen hydrofobní interakce, což má za následek horší výtěžnost u polárního chlorofenolu, aminosilikagel měl nedostatečnou adsorpční kapacitu.(16)

Problémy s grafenem v klasickém SPE mohou být překonány nejen kovalentním navázáním vrstev grafenu k substrátu, ale také vyvinutím nekonvenčních metod. Zhang *et al.* při stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků pomocí mikro-SPE použili sulfonované grafenové vrstvy (1 mg) uzavřené v obalu z polypropylenové membrány (10 mm x 8 mm). Ve zmiňovaném postupu ponořili obal mikro-SPE do vodného vzorku a třepali. Po extrakci byl obal s adsorbovanými analyty přenesen do mikrovialky obsahující desorpční rozpouštědlo a ultrazvukován. Konečný extrakt byl přímo analyzován pomocí analytického systému GS-MS. Takový postup snižuje ztrátu grafenu během extrakce. Kromě toho zavedení skupiny p-fenyl-SO₃H do grafenu zvýšilo jeho rozpustnost ve vodě a přítomnost negativního náboje skupiny – SO₃⁻ způsobuje elektrostatické odpuzování, které zabraňuje agregaci. Problémy s aplikací vzorku a elucí může být vyřešeno pomocí disperzní SPE (DSPE) Ve srovnání s klasickou SPE prosazuje DSPE bezprostřední interakce mezi analyty a grafenem přímo ve vzorku a zkracuje jeho dobu přípravy. Grafen je pak pomocí centrifugace izolován z analyzovaného roztoku nebo eluentu.(15)

Ionty kovů přítomné v hydratované formě nebo jako komplexy s jednoduchými ionty nejsou adsorbovány na grafenové vrstvy. K retenci iontů kovů je proto vyžadována tvorba

hydrofobních komplexů. Wang *et al.* navrhli metodu na stanovení olova za použití dithizonu jako chelatačního činidla a redukovaného grafen-oxidu jako pevného sorbentu. Dithizon obsahuje benzenový kruh a tak Pb(II)-dithizon tvoří silné π -interakce s grafenem, jakmile roztok vzorku prochází přes SPE kolonku. V porovnání s uhlíkovými nanotrubičkami lze s redukovaným grafen-oxidem snáze dosáhnout kompletní eluce. Zbylé hydrofilní skupiny po redukcí s hydrazinem zvyšují vodní smáčivost adsorbentu a usnadňují desorpci hydrofobních komplexů. Redukovaný grafen oxid a tvorba hydrofobních komplexů před aplikací vzorku byla také využita pro stanovení iontů chromu, kobaltu a niklu. (15)

V dalším publikovaném článku byla uvedena příprava částic oxidu křemičitého potažených grafen-oxidem pomocí elektrostatických sil, které byly využívány pro selektivní extrakce hemoglobinu z lidské krve. Autoři tohoto článku objevili, že adsorpce proteinů na grafen-oxid byla zvýšena při hodnotách pH blízkých jejich hodnotám pI. Pravděpodobně je to způsobeno díky zvýšené tvorbě vodíkových můstků. Při pH 7 byla dosažena adsorpční účinnost 85 % hemoglobinu bez vlivu ostatních proteinů. (8)

Kombinací s magnetickými materiály lze ulehčit extrakci a prekoncentraci. Běžně je těžké získat zpátky grafen ze suspenze i vysokorychlostní centrifugací, jelikož je to velmi lehký materiál. Dodání magnetických vlastností by mohlo vyřešit tento problém. Luo *et al.* připravili grafen-Fe₃O₄/SiO₂ – magnetický komposit, kterým extrahovali sulfonamidová antibiotika z vodných roztoků. Dvě složky kompozitu umožnily manipulaci s materiálem a adsorpční schopnosti. (8)

Wang *et al.* připravili grafen-Fe₃O₄ komposit pomocí precipitace Fe²⁺ a Fe³⁺ v alkalickém roztoku v přítomnosti grafenu *in situ*. Tento materiál byl úspěšně použit při extrakci karbamátových pesticidů a triazinových herbicidů z vodných roztoků. Adsorbent mohl být znovu použit dvanáctkrát. (8)

V poslední době připravili Liu *et al.* Fe₃O₄/SiO₂/grafenové mikročástice, které měly být použity na analýzu peptidů a proteinů pro MALDI-MS. Materiál měl mnohavrstevnou strukturu. Grafenový obal zachovával vysokou adsorpční kapacitu a dobrou extrakční schopnost, silikagelový obal poskytoval dobrou ochranu pro jádro s Fe₃O₄, takže zvýšil stabilitu materiálu v nevhodných podmínkách a prodloužil tak dobu jeho použitelnosti. (8)

Kromě kapalných vzorků je možné grafen využít pro předběžnou přípravu pevných vzorků. Například grafen byl použit jako sorbent v disperzní SPE (DSPE) pro extrakci polybromovaných difenyl etherů a jejich methoxylovaných analogů z pevných vzorků. DSPE umožňuje současné rozptýlení vzorku, extrakci a vyčištění v jednom kroku. Rozdrcením pevných vzorků s grafenovým práškem způsobuje dostatečné rozptýlení vzorku díky rozsáhlé ploše grafenu a jeho flexibilním nanovrstvám, a tak významně zvyšuje extrakční účinnost.(8)

3 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem rigorózní práce bylo hodnocení extrakční výtěžnosti SPE s využitím nemodifikovaných sorbentů ZirChrom[®]-SAX, ZirChrom[®]-SHAX, ZirChrom[®]-PEZ a 9-aminosilikagelu a následně stejných sorbentů modifikovaných grafenem. Extrakční výtěžnost byla hodnocena pomocí modelové směsi analytů obsahující guajfenezin, ibuprofen, propylparaben, lidokain, 4-isobutylacetofenon. Pro jejich separaci bylo nutné vyvinout vhodné chromatografické podmínky, které by umožnily dosáhnout separace všech analytů a symetrických píků při celkové době analýzy do 15 minut.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Chemikálie a materiál

Guajfenesin (GUA), Sigma-Aldrich, Německo

Ibuprofen (IBU), Sigma-Aldrich, Německo

Lidokain (LID), AstraZeneca, Německo

Propylparaben (PPB), Sigma-Aldrich, Německo

4-isobutylacetofenon (4-IBAF), Lancaster Synthesis, USA

Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, Chemifarm s.r.o., Česká republika

Acetonitril gradient grade HPLC, Merck, Německo

Methanol gradient grade HPLC Merck, Německo

Amoniak 25% GR, Merck, Německo

Kyselina chlorovodíková, Sigma-Aldrich, Německo

Kyselina mravenčí, Sigma-Aldrich, Německo

Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát, Sigma-Aldrich, Německo

Síran zinečnatý, Sigma-Aldrich, Německo

Hydrogenfosforečnan didraselný, Sigma-Aldrich, Německo

Čištěná voda, připravena reverzní osmózou, FaF UK, Hradec Králové, Česká republika

Byly použity chemikálie analytické čistoty s výjimkou methanolu a acetonitrilu.

Biologický materiál

Králičí plazma, ZOO servis, Dvůr Králové, Česká Republika

Králičí moč, LF UK v Hradci Králové, Hradec Králové, Česká Republika

4.2 Přístroje

4.2.1 Chromatografický systém

- Chromatografická sestava LC 20A Prominence, skládající se ze dvou pump, degasseru, autosampleru, termostatového prostoru pro kolonu, komunikačního modulu a detektoru diodového pole, Shimadzu, Německo
- LC Solution Software, verze 1.21 SP1, Shimadzu, Německo
- Předkolona Discovery HS C18; 20 mm x 4,6 mm, částice 3 μm , Sigma-Aldrich, Německo
- Chromatografická kolona Discovery HS C18; 75 mm x 4,6 mm, částice 3 μm , Sigma-Aldrich, Německo

4.2.2 Další přístroje

- Analytické váhy CPA225D-OCE, Sartorius AG, Německo
- Acidimetr CyberScan pH510, Eutech instruments, Singapur
- Centrifuga IEC CL31R Multispeed, Thermo electron corporation, USA
- Vortex mixer, VELP scientifica, Itálie

4.2.3 Pomůcky

- SPE vakuový manifold, Sigma-Aldrich, Německo
- SPE kolonky
- Laboratorní sklo
- Mikropipety, Eppendorf, Německo

4.3 Extrakce na pevné fázi

4.3.1 Sorbenty

Byly testovány následující sorbenty: ZirChrom[®]-SHAX (SHAX, oxid zirkoničitý pokrytý polyethyleniminem), ZirChrom[®]-SAX (SAX, oxid zirkoničitý pokrytý polyethyleniminem – méně zesíťovaný oproti SHAX), ZirChrom[®]-PEZ (PEZ, oxid zirkoničitý pokrytý ethylendiamin-N,N,N',N'-tetramethylenfosforečnou kyselinou), aminosilikagel (AS, Sigma-Aldrich, Německo) bez modifikace a následně s modifikací s oxidovaným grafenem.

Grafen-oxid (GO) byl připraven oxidací práškového grafitu s využitím upravené metody podle Hummerse. (17) Modifikace sorbentu byla s obměnami převzata z článku publikovaného Luo *et al.*(16). Vodní suspenze GO byla smíchaná s jednotlivými sorbenty a následně byla aplikována termální redukce v mikrovlnném reaktoru v rozmezí 15 až 60 min. Modifikovaný sorbent byl promyt vodou a vpraven do SPE kolonky v množství přibližně 0,05 g a uzavřen fritami.

4.3.2 Cyklus operací s SPE kolonkou

Prvním krokem byla aktivace kolonky 1 ml methanolu a následným promytím 1 ml čištěné vody. Následně byl aplikován vzorek o objemu od jednoho do tří mililitrů a došlo k sorpci analyzovaných látek. Poté byly promyty nečistoty čištěnou vodou, vodným roztokem kyseliny o pH 3 nebo vodným roztokem zásady o pH 8,4 nebo 9,4, dále 20 % methanolem nebo 20 % acetonitrilem. Množství čištěné vody se pohybovalo od 1 do 3 mililitrů, u ostatních byl použit 1 ml. K eluci byl používán 1 ml roztoku amoniaku (25%) v acetonitrilu v poměru 5:95 (v/v). Eluát byl dovážen do 2,5 g 50 % acetonitrilem a nastříknut na kolonu.

K regeneraci kolonky byl použit 1 ml 0,25 mol/l HCl a 4 ml čištěné vody.

4.3.3 Příprava vzorků

Pro hodnocení extrakční výtěžnosti jednotlivých sorbentů byly připraveny zásobní roztoky každé zkoušené látky o koncentraci 10 mg/ml rozpuštěním v methanolu.

Vzorky aplikované na SPE kolonku byly připraveny ze zásobních roztoků několika způsoby:

- Vodné vzorky (VzV-1) obsahovaly 10 μ l zásobního roztoku každé analyzované látky a 950 μ l čištěné vody.
- Ve vzorcích obsahujících kyselinu (VzK) byla voda nahrazena zředěnou kyselinou mravenčí (20 μ l HCOOH doplněno vodou do 100 ml, pH 3)
- Ve vzorcích obsahujících zásadu byla voda nahrazena buď za zředěný amoniak (VzZ-1) (20 μ l 25% NH₃ doplněno vodou do 100 ml, pH 9,4), nebo za 0,010 mol/l roztok hydrogenfosforečnanu disodného (VzZ-2) (navážka 0,358 g Na₂HPO₄ byla rozpuštěna ve 100 ml čištěné vody, pH 8,4).
- Vodné vzorky o objemu 2 ml (VzV-2) byly připraveny z 10 μ l zásobního roztoku od každé analyzované látky a 1950 μ l čištěné vody.
- Vodné vzorky o objemu 3 ml (VzV-3) byly připraveny z 10 μ l zásobního roztoku od každé analyzované látky a 2950 μ l čištěné vody.
- Vzorky obsahující 5% acetonitrilu (VzA-1) byly připraveny z 10 μ l zásobního roztoku od každé analyzované látky 50 μ l ACN a 900 μ l čištěné vody.
- Vzorky obsahující 10% acetonitrilu (VzA-2) byly připraveny z 10 μ l zásobního roztoku od každé analyzované látky, 100 μ l ACN a 850 μ l čištěné vody.

Vzorky plazmy byly připraveny několika způsoby:

Zásobní roztok obsahující všechny analyzované látky byl připraven jejich rozpuštěním v methanolu, výsledná koncentrace byla 20 mg/ml.

- Vzorky plazmy s 10% acetonitrilem (VzP-ACN1): Ke 195 μ l prázdné králičí plazmy bylo přidáno 5 μ l zásobního roztoku, plazma byla precipitována 200 μ l acetonitrilu. Vzorky byly důkladně protřepány na vortexu a centrifugovány 10 minut při 10 000 otáčkách za minutu. Po centrifugaci bylo odebráno 250 μ l supernatantu a doplněno čistou vodou do 2 ml.
- Vzorky plazmy s 5% acetonitrilem (VzP-ACN2): K 195 μ l prázdné králičí plazmy bylo přidáno 5 μ l zásobního roztoku, plazma byla precipitována 100 μ l acetonitrilu. Vzorky byly důkladně protřepány na vortexu a centrifugovány 10 minut při 10 000 otáčkách za minutu. Po centrifugaci bylo odebráno 250 μ l supernatantu a doplněno čistou vodou do 2 ml.
- Vzorky plazmy s vodou 1:4 (VzP-V1): K 195 μ l prázdné králičí plazmy bylo přidáno 5 μ l zásobního roztoku a 800 μ l čisté vody.
- Vzorky plazmy s vodou 1:9 (VzP-V2): K 195 μ l prázdné králičí plazmy bylo přidáno 5 μ l zásobního roztoku a 1800 μ l čisté vody.
- Vzorky plazmy s kyselinou mravenčí (VzP-KM): K 195 μ l prázdné králičí plazmy bylo přidáno 5 μ l zásobního roztoku a 800 μ l zředěné kyseliny mravenčí (20 μ l HCOOH doplněno vodou do 100 ml, pH 3).
- Vzorky plazmy s dihydrogenfosforečnanem sodným (VzP-Z): K 195 μ l prázdné králičí plazmy bylo přidáno 5 μ l zásobního roztoku a 800 μ l 0,010 mol/l dihydrogenfosforečnanu sodného (navážka 0,034 g NaH₂PO₄ je rozpuštěna ve 25 ml vody, pH 3, upraveno zředěnou kyselinou fosforečnou RS).

- Vzorke plazmy se síranem zinečnatým (VzP-S): K 195 µl prázdné králíčí plazmy bylo přidáno 5 µl zásobního roztoku, plazma byla precipitována 10 µl 10% síranem zinečnatým. Vzorke byly důkladně protřepány na třepacím zařízení a centrifugovány 10 minut při 10 000 otáčkách za minutu. Po centrifugaci bylo odebráno 150 µl supernatantu a doplněno čistou vodou do 1 ml.
- Vzorke plazmy s kyselinou chloristou (VzP-KCh): K 195 µl prázdné králíčí plazmy bylo přidáno 5 µl zásobního roztoku, plazma byla precipitována 50 µl 0.66 mol/l kyseliny chloristé. Úprava pH na 6,5 byla provedena pomocí 150 µl 0,66 mol/l hydrogenfosforečnanu didraselného a 600 µl čisté vody. Vzorke byly důkladně protřepány na třepacím zařízení a centrifugovány 10 minut při 10 000 otáčkách za minutu. Po centrifugaci bylo odebráno 950 µl supernatantu.
- Vzorke moči s vodou 1:4 (VzM): K 195 µl prázdné králíčí moči bylo přidáno 5 µl zásobního roztoku (20 mg/ml) a 800 µl čisté vody.

4.4 Optimalizace chromatografických podmínek

4.4.1 Stacionární fáze a další chromatografické podmínky

Jako stacionární fáze byla použita kolona Discovery HS C18 a předkolona se stejnou náplní. Termostat v kolonovém prostoru byl nastaven na 25°C a průtok mobilní fáze na 1 ml/min. Vzorek byl nastříkovan v objemu 10 µl a vzorke byly měřeny při vlnových délkách 220 nm a 254 nm.

Při kvantifikaci byla použita metoda vnějšího standardu.

4.4.2 Mobilní fáze

Vodná složka mobilní fáze (A) obsahovala 5 % acetonitrilu v pufru složeného z dihydrogenfosforečnanu sodného a hydrogenfosforečnanu disodného s výsledným pH 6,4.

Fosfátový pufr byl připraven rozpuštěním navážky 1,00 g dihydrogenfosforečnanu sodného a 0,50 g hydrogenfosforečnanu disodného v čišťené vodě, doplněn do celkového objemu 1000 ml a přefiltrován přes 0,45 µm filtr, změřené pH 6,4. K 950 ml filtrátu bylo přidáno 50 ml 100 % acetonitrilu

Jako organická složka mobilní fáze (B) byl použit 100 % acetonitril.

Separace a délka analýzy byla testována při isokratické a gradientové eluci v různých vzájemných poměrech vodné a organické složky od 10 % do 80 % objemového podílu organické fáze.

Nejlepší separace bylo dosaženo gradientem s obsahem 10 % až 80 % složky B za 7 minut, jehož součástí byla minuta a půl trvající isokratická eluce 50% složky B. Program gradientu: 0-1 min (10 % B), 1-2,5 min (10-50 % B), 2,5-4 min (50 % B), 4-5,5 min (50-80 % B), 5,5-7 min (80 % B), 7-10 min (80-10 % B), 10-15 min (10 %B).

4.4.3 Příprava zásobních roztoků a vzorků

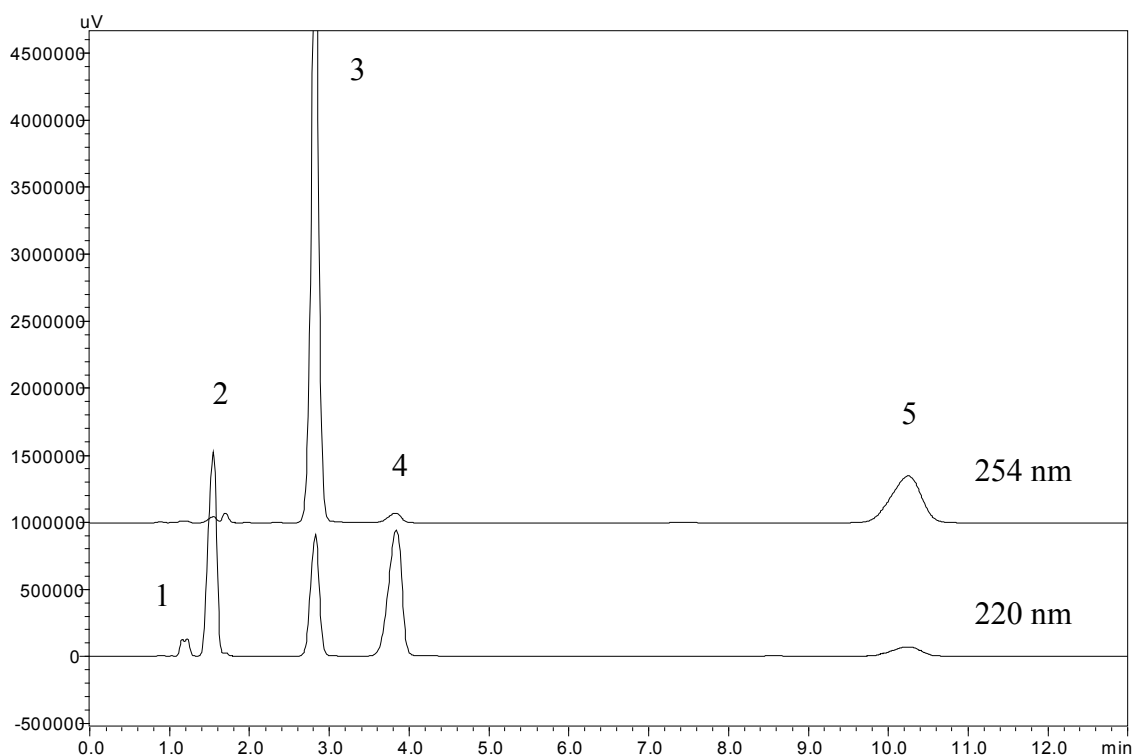
Vzorky používané při optimalizaci chromatografických podmínek byly připraveny následujícím způsobem: K 30 µl zásobního roztoku GUA, IBU, PPB, LID, nebo 4-IBAF (1 mg/ml) bylo přidáno 970 µl vodné složky mobilní fáze.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Úprava chromatografických podmínek pro HPLC analýzu

Cílem optimalizace chromatografických podmínek pro HPLC analýzu GUA, IBU, PPB, LID, 4-IBAF bylo zlepšení separace všech analytů, symetrie píků a dosažení doby analýzy do 15 minut.

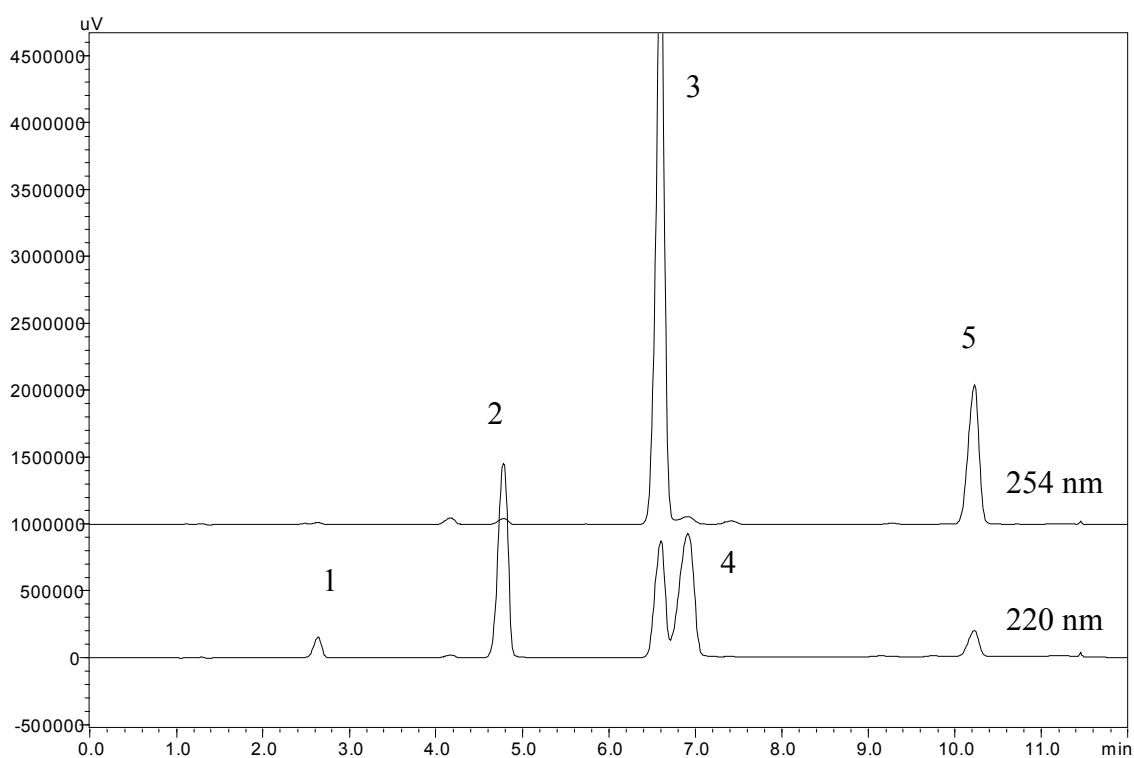
Jako výchozí postup byla zvolena isokratická eluce. Při isokratické eluci byla použita mobilní fáze tvořena vodnou složkou A (fosfátový pufř s 5% ACN) a organickou složkou B (ACN) v poměru 50:50 (v/v). Průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml/min. Separace analytů byla prováděna na koloně Discovery HS C18 s předkolonou stejného typu, detekce při vlnových délkách 220 nm (GUA, IBU, LID) a 254 nm (PPB, 4-IBAF). Většina analytů byla dobře separována, jen GUA a IBU byly eluovány blízko sebe. Hodnoty retenčních časů v minutách byly pro GUA 1,2; IBU 1,5; PPB 2,8; LID 3,8 a 4-IBAF 10,3. (Obr. 4)



Obr. 4 Chromatografický záznam separace modelové směsi, isokratická metoda 50:50 (v/v) A:B.

GUA – 1, $t_R = 1,2$ min; IBU – 2, $t_R = 1,5$ min; PPB – 3, $t_R = 2,8$ min; LID – 4, $t_R = 3,8$ min; 4-IBAF – 5, $t_R = 10,3$ min

Abychom od sebe oddělili GUA a IBU a přiblížili 4-IBAF k ostatním analytům, byla isokratická eluce zaměněna za gradientovou. Lineární gradient mobilní fáze 20 % - 80 % složky B za 10 minut (Gr-1) měl za následek zvýšení rozdílu retenčních časů GUA a IBU díky nižšímu obsahu organické složky, avšak za cenu nedostatečného rozdělení píků PPB a LID, retence 4-IBAF nebyla ovlivněna. Retenční časy v minutách byly pro GUA 2,6; IBU 4,8; PPB 6,6; LID 6,9 a 4-IBAF 10,3 (Obr. 5)

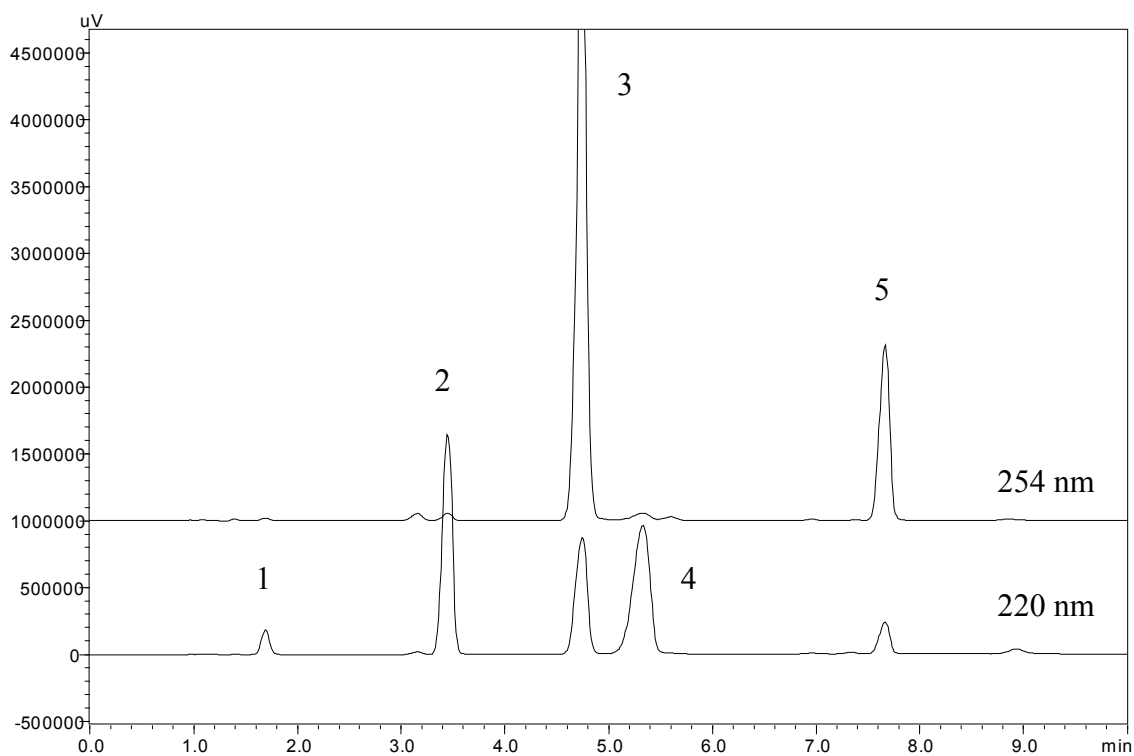


Obr. 5 Chromatografický záznam separace modelové směsi, gradientová metoda 20-80% B. (Gr-1)

GUA – 1, $t_R = 2,6$ min; IBU – 2, $t_R = 4,8$ min; PPB – 3, $t_R = 6,6$ min, LID – 4, $t_R = 6,9$ min; 4-IBAF – 5, $t_R = 10,3$ min

Program gradientu (Gr-1): 0-10 min (20- 80 % B)

Poté byl zkoušen lineární gradient 30 % až 80 % složky B od 1. do 6. minuty (Gr-2), ale k dostatečnému oddělení PPB a LID však nedošlo. (Obr. 6)

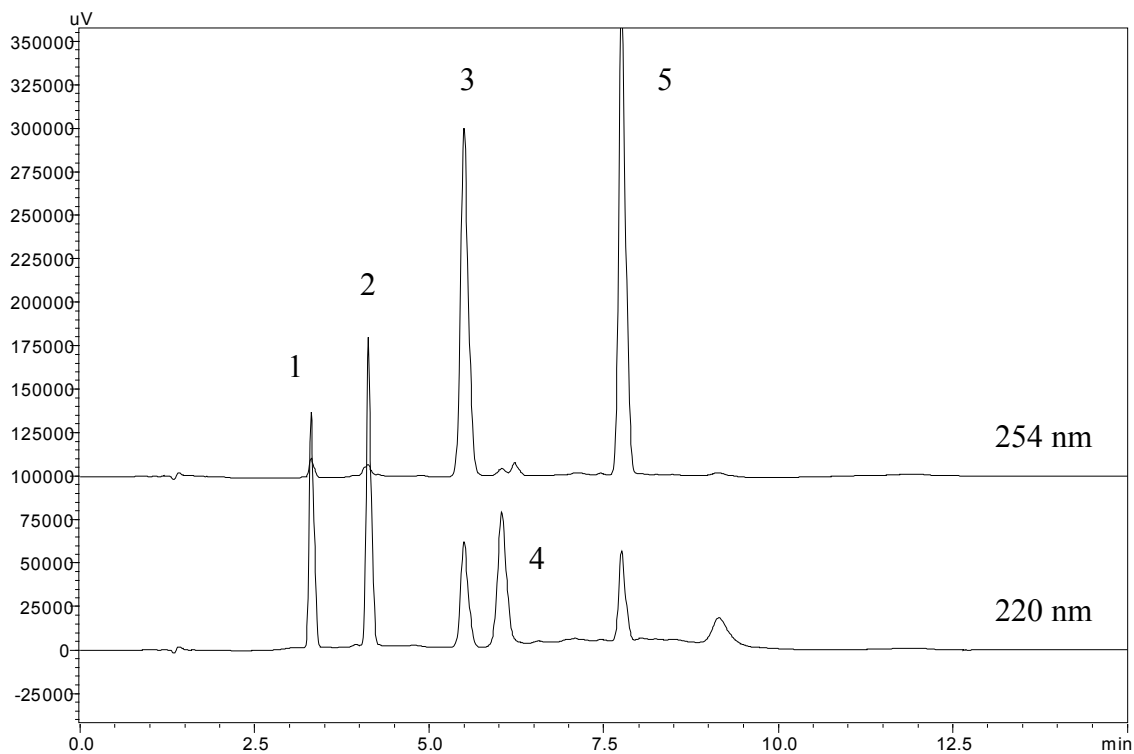


Obr. 6 Chromatografický záznam separace modelové směsi, gradientová metoda 30-80% B. (Gr-2)

GUA – 1, $t_R = 1,7$ min; IBU – 2, $t_R = 3,6$ min; PPB – 3, $t_R = 4,9$ min, LID – 4, $t_R = 5,2$ min; 4-IBAF – 5, $t_R = 6,9$ min

Program gradientu (Gr-2): 0-1 min (30 % B), 1-6 min (30-80 % B)

Nejllepší separace bylo dosaženo gradientem s obsahem 10 % až 80 % složky B za 7 minut, jehož součástí byla minuta a půl trvající isokratická eluce 50% složky B (Gr-3). Celkový čas analýzy s následnou ekvilibrací kolony byl 15 minut. Byl pozorován šum základní linie od třetí minuty. Retenční časy v minutách byly pro GUA 3,3; IBU 4,1; PPB 5,5; LID 6,0 a 4-IBAF 7,8. (Obr. 7)



Obr. 7 Chromatografický záznam separace modelové směsi, gradientová metoda 10-80%B. (Gr-3)

GUA – 1, $t_R = 3,3$ min; IBU – 2, $t_R = 4,1$ min; PPB – 3, $t_R = 5,5$ min, LID – 4, $t_R = 6,0$ min; 4-IBAF – 5, $t_R = 7,9$ min

Program gradientu s ustálením (Gr-3): 0-1 min (10 % B), 1-2,5 min (10-50 % B), 2,5-4 min (50 % B), 4-5,5 min (50-80 % B), 5,5-7 min (80 % B), 7-10 min (80-10 % B), 10-15 min (10 % B)

5.2 Hodnocení vlivu experimentálních podmínek na extrakční výtěžnost

Cílem této práce bylo hodnotit extrakční výtěžnosti u sorbentů SAX, SHAX, PEZ, AS bez grafenu a následně po modifikaci grafenem. V předchozích experimentech bylo prokázáno, že záporně nabitě látky mají vyšší afinitu ke kladně nabitému SAX, SHAX a AS bez grafenu, zatímco kladně nabitě látky lépe zadržuje záporně nabitý PEZ bez grafenu.

Vzorky byly připraveny ve vodě (VzV-1), sorbenty bez grafenu byly promývány vodou a eluovány roztokem amoniaku (25%) v acetonitrilu v poměru 5:95 (v/v), jak je uvedeno v kapitole 4.3.2. Procentuální hodnoty extrakčních výtěžností ze dvou měření a jejich průměr jsou uvedeny v tabulce. (Tab. 1) Z tabulky je patrné, že SAX, SHAX a AS lépe zadržují kyseliny (ibuprofen), zatímco PEZ zásady (lidokain).

Tab. 1 Průměr extrakčních výtěžností u sorbentů bez grafenu, neutrální prostředí

voda	SAX			SHAX			PEZ			AS		
	1	2	ø	1	2	ø	1	2	ø	1	2	ø
GUA	2	2	2	9	12	11	3	6	5	3	4	3
IBU	94	98	96	103	100	101	6	11	8	96	99	97
LID	2	3	2	13	13	13	100	100	100	4	3	3
PPB	16	17	17	17	19	18	7	11	9	8	7	8
4-IBAF	36	30	33	37	42	40	50	38	44	30	36	33

Pozn.: 1 – měření č. 1 [%]; 2 – měření č. 2 [%]; ø – průměr z měření č. 1 a 2 [%]

Na rozdíl od sorbentů bez modifikace sorbenty s grafenem zadržovaly všechny typy analytů. Pro porovnání byly vzorky (VzV-1) a způsob eluce připraveny jako v předchozím případě. Procentuální hodnoty extrakčních výtěžností ze dvou měření a jejich průměr jsou uvedeny v tabulce. (Tab. 2)

Tab. 2 Průměr extrakčních výtěžností u sorbentů s grafenem, neutrální prostředí

voda	SAX-G			SHAX-G			PEZ-G			AS-G		
	1	2	ø	1	2	ø	1	2	ø	1	2	ø
GUA	51	58	55	83	85	84	73	84	79	71	63	67
IBU	55	49	52	93	93	93	86	94	90	100	97	98
LID	72	74	73	98	95	96	94	97	95	69	62	65
PPB	68	77	72	87	92	89	83	91	87	96	95	96
4-IBAF	53	53	53	90	74	82	88	75	82	36	28	32

Pozn.: 1 – měření č. 1 [%]; 2 – měření č. 2 [%]; ø – průměr z měření č. 1 a 2 [%]

Snížením pH vzorku (VzK) i promývacího rozpouštědla přidavkem zředěné kyseliny mravenčí došlo na sorbentech SHAX, PEZ, AS s grafenem ke snížení retence lidokainu, ostatní analyty byly zadržovány podobně jako v neutrálním prostředí. Procentuální hodnoty extrakčních výtěžností ze dvou měření a jejich průměr jsou uvedeny v tabulce. (Tab. 3)

Tab. 3 Průměr extrakčních výtěžností u sorbentů s grafenem, kyselé prostředí

HCOOH	SHAX-G			PEZ-G			AS-G		
	1	2	ø	1	2	ø	1	2	ø
GUA	82	87	84	99	80	89	65	62	63
IBU	70	96	83	94	96	95	103	103	103
LID	56	56	56	94	70	82	52	72	62
PPB	92	89	91	103	87	95	98	98	98
4-IBAF	74	71	73	91	86	88	35	35	35

Pozn.: 1 – měření č. 1 [%]; 2 – měření č. 2 [%]; ø – průměr z měření č. 1 a 2 [%]

Zvýšením pH vzorku i promývacího roztoku zředěným amoniakem (VzZ-1) nebo hydrogenfosforečnanem disodným (0.010 mol/l) (VzZ-2) došlo k poklesu sorpce

ibuprofenu na SHAX a PEZ, u ostatních analytů nebyla pozorována významnější změna oproti výsledkům v neutrálním prostředí. Procentuální hodnoty extrakčních výtěžností ze dvou měření a jejich průměr jsou uvedeny v tabulkách. (Tab. 4)(Tab. 5)

Tab. 4 Průměr extrakčních výtěžností u sorbentů s grafenem, amoniak

NH ₃	SHAX-G			PEZ-G			AS-G		
	1	2	ø	1	2	ø	1	2	ø
GUA	82	76	79	72	74	73	73	64	69
IBU	10	21	15	27	32	29	98	103	100
LID	93	95	94	92	84	88	94	75	85
PPB	81	88	85	80	82	81	95	90	93
4-IBAF	66	89	77	62	64	63	45	43	44

Pozn.: 1 – měření č. 1 [%]; 2 – měření č. 2 [%]; ø – průměr z měření č. 1 a 2 [%]

Tab. 5 Průměr extrakčních výtěžností u sorbentů s grafenem, pufr

Na ₂ HPO ₄	SHAX-G			PEZ-G			AS-G		
	1	2	ø	1	2	ø	1	2	ø
GUA	82	80	81	72	75	74	62	56	59
IBU	14	12	13	12	9	10	66	79	72
LID	98	98	98	98	100	99	71	50	60
PPB	92	92	92	89	98	94	99	99	99
4-IBAF	78	82	80	74	86	80	39	33	36

Pozn.: 1 – měření č. 1 [%]; 2 – měření č. 2 [%]; ø – průměr z měření č. 1 a 2 [%]

Dále byla testována schopnost sorbentu udržet analyty při zvyšujícím se množství promývacího roztoku od jednoho do tří mililitrů. V následující tabulce (Tab. 6) jsou uvedeny procentuální hodnoty extrakčních výtěžností ze dvou měření a jejich průměr na sorbentu SHAX s grafenem v neutrálním prostředí. Nejlepších výsledků bylo dosaženo

s jedním mililitrem, avšak rozdíly u vyšších objemů byly malé. Z toho vyplývá, že množství promývacího roztoku v testovaném rozmezí nemá významný vliv na schopnost tohoto sorbentu udržet analyty.

Tab. 6 Průměr extrakčních výtěžností u SHAX-G, objem promývacího roztoku 1 – 3 ml

voda/ SHAX-G	1 ml			2 ml			3 ml		
	1	2	ø	1	2	ø	1	2	ø
GUA	66	66	66	65	66	66	60	53	56
IBU	78	72	75	66	69	67	77	80	79
LID	93	95	94	91	80	85	79	75	77
PPB	81	92	87	82	87	85	91	87	89
4-IBAF	66	78	72	88	83	85	85	81	83

Pozn.: 1 – měření č. 1 [%]; 2 – měření č. 2 [%]; ø – průměr z měření č. 1 a 2 [%]

Schopnost SHAX s grafenem zachytit analyty i při větším množství zředěného vzorku byla zkoumána s použitím zvyšujícího se objemu nanášeného vzorku ve vodě v rozmezí 1 až 3 ml (VzV-2, VzV-3). V tabulce (Tab. 7) jsou zobrazeny procentuální hodnoty extrakčních výtěžností ze dvou měření a jejich průměr na sorbentu SHAX s grafenem v neutrálním prostředí. Nejnižší výtěžnost byla získána po nanesení vzorku o objemu 3 ml, vzorky s objemem 1 a 2 ml byly srovnatelné. Při vyšším objemu nanášeného vzorku může být analyt s nižší afinitou k sorbentu vymýván.

Tab. 7 Průměr extrakčních výtěžností SHAX-G, objem vzorku 1 – 3 ml

voda/ SHAX-G	1 ml vz			2 ml vz			3 ml vz		
	1	2	ø	1	2	ø	1	2	ø
GUA	79	70	75	72	85	78	72	73	73
IBU	76	88	82	86	91	89	67	62	64
LID	95	84	90	91	96	93	88	80	84
PPB	88	89	89	93	95	94	88	78	83
4-IBAF	76	81	78	87	95	91	76	72	74

Pozn.: 1 – měření č. 1 [%]; 2 – měření č. 2 [%]; ø – průměr z měření č. 1 a 2 [%]

Dále byla testována schopnost SHAX modifikovaného grafenem zadržovat analyt při promývání vzorku (VzV-1) 20 % acetonitrem a 20 % methanolem. Propláchnutí kolonky vhodným rozpouštědlem by mělo vymýt zbytky matrice vzorku z kolonky, zatímco žádané látky musí zůstat sorbovány na pevné fázi. Promytí methanolem může vést k odstranění neutrálních nepolárních sloučenin, které se zadržely na SPE kolonce. Promytí 20% methanolem poskytuje stále dobrou extrakční výtěžnost. (Tab. 8) V případě potřeby by promývací roztok mohl obsahovat organické rozpouštědlo.

Tab. 8 Průměr extrakčních výtěžností u SHAX-G, promývání vzorku ACN nebo MeOH

voda/ SHAX-G	20% ACN			20% MeOH		
	1	2	ø	1	2	ø
GUA	18	18	18	48	49	49
IBU	61	58	60	66	71	69
LID	62	62	62	87	88	87
PPB	71	73	72	86	86	86
4-IBAF	73	71	72	84	82	83

Pozn.: 1 – měření č. 1 [%]; 2 – měření č. 2 [%]; ø – průměr z měření č. 1 a 2 [%]

Dále byl testován vzorek s obsahem 5 a 10 % acetonitrilu (VzA-1, VzA-2). Nanesený vzorek s 5 % acetonitrilu měl nižší extrakční výtěžnost než vzorek s 10 % acetonitrilu. (Tab. 9)

Tab. 9 Průměr extrakčních výtěžností u SHAX-G, vzorek s ACN

voda/ SHAX-G	5% ACN vz			10% ACN vz		
	1	2	ø	1	2	ø
GUA	67	60	63	73	69	71
IBU	83	82	83	77	73	75
LID	70	72	71	94	88	91
PPB	81	75	78	80	74	77
4-IBAF	74	68	71	96	93	94

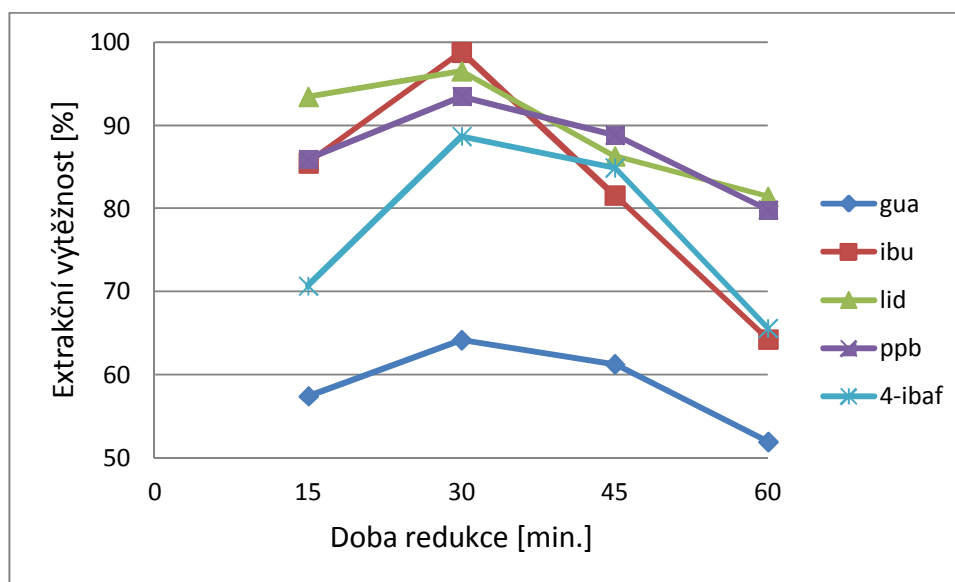
Pozn.: 1 – měření č. 1 [%]; 2 – měření č. 2 [%]; ø – průměr z měření č. 1 a 2 [%]

Bylo zjištěno, že i doba vaření sorbentu (stupeň redukce) má vliv na jeho retenční vlastnosti. Byly testovány sorbenty SHAX s grafenem, které byly vařeny 15, 30, 45 a 60 minut. Procentuální hodnoty extrakčních výtěžností ze dvou měření a jejich průměr jsou uvedeny v tabulce. (Tab. 10) Grafické znázornění závislosti extrakčních výtěžností na době redukce je na obrázku (Obr. 8). Nejlepších výsledků bylo dosaženo na sorbentu vařeném 30 minut. Během 15 minut pravděpodobně neproběhla úplná redukce grafen-oxidu.

Tab. 10 Průměr extrakčních výtěžností u SHAX-G, doba redukce 15 – 60 min.

voda/ SHAX-G	60 min			45 min			30 min			15 min		
	1	2	ø	1	2	ø	1	2	ø	1	2	ø
GUA	49	55	52	58	64	61	61	67	64	57	58	57
IBU	67	61	64	82	81	82	97	100	99	89	82	85
LID	85	78	81	82	90	86	90	103	97	95	92	93
PPB	82	78	80	88	90	89	89	98	93	88	84	86
4-IBAF	70	61	66	82	88	85	81	96	89	73	68	71

Pozn.: 1 – měření č. 1 [%]; 2 – měření č. 2 [%]; ø – průměr z měření č. 1 a 2 [%]



Obr. 8 Grafické znázornění závislosti extrakčních výtěžností na době redukce

Během výše zmíněných pokusů obsahoval nanášený vzorek všech pět analytů. Proto bylo testováno, zda nemá interakce mezi jednotlivými různě nabitými látkami vliv na retenci. V následující tabulce (Tab. 11) jsou zobrazeny procentuální hodnoty extrakčních výtěžností ze dvou měření a jejich průměr na sorbentech SHAX a AS s grafenem v neutrálním prostředí, kde nanášený vzorek obsahoval vždy jen jeden analyt. Při porovnání s předchozí tabulkou (Tab. 2) je patrné, že nedochází k vzájemným interakcím mezi jednotlivými analyty.

Tab. 11 Průměr extrakčních výtěžností u SHAX-G a AS-G, analyty jednotlivě

voda	SHAX-G			AS-G		
	1	2	ø	1	2	ø
GUA	71	77	74	48	47	47
IBU	91	100	95	81	95	88
LID	96	98	97	87	102	94
PPB	100	96	98	80	84	82
4-IBAF	66	71	68	78	86	82

Pozn.: 1 – měření č. 1 [%]; 2 – měření č. 2 [%]; ø – průměr z měření č. 1 a 2 [%]

Pro případné využití těchto sorbentů pro úpravu biologického materiálu byla testována extrakce vzorků z čisté králičí plazmy a moči. Bylo zkoušeno ředění plazmy vodou, roztokem kyseliny a zásady, a dále precipitace plazmy různými precipitačními činidly.

Králičí plazma se všemi analyty byla naředěna 1 : 4 (v/v) čištěnou vodou (VzP-V1) a testována na sorbentech SHAX, SAX a PEZ s grafenem. Procentuální hodnoty extrakčních výtěžností ze dvou měření a jejich průměr jsou uvedeny v tabulce. (Tab. 12) V tabulce byl pozorován pokles výtěžnosti ibuprofenu na všech sorbentech, což mohlo být v důsledku vysoké vazebnosti ibuprofenu na bílkoviny v plazmě.

Tab. 12 Průměr extrakčních výtěžností u sorbentů s grafenem, plazma ředěna vodou

voda	SAX-G			SHAX-G			PEZ-G		
	1	2	ø	1	2	ø	1	2	ø
GUA	46	45	45	55	59	57	40	38	39
IBU	12	12	12	13	12	13	24	19	21
LID	77	75	76	79	84	82	66	60	63
PPB	69	67	68	84	79	82	66	63	64
4-IBAF	77	74	76	95	98	97	84	81	82

Pozn.: 1 – měření č. 1 [%]; 2 – měření č. 2 [%]; ø – průměr z měření č. 1 a 2 [%]

Dále byla testována králičí plazma obsahující všechny analyty, která byla naředěna 1 : 4 (v/v) dihydrogenfosforečnanem sodným (0,010 mol/l) (VzP-Z) nebo zředěnou kyselinou mravenčí (VzP-KM). Výtěžnost ibuprofenu v kyselém prostředí byla pouze 10 %, v pufru přibližně 14 %. (Tab. 13)

Tab. 13 Průměr extrakčních výtěžností SHAX-G, plazma ředěna kyselinou nebo puforem

SHAX-G	HCOOH			NaH ₂ PO ₄		
	1	2	ø	1	2	ø
GUA	36	40	38	59	57	58
IBU	8	11	10	14	13	14
LID	32	34	33	79	76	77
PPB	43	49	46	96	97	96
4-IBAF	65	70	67	100	98	99

Pozn.: 1 – měření č. 1 [%]; 2 – měření č. 2 [%]; ø – průměr z měření č. 1 a 2 [%]

Králičí plazma byla precipitována acetonitrilem (VzP-ACN1, VzP-ACN2), síranem zinečnatým (VzP-S) a kyselinou chloristou (VzP-KCh) (viz kapitola 4.3.3). Plazma byla centrifugována, supernatant byl naředěn a nanesen na SPE kolonku. Průměr výtěžností ze dvou měření v procentech je uveden v tabulce. (Tab. 14) Výtěžnost ibuprofenu byla kolem 32 % v případě 10 % acetonitrilu, 12 % u 5 % acetonitrilu a 15 % po precipitaci kyselinou chloristou. Precipitace pomocí síranu zinečnatého vedla ke snížení výtěžnosti všech analytů pod 25 %.

Tab. 14 Průměr extrakčních výtěžností u SHAX-G, precipitace plazmy

SHAX-G	10% ACN plazma			5% ACN plazma			ZnSO ₄ plazma			HClO ₄ plazma		
	1	2	ø	1	2	ø	1	2	ø	1	2	ø
GUA	43	47	45	31	28	29	24	19	21	46	39	43
IBU	32	32	32	14	9	12	10	3	7	14	16	15
LID	54	62	58	51	43	47	20	15	18	59	48	54
PPB	51	64	58	52	43	48	8	4	6	57	51	54
4-IBAF	52	57	54	44	35	39	9	4	6	44	38	41

Pozn.: 1 – měření č. 1 [%]; 2 – měření č. 2 [%]; ø – průměr z měření č. 1 a 2 [%]

Vzorky s králíčí močí (VzM) byly ředěny stejně jako v případě plazmy čištěnou vodou v poměru 1 : 4 (v/v). Výtěžnost ibuprofenu byla podobná jako u vzorku králíčí plazmy a to přibližně 19 %. V tabulce jsou uvedeny procentuální hodnoty extrakčních výtěžností ze dvou měření a jejich průměr na sorbentu SHAX s grafenem v neutrálním prostředí. (Tab. 15)

Tab. 15 Průměr extrakčních výtěžností u SHAX-G, moč ředěna vodou

SHAX-G	moč		
	1	2	ø
GUA	33	35	34
IBU	18	19	19
LID	67	79	73
PPB	82	90	86
4-IBAF	78	81	79

Pozn.: 1 – měření č. 1 [%]; 2 – měření č. 2 [%]; ø – průměr z měření č. 1 a 2 [%]

6 ZÁVĚR

V rigorózní práci jsou nejprve popsány úpravy chromatografických podmínek pro stanovení modelové směsi analytů (guajfenezin, ibuprofen, lidokain, propylparaben, 4-isobutylacetofenon) určené pro hodnocení extrakční výtěžnosti nových SPE sorbentů. Separace byla provedena na koloně Discovery HS C18 s předkolonou stejného typu. Odezva detektoru byla zaznamenána při vlnových délkách 220 nm a 257 nm. Mobilní fáze byla tvořena vodnou složkou A (fosfátový pufr s 5% ACN) a organickou složkou B (ACN).

Nejlepší separace bylo dosaženo gradientem: 0-1 min (10 % B), 1-2,5 min (10-50 % B), 2,5-4 min (50 % B), 4-5,5 min (50-80 % B), 5,5-7 min (80 % B), 7-10 min (80-10 % B), 10-15 min (10 %B).

Poté byla testována extrakční výtěžnost pomocí SPE u nemodifikovaných sorbentů ZirChrom[®]-SAX, ZirChrom[®]-SHAX, ZirChrom[®]-PEZ a aminosilikagelu a následně stejných sorbentů modifikovaných grafenem. Porovnáním extrakčních výtěžností bylo zjištěno, že v neutrálním prostředí měly k sorbentům SAX, SHAX a AS bez modifikace vyšší afinitu záporně nabitě látky (kyseliny), zatímco kladně nabitě analyty lépe zadržuje záporně nabitý PEZ bez modifikace. Všechny sorbenty byly modifikovány grafenem a došlo ke zvýšení výtěžností u všech modelových látek, v některých případech až na 80 %.

V porovnání s neutrálním prostředím došlo na sorbentu SHAX s grafenem v kyselém prostředí k poklesu extrakční výtěžnosti u lidokainu z 95 % na 56 %, zatímco v zásaditém u ibuprofenu z 96 % na 15 %.

Na stejném sorbentu bylo zjištěno, že množství promývacího rozpouštědla ani objem nanášeného vzorku nemá významný vliv na extrakční výtěžnost. Promývání 20 % acetonitrilem vedlo k jejímu snížení, zachytávání však bylo dostatečné pro většinu analytů. Vzorek s 10 % acetonitrilu měl vyšší výtěžnost než vzorek s 5 % acetonitrilu.

Bylo zjištěno, že i doba redukce použitá při přípravě sorbentu má vliv na extrakční výtěžnost. Nejlepších výsledků bylo dosaženo na modifikovaném sorbentu SHAX s grafenem, který byl tepelně redukován 30 minut.

Při extrakci analytů z čisté králičí plazmy ředěné vodou nebo zředěným roztokem kyseliny mravenčí došlo k poklesu výtěžnosti u ibuprofenu, s nejvyšší pravděpodobností v důsledku vysoké vazebnosti léčiva na plazmatické bílkoviny. Zároveň byla testována precipitace plazmy acetonitrilem (finální koncentrace acetonitrilu 5 a 10 %), kyselinou chloristou a síranem zinečnatým s následným naředěním vzorku. Nejlepších výsledků bylo dosaženo po precipitaci s obsahem 10 % acetonitrilu, kde byla průměrná extrakční výtěžnost ibuprofenu 32 %.

Extrakční výtěžnost ibuprofenu ve vzorku králičí moči ředěné vodou byla podobná jako u vzorku s králičí plazmou (19 %), ostatní analyty se pohybovaly nad 70 %.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Kandidát Mgr. Jana Kresová

Konzultant Doc. PharmDr. Petra Kovaříková, Ph.D.

Název rigorózní práce Studium možností využití alternativních sorbentů pro úpravu vzorku

Úprava vzorku patří mezi základní kroky při chromatografické analýze biologických vzorků. Na jejím provedení záleží celkový úspěch analytického stanovení. Extrakce na pevnou fázi (Solid Phase Extraction – SPE) je v současnosti dominantní technikou na poli úpravy vzorků biologických materiálů.

Grafen patří mezi nové formy uhlíkatého materiálu. Díky jeho výjimečným vlastnostem (velký povrch, struktura bohatá na π -elektrony, dobrá tepelná a chemická stabilita) se stal vhodným materiálem (adsorbentem) pro analytickou úpravu vzorků.

Cílem této práce bylo hodnocení extrakčních vlastností u několika sorbentů bez modifikace (ZirChrom[®]-SAX, ZirChrom[®]-SHAX, ZirChrom[®]-PEZ a aminosilikagel) a následně s modifikací s oxidovaným grafenem ve spojení s termální redukcí. Extrakční výtěžnost byla hodnocena pomocí modelové směsi obsahující analyt hydrofilní, lipofilní, bazické, kyselé a neutrální povahy.

Při hodnocení extrakční výtěžnosti byla zaměřena pozornost na vliv pH, objemu nanášeného vzorku i promývacího roztoku, včetně přídavku organického rozpouštědla a stupeň redukce grafenu.

Bylo zjištěno, že všechny sorbenty modifikované s grafenem dosahovaly vyšších extrakčních výtěžností (nad 70 %) u všech analytů než bez modifikace. V porovnání s neutrálním prostředím došlo na sorbentu SHAX s grafenem v kyselém prostředí k poklesu extrakční výtěžnosti u lidokainu, zatímco v zásaditém u ibuprofenu. Bylo zjištěno, že množství promývacího rozpouštědla ani objem nanášeného vzorku nemá významný vliv na extrakční výtěžnost. Přítomnost organické složky v promývacím roztoku nebo vzorku vedla k oslabení zachytávání analytu, extrakční výtěžnost však byla u většiny analytu

dostatečná. V případě hodnocení procesu přípravy sorbentu bylo nejlepších výsledků dosaženo na modifikovaném sorbentu SHAX s grafenem, který byl tepelně redukován 30 minut.

Při extrakci analytů z čisté králičí plazmy byl pozorován výrazný pokles výtěžnosti. Proto byly testovány různé metody úpravy vzorku plazmy před samotnou SPE a nejlepších výsledků bylo dosaženo pomocí precipitace acetonitrilem.

V případě králičí moči bylo hodnoceno pouze naředění vzorku vodou.

ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmaceutical Chemistry and Drug Control

Candidate Mgr. Jana Kresová

Consultant Doc. PharmDr. Petra Kovaříková, Ph.D.

Title of Thesis Study on possibility of utilization of alternative sorbents for sample preparation

Sample preparation belongs to basic operations during biological sample analysis. Overall success of analytical determination depends on its accomplishment. Nowadays, Solid Phase Extraction (SPE) is positively a dominant technique in the field of biological materials sample preparation.

Graphene is one of the new forms of carbonaceous materials. Due to its extraordinary properties (large surface area, structure rich in π -electrons, good thermal and chemical stability) it became a suitable adsorbent in analytic sample preparation.

The aim of this work was to evaluate extraction recoveries of several sorbents: ZirChrom[®]-SHAX (SHAX, polyethyleneimine-coated zirconia), ZirChrom[®]-SAX (SAX, polyethyleneimine-coated zirconia – less cross-linked than SHAX), ZirChrom[®]-PEZ (PEZ, ethylenediamine-N,N,N',N'-tetramethylenphosphoric-acid-coated zirconia), aminosilica (AS) both unmodified and graphene-oxide modified followed by thermal reduction. The extraction efficiency was tested using the model mixture containing a hydrophilic, a lipophilic, an alkaline, an acidic and a neutral analyte.

The recovery was evaluated with respect of the effect of pH, a volume of both sample and washing solution, including organic solvent addition and a degree of graphene reduction.

A higher recovery (over 70%) for all analytes was achieved using the sorbents modified with graphene when compared to those without modification. In comparison to neutral environment, a drop in recovery was observed for lidocaine on SHAX sorbent in acidic conditions, whereas ibuprofen was poorly extracted in alkaline environment. Neither the amount of washing solvent, nor the volume of sample significantly influenced the

recovery. The presence of organic modifier in washing solvent or sample caused the decrease in analyte retention. However, the extraction recovery was sufficient for most of the analytes. Regarding the preparation of the sorbent, the best results were achieved on SHAX sorbent modified with graphene, which was thermally reduced over 30 minutes.

A substantial drop in recovery was observed during the extraction of analytes from pure rabbit plasma. Various methods of plasma sample preparation prior to SPE were tested and the best results were achieved using precipitation with acetonitrile

In case of rabbit urine only dilution of the sample with water was tested.

LITERATURA

1. **Hansen, S.H., Pedersen-Bjergaard, S. a Rasmussen, K.E.** *Introduction to Pharmaceutical Chemical Analysis*. New York : John Wiley & Sons, 2012. ISBN: 978-0-470-66121-5.
2. **Moldoveanu, S. a David, V.** *Modern Sample Preparation for Chromatography*. Amsterdam : Elsevier B.V., 2014. ISBN 978-0-444-54319-6.
3. **Nováková, L. a Douša, M. a kol.** *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Praha : Europrint a.s., 2013. ISBN 978-80-260-4244-0.
4. **Nováková, L., Douša, M. a kol.** *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha : Europrint a.s., 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
5. **Cazes, J.** *Encyclopedia of Chromatography*. New York : Taylor & Francis group, 2005. ISBNB 0-8247-2785-1.
6. Guide to Solid Phase Extraction. *Sigma-Aldrich Co. LLC*. [Online] 1998. [Citace: 10. leden 2014.]
<http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>.
7. **Simpson, N.J.K.** *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications*. New York : Marcel Dekker, Inc., 2010. ISBN: 0-8247-0021-X.
8. **Liu, Q., Shi, J. a Jiang, G.** Application of graphene in analytical sample preparation. *Trends in Analytical Chemistry*. 2012, 37, s. 1-11.
9. **Thurman, E.M. a Mills, M.S.** *Solid-Phase Extraction: Principles and Practice*. New York : John Wiley & Sons, 1998. ISBN 978-0-471-61422-7.
10. HPLC Column product guide 2013-2014. *ZirChrom Separations, Inc.* [Online] 2013. [Citace: 13. leden 2014.]
<http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>.
11. **Pawliszyn, J.** *Sampling and Sample Preparation for Field and Laboratory*. Amsterdam : Elsevier Science B.V., 2002. ISBN: 0-444-50510-5.

12. **Staples, Ch.A.** *The Handbook of Environmental Chemistry*. New York : Springer Science & Business Media, 2003. ISBN: 0-387-55255-3.
13. **Pawliszyn, J.** *Sampling and Sample Preparation for Field and Laboratory*. Amsterdam : Elsevier Science B.V., 2002. ISBN 0-444-50510-5.
14. **Wilson, I.D.** *Handbook of Analytical Separation - Bioanalytical Separations*. Amsterdam : Elsevier Science B.V., 2003. ISBN 0444506586.
15. **Sitko, R., Zawisza, B. a Malicka, E.** Graphene as a new sorbent in analytical chemistry. *Trends in Analytical chemistry*,. 2013, 51, s. 33-43.
16. **Luo, Y.B., a další.** Facile fabrication of reduced graphene oxide-encapsulated silica: A sorbent for solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*. 2013, 1299, s. 10-17.
17. **Chen, J., a další.** *Analitica Chimica Acta*. 2010, 678, s.44-49.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1 ZirChrom [®] -SAX.....	16
Obr. 2 ZirChrom [®] -SHAX.....	16
Obr. 3 ZirChrom [®] -PEZ	17
Obr. 4 Chromatografický záznam separace modelové směsi, isokratická metoda 50:50 (v/v) A:B.	41
Obr. 5 Chromatografický záznam separace modelové směsi, gradientová metoda 20-80% B. (Gr-1).....	42
Obr. 6 Chromatografický záznam separace modelové směsi, gradientová metoda 30-80% B. (Gr-2).....	43
Obr. 7 Chromatografický záznam separace modelové směsi, gradientová metoda 10-80%B. (Gr-3).....	44
Obr. 8 Grafické znázornění závislosti extrakčních výtěžností na době redukce	50

SEZNAM TABULEK

Tab. 1 Průměr extrakčních výtěžností u sorbentů bez grafenu, neutrální prostředí.....	45
Tab. 2 Průměr extrakčních výtěžností u sorbentů s grafenem, neutrální prostředí.....	46
Tab. 3 Průměr extrakčních výtěžností u sorbentů s grafenem, kyselé prostředí.....	46
Tab. 4 Průměr extrakčních výtěžností u sorbentů s grafenem, amoniak.....	47
Tab. 5 Průměr extrakčních výtěžností u sorbentů s grafenem, pufr.....	47
Tab. 6 Průměr extrakčních výtěžností u SHAX-G, objem promývacího roztoku 1 – 3 ml.....	48
Tab. 7 Průměr extrakčních výtěžností SHAX-G, objem vzorku 1 – 3 ml.....	48
Tab. 8 Průměr extrakčních výtěžností u SHAX-G, promývání vzorku ACN nebo MeOH.....	49
Tab. 9 Průměr extrakčních výtěžností u SHAX-G, vzorek s ACN.....	49
Tab. 10 Průměr extrakčních výtěžností u SHAX-G, doba redukce 15 – 60 min.....	50
Tab. 11 Průměr extrakčních výtěžností u SHAX-G a AS-G, analyty jednotlivě	51
Tab. 12 Průměr extrakčních výtěžností u sorbentů s grafenem, plazma ředěna vodou	52
Tab. 13 Průměr extrakčních výtěžností SHAX-G, plazma ředěna kyselinou nebo pufrem.....	52
Tab. 14 Průměr extrakčních výtěžností u SHAX-G, precipitace plazmy.....	53
Tab. 15 Průměr extrakčních výtěžností u SHAX-G, moč ředěna vodou	53