



## **Disertační práce**

# **Tvorba polykaprolaktonových vláknenných struktur technologií meltblown a studium jejich následných aplikací**

*Studijní program:*

P3106 Textilní inženýrství

*Studijní obor:*

Textilní technika a materiálové inženýrství

*Autor práce:*

**Ing. Jakub Erben**

*Školitel práce:*

doc. Ing. Jiří Chvojka, Ph.D.

Katedra netkaných textilií a nanovláknenných  
materiálů

Liberec 2023

## Prohlášení

Prohlašuji, že svou disertační práci jsem vypracoval samostatně jako původní dílo s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé disertační práce a konzultantem.

Jsem si vědom toho, že na mou disertační práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci nezasahuje do mých autorských práv užitím mé disertační práce pro vnitřní potřebu Technické univerzity v Liberci.

Užiji-li disertační práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti Technickou univerzitu v Liberci; v tomto případě má Technická univerzita v Liberci právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Současně čestně prohlašuji, že text elektronické podoby práce vložený do IS/STAG se shoduje s textem tištěné podoby práce.

Beru na vědomí, že má disertační práce bude zveřejněna Technickou univerzitou v Liberci v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů.

Jsem si vědom následků, které podle zákona o vysokých školách mohou vyplývat z porušení tohoto prohlášení.

## ABSTRAKT

Disertační práce je koncipována jako komentovaný soubor vědeckých publikací členěný do tří vzájemně navazujících částí. Představuje světově první zveřejněný výzkum zabývající se zpracováním samotného biodegradabilního polykaprolaktonu technologií meltblown do podoby mikrovláken tvořících základní složku unikátního vláknenného kompozitu a následným studiem jeho využití ve vybraných aplikacích.

První část práce popisuje především výzkum vedoucí ke stanovení optimálních procesních podmínek spolu s jejich vlivem na výsledný vláknenný produkt po stránce strukturální, mechanické i chemické. Výsledky ukazují vhodné viskoelastické vlastnosti polykaprolaktonu spolu s jeho chemickou stabilitou, což umožňuje jeho zpracování pomocí technologie meltblown do podoby kompaktní mikrovláknenné vrstvy o vysokém stupni homogenity. Následně je popsán způsob výroby vysoce funkčního kompozitního materiálu ze směsi mikrovláken a nanovláken, kombinující technologii meltblown a elektrické zvlákňování.

Další část práce shrnuje možnosti využití polykaprolaktonových vláknenných struktur v regenerativní medicíně jako tkáňových nosičů především pro kostní aplikace. Experimenty se zaměřují na testování mikro-nanovláknenného kompozitu v porovnání s rozdílnými vláknennými strukturami. Biologické testy *in vitro* prokazují biokompatibilitu testovaných struktur a jejich schopnost podpořit viabilitu kostních i kmenových buněk. Na základě *in vivo* testů v podobě implantací do kostního defektu králíka je prokazatelné, že testovaný kompozit je netoxický a dle histologických dat inhibuje růst nové kostní tkáně.

Poslední část se zabývá využitím polykaprolaktonových vláknenných struktur v analytické chemii jako sorbentů pro úpravu vzorků metodou extrakce na tuhé fázi v kapalinových chromatografiích. Mikro-nanovláknenné kompozity jsou porovnávány s konvenčně využívanými nanovláknennými materiály i komerčními sorbenty. Sledován je především vliv technologie zpracování a výsledné struktury vláknenného sorbentu na extrakční vlastnosti, stabilitu v mobilní fázi a opakovatelnost použití. Popsána je funkcionalizace vláknenných sorbentů polyfenoly a možnosti jejich kombinace s 3D tiskem. Výsledky ukazují velmi dobrou stabilitu, nižší spotřebu organických rozpouštědel, zvýšenou extrakční kapacitu a selektivitu v porovnání s běžně používanými nanovláknennými materiály i komerčními sorbenty.

**Klíčová slova:** meltblown, polykaprolakton, biodegradabilní polymer, tkáňové inženýrství, analytická chemie

## ABSTRACT

The dissertation is designed as an annotated collection of scientific publications divided into three interrelated parts. It represents the world's first published research dealing with the processing of biodegradable polycaprolactone itself by meltblown technology into microfibrils forming the basic component of a unique fibre composite, and the subsequent study of its use in selected applications.

The first part describes mainly research leading to the determination of optimal process conditions together with their influence on the resulting fibre product in terms of structural, mechanical and chemical aspects. The results show sufficient viscoelastic properties of the polycaprolactone together with its chemical stability, which allows its processing by meltblown technology into a compact microfibrillar layer with a high degree of homogeneity. Subsequently, a method of producing a highly functional composite material from a mixture of microfibrils and nanofibers, combining meltblown technology and electric softening, is described.

The next section summarizes the possibilities of using polycaprolactone fibre structures in regenerative medicine as tissue carriers, especially for bone applications. Experiments focus on testing the micro-nanofibrillar composite against different fibre structures. *In vitro* tests demonstrate the biocompatibility of the tested structures and their ability to support bone and stem cell viability. Based on *in vivo* tests in the form of implantation into a rabbit bone defect, the tested composite is shown to be non-toxic and inhibits the growth of new bone tissue according to histological data.

The last part deals with the use of polycaprolactone fiber structures in analytical chemistry as sorbents for sample treatment by solid-phase extraction in liquid chromatography. Micro-nanofibrillar composites are compared with conventionally used nanofibrillar materials and commercial sorbents. In particular, the influence of processing technology and the resulting fiber sorbent structure on the extraction properties, stability in the mobile phase, and repeatability of use is investigated. The functionalization of fiber sorbents with polyphenols and the possibilities of their combination with 3D printing are described. The results show very good stability, lower organic solvent consumption, increased extraction capacity and selectivity compared to commonly used nanofibrillar materials and commercial sorbents.

**Keywords:** meltblown, polycaprolactone, biodegradable polymer, tissue engineering, analytical chemistry

## PODĚKOVÁNÍ

V první řadě velmi děkuji svému školiteli doc. Ing. Jiřímu Chvojkovi, Ph.D. za poskytnutí inspirativního prostředí pro vědeckou práci a za jeho bezmeznou důvěru v mou samostatnost. Velmi oceňuji pomoc od svých kolegů z Katedry netkaných textilií a nanovlákných materiálů, kteří nikdy neváhali podpořit mé zvrácené vědecké myšlenky. Poděkování dále patří týmu prof. RNDr. Dalibora Šatínského, CSc. z Katedry analytické chemie Univerzity Karlovy, zejména PharmDr. Martině Hákové, Ph.D. za výbornou spolupráci v oblasti využití polymerních vláken pro analytickou chemii.

Velké poděkování patří mým nejbližším, rodině za nezbytnou genetickou výbavu a podporu ve studiu a především mé přítelkyni Markétě za bezmeznou trpělivost a tu nejlepší péči.

Výzkum prezentovaný v této disertační práci by nemohl vzniknout bez finanční podpory grantových projektů:

- „Nanovlákné materiály pro tkáňové inženýrství“ (č. CZ.1.05 / 3.1.00 / 14.0308, 2013-2015) financovaný Evropským sociálním fondem a státním rozpočtem České republiky;
- „Nanovlákné polymery jako perspektivní sorbenty pro on-line extrakci v chromatografických systémech“ (17-08738S) financovaný Grantovou agenturou České republiky;
- „Nanovlákné polymery s funkcí materiálů s omezeným přístupem pro on-line chromatografické extrakce komplexních matric“ (20-19297S) financovaný Grantovou agenturou Česká republiky.

## OBSAH

<b>1</b>	<b>ÚVOD .....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>CÍL PRÁCE .....</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>10</b>
3.1	Technologie meltblown .....	10
3.1.1	Procesní a technologická charakterizace.....	11
3.1.2	Materiálové a strukturní charakteristiky .....	13
3.1.3	Vliv technologických proměnných .....	15
3.1.4	Možnosti produkce nanovláken .....	16
3.2	Biodegradabilní polymery .....	18
3.2.1	Základní rozdělení a charakterizace.....	19
3.2.2	Alifatické polyestery .....	21
3.2.3	Polykaprolakton .....	23
3.2.4	Biodegradabilní polymery v technologii meltblown .....	25
3.3	Tkáňové inženýrství.....	27
3.3.1	Tkáňové inženýrství kosti .....	28
3.3.2	Požadavky na kostní tkáňové nosiče.....	30
3.3.3	Kostní tkáňové nosiče .....	32
3.4	Analytická chemie .....	35
3.4.1	Kapalinová chromatografie.....	35
3.4.2	Úprava vzorků metodou SPE.....	37
3.4.3	Uspořádání SPE .....	38
3.4.4	Sorbenty pro SPE.....	40
3.4.5	Nanovláknenné sorbenty pro SPE.....	42
3.5	Shrnutí teoretické části a stanovení tezí.....	44
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>47</b>
4.1	Publikované práce.....	47
4.1.1	Seznam publikovaných prací .....	48
4.2	Studium zpracovatelnosti polykaprolaktonu technologií meltblown .....	52
4.2.1	Testování a výběr granulátu .....	52
4.2.2	Studium zpracovatelnosti polykaprolaktonu.....	53
4.2.3	Testování vlivu zpracování na stabilitu polymeru .....	60
4.3	Komentář č. 1.....	62
4.4	Komentář č. 2.....	66
4.5	Komentář č. 3.....	68
4.6	Komentář č. 4.....	70

4.7	Komentář č. 5.....	73
4.8	Komentář č. 6.....	76
4.9	Komentář č. 7.....	79
4.10	Komentář č. 8.....	81
4.11	Komentář č. 9.....	84
<b>5</b>	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>86</b>
<b>6</b>	<b>PERSPEKTIVY BUDOUCÍHO VÝZKUMU .....</b>	<b>88</b>
<b>7</b>	<b>SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>89</b>
<b>8</b>	<b>VÝSTUPY KANDIDÁTA VE VZTAHU K ŘEŠENÉ PROBLEMATICE.....</b>	<b>103</b>
<b>9</b>	<b>PŘÍLOHY .....</b>	<b>107</b>

## SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

ALP	Alkalická fosfatáza
AV	Akademie věd
BMP 2	Kostní morfogenetický protein 2
BP	Biodegradabilní polymery
CDA	Celulóza-diacetát
CNC	Počítačově řízený
DCS	Diferenciální skenovací kalorimetrie
ECM	Mezibuněčná hmota
FDA	Federální úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FDM	Modelování tavnou depozicí
GPC	Gelová permeační chromatografie
HA	Hydroxyapatit
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
BSP	Kostní sialoprotein
RunX	Transkripční faktor 1
LLE	Extrakce z kapaliny do kapaliny
MFR	Index toku taveniny
MIP	Molekulárně vtištěný polymerní sorbent
MOF	Metalicko-organická rámová struktura
MTT	Test metabolické aktivity s využitím diphenyltetrazolium bromidu
OTA	Ochratoxin
PA6	Polyamid 6
PAN	Polyakrylonitril
PBS	Polybutylen sukcinát
PBT	Polybutylentereftalát
PC	Polykarbonát
PCL	Polykaprolakton
PD	Polydisperzita
PDLA	D-isoforma kyseliny polymléčné
PDLLA	Racemická směs D- a L-isoformy kyseliny polymléčné
PE	Polyethylen
PAE	Polyethylen adipát
PEG	Polyethylen glykol
PET	Polyethylentereftalát
PGA	Kyselina polyglykolová
PHA	Polyhydroxyalkanoát
PHB	Polyhydroxybutyrát



PHBV	Kopolymer polyhydroxybutyrátu a polyhydroxyvalerátu
PHV	Polyhydroxyvalerát
PID	Polyimid
PLA	Kyselina polymléčná
PLGA	Kopolymer kyseliny polymléčné a kyseliny polyglykolové
PLLA	L-isoforma kyseliny polymléčné
PP	Polypropylen
PPC	Polypropylen karbonát
PPF	Polypropylen fumarát
PPS	Polyfenylsulfid
PS	Polystyren
PVA	Polyvinylalkohol
PVC	Polyvinylchlorid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAM	Materiály s omezeným přístupem
RP-HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi
RPLC	Kapalinová chromatografie na reverzní fázi
RSD	Relativní směrodatná odchylka
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
SLA	Stereolitografie
SPE	Extrakce na tuhou fázi
TCP	Trikalciumfosfát
TIK	Tkáňové inženýrství kosti
TPS	Termoplastický škrob
TPUR	Termoplastický polyuretan
UHLPC	Ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UK	Univerzita Karlova
UV	Ultrafialová oblast spektra
Vis	Viditelná oblast spektra
95% IS	95% interval spolehlivosti
$M_n$	Číselná střední molární hmotnost
$M_w$	Hmotnostní střední molární hmotnost
$T_g$	Teplota skelného přechodu
$T_m$	Teplota tání
$T_r$	Retenční čas
$\bar{X}$	Aritmetický průměr
$\Delta H_m$	Entalpie tání
$\Delta X$	Krystalinita

# 1 ÚVOD

V posledních letech rapidně vzrůstá zájem o produkty na bázi biologicky rozložitelných polymerů. Tento trend vyvolává zejména snaha světových vlád o politiku udržitelného rozvoje v kombinaci se snížením negativních vlivů na životní prostředí po stránce hromadění plastového odpadu. Biologicky rozložitelné polymery pocházejí v mnoha případech z obnovitelných zdrojů a mají schopnost se po čase rozpadnout na biologicky šetrné látky. Z těchto důvodů roste trh s biodegradabilními materiály o 15–20 % ročně. Biodegradabilní polymery nejsou pro své unikátní vlastnosti žádané pouze v masové produkci běžných výrobků, ale i pro tvorbu specializovaných produktů s vysokou přidanou hodnotou v biotechnologickém a medicínském sektoru. Masivnější rozšíření biodegradabilních plastů prozatím omezuje často nedostatečný nebo chybějící výzkum možností jejich využití pro různé zpracovatelské technologie a jejich koncové aplikace.

Z celosvětové roční produkce plastových výrobků zaujímají 10% podíl netkané textilie. Jedním z jejich hlavních způsobů výroby je technologie meltblown, která je schopna produkovat z termoplastických polymerů vlákna nejen o mikrometrických, ale i nanometrických průměrech. Struktury tvořené takovými vlákny z biodegradabilních polymerů jsou pro své unikátní strukturní a materiálové vlastnosti velmi perspektivní v mnoha oborech. Nicméně výzkumů zabývajících se zpracováním biodegradabilních polymerů touto technologií je v současnosti omezené množství.

Polymerní nanovlákna mají mimo jiné pro svou porozitu a vysoký měrný povrch vhodné předpoklady pro využití ve tkáňovém inženýrství nebo analytické chemii, protože progresa v těchto oblastech spočívá především ve vývoji a implementaci nových forem materiálových struktur. Ty přinášejí ve formě buněčných nosičů účinnější léčebné postupy v regeneraci tkání nebo jako extrakční sorbenty zvyšují rychlost a přesnost chemických analýz. Avšak nanovlákna konvenčně produkovaná metodou elektrického zvlákňování, která byla v těchto oblastech zejména využívána, přináší celou řadu limitací. Jsou jimi kombinace nedostatečné porozity, objemnosti a mechanické odolnosti, přítomnost zbytkových rozpouštědel a nízká produktivita výroby, která neúměrně zvyšuje výrobní náklady, a tím iracionalizuje případnou komercializaci. Současným trendem v obou oblastech je tak snaha o vývoj a využití vlákenných kompozitů potlačujících zmíněné limitace nanovláken při zachování jejich výhod tak, aby výroba byla zároveň produktivní a cenově přijatelná.

Perspektivní možností vývoje takovýchto kompozitních vlákenných materiálů je využití technologie meltblown v kombinaci s biodegradabilním polymerem ve formě polykaprolaktonu.

## 2 CÍL PRÁCE

Tato práce má ambici skrze stanovené cíle přispět k vědnímu posunu v oblastech s vysokým celospolečenským dopadem, jakou jsou regenerativní medicína různých tělních tkání, enviromentální chemická analýza nebo produkce nových materiálů umožňující snížování množství nerozložitelného plastového odpadu. Fundamentálními cíli práce tedy jsou studium tvorby biodegradabilních polykaprolaktonových vláknenných struktur technologií meltblown a následný návrh způsobu výroby kompozitního materiálu využívající tato vlákna jako svou základní složku. Dalším cílem je pak využití tohoto kompozitu jako základu pro vývoj tkáňových nosičů i extrakčních sorbentů a studium jejich využití v regeneraci kostní tkáně, respektive v předúpravě vzorků pro kapalinové chromatografie.

Popsané výzkumné fundamenty práce lze rozdělit do dílčích cílů následovně:

- Vypracování teoretické části shrnující základní principy a dosavadní stav poznání v oblastech definujících tematicky tuto práci.
- Na základě poznatků teoretické části definovat teze stanovujících metodický přístup k tvorbě vláknenného kompozitu a vývoji buněčných nosičů / extrakčních sorbentů.
- Studium zpracovatelnosti polykaprolaktonu technologií meltblown, stanovení podmínek zpracovatelnosti a vlastností výsledných vláknenných struktur.
- Experimentální tvorba vláknenného kompozitu obsahujícího vlákna produkovaná technologií meltblown.
- Studium aplikace vláknenného kompozitu ve vývoji buněčného nosiče pro regeneraci kostní tkáně metodou *in situ*.
- Testování *in vitro* a *in vivo* biokompatibility a schopnosti podpory buněčného růstu.
- Studium aplikace vláknenného kompozitu ve vývoji sorbentu pro úpravu vzorků metodou extrakce na tuhé fázi v kapalinových chromatografiích.
- Testování způsobu použití a stanovení extrakční účinnosti pro jednotlivé skupiny analytů.

### 3 TEORETICKÁ ČÁST

Teoretická část je členěna do čtyř tematických kapitol. Ty popisují výrobní technologii, skupinu materiálů a aplikační oblasti, využití v experimentální části této práce. První kapitola se věnuje technologii meltblown a je zakončena přehledem jejího využití pro výrobu nanovláken. Druhá kapitola představuje biodegradabilní polymery, zejména polykaprolakton, a také shrnuje dosavadní využití této skupiny polymerů pro danou technologii. Poslední dvě kapitoly se věnují představení oblasti tkáňového inženýrství kosti a předúpravy vzorků v analytické chemii. Jsou zde popsány základní principy, představeny specifické požadavky na využívané materiály v podobě tkáňových nosičů, respektive sorbentů, a zvýšená pozornost je věnovaná popisu dosavadního využití vláknenných polymerních materiálů v těchto oblastech.

#### 3.1 Technologie meltblown

Syntetická vlákna mikrometrických a submikrometrických průměrů jsou pro své užité vlastnosti velmi žádaným artiklem napříč průmyslovými i vědními obory. Tyto třídy vláken jsou produkovány za použití různých polymerů a výrobních technik. Mezi ně patří kromě přímé extruze také elektrické a odstředivé zvlákňování. Avšak dominantní metodou pro výrobu těchto vláken je technologie meltblown, která zahrnuje především realizaci styku polymerního roztoku nebo polymerní taveniny s vysokorychlostním proudem vzduchu nebo jiného plynu, který umožňuje rychlé převedení polymerní taveniny do podoby náhodně kladených mikrovláken (Malkan and Wadsworth, 1991). Technologie meltblown nevyžaduje využití rozpouštědel, což se promítá do ekonomičtějšího a ekologičtějšího procesu s relativně vysokou rychlostí výroby.

Meltblown textilie představují 10 % současné hodnoty trhu s netkanými textiliemi při jejich roční produkci v řádu více jak milionu tun. Hlavními aplikačními segmenty jsou osobní hygiena, energetika, akustické či tepelné izolace a především filtrace. Očekává se, že v dalších pěti letech poroste trh s meltblown textiliemi průměrným tempem 15,3 % za rok (Kalil, 2022).

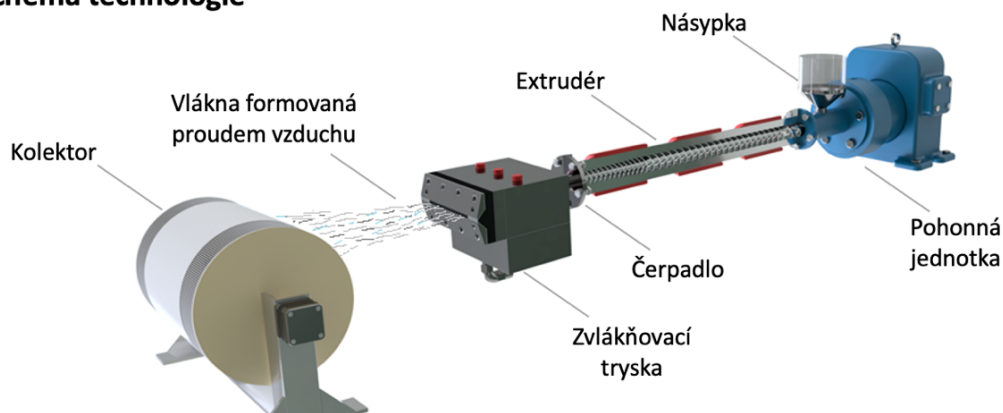
Technologii meltblown vyvinuli v první polovině 50. let Wentz a kol. ve spolupráci s United States Naval Research Laboratory pro výrobu mikrovláknenných atmosférických filtrů zachytávajících radioaktivní částice (McCulloch, 1999). Současnou koncepci technologie představila 60. letech společnost EXXON. Od té doby byla tato technologie a související produkty velmi úspěšně komercializovány. Doposud bylo uděleno v souvislosti s technologií meltblown více než 330 patentů (Zhao, 2002).

### 3.1.1 Procesní a technologická charakterizace

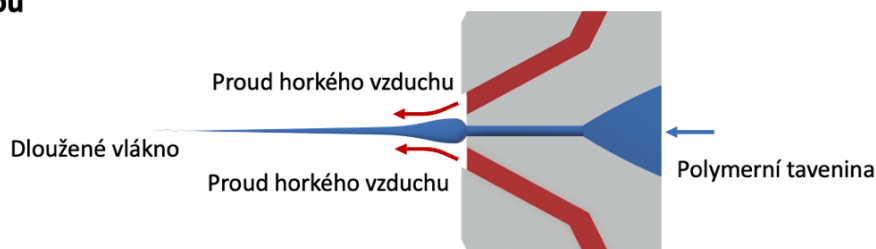
Technologie meltblown zahrnuje jednostupňový proces, při kterém je polymerní materiál konvertován na formy netkané textilie. Termoplastický polymer je nejčastěji ve formě taveniny vytlačován extrudérem přes lineární zvlákňovací trysku, obsahující obvykle několik set malých otvorů kruhového průřezu. Konvergentní proudy horkého vzduchu (vystupující z horní a dolní části čela zvlákňovací trysky) rapidně zeslabí a zformují vytlačovaný proud polymerní taveniny na jemná vlákna, typicky o průměru 1–7  $\mu\text{m}$ . Takto formovaná vlákna jsou následně proudem chladnoucího vzduchu ukládána na dopravníkový kolektor, čímž je formován pás netkané textilie z náhodně orientovaných vláken, která nejsou dále dodatečně pojena (Malkan and Wadsworth, 1991). Jedná se o energeticky náročný termický proces skládající se z pěti základních částí (obr. 3.1) – extrudéru, dávkovacího čerpadla, zvlákňovací trysky, formovací zóny a záchytného kolektoru následovaného navijecím zařízením (Nayak, 2012).

Ve vrstvě vytvořené technologií meltblown jsou vlákna držena pohromadě pouze kombinací jejich vzájemného zapletení a materiálové koheze, protože vlákna jsou tvářena do svých průměrů a ukládána na kolektor v částečně roztaveném stavu. Proto textilie vytvořené technologií meltblown vykazují nízké až střední pevnosti (Nayak, 2012).

#### Schéma technologie

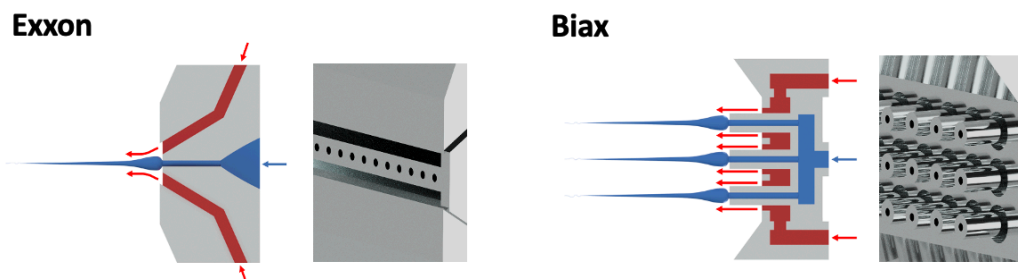


#### Řez tryskou



Obrázek 3.1: Základní schéma technologie meltblown spolu s detailním řezem zvlákňovací tryskou znázorňující proces formování vlákna

Polymer ve formě granulí, pelet nebo prášku je gravitačně dodáván do extrudéru, rozděleného do tří zón reflektujících svou rozdílnou geometrií teplotní gradient ohřevu polymerní taveniny doprovázený změnou reologie. Zóny lze rozdělit na plnicí, homogenizační a vytlačovací. Tavenina je dále protlačována z extrudéru k zubovému čerpadlu, které konzistentně dávkuje její přesné množství přes soustavu ocelových sít k zvlákňovací trysce. Tryska je samostatně vyhřívaná ocelová zápustková sestava, zahrnující rozvodné systémy polymerní taveniny i horkého vzduchu a takzvaný nos, který obsahuje zvlákňovací otvory o průměru 0,1–0,8 mm (typicky 0,4 mm). Rozvodný systém rybinového, trapézového nebo T-typu zajišťuje homogenní distribuci polymerní taveniny směrem ke zvlákňovacím otvorům na čele nosu (Lin *et al.*, 2013). Otvory o typickém poměru jejich délky a průměru v rozmezí 10–100 mohou být uloženy v jedné nebo několika řadách o hustotě 10–35 otvorů/cm. Polymerní tavenina vytlačovaná těmito otvory je strhávána konvergentními proudy vzduchu o teplotě totožné s teplotou taveniny a rychlosti v rozmezí 150–300 m/s. Vysoký hmotnostní poměr vzduchu a polymerní taveniny (~ 100) zajišťuje dostatečné formativní síly umožňující vznik mikrovláken, která jsou dále unášena chladnoucím proudem vzduchu a nahodile ukládána na kolektor do podoby netkané textilie, která je kontinuální rychlostí odtahována. K nejvyšší míře zeslabení vlákna dochází 10–20 mm od trysky, a ke konečnému zachycení na kolektoru ve vzdálenosti 200–500 mm od trysky (Bresee and Ko, 2003; Dutton, 2008).



Obrázek 3.2: Schéma detailu zvlákňovacích trysek typu EXXON a BIAX

Nejdůležitější částí celého systému je sestava zvlákňovací trysky, která zajišťuje kvalitu finálního produktu. Přes různé lamelové, vířivé nebo modulární typy zvlákňovacích trysek, které byly během let představeny, jsou dnes ustáleny dvě základní koncepce (obr. 3.2). Rozšířenějším typem je slotová konstrukce od firmy EXXON v podobě typického ostrého nosu s jednou řadou otvorů s přívody primárního vzduchu v horní a dolní části čela. Druhou, méně rozšířenou, je prstencová konstrukce od firmy BIAX, disponující plochýmnosem se zvlákňovacími otvory v podobě kapilár uložených v několika řadách, které homogenně obtéká primární vzduch (Hassan, Khan and Pourdeyhimi, 2016). Tento typ je ve srovnání s tryskou od firmy EXXON méně energeticky náročný a produktivnější, avšak za cenu širší distribuce průměrů vláken (Hao and Zeng, 2019).

### 3.1.2 Materiálové a strukturní charakteristiky

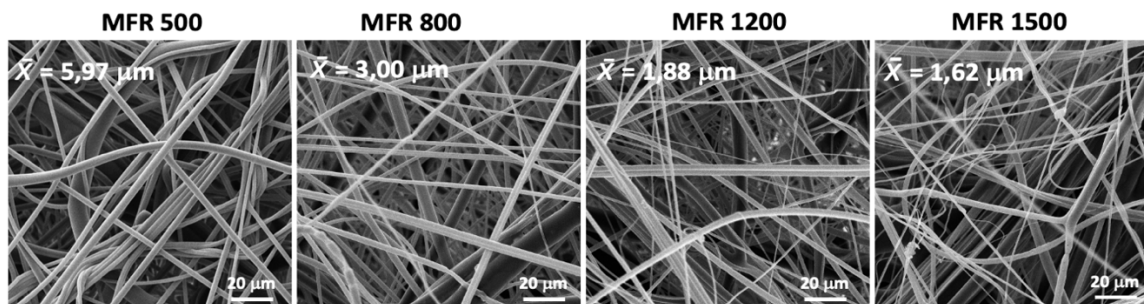
Vlákná vykazují také termické větvení, které nastává při vyšší rychlosti proudu taveniny oproti rychlosti vzduchu a při kolizi štěpících se vláken s dalšími takovými vlákny (Bhat and Malkan, 2007). Ve vrstvě vytvořené technologií meltblown jsou vlákna držena pohromadě pouze kombinací jejich vzájemného zapletení a materiálové koheze, protože vlákna jsou tvářena do svých průměrů a ukládána na kolektor v částečně roztaveném stavu. Před ani po uložení vláken na kolektor neexistuje žádný další způsob jejich pojení, proto vrstvy vytvořené technologií meltblown vykazují nízké až střední pevnosti (Malkan and Wadsworth, 1991). Obecně jsou tyto textilie typické svou měkkostí, objemností, strukturální homogenitou a dobrou nasákavostí. Výsledná vláknenná struktura poskytuje póry v mikroměřítku, což má za následek vysokou poréznost, vysoký měrný povrch na jednotku hmotnosti, vynikající bariérové vlastnosti, vysoký faktor krytí a dobré izolační účinky.

Vlastnosti meltblownových textilií mohou být ovlivněny v závislosti na požadavcích konečného uživatele výběrem vhodného polymeru, nastavením procesních proměnných a zařazením pojicích a dalších dokončovacích procesů. Hlavními charakteristickými vlastnostmi těchto struktur jsou (Bhat and Malkan, 2007):

- náhodná orientace vláken,
- průměr vláken kolísající po jejich délce,
- vlákna spojitě délky s výjimkou oblastí shotů,
- vlákna s hladkou topografií povrchu a typicky kruhovým průřezem,
- nízká až střední pevnost vrstvy,
- průměr vláken v rozsahu 0,5–30  $\mu\text{m}$ , typicky 2–7  $\mu\text{m}$ ; plošná hmotnost se pohybuje v rozmezí 10–2000  $\text{g}/\text{m}^2$ , typicky 20–350  $\text{g}/\text{m}^2$ .

Pro meltblown lze použít celou řadu polymerů, jsou na ně ale kladeny z podstaty technologie poměrně specifické nároky. Jedná se zpravidla o termoplastické polymery nižších molekulových hmotností s úzkou distribuční křivkou a z toho vycházející nízkou polydisperzitou. Dalšími nezbytnými vlastnostmi jsou nízká viskozita polymerní taveniny s indexem toku (MFR) v rozmezí 100–2000  $\text{g}/10 \text{ min}$  (Dutton, 2008). Typicky jsou zvláknovány polyolefiny – především izotaktický polypropylen (PP) s velmi dobrými užitnými a zpracovatelskými vlastnostmi, který představuje až 75 % celkové spotřeby. Naproti tomu polyethylen (PE) je poměrně obtížně zpracovatelný. Dále se využívají polyestery, polyethylentereftalát (PET) a především polybutylentereftalát (PBT), které musí být před samotným procesem vysoušeny. Polyamid 6 (PA6) je velmi dobře zpracovatelný, tvoří velmi málo defektů, ovšem je náchylný k termooxidativní degradaci (Dutton, 2008).

Dalšími minoritně zpracovávanými polymery jsou termoplastický polyuretan (TPUR), polykarbonát (PC), polyvinylalkohol (PVA) nebo polyfenylsulfid (PPS). (Bhatand Malkan, 2007). Existují pilotní studie popisující zpracování netermoplastických polymerů, například viskózního roztoku celulózy v organickém rozpouštědle (Tang and Mukhopadhyay, 2006). Z nároků na používané polymery vyplývá, že je možné využívat i termoplastické biodegradabilní polymery, čemuž se bude věnovat samostatně kapitola 3.2.4.



Obrázek 3.3: SEM snímky PP vlákněných vrstev demonstrující vliv rozdílných hodnot MFR

Vedle daných polymerů lze ovšem využít některé druhy přísad v podobě různých částic, molekul a pigmentů, které propůjčují výsledným textiliím jiné užitné nebo vzhledové vlastnosti. Běžně jsou využívány k barvení pigmenty v podobě koncentrovaných „masterbatchů“, které nemají signifikantní vliv na reologii taveniny, ale projevují se zvýšením rigidity vlákněných vrstev. Například za účelem zvýšení záchytných charakteristik vlákněných vrstev lze přidávat do taveniny jemné částice perlitu, titaničitanu barnatého nebo grafenu, které ovšem působí jako nukleační činidla a snižují MFR taveniny (Xiao *et al.*, 2015; Cabello-Alvarado *et al.*, 2022).

Stupeň polydisperzity a viskozita reprezentované hodnotou MFR mají přímý vliv na strukturu a mechanické vlastnosti vlákněné vrstvy. Obecně lze říci, že pevnostní charakteristiky vrstev dosahují maxima při MFR 300 a s vyšší hodnotou klesají ve prospěch elasticity. Naproti tomu se zvyšujícím se MFR klesá aritmetický průměr vláken při mírném zvýšení rozpětí těchto hodnot. Nezanedbatelným aspektem je nižší energetická náročnost zpracování polymerů s vyšším MFR, a tím i konečné výrobní náklady (Jones, 1987).

Výsledná pevnost vrstev je kombinací pevností jednotlivých vláken, jejich zapletení a pevností vzájemných tepelných spojů. Zvýšení zapletení jednotlivých vláken v kombinaci s vyšším průměrem vláken má vliv na snížení elongace. Změny teploty taveniny mají prokazatelný vliv na pevnostní charakteristiky vrstev. Při snížení teploty taveniny vzrůstá houževnatost a maximální síla do přetruhu konečné struktury. Naproti tomu zvyšování průtokové rychlosti maximální sílu do přetruhu snižuje (Bhat and Malkan, 2007).



### 3.1.3 Vliv technologických proměnných

Obecně existují dva rozdílné přístupy k popisu jednotlivých aspektů ovlivňujících formování vláken a vlastnosti výsledné vlákenné vrstvy. Jeden přístup považuje za zásadní pro formování vláken vliv primárního vzduchu těsně po výstupu z otvorů na čele trysky a marginalizuje vliv geometrie těchto otvorů (Wente, 1954). Naopak upřednostňuje viskozitně-teplotní charakteristiky a povrchové napětí polymerní taveniny. Druhý přístup naopak pokládá za zásadní vliv geometrie trysky a formativních sil po celou dobu jejich letu (Milligan and Haynes, 1994).

Studie se shodují, že zvětšením vzdálenosti kolektoru od zvlákňovací trysky se zmenšuje střední hodnota průměrů vláken. Zvětšení vzdálenosti poskytuje nejen delší dráhu pro formování vláken, ale také umožňuje štěpení jejich určitého podílu na jemnější vlákna, podporuje jejich zapletení a zvyšuje celkovou porozitu. Naopak se zvýšením vzdálenosti klesá celková pevnost v axiálním směru, zatímco v příčném směru je tento pokles méně významný. Tyto vztahy ovšem platí pouze v případě, pokud je zachována konstantní hodnota tažné síly vzduchu působící na taveninu, kterou je možné regulovat změnou hmotnostního poměru polymeru a vzduchu (Uyttendaele and Shambaugh, 1990; Chen and Huang, 2005).

Změna tohoto poměru má zásadní vliv na mechano-strukturální vlastnosti. Zvýšením hmotnostního průtoku vzduchu k polymeru dochází ke snížení průměrů vláken a elasticity, což je dáno zvýšením tažné síly primárního vzduchu působící na vlákna. Naopak, při zvýšení tohoto poměru se mez pevnosti a počáteční modul se zvyšují. Tento poměr je v přímé závislosti k hodnotám rychlosti průtoku polymeru zvlákňovacími otvory a tlaku vzduchu. Jak již bylo zmíněno, přílišné zvýšení tohoto poměru vede k rozpadu vláken, nízkému ojednocení, jejich odtrhu, tvorbě objemných globulárních defektů v podobě shotů a k celkovému snížení kvality výsledné vrstvy. Velmi důležitým faktorem je teplota primárního vzduchu, jejíž zvýšení vede obecně ke snížení průměrů vláken i elongace, ale také způsobuje nárůst hodnot modulu (Zhang *et al.*, 2002). Některé studie však vliv teploty vzduchu na snížení průměru vláken rozporují (Chen, Wang and Huang, 2005). Výslednou jemnost vláken a pevnost vlákenných vrstev ovlivňuje také typ a úhel přidavného proudění vzduchu ve vztahu ke směru toku primárního vzduchu. Oscilační nebo příčné proudění vytváří menší průměry vláken a zvyšuje jejich zapletení a celkovou pevnost vrstev. To je důsledkem vyvolání oscilace formovaných vláken, které tak podléhají vyšší míře smykového napětí. Naopak menší úhel vzhledem k ose proudění poskytuje vyšší míru ojednocení vláken a snižuje výskyt defektů (Nayak, 2012).

Samotný náběžný úhel primárního vzduchu daný geometrií nosu zvlákňovací trysky vykazuje částečně odlišné závislosti. Nos zvlákňovací trysky s úhlem  $60^\circ$  vede ke snížení průměru vláken oproti použití  $90^\circ$  úhlu. Nicméně vlastnosti vytvořené vrstvy, jako celková porozita, filtrační účinnost a pevnost, byly vyšší při použití nosu s úhlem  $90^\circ$  (Bhat and Malkan, 2007). Jak již bylo řečeno, napříč studii nepanuje shoda vlivu průměru zvlákňovacích otvorů na hodnoty průměrů vláken. Ovšem je prokázán vliv změny poměru jejich délky a průměru (L/D). Při zvýšení tohoto poměru dochází ke snížení střední hodnoty průměrů vláken. Stejný vliv má zvýšení hustoty zvlákňovacích otvorů (Hassan *et al.*, 2013).

Popsán je také účinek rozprašování vodního aerosolu bezprostředně za ústím zvlákňovací trysky. Tento proces zlepšuje mechanické vlastnosti vrstev, především tažnost, pevnost v přetrhu a minimalizuje výskyt shotů (Bresee and Qureshi, 2005).

### 3.1.4 Možnosti produkce nanovláken

Po dlouhou dobu výzkumy ukazovaly, že není možné kontinuálně produkovat technologií meltblown vlákna s průměry pod  $1\ \mu\text{m}$ . Avšak s postupem vývoje nových materiálů a technologií je možné tuto hranici prolomit a produkovat stabilně vlákna s průměry ve stovkách nanometrů. Tento průlom dovolují nové polymerní materiály s vysokým MFR v rozmezí 1200–2000 i nižším stupněm polydisperzity a také nové technologie umožňující výrobu zvlákňovacích trysek s otvory menších průměrů, větší délky a hustoty.

Jedním ze základních faktorů, kterými lze radikálně snižovat průměry vláken pod  $1\ \mu\text{m}$ , je zvýšení hmotnostního poměru vzduch/polymer. Obecně je ve výzkumech spíše preferováno snižování průtokové rychlosti ve spojení s vhodnou reologií polymeru (nejčastěji PP) a geometrií zvlákňovacích otvorů nežli zvyšování objemu primárního vzduchu. Hasan a kol. ve své studii demonstrují tvorbu nanovláken využitím PP s MFR 1800 protlačovaného zvlákňovacími otvory o průměrech v hlavě klasického slotového designu při velmi nízkých průtokových rychlostech taveniny v rozmezí 0,0022 a 0,214 g/otvor/min. Z výsledků vyplývá, že snížení průtokové rychlosti při konstantním průtoku vzduchu má přímý vliv na snížení průměrů vláken až na střední hodnotu  $1,5\ \mu\text{m}$ , respektive  $0,3\ \mu\text{m}$ . Střední hodnoty průměrů vláken  $0,3\ \mu\text{m}$  lze dosáhnout při nejnižší míře průtoku taveniny v kombinaci se zvlákňovacími otvory o průměru  $0,127\ \text{mm}$ , poměru L/D 200 a hustotě 39 otvorů na jeden centimetr šířky zvlákňovací trysky (Hassan *et al.*, 2013). Podobný technologický princip je verifikován pro tvorbu nanovláken i při použití PP s extrémními MFR dosahujícími hodnot 2000 (Kamin *et al.*, 2019). Velmi malé rychlosti průtoků taveniny je možné využít nejen v případě PP, ale i PBT a PS, kdy průtoková rychlost polymeru  $0,035\ \text{g/otvor/min}$  umožňuje produkci vláken se střední hodnotou jejich průměrů pod  $500\ \text{nm}$  (Ellison *et al.*, 2007).

Nanovlákná lze produkovat využitím speciální vrstvené konstrukce hlavy se zvlákňovacími otvory drážkového průřezu. Pomocí otvorů se středním průměrem 0,064 lze produkovat nanovlákná z PP (MFR 1200) o střední hodnotě průměru 400 nm (Ward, 2001). Jiná studie popisuje tvorbu nanovláken s průměry pod 500 nm z PET, PA6 nebo PE při využití stejné konstrukce hlavy s otvory o průměru 0,12 mm s extrémním poměrem L/D v rozsahu 200–1000 (Brang, Wilkie and Haggard, 2008). Tato alternativní konstrukce je však vnímána jako velmi komplikovaná pro přenos do průmyslového měřítká.

Obecně jsou procesy tvorby nanovláken pomocí technologie meltblown založené na principu nízké rychlosti průtoku taveniny popisovány jako poměrně neproduktivní a problematické směrem k průmyslovému využití. Společnost Hills inc. vyvinula meltblown technologii pro produkci nanovláken z homopolymerů (MFR 1500–1800) o průměrech vláken v rozmezí 25–400 nm. Technologie využívá zvlákňovací otvory tvořené vrstvenými lamelami o hustotě více než 35 otvorů na jeden centimetr a vysokými poměry L/D pro poměrně produktivní proces výroby racionalizující jeho průmyslové využití. Vyšší produktivity dosahuje také zařízení využívající prstencové konstrukce zvlákňovací trysky s tupým nosem typu BIAX, která je schopná při použití PP s MFR 1500 a zvlákňovacích kapilár o vnitřním průměru 0,15 mm produkovat směs mikro a nanovláken o průměrech v rozmezí 0,2–6  $\mu\text{m}$  a střední hodnotě 1,5  $\mu\text{m}$  (Hoda *et al.*, 2021).

Existují také alternativní postupy využívající k produkci nanovláken mísení polymerní taveniny s další složkou pracující na separačním nebo porogenním principu. Je popsán způsob přípravy PP nanovláken o průměru 438–755 nm za pomoci injektáže separační směsi na bázi vzduchu a vody do odvzdušňovacího otvoru extrudéru. Další principy využívají pro tvorbu nanovláken metodu takzvaných „ostrovů v moři“ spočívající v extruzi dvou nemísitelných složek a následným vymytím jedné z nich v příslušném organickém rozpouštědle (Soltani and Macosko, 2018). Jiná studie popisuje extruzi bikomponentních vláken typu jádro plášť, z nichž je poté vymyta vnější složka (Bodaghi and Sinangil, 2006).

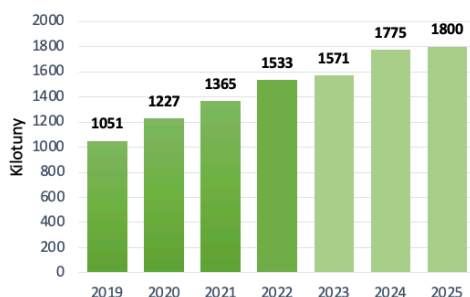
### 3.2 Biodegradabilní polymery

Biodegradabilní nebo také biologicky odbouratelné polymery (BP) představují progresivní skupinu polymerních materiálů, které jsou po určité době rozložitelné v živočišných nebo environmentálních systémech na nízkomolekulární deriváty netoxické pro dané prostředí. V posledním desetiletí zájem o využití těchto materiálů rapidně vzrůstá a je to dáno dvěma základními aspekty. Na jedné straně je to snaha o dosažení udržitelného rozvoje, a to redukcí objemu nerozložitelného plastového odpadu, který je podpořen aktivitou některých světových vlád vydávajících moratoria na zvyšování podílu výrobků z biodegradabilních polymerů. Na straně druhé je to poptávka po nových materiálech pro speciální medicínské a biotechnologické aplikace (Samir *et al.*, 2022).

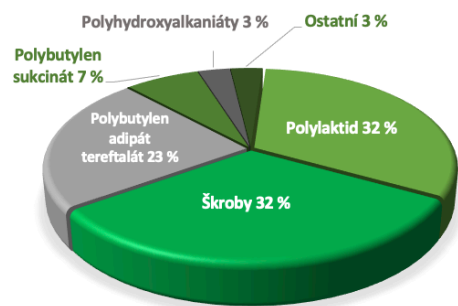
Při minimalizaci nerozložitelného plastového odpadu mluvíme o využití BP především v obalových materiálech (potravinové obaly, tašky) nebo v oblasti jednorázových hygienických (pleny, vlhčené ubrousky) a bariérových výrobků (roušky, jednorázové oděvy). V případě biomedicínských aplikací je vývojovým trendem využití těchto polymerů k výrobě rozložitelné protetiky a vstřebatelných implantátů, tkáňových nosičů nebo krycího materiálu (Alaswad, Mahmoud and Arunachalam, 2022).

Je pozoruhodné, že celosvětová produkce plastů dosáhla v roce 2022 téměř 400 milionů tun při celkové hodnotě trhu přesahující 800 miliard USD a v nadcházejícím desetiletí poroste průměrným tempem 4 % ročně. Z tohoto objemu představovaly v daném roce BP s 1,5 milionem tun méně než 0,5 % (obr 3.4). Predikce však předpokládají, že objem produkce této skupiny polymerů poroste ročním tempem 7–15 % a v roce 2030 bude představovat přibližně 5% podíl celkově vyrobených plastů (Shen *et al.*, 2023).

**Roční produkce**



**Zastoupení**

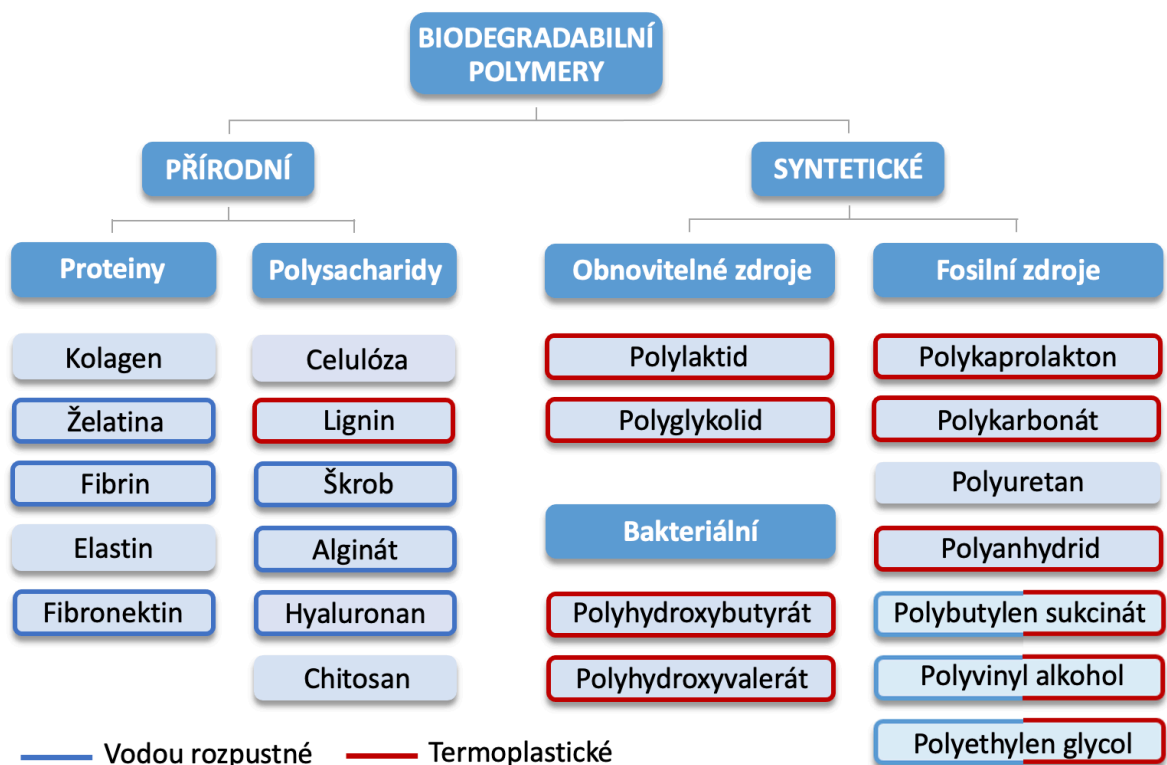


Obrázek 3.4: Roční produkce BP s výhledem do dalších tří let a zastoupení jednotlivých tříd BP v roce 2022

### 3.2.1 Základní rozdělení a charakterizace

Biodegradabilní polymery se dají obecně rozdělit (obr. 3.5) dle procesu výroby na přírodní a syntetické, nebo dle výchozí suroviny pro jejich výrobu na polymery fosilního původu či z obnovitelných zdrojů (Kumbar, Laurencin and Deng, 2014).

Přírodní BP, pocházející z živočišných nebo rostlinných zdrojů, jsou přirozeně se vyskytující polymery. Ty vznikají během životního cyklu všech organismů z monomerů produkovaných metabolickými procesy. Jejich produkce je závislá na enzymaticky katalyzovaných reakcích během procesů doprovázejících životní cyklus všech organismů. Přírodní BP se dělí podle struktury na proteiny a polysacharidy. Mezi BP na bázi proteinů se řadí kolagen, želatina, elastin a přírodní hedvábí. Polysacharidy představují celulóza, škrob, alginát, chitin a kyselina hyaluronová. Přírodní BP vykazují vysokou míru biokompatibility a přirozené degradace. Avšak nevýhodami jsou jejich nízká reprodukovatelnost výroby, omezené možnosti optimalizace jejich parametrů a mnohdy nedostatečné mechanické vlastnosti. Jejich degradace probíhá převážně enzymaticky, takže degradační profil bývá do jisté míry ovlivněn momentální enzymatickou aktivitou (Samir *et al.*, 2022).



Obrázek 3.5: Klasifikace vybraných BP podle způsobu výroby, termoplastického chování a rozpustnosti ve vodném prostředí

Syntetické BP jsou vyráběny konvenčními polymeračními postupy z monomerů vycházejících z ropných derivátů nebo obnovitelných zdrojů. První syntézy BP se objevují během 30. a 40. let 20. století, avšak velkoobjemová syntéza je spojena až s vývojem nových skupin katalyzátorů v 60. a 70. letech. Mezi syntetické BP z obnovitelných zdrojů řadíme kyseliny polyglykolovou a polymléčnou vycházející ze škrobových monomerů nebo polyhydroxyalkanoáty produkované rekombinantními postupy. Z fosilních zdrojů vychází polykaprolakton, polydioxanon, dále některé variace polybutylenů či polykarbonátů, polyuretany a další, uvedené na obrázku 1.2. Syntetické BP lze velmi dobře funkcionalizovat širokou škálou postupů, nebo definovat jejich vlastnosti vycházející přímo ze způsobu jejich syntézy. Z toho vychází také dobrá reprodukovatelnost vlastností mezi výrobními šaržemi a ve srovnání s přírodními BP lepší mechanické vlastnosti. Směrem ke speciálním aplikacím v biomedicinském sektoru lze mluvit o lepší cenové dostupnosti oproti přírodním BP. Jejich biodegradace probíhá převážně hydrolytickými mechanismy, a je tak méně náchylná k výkyvům degračního profilu (Vroman and Tighzert, 2009).

Degradace těchto polymerů je schopnost jejich úplné resorpce v různě dlouhém čase na nízkomolekulární deriváty v podobě vody, oxidu uhličitého, amoniaku atd. K degradaci dochází abioticky – oxidací, fotodegradací, hydrolýzou nebo bioticky za působení mikroorganismů a enzymů (Burkersroda, Schedl and Göpferich, 2002). Rychlost degradace je spojená s různými faktory, jako např. teplota, pH, molekulová hmotnost, míra krystalinity a hydrofilita povrchu. Tyto faktory přímo ovlivňují míru difuze vodné báze, která stanovuje míru erozního děje na rozhraní vodné a polymerní fáze. Eroze je pak typicky klasifikována jako povrchová, objemová nebo kombinace obou. Pouze povrchově degradující BP vykazují delší degrační profil při konzistentnějším úbytku hmotnosti a mechanických vlastností (Determan *et al.*, 2004).

Pro technologii meltblown je perspektivní zejména skupina syntetických BP, která obsahuje ve srovnání s těmi přírodními celou řadu termoplastů. Při syntéze je možné velmi dobře kontrolovat hodnotu i distribuci jejich molekulové hmotnosti, vedoucí k příznivému tokovému chování, které je nezbytné pro danou technologii. V této skupině se jako perspektivní jeví zejména alifatické polyestery, které představují široké portfolio biodegradabilních termoplastů s variabilními užitnými vlastnostmi. Ty jsou vzhledem k relativně snadné syntéze a poměrně nízké ceně také tržně nejdostupnější skupinou BP. V dalším textu tak bude věnována pozornost právě této skupině polymerů (Manavitehrani *et al.*, 2016).

### 3.2.2 Alifatické polyestery

Lineární alifatické polyestery jsou převážně termoplastické hydrofobní polymery. Představují nejrozšířenější formu syntetických BP pro jejich variabilní fyzikální a mechanické vlastnosti. Lze je poměrně snadno zpracovávat různými technologiemi do požadovaných struktur s minimálním rizikem imunogenicity a přenosu infekce. Alifatické polyestery obsahují ve svém řetězci alifatickou esterovou vazbu náchylnou k hydrolytickému štěpení, což zaručuje jejich biodegradaci (Gunatillake, Mayadunne and Adhikari, 2006). I když existuje celá řada těchto polymerů, mezi plně resorbovatelné lze řadit pouze ty s kratším alifatickým řetězcem. Jejich typické zástupce lze uvést a rozřadit podle zdroje původu následovně:

- Z obnovitelných zdrojů na bázi škrobů: kyselina polymléčná (PLA), kyselina polyglykolová (PGA) a jejich kopolymer (PLGA).
- Z fosilních zdrojů v podobě ropy: polykaprolakton (PCL), polypropylen karbonát (PPC), polybutylen sukcinát (PBS) a polypropylen fumarát (PPF).
- Z obnovitelných zdrojů na základě diazotrofních bakterií: polyhydroxybutyrát (PHB), polyhydroxyvalerát (PHV) a jejich kopolymer (PHBV).

Alifatické polyestery lze běžně syntetizovat polykondenzací difunkčních monomerů: hydroxykyselin, dikyselin s dioly, chloridy dikyselin s dioly nebo výměnou esterů reakcí diesterů a diolů. Ale protože je obtížné dosáhnout vysoké molekulové hmotnosti polykondenzačním procesem, jsou preferovány polymerace za otevření kruhu, které umožňují při mírnějších reakčních podmínkách a kratším reakčním čase dosažení vysokých molekulových hmotností (Albertsson and Varma, 2003). V případě PLA a PGA předchází samotné syntéze fermentační procesy. Syntéza PHB a PHV probíhá v mikroorganismech (acetobacter, rhizobium) jako polykondenzace dvou acetoacetylových-CoA skupin vznikajících metabolickými procesy (Zinn, Witholt and Egli, 2001).

Uvedenými postupy lze syntetizovat alifatické polyestery v určitém rozsahu molekulových hmotností, polydisperzity a variability izomerních stavů. Tyto parametry přímo ovlivňují molekulární strukturu a tím mechanické vlastnosti, degradační profil i přechodové teploty. Alifatické polymery tak nejsou variabilní ve svých vlastnostech pouze v rámci různých polymerů, ale do určité míry i v případě jediného polymeru (Middleton and Tipton, 2000). Pro jednotlivé zástupce tak nejsou často uváděny přesné hodnoty daných vlastností, ale jejich rozsahy (tab. 3.1).

Tabulka 3.1: Přehled vlastností alifatických polyesterů (Manavitehrani *et al.*, 2016)

Polymer	T <sub>g</sub> [°C]	T <sub>m</sub> [°C]	Youngův modul [MPa]	Mez pevnosti v tahu [MPa]	Prodloužení do přetrhu [%]	Plná degradace <i>in vitro</i>
PGA	40–50	220–230	7000–8400	900	20–30	6–12 měsíců
PLA	45–60	150–162	2700	25–50	3–6	12–16 měsíců
PLLA	55–65	170–200	3500	40–150	5–10	20–36 měsíců
PLGA (85:15)	50–55	–	2000	40–65	3–10	5–6 měsíců
PLGA (50:50)	40–50	–	2000	65	3–10	1–2 měsíce
PPC	17	–	830	22	330	–
PHB	25–45	168–182	3500	40	10	1–2 roky
PBS	–44	100–120	700	30	6	–
PCL	–60	55–60	700	4–28	300–700	2–4 roky
PPF	22–37	200	2000–3000	3–35	20	2–4 roky

PLA je nejčastěji využívaným alifatickým polyesterem, připravovaným z fermentovaných škrobů. Jedná se o termoplastický polymer dobře rozpustný v organických rozpouštědlech, velmi dobře zpracovatelný různými technologiemi. PLA je chirální molekula vyskytující se ve třech izomerních formách: krystalický poly-L-laktid (PLLA) / poly-D-laktid (PDLA) a jejich amorfní mezofорма poly-DL-laktid (PDLLA). Jednotlivé izomery se liší svými mechanickými vlastnostmi a dobou degradace. PLA je využíván v obalových materiálech, pro 3D tisk nebo v medicíně k výrobě fixačních přípravků ortopedické chirurgie. Limitujícím faktorem širšího využití PLA je jeho poměrně velká křehkost (Avérous, 2013).

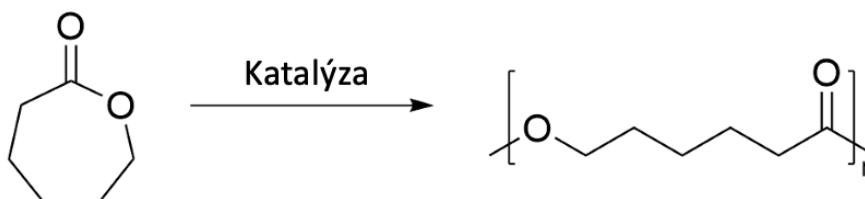
PGA je nejjednodušší lineární alifatický termoplastický polyester s vysokou mírou krystalinity (45–55 %) a dobrými mechanickými vlastnostmi. Je špatně rozpustný v organických rozpouštědlech. Kvůli špatné rozpustnosti je zpracování omezené převážně na termické technologie. Díky vyšší hydrofilitě je degradační proces PGA v porovnání s PLA rychlejší, a tím může docházet k nežádoucí akumulaci kyselých degradačních produktů v organismu, což značně omezuje medicínské využití čistého PGA. Velmi často je pak využíván PLGA jako kopolymer výše zmíněných, který nabízí požadované vlastnosti dané změnou poměru jednotlivých složek (tab. 3.1). Tyto materiály jsou používány v klinické praxi ve formě vstřebatelných chirurgických šicích nití (Gentile *et al.*, 2014).

Zajímavou alternativou posledních let jsou polyhydroxyvaleráty produkované bakteriálními kmeny, které vznikají jako přirozená komponenta jejich mezibuněčné hmoty, a to při dostatečné saturaci uhlíkem a současném nedostatku esenciálních nutrietů. Nejběžnějším zástupcem je PHB, který bývá velmi často směsován s PHA, čímž je poměrně účinně řízen degradační profil a mechanické vlastnosti. Nevýhodou této skupiny polymerů je jejich vysoká polydisperzita vycházející z povahy syntézy (Zinn, Witholt and Egli, 2001).



### 3.2.3 Polykaprolakton

PCL je semikrystalický hydrofobní polymer vyráběný z ropy s dlouhou dobou degradace v rozmezí 2–4 roky. Jedná se o alifatický polyester s velmi dobrou rozpustností v organických rozpouštědlech, je mísitelný s celou řadou dalších polymerů i nízkomolekulárních látek. PCL je termoplastický polymer s teplotou tání (55–60 °C) a teplotou skelného přechodu (–60 °C). Jedná se o polymer, jehož využití v medicíně je schváleno Agenturou pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) (Woodruff and Hutmacher, 2010).



Obrázek 3.6: Schematické znázornění polymerace PCL

Výroba probíhá metodou polymerace za otevření kruhu cyklického monomeru kaprolaktonu při použití koordinačních katalyzátorů v podobě například oktoátu cínu (obr. 3.6). Takto lze připravit PCL s nízkým stupněm polydisperzity, molekulové hmotnosti v rozmezí 3 000–80 000 g/mol a krystalinitě 20–60 %, která klesá s rostoucí hodnotou molekulové hmotnosti. Konečné mechanické, termické a degradační vlastnosti PCL pak závisí právě na těchto hodnotách (Sisson, Ekinci and Lendlein, 2013).

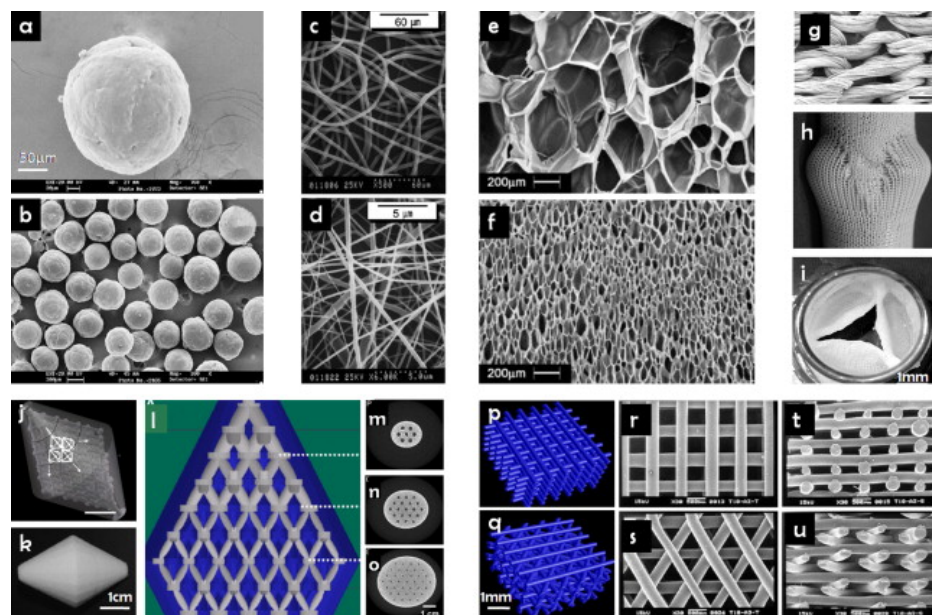
PCL má poměrně nízký modul (~ 700 MPa) a pevnost v tahu (8–28 MPa), avšak vysoký stupeň poměrného prodloužení (300–700 %), což z něho činí biomateriál s velmi dobrou elasticitou. PCL je rozpustný v chloroformu, dichlormethanu, tetrachlormethanu, benzenu, toluenu, cyklohexanonu a 2-nitropropanu při pokojové teplotě. Má nízkou rozpustnost v acetonu, 2-butanonu, ethylacetátu, dimethylformamidu, acetonitrilu a je nerozpustný v alkoholu, petroletheru a diethyletheru (Woodruff and Hutmacher, 2010).

K degradaci PCL dochází převážně hydrolytickým štěpením esterových skupin. Následná intracelulární degradace se projevuje *in vivo* až v poslední fázi štěpení u fragmentů s molekulovou hmotností pod 3 000 g/mol. Degradace polymeru probíhá dvoufázově a homogenně v celém jeho objemu. Nejprve dochází k degradaci amorfní fáze polymeru vlivem přednostní difuze vody do těchto částí. V druhé fázi pak degradují krystalické části polymeru. Meziprodukt *in vivo* degradace, kyselina 6-hydroxykapronová, je dále v organismu přeměněn na acetylcoenzym-A a metabolizován cyklem kyseliny citronové (Gunatillake and Adhikari, 2003).

S ohledem na dlouhodobý degradační profil, vysokou permeabilitu pro mnohé druhy léčiv a biokompatibilitu je PCL využíván pro dlouhodobé dodávání léčiv, například v podobě implantační tyčinky Capronor<sup>®</sup>, schopné do těla dodávat po dobu jednoho roku antikoncepční látku Levonorgestrel (Darney *et al.*, 1989). Kopolymer PCL–PGA je také využíván pro výrobu dlouhodobě vstřebatelných chirurgických sutur, dostupných pod různými obchodními názvy (Trustisorb<sup>®</sup>, Monoderm<sup>®</sup> nebo Monocryl<sup>®</sup>) (Middleton and Tipton, 2000). Dalším oficiálně schváleným medicínským přípravkem je degradabilní foliový implantát Mesofol<sup>®</sup> z kopolymeru PLA–PCL, využívaný pro zpevnění měkkých tkání (Klopp *et al.*, 2008).

PCL se také objevuje v polymerním průmyslu, nejčastěji jako aditivní složka. Využívá se pro výrobu některých druhů polyuretanů nebo jako změkčovač pro PVC a vybrané druhy pryskyřic. V obalovém průmyslu bývá PCL směšován s termoplastickými škroby nebo PBS pro zvýšení celkové degradability těchto materiálů. Společně s PLA je běžně využívaným materiálem tiskových strun pro FDM 3D tisk (Woodruff and Hutmacher, 2010).

V případě experimentálního vývoje a výzkumu je PCL díky svým vlastnostem hojně využíván ve tkáňovém inženýrství kosti. Často slouží pro výrobu degradabilních tkáňových nosičů produkovaných rozličnými technologiemi, jakými jsou elektrické zvlákňování nebo různé metody 3D tisku (obr. 3.7).



Obrázek 3.7: Struktury pro tkáňové inženýrství vyrobené z PCL: nanosféry (a, b) nanovlákná (c, d); pěny (e, f); pletené textilie (g, h, i); tkáňové nosiče vyrobené SLS 3D tiskem (j–o) a FDM 3D tiskem (p–u), (Woodruff and Hutmacher, 2010)

### 3.2.4 Biodegradabilní polymery v technologii meltblown

S ohledem na již zmíněné trendy a stoupající objem produkce netkaných textilií technologií meltblown, je využití BP v této technologii velmi aktuální téma. Přírodní biodegradabilní polymery, zejména termoplastické deriváty celulózy a škrobů, jsou pro výrobu mikrovláken velmi atraktivní díky svému minimálnímu dopadu na životní prostředí. Ovšem pro svou chemickou heterogenicitu nedosahují potřebných reologických vlastností a jsou pro technologii meltblown využívány pouze jako minoritní plniva. Vědecká literatura popisuje velmi dobrou využitelnost syntetických BP, zejména pak termoplastických alifatických polyesterů, které disponují potřebnou reologií a stabilitou (Arraiza *et al.*, 2007).

První popsané experimentální využití BP pro technologii meltblown pochází až z přelomu tisíciletí. Studie shrnuje možnosti využití v té době dostupných polymerů – PLA, PEA, PVA, PCL, termoplastický škrob (TPS) a celulózu-diacetát (CDA). Výsledky ukazují, že zejména vláknenné vrstvy z PLA snesou po stránce morfologie srovnání s tradičními PP vrstvami (Müller and Krobjilowski, 2001).

Následně je vědeckými studiemi nejčastěji popisované právě využití PLA, které je doposud společně s PBS také jediným komerčně využívaným BP pro technologii meltblown. Dzierzkowska a kol. popisuje použití PLA o hodnotě MFR 40 v kombinaci se zvláknovacími otvory o průměru 0,25 mm, čímž lze dosáhnout průměrů vláken v rozmezí 2,5–4,6  $\mu\text{m}$ . Výsledky ukazují, že se vzrůstající teplotou zvláknovací trysky klesá střední hodnota průměrů vláken. Vytvořené mikrovláknenné vrstvy zároveň vykazují biokompatibilitu při *in vitro* kultivaci s primárními keratinocyty (Dzierzkowska *et al.*, 2021). Další výzkum popisuje tvorbu vláken s průměry v rozmezí 2,3–3,7  $\mu\text{m}$  pro PLA s MFR 120 a při průměru zvláknovacích otvorů 0,4 mm. Studie zároveň prokazuje jejich srovnatelné filtrační vlastnosti při porovnání s PP mikrovláknennými vrstvami (Jafari, Shim and Joijode, 2021). Je prokázáno, že lze zpracovat i PLA s hodnotami MFR 20, zde již vzrůstá průměr vláken na hodnoty 4,8–9,6  $\mu\text{m}$  při totožném průměru zvláknovacích otvorů (Vadas *et al.*, 2018).

Studie popisují také zvláknování PLA ve směsi s dalšími polymery. Například PLA s PHB v hmotnostní poměru 85/15 umožňují tvorbu vláken o střední hodnotě průměru 4,62  $\mu\text{m}$ , v případě poměru 75/25 vzrůstá střední hodnota průměrů na 15,6  $\mu\text{m}$  (Latwinska, Sójka-Ledakowicz and Kudzin, 2015). Ovšem jak v případě 100% PLA a PHB, tak jejich směsí je zmiňována vysoká rigidita vláknenných vrstev (Kann, 2009).

Kromě využití klasických BP se objevují i zajímavé alternativy spočívající ve využití lineárních akrylových polymerů funkcionalizovaných síťovacími činidly. Ty umožňují tvorbu vlákných vrstev se středním průměrem vláken okolo 10  $\mu\text{m}$ , které jsou dodatečně síťovatelné působením UV záření. Tyto vazby jsou termicky reverzibilní a umožňují následnou recyklaci vlákných vrstev (Jin *et al.*, 2018, 2019). Další alternativou je využití viskózního roztoku celulózy, který je možné za určitých podmínek zpracovat technologií meltblown. Studie představuje zpracování různě koncentrovaných roztoků celulózy v methylmorfolin-N-oxidu protlačované přes trysku s jedním zvláknovacím otvorem o průměru 0,27 mm. Výsledné vlákně vrstvy obsahují vlákna o průměru 1,8–22,4  $\mu\text{m}$ , avšak jejich elongace do přetrhu dosahuje maximálně 10 % a vrstvy jsou rigidního charakteru (Tang and Mukhopadhyay, 2006).

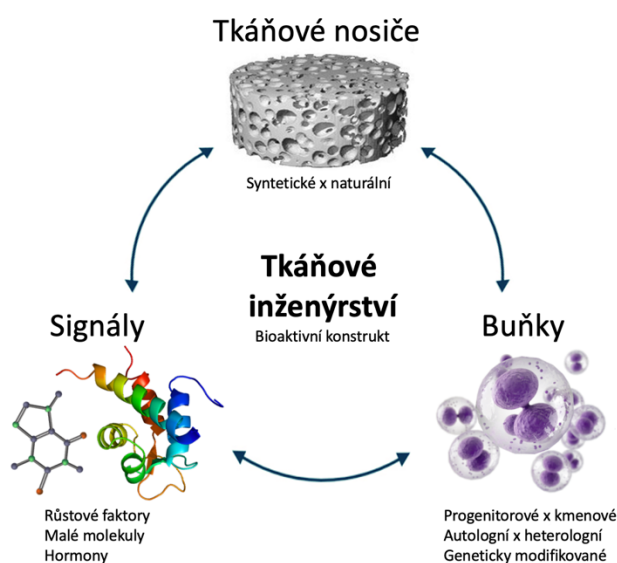
Frekventované téma je také směsování BP s klasickým PP, za účelem nahrazení části nedegradabilního PP určitou degradabilní složkou nebo zlepšení mechanických vlastností BP vrstev. PLA lze směšovat s PP v hmotnostním poměru 50/50 při střední hodnotě průměrů vláken 8,81  $\mu\text{m}$  a zvýšení maximální elongace na 22 % oproti 8 % v případě 100% PLA (Łatwińska *et al.*, 2016). Zmínit lze také směsování PP s PEG (Zhang *et al.*, 2021) nebo PPT (Tian, Pan and Pan, 2019).

Přes příznivé reologické vlastnosti PCL dosavadní studie popisují využití tohoto polymeru pouze ve směsi s jinými polymery. Yu a kol. popisují zpracování PLA (MFR 80) s PCL (MW 80 000 g/mol) v hmotnostním poměru 85/5. Extruze taveniny o teplotě 240 °C přes zvláknovací otvory o průměru 0,35 mm umožňuje produkci uniformní vlákně vrstvy se střední hodnotou průměrů vláken 7,1  $\mu\text{m}$  a maximální elongací 19,1 % (Yu *et al.*, 2014). Jiná studie popisuje tvorbu mikrovlákně vrstev ze směsi PP (MFR 500) a PCL (MW 37 000 g/mol) v hmotnostním poměru 50/50 s přidavkem 2 hm. % karbonových nanotrubic, které dosahují střední hodnoty průměrů vláken 2,07  $\mu\text{m}$  (Krucíńska *et al.*, 2013).

### 3.3 Tkáňové inženýrství

Tkáňové inženýrství je od roku 1993 definováno jako interdisciplinární obor využívající znalostí inženýrství a přírodních věd k vývoji biologických náhrad sloužících k obnově, zachování nebo zlepšení funkcí tkání nebo orgánů (Langer and Vacanti, 1993). Tento obor synergicky kombinuje dva dosud používané principy regenerativní medicíny, spočívající v transplantaci orgánů nebo jejich nahrazení umělou náhradou. Multidisciplinarita, kde jsou využívány biologie, chemie, fyzika, materiálové vědy a medicína, je tak nezbytnou podmínkou k dosažení cílů tkáňového inženýrství. Proces tkáňového inženýrství spočívá ve 3 hlavních faktorech: tkáňové nosiče, buňky a signály, jak je znázorněno na obrázku 3.8.

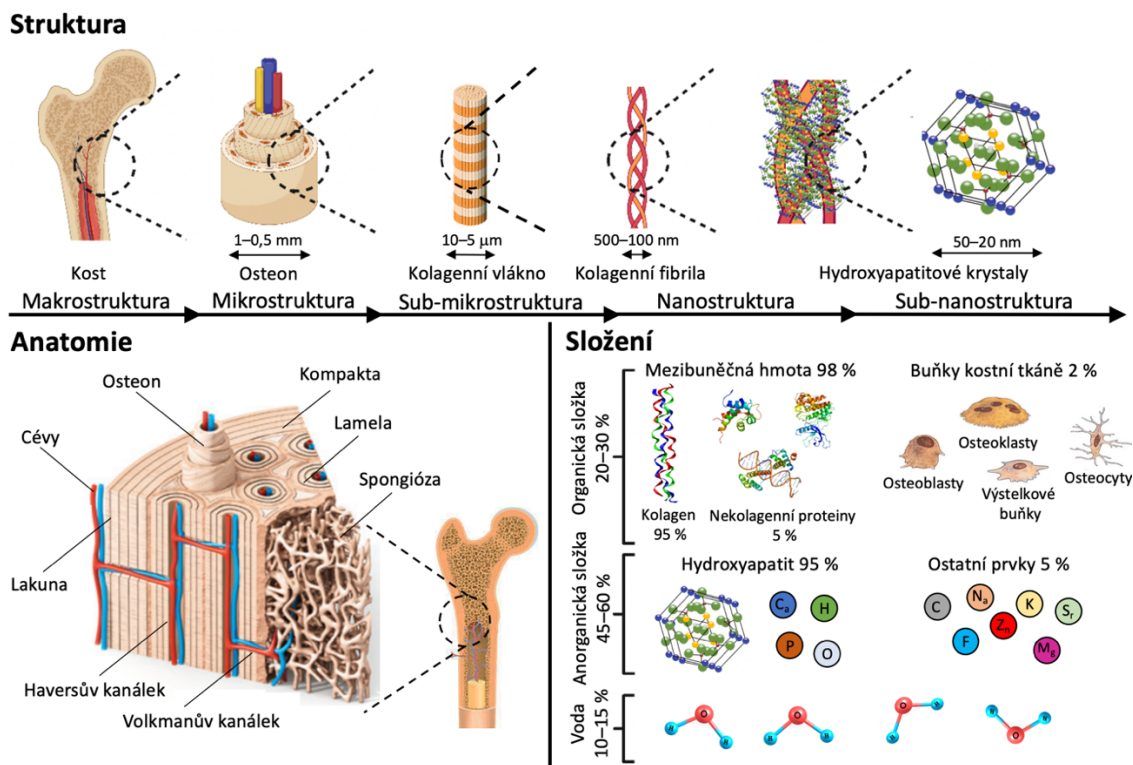
1. Tkáňové nosiče, neboli scaffoldy, připravené z biokompatibilních materiálů, dočasně nahrazují funkci mezibuněčné hmoty – takzvané extracelulární matrice (ECM). Tím poskytují buňkám podporu pro jejich adhezi a proliferaci vedoucí k regeneraci tkáně, včetně nativní mezibuněčné hmoty.
2. Hlavním biologickým materiálem jsou buňky autologního, alogenního a xenogenního původu. Ty mohou být kmenové nebo diferencované v různém stupni. Lze také využívat buňky geneticky upravené, čímž je inhibována nebo indukována jejich specifická schopnost.
3. Signály představují stimulační faktory v podobě bioaktivních substancí. Těmi jsou růstové, diferenciatní či angiogenní faktory, hormony a další malé molekuly v kombinaci s postupy na bázi mechanické či elektrické stimulace. Ty jsou využívány za účelem indukce, urychlení, posílení anebo kontroly buněčné diferenciacce a tkáňové obnovy.



Obrázek 3.8: Schéma konceptu tkáňového inženýrství

### 3.3.1 Tkáňové inženýrství kosti

Kostní tkáň je hierarchicky uspořádaný kompozitní systém skládající se z anorganické složky, organické složky a vody. Vnější struktura nativní kosti – kompakta (~ 10 %) se skládá z Haversových kanálků a osteonů, zatímco její vnitřní část – spongióza (~ 90 %) má trabekulární strukturu s porozitou 75–85 % (Zhang, Mcadams II and Grunlan, 2016). ECM je tvořena vláknitou složkou v podobě fibril z kolagenu typu I a amorfní složkou tvořenou proteoglykany spolu se strukturálními glykoproteiny (Robinson and Watson, 1952). Mezi kolagenními fibrilami je deponována anorganická složka ve formě krystalů hydroxyapatitu, jejichž kvalita a velikost se mění v čase (obr. 3.9). Dále je ECM tvořena celou kaskádou bioaktivních molekul v podobě růstových faktorů a morfogenních proteinů. Kostní tkáň obsahuje čtyři typy buněk: osteoblasty, osteoklasty, osteocyty a buňky kostní výstelky. Buňky kostní výstelky jsou neaktivní buňky, které slouží k lokalizaci kompartmentu kostní remodelace (Sims and Martin, 2014). Na místě kostního kompartmentu jsou produkovány specifické stimulační faktory přitahující buňky diferencující se na osteoblasty nebo osteoklasty, které zajišťují vyvážený stav v kontextu dynamické kostní remodelace. Osteoblasty jsou v tomto mechanismu zodpovědné za produkci nové matrice a po jejich pevném ukotvení do matrice se stávají osteocyty. Osteoklasty naopak resorbují kostní matici za uvolňování kyselé fosfatázy a kolagenázy (Vaananen *et al.*, 2000).



Obrázek 3.9: Schematické znázornění základní struktury, anatomie a složení kostní tkáně

Transplantace kosti je v celosvětovém měřítku druhou nejčastější transplantovanou tkání, hned po krvi. Hlavní příčinou jsou defekty kostní tkáně způsobené traumaty, resekci nádoru, dědičností nebo degenerativním onemocněním. V důsledku toho je v současnosti provedeno ročně více než 2,2 milionu transplantací autologních nebo alogenních kostních štěpů. Využití především autologních štěpů z ilikálního hřebene je v dnešní době považováno za zlatý standard léčby, protože jako jediný dosahuje zároveň osteoinduktivní i osteokonduktivní aktivity v kombinaci s neimunogenitou (Wickramasinghe, Dias and Premadasa, 2022). Použití kostních štěpů k léčbě poškozené kostní tkáně je však spojeno s několika omezeními, včetně výrazné morbidity, bolesti v návaznosti na odběr, finanční náročnosti i nedostatku dárcovského materiálu. V případě alogenních štěpů je nutné zmínit riziko nepříznivé imunitní odpovědi a přenosu onemocnění (Agarwal and García, 2015). V důsledku těchto omezení a zásadního nedostatku štěpů existuje velká celospolečenská poptávka po využití tkáňového inženýrství kosti (TIK) pro vývoj alternativních kostních graftů.

Kostní tkáň má v porovnání s jinými typy tkání vysokou schopnost plné regenerace, která je ovšem závislá na mnoha faktorech, jakými jsou, mimo celkové anamnézy pacienta, také lokalizace, rozsah a typ kostního defektu. Kritická velikost kostních defektů vyžadujících rozsáhlejší intervence je v závislosti na lokalizaci 1–2 cm. Defekty větších rozměrů již nedovolují samoregeneraci plnohodnotnou kostní tkání procesem primárního hojení (Schemitsch, 2017). Kostní defekty jsou v klinické praxi děleny na ortopedické (výrazně zatěžované kosti) a kraniofaciální (kosti bez většího zatížení) (Jakus *et al.*, 2016). Z hlediska tkáňového inženýrství jsou kostní defekty rozdělovány podle zatížení na nosné, nenosné a podle lokalizace na ty nalézající se v kompaktní nebo spongiózní kostní tkáni. Ve světle těchto informací je zřejmé, že nároky na regenerativní postupy kostní tkáně budou velmi různorodé, a to nejen z hlediska mechano-strukturálních vlastností použitých materiálů.

Existují studie využívající buněčnou terapii v podobě implantace exogenních kmenových buněk do místa kostního defektu (Reddi, 2000). Tradiční přístupy tkáňového inženýrství používají kmenové buňky v kombinaci s nosnými scaffoldy jako terapeutické konstrukty. Oba přístupy jsou časově i finančně náročné, trpí obecným nedostatkem vhodného buněčného materiálu a vysokou mírou imunitní reakce (Hu *et al.*, 2019; Bharadwaz and Jayasuriya, 2020). Ve srovnání s jinými tkáněmi disponuje při navození určitých podmínek kostní tkáň markantně vyšším potenciálem seberegenerace. To je velmi dobrý předpoklad pro využití *in situ* tkáňového inženýrství, které řeší nedostatky tradičních přístupů. *In situ* koncept využívá zejména bioaktivní scaffoldy, podobné svou strukturou kostní ECM, pro implantaci do místa defektu, kde vyvolají proces primární seberegenerace kostní tkáně pomocí infiltrace endogenních buněk pacienta (Sengupta, Waldman and Li, 2014).

### 3.3.2 Požadavky na kostní tkáňové nosiče

*In situ* scaffoldy pro regeneraci kostní tkáně musí mít kromě nezbytné biokompatibility také schopnost osteokonduktivity a osteoindukce. Osteokonduktivita je definována jako schopnost scaffoldu umožnit syntézu nové kostní tkáně. Osteoindukci lze popsat jako schopnost podpory migrace endogenních progenitorových buněk a jejich osteogenní diferenciaci. Pokud jsou účinně využity zejména materiálové a strukturo-mechanické vlastnosti scaffoldu k vyvolání osteoindukce, může být snížena nebo zcela potlačena závislost na přítomnosti dalších složek v podobě osteogenních faktorů nebo bioreaktorových jednotek.

Z geometrického hlediska musí být struktura scaffoldu objemného charakteru a splňovat nezbytné makro i mikroskopické charakteristiky. Zejména *in situ* scaffoldy musí být schopny zcela vyplnit prostor kostních defektů a velmi přesně kopírovat jejich mnohdy složitou topografii tak, aby došlo na rozhraní scaffold – okolní tkáň k mechano-transdukční interakci. Vzhledem k tomu, že kostní tkáň tvoří hierarchické uspořádání, ukazuje se také, že struktura scaffoldu s určitou mírou paralelizace indukuje vznik nové kostní tkáně. V případě vlákněných scaffoldů bylo prokázáno, že paralelizovaná vlákna mají příznivý vliv na buněčnou viabilitu lidských osteoblastů SAOS-2. Tento vliv byl pozorován u paralelizovaných vlákněných struktur ze syntetických (Cristofaro *et al.*, 2018) i přírodních polymerů (Matsugaki *et al.*, 2015).

Kostní tkáň má velmi vysoké nároky na celkový stupeň porozity scaffoldu, velikost pórů a jejich interkonektivitu, které umožňují regeneraci v důsledku dostatečné vaskularizace a inervace perivaskulárními inervačními vlákny. V případě ideální velikosti pórů nepanuje napříč vědeckými studii shoda. Některé výzkumy uvádějí, že velikost pórů pod 200  $\mu\text{m}$  umožňuje buněčnou proliferaci a osteogenezi *in vitro* i *in vivo* pouze na periférii struktury scaffoldu. Tyto studie ukazují, že scaffoldy s velikostí pórů v rozmezí 200–350  $\mu\text{m}$  zajišťují optimální osteogenezi v celé struktuře (Karageorgiou and Kaplan, 2005; Murphy, Haug and O'Brien, 2010). Naproti tomu jiné studie stanovují spodní hranici tohoto rozmezí na hodnotě 100  $\mu\text{m}$  a doporučují začlenit určitý podíl pórů s velikostí pod 100  $\mu\text{m}$  (Wang *et al.*, 2015; Dorozhkin, 2018). Velmi důležitou roli zastává topografie struktury v submikrometrickém i nanometrickém měřítku. Povrchová přítomnost pevných topografických prvků, vláken nebo částic o rozměrech 0,1–1  $\mu\text{m}$  podporuje adhezi, viabilitu, diferenciaci a expresi jednotlivých složek ECM u kmenových buněk i osteoblastů (Wennerberg, 1998; Harvey, Henderson and Vengallatore, 2010).



Mechanické vlastnosti scaffoldu by měly být v co nejvyšším souladu s okolní kostní tkání. Tuhost scaffoldu by neměla být výrazně nižší ale ani vyšší, aby nedošlo k efektu takzvaného “stress shielding“, které v důsledku snižuje denzitu nové i okolní kostní tkáně (Takizawa *et al.*, 2018). Kostní buňky vykazují citlivost na mechanické odezvy okolní ECM a reagují na míru této odezvy biochemickými signály. Při kontaktu buněk se scaffoldem, jehož struktura se při styku s buňkami nedeformuje, dochází k reorganizaci cytoskeletu a mechano-transdukční signalizaci vedoucí ke vzniku kvalitnějších fokálních lézí adhezního integrinu mající vliv na míru adheze a následnou osteoindukci (Breuls, Jiya and Smit, 2008; Pobloth *et al.*, 2018). Při testování kontaktu kmenových buněk s polymerními strukturami různých tuhostí vykazovaly buňky nejvyšší míru počáteční adheze a osteogeneze v prvním týdnu u struktur s Youngovým modulem v rozmezí 62–68 kPa (Sun *et al.*, 2018).. V případě osteoblastů bylo dosaženo nejvyšší míry viability a proliferace při tuhosti 134 kPa (Zhang *et al.*, 2017).

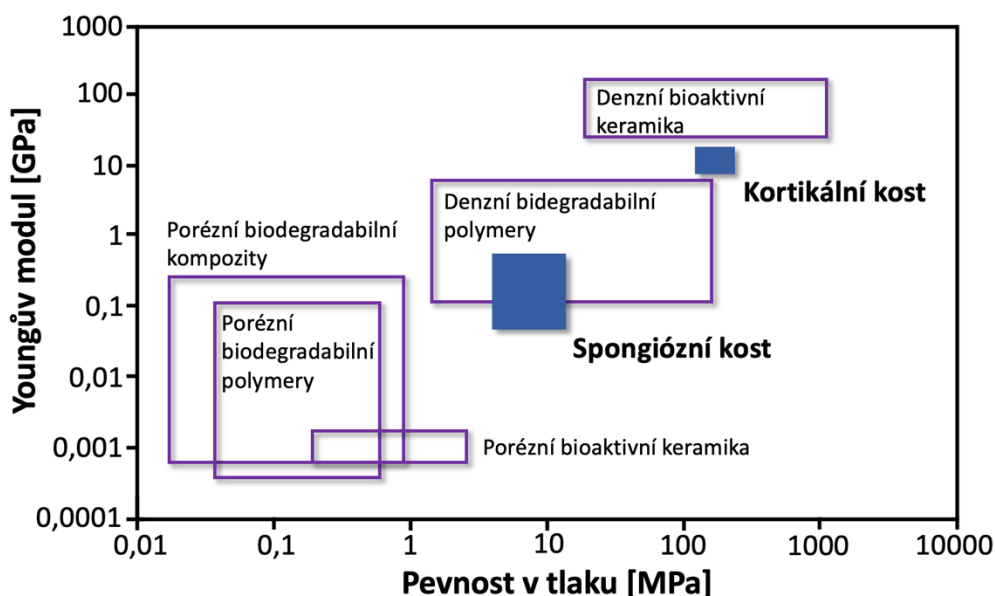
Potřebné mechanické vlastnosti scaffoldu mohou být do určité míry nahrazeny schopností řízené degradace, kdy je jejich struktura postupně nahrazována tkání mechanickými vlastnostmi odpovídající nativní kosti. Mechanismus postupné degradace zvyšuje tvorbu minerální složky v porovnání s nedegradabilními scaffoldy. V případě spinální fúze je žádoucí degradace scaffoldu v rozmezí 9–12 měsíců. Pro kraniofaciální aplikace by měl být scaffold degradován po 3–6 měsících. Zároveň však nesmí docházet ke vzniku rozkladných produktů, které vychylují acidobazickou rovnováhu v místě hojení (Feng *et al.*, 2018).

Dalším důležitým faktorem jsou povrchové biofyzikální vlastnosti scaffoldu, které se dají ovlivnit výběrem materiálu nebo následnou funkcionalizací (Webb, Hlady and Tresco, 1998). Povrchy hydrofilní povahy mají tendenci zvyšovat adsorpci adhezních proteinů. Hydrofilita povrchu bývá velmi často zvyšována pomocí plasmatické úpravy, která zároveň zvyšuje drsnost povrchu. Další možností je využití povlakování povrchů osteokonduktivními materiály na bázi polydopaminu, grafenoxidu a různých proteinů, které zvyšují hydrofilitu a zároveň podporují nukleační procesy (Koons, Diba and Mikos, 2020). S ohledem na složení kostní ECM jsou pro zvýšení osteoindukce napříč výzkumy nejčastěji využívány různé formy biokeramiky vykazující chemickou podobnost s minerální složkou kostní ECM. Nejčastěji je využíván hydroxyapatit (HA), trikalciumfosfát (TCP) a bioaktivní sklo ve formě částic, sfér nebo celistvých povlaků (Yang, Best and Cameron, 2018). Pro zvýšení bioaktivity jsou v některých případech *in situ* scaffoldy funkcionalizovány bioaktivními molekulami. Může se jednat například o osteoindukční faktor BMP 2 v kombinaci s kolagenním potahem celulózových vláken (Zhang *et al.*, 2019) nebo o využití růstového faktoru v kombinaci s hydrogelem vázaným ve vlákenné struktuře (Igwe, Mikael and Nukavarapu, 2014).

### 3.3.3 Kostní tkáňové nosiče

Je zřejmé, že vzhledem k mnoha protichůdným požadavkům na materiály pro TIK neexistuje žádný univerzální design ani materiál, který by byl považován za ideální pro tvorbu scaffoldů. Přes některé základní požadavky mohou být další vlastnosti voleny podle konkrétní aplikace, a to i v případě tak kritických požadavků pro TIK, jakými jsou mechanostрукturní vlastnosti (Jakus *et al.*, 2016). Je třeba vzít v úvahu, že mechanické charakteristiky lidské kosti se výrazně liší v závislosti na typu kosti. Youngův modul kompaktní kosti dosahuje hodnot 15–20 GPa a pevnosti v tlaku 100–200 MPa, na druhé straně Youngův modul trabekulární kosti pouze 0,1–2 GPa a pevnosti v tlaku 2–20 MPa. Pro výběr materiálu je třeba brát v potaz také povahu defektu, například v případě nenosného defektu mohou být vybrány méně pevné materiály přinášející jiné benefity (Olszta *et al.*, 2007).

Kovy se ukazují, i přes velmi dobré mechanické vlastnosti, jako ne příliš vhodné kvůli korozním procesům uvolňujícím nežádoucí ionty, nutnosti předúpravy jejich povrchu a výraznými limity řízené degradace v případě magnéziových slitin (Eliaz, 2019). S ohledem na organické a anorganické složení přirozené kostní tkáně jsou nejběžnějšími biomateriály používanými pro kostní scaffoldy biopolymery, biokeramika a kompozitní materiály. Jak je vidět na obrázku 3.10, tyto třídy materiálů disponují širokým rozpětím mechanických vlastností (Rezwan *et al.*, 2006).



Obrázek 3.10: Hodnoty modulu pružnosti a pevnosti v tlaku různých tříd biomateriálů pro TIK ve srovnání s lidskou kostí

Biopolymery, které disponují požadovanou biodegradabilitu lze rozdělit na přírodní a syntetické. Přírodní polymery jsou hydrofilní, vykazují velmi dobrou biokompatibilitu, schopnost buněčné adheze a vysokou míru osteoindukce. Naproti tomu nevýhodou těchto polymerů je nízká reprodukovatelnost mezi šaržemi a omezené možnosti změny jejich bazálních vlastností. V nejvyšší míře jsou pro TIK využívány kolagen, alginát, hedvábí a chitosan. Syntetické polymery nabízí široké portfolio degradabilních materiálů, které nabízejí za cenu nižší biokompatibility více možností pro chemické modifikace, velmi dobrou reprodukovatelnost a zpracovatelnost. Ve srovnání s přírodními polymery disponují vyšší mírou pevnosti a osteokondukce. Pro TIK jsou nejčastěji využívány biodegradabilní polyestery a jejich kopolymery s pomalejším resorpčním profilem, například PCL, PLA a PLGA. V případě biokeramiky lze mluvit o anorganických materiálech obsahujících ionty  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Si}^{4+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Li}^{+}$  a  $\text{Ag}^{+}$ , které jsou schopny interakcí s okolní kostní tkání. Biokeramické materiály vykazují velmi dobrou schopnost osteoindukce i osteokondukce a dosahují vysokých pevností. Jsou však křehké, vykazují pomalou rychlost degradace a obtížnou zpracovatelnost. Nejběžnějším typem jsou fosforečnany v podobě HA a TCP (Koons, Diba and Mikos, 2020). Tabulka 3.2 shrnuje jednotlivé třídy materiálů.

*Tabulka 3.2: Přehled materiálů využívaných pro TIK (Koons, Diba and Mikos, 2020)*

<b>Typ materiálu</b>	<b>Hlavní výhody</b>	<b>Hlavní nevýhody</b>	<b>Příklady</b>
Přírodní polymery	Biomimetické vlastnosti	Nízké mechanické vlastnosti, potenciální imunogenita, nízká reprodukovatelnost	Kolagen a želatina Hedvábí Alginát Alkanoáty
Syntetické polymery	Široké spektrum složení a vlastností, snadno modifikovatelné	Možnost produkce nežádoucích degradačních produktů	Polykaprolakton Kyselina polymléčná Polypropylen fumarát
Biokeramika	Vysoký tlakový modul, bioaktivní ionty	Křehkost	Hydroxyapatit Trikalciumpfosfát Bioaktivní sklo
Biodegradabilní kovy	Vysoká pevnost v tlaku	Korozivní procesy, nízká variabilita degradace	Slitiny magnézia
Uhlíkové nanomateriály	Vysoká pevnost v tahu, schopnost vázat bioaktivní molekuly	Potenciální cytotoxicita	Uhlíkové nanotrubičky Grafen Grafenoxid

Každá z těchto materiálových i technologických variant přináší nejen výhody, ale i nevýhody při jejich využití ve tkáňovém inženýrství. Ukazuje se, že jednosložkové scaffoldy nejsou schopny plnit nároky kladené na jejich vlastnosti, proto je trendem vývoj kompozitních řešení, které kombinují nejen biomateriály, ale i výrobní technologie (O'Brien, 2011). Z tohoto důvodu je stále atraktivnější vývoj kompozitů obsahujících kombinace polymer–polymer a polymer–biokeramika.

Kompozitní scaffoldy s typicky vysokou porozitou nezbytnou pro TIK, kombinující grafen oxid, kolagen a HA, lze připravit lyofilizací. Skupina obsahující 0,1% grafen oxidu vykazuje významně vyšší adhezi a proliferaci kmenových buněk *in vitro* a více než dvakrát vyšší tvorbu kostní tkáně *in vivo* ve srovnání se skupinou neobsahující grafen oxid (Zhou *et al.*, 2018). Další výzkum představuje scaffoldy na bázi želatiny obohacené chitosanem, alginátem a HA, připravené metodou zpěňování. Výsledky ukazují, že struktura má velmi dobrou mechanickou stabilitu, hydrofilitu a podporuje rychlost proliferace osteoblastů při zachování jejich fenotypu *in vitro* (Sharma *et al.*, 2016). Jiný přístup, využívající emulgaci TCP a PLGA pro tvorbu mikrosfér tvořících strukturu scaffoldu, zvyšuje expresi osteokalcinu během kultivace *in vitro* u primárních osteoblastů (Amini *et al.*, 2012).

Velmi slibnou skupinou pro TIK jsou vlákenné kompozity na bázi netkaných textilií. Tyto materiály, složené z polymerních vláken o průměrech v řádech stovek nanometrů nebo jednotek mikrometrů, tvoří díky své morfologii vysoce porézní struktury trojrozměrného charakteru, které jsou podobné kostní ECM. Zároveň poskytují vysoký měrný povrch pro snadnou adici bioaktivních látek v podobě molekul, povlaků nebo nanočástic. Výběrem vhodného polymeru a technologie výroby lze řídit jejich strukturu, fyzikální i mechanické vlastnosti (Chen *et al.*, 2017). Polymerní nanovláknenné scaffoldy, vyrobené elektrickým zvlákněním, mohou být kombinovány s inkorporovanými nanočásticemi HA, alaptitu nebo oxidu zinečnatého, které podporují osteoindukci. Další možností je kombinace polymerních nanovláken s *in situ* povlaky. Například PCL vlákna funkcionalizovaná takzvanými „dip coating“ povlaky na bázi peptidů (Li *et al.*, 2019) nebo polydopaminu (Hasani-Sadrabadi *et al.*, 2019) zvyšují buněčnou adhezi a nukleační procesy HA. Jiný přístup využívá kompozity složené z vlákenné struktury prosycené hydrogelovou maticí, která zlepšuje mechanické vlastnosti, strukturní stabilitu a celkovou bioaktivitu scaffoldů (Li *et al.*, 2014). Lze zmínit kombinace PCL nanovláken s kolagenovým hydrogelem nebo kolagenová nanovláknena s želatinou (Moy, Limaye and Arinzeh, 2020). Také mikrovlákna hedvábí dispergovaná v želatinovém hydrogelu s inkorporovanými nanočásticemi HA umožňují tvorbu plnohodnotné lamelární kosti po dvou měsících od implantace do kostních defektů potkana (Anitha *et al.*, 2017). Další studie popisuje využití růstového faktoru VEG v kombinaci s hydrogelem vázaným ve vlákenné polymerní struktuře, který umožňuje zvýšenou expresi kostních markerů BSP a RunX (Igwe, Mikael and Nukavarapu, 2014).

### 3.4 Analytická chemie

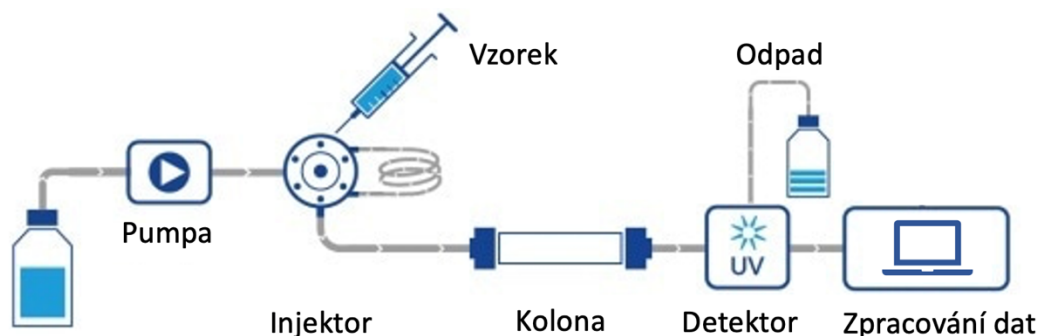
Analytická chemie je obor, který využívá analytických metod a technik k separaci, identifikaci a kvantifikaci hmoty od jednoduchých molekul až po složité směsi. Látky, které zkoumá, se nazývají analyty. Tento obor využívá, podle povahy cílové informace, kvalitativní a kvantitativní analýzu. Kvalitativní analýza se zaměřuje na identifikaci složení vzorku a dokazuje přítomnost jednotlivých analytů v podobě prvků, iontů a charakteristických chemických skupin. Kvantitativní analýza je založena na stanovení množství jednotlivých analytů ve vzorku, které je vyjádřené látkovým množstvím, hmotností nebo koncentrací. Nejvýznamnější zástupci zde využívaných metod jsou chromatografické, spektroskopické, spektrometrické a rezonanční techniky (Skoog *et al.*, 2014).

#### 3.4.1 Kapalinová chromatografie

Chromatografie je souhrnné označení pro skupinu fyzikálně-chemických separačních metod, jejichž podstatou je rozdělení složek směsného vzorku mezi stacionární a mobilní fázi. Vzorek rozpuštěný ve fluidním rozpouštědle nazývaném mobilní fáze je unášen přes stacionární fázi. Podle povahy mobilní a stacionární fáze se chromatografické techniky dělí na plynové a kapalinové (McMurry, 2010).

Dnes je nejčastěji používána kapalinová chromatografie. Tato technika funguje na principu vzorku rozpuštěného v kapalinovém rozpouštědle mobilní fáze, který je unášen přes porézní stacionární fázi. Na základě rozdílného chemicko-fyzikálního faktoru mezi fázemi (například polarity) vykazují analyty vzorku podle své chemické povahy rozdílnou afinitu ke stacionární fázi, kterou jsou na základě tohoto mechanismu zadržovány po různě dlouhou dobu, tu nazýváme retenční čas. Kapalinové chromatografie pracují, podle typu mezifázové interakce, na principech adsorpce, permeace, iontové výměny, afinity či chirace (Karger, 1997).

Na konci 60. let minulého století byl představen koncept vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Oproti předchozím variantám probíhá pohyb mobilní fáze za tlaku 20–40 MPa přes kolonu o průměru 2,1–4,6 mm obsahující stacionární fázi v podobě částic o průměru 3–50  $\mu\text{m}$  směrem k detektoru (UV/Vis, fotodiodové pole, hmotnostní spektrometr). Analyty směsného vzorku jsou od sebe odděleny v důsledku jejich různého stupně fyzikální nekovalentní interakce s částicemi stacionární fáze, typicky dipól-dipól a iontové. Tato metoda je schopna realizovat přesnou separaci desítek nízko i makromolekulárních analytů ze složitých matic v řádu minut. HPLC je běžně využívaná ve farmacii, biochemii, forenzních vědách, potravinářském a polymerním průmyslu. 90 % analytických separací látek netěkavé povahy je realizováno touto metodou (Rimmer, 2019).



Obrázek 3.11: Základní koncept procesu HPLC

Proces, ve kterém je stacionární fáze polárnější než mobilní fáze, se nazývá kapalinová chromatografie na normální fázi (NPLC) a naopak, tam kde je polárnější rozpouštědlo, je zaveden termín kapalinová chromatografie na reverzní fázi (RPLC). V současnosti více preferovaná RPLC chromatografie využívá středně polární mobilní fázi, která je nejčastěji složena z určitého poměru vody a methanolu nebo acetonitrilu. RP–HPLC funguje na principu hydrofobních interakcí, který pramení z vysoké symetrie v dipolární struktuře vody. Změnou poměru vody a organického rozpouštědla je možné přizpůsobit polaritu mobilní fáze podle vlastností analytu, a tím optimalizovat proces retence (Ali, 2022). Celkově jsou polarita, teplota a pH faktory, kterými lze ovlivňovat vlastnosti mobilní fáze na izotaktickém nebo gradientním principu (Xiang, Liu and Lee, 2006).

Běžnou stacionární fází pro RPLC je porézní oxid křemičitý ve formě částic o průměru 2–50  $\mu\text{m}$ , na jehož hydroxylové skupiny je navázaný oktadecylový uhlíkový řetězec (-C18), oktylový uhlíkový řetězec (-C8) nebo kyanoskupina (-CN) (Ali, 2022). Částicová forma stacionární fáze bývá nově nahrazována monolitickými strukturami, které umožňují separaci za kratší dobu při nižším tlaku. Jedná se o křemičité nebo polymerní bloky s vysoce porézní interkonektivní strukturou, které jsou funkcionalizované totožnými ligandy jako jejich částicové formy (Masini and Svec, 2017). Další, poměrně novou formou stacionární fáze jsou povrchově porézní částice o průměru 1,5–5  $\mu\text{m}$ . Ve srovnání s plně porézními částicemi zajišťují účinnější přenos hmoty, což vede za stejného tlaku k vyšší separační účinnosti. Povrchově porézní částice se skládají z křemíkového, méně často aluminiového nebo polymerního jádra a křemíkového pláště s definovanou porozitou (Preti, 2016).

Vývoj HPLC metod probíhá směrem k rychlejšímu, účinnějšímu a přesnějšímu stanovení, v kombinaci se snahou o minimalizaci produkce toxického odpadu v podobě organických rozpouštědel mobilní fáze. Probíhá tak rychlý vývoj v miniaturizaci, automatizaci a zvyšování provozních tlaků separačních systémů.

Jedním z vývojových směrů je využití ultravysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHLPC). Tato metoda pracuje s tlakem 90–150 MPa a zároveň jemnějšími elementy stacionární fáze – 2  $\mu\text{m}$  v případě plně porézních, 3  $\mu\text{m}$  v případě povrchově porézních, umístěných v užších a kratších kolonách (Xiang, Liu and Lee, 2006). Dalším stupněm miniaturizace jsou mikro/nanofluidní systémy, které pracují na bázi lab-on-chip a vykazují rozdílné konstrukční charakteristiky, které zohledňují změnu tokových charakteristik kapalin v nanolitrových objemech. Tyto systémy přináší velmi přesnou a rychlou analýzu v oblasti biofarmak a nukleotidů. Novým trendem je také zavedení takzvané multidimenzionální chromatografie a různých at-line procesních operací (Rimmer, 2019).

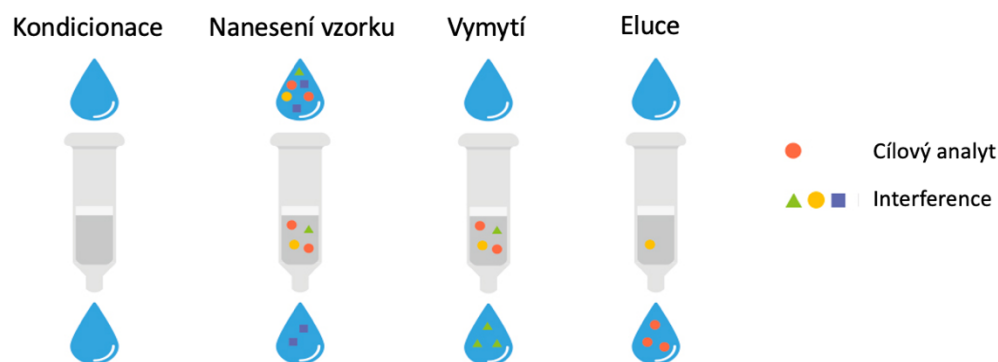
### 3.4.2 Úprava vzorků metodou SPE

Ve většině chemických analýz není odebraný vzorek vhodný pro přímou analýzu a musí být upraven do vhodné formy. Vzorek bývá často složitou směsí analytů, interferenčních nečistot a matrice. Převedení jakéhokoli vzorku do formátu ideálního pro měření analytu se nazývá úprava vzorku. Ta bývá kritickým krokem celkové analýzy, který určuje přesnost a časovou náročnost procesu. Cílem úpravy vzorků je jejich transformace do formy vhodné pro měření pomocí čištění, zjednodušení a předkoncentrování pro zlepšení detekčního limitu (Fumes *et al.*, 2015).

Strategie přípravy kapalných vzorků jsou obvykle založeny na extrakci kapalina–kapalina (LLE) nebo extrakci na tuhou fázi (SPE), která je v současnosti díky řadě výhod upřednostňována. Hlavními přednostmi této metody jsou vysoká extrakční výtěžnost, nižší spotřeba rozpouštědel, zjednodušení vzorku, zkrácení času analýzy, univerzálnost a snadná adaptabilita na HPLC. Metoda využívá k extrakci velmi širokou škálu sorbentů v podobě tuhých mikroporézních struktur, které lze variabilně měnit podle povahy analytů. Cílem této metody je extrakce požadované sloučeniny z kapalného vzorku v kvalitě, která umožňuje následnou analýzu (Płotka-Wasyłka *et al.*, 2015).

Mechanismus účinku SPE je založen na interakci mezi pevnou fází sorbentu a kapalným vzorkem obsahujícím analyty, který je autonomně nebo za tlakového gradientu perkolován přes jeho strukturu. Na základě fyzikálně-chemických vlastností pevného sorbentu, matrice a molekul analytu dochází k interakcím typu  $\pi$ – $\pi$ , dipól–dipól, vodíkových můstků a Van der Waalových sil. SPE se ve své podstatě řídí stejnými retenčními a elučními mechanismy jako kapalinová chromatografie, které lze rozdělit na polární, nepolární a iontové (Ötles and Kartal, 2016).

V závislosti na použitém mechanismu dochází k selektivní extrakci, selektivní eluci nebo selektivnímu promytí. Pokud je zvolen selektivní sorbent, jsou navázány požadované interference nebo analyty, které následně eluční činidlo uvolní. Naopak sorbent neselektivní povahy naváže interference spolu s analyty a selektivní činidlo pak vymyje pouze interference nebo eluuje analyty. Těmto krokům (obrázek 3.12) však vždy předchází kondicionace organickým rozpouštědlem, které je voleno podle druhu sorbentu, a umožní odstranění nečistot vzniklých při jeho výrobě a u některých druhů také aktivaci – rozvinutí uhlíkových řetězců. SPE vyžaduje zohlednění některých klíčových parametrů pro výběr nejvhodnějších podmínek optimálního fungování metody. Jakmile je vybrán sorbent v závislosti na povaze vzorku a cílových analytů, je třeba zvolit odpovídající hodnotu pH, teplotu, iontovou sílu, čas jednotlivých kroků a způsob agilace (Badawy *et al.*, 2022).



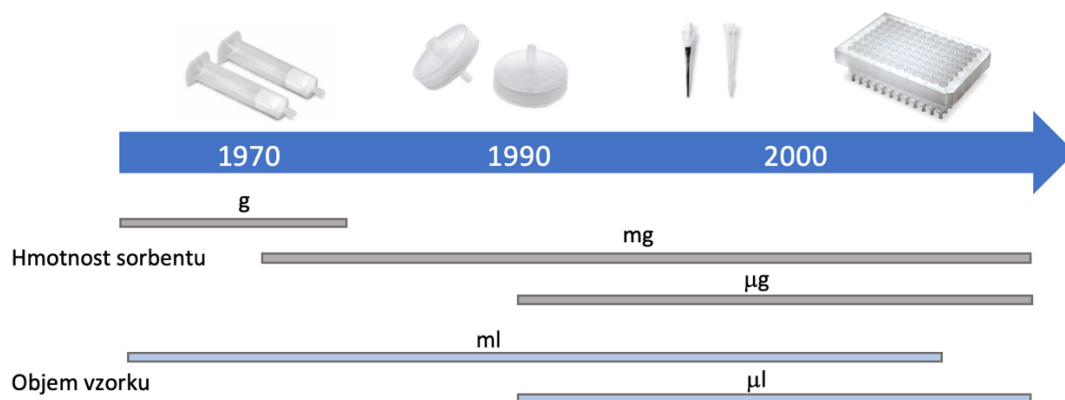
Obrázek 3.12: Jednotlivé kroky SPE při použití neselektivního sorbentu

### 3.4.3 Uspořádání SPE

Důležitými aspekty SPE jsou nejenom sorbenty a podmínky procesu, ale také samotné konstrukční uspořádání, které prošlo během let podstatným vývojem. Nejběžnějším formátem jsou jednorázové kolonky v podobě polypropylenové stříkačky variabilních rozměrů naplněné různým množstvím sorbentu (částice o průměru 40  $\mu\text{m}$ ) mezi dvěma fritami. Nejběžněji používaná konfigurace je 0,5 g sorbentu v 5 ml kolonce. Vzorek při úpravě protéká sorbentem shora pomocí přetlaku vyvíjeného pístem nebo podtlakem. Metoda vyniká svou jednoduchostí a variabilitou použití, ty ovšem limitují nízké průtokové rychlosti (Nema, Chan and Ho, 2010). Extrakční disky oproti kolonkám využívají rozdílnou geometrii uložení sorbentu. V případě disků je sorbent uložen ve větší ploše a tenčí vrstvě mezi dvěma filtry ze skelných vláken nebo polymerní membrány. Filtry současně umožňují použití jemnějších částic sorbentů o průměru 8  $\mu\text{m}$ . Tyto specifikace zaručují účinnější přenos hmoty při vyšších průtokových rychlostech (Thurman and Snavely, 2000).

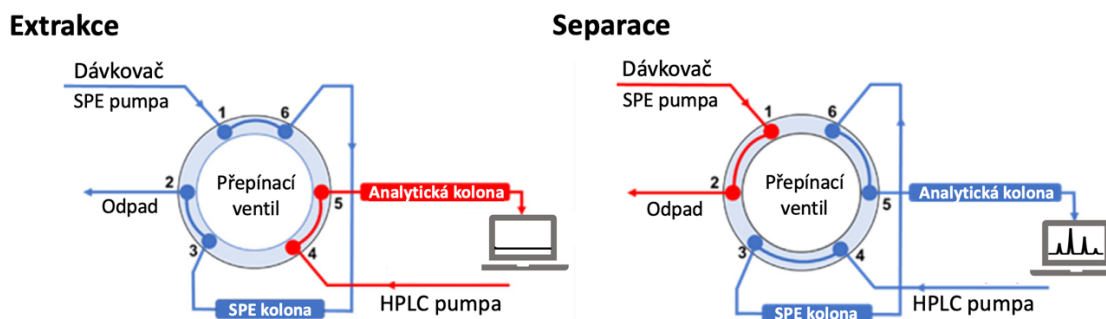


Prvním formátem, vycházejícím ze snahy o miniaturizaci, jsou jednorázové pipetovací špičky, nejčastěji používané pro nízkoobjemové vzorky s proteinovými nebo peptidovými složkami. Sorbent na bázi částic (20–30  $\mu\text{m}$ ), nebo nově monolitu, je imobilizován před ústím pipetovací špičky. Výhodou tohoto provedení je částečná automatizace spojená s úsporou času a objemu potřebných rozpouštědel. Na druhé straně je metoda nevhodná pro komplexnější matrice, které mohou zablokovat ústí špičky (Shen *et al.*, 2013). Mikrotitrační destičky představují další posun v miniaturizaci a automatizaci SPE. Jedná se o soustavu miniaturních extrakčních patron integrovaných do perforované destičky s 96, 384 nebo 1536 pozicemi. Každá patrona o objemu 0,65–2 ml obsahuje 3–200 mg sorbentu umístěného mezi frity. Tato konstrukce umožňuje ve spojení s manipulátory automatizaci úpravy vysokého počtu maloobjemových vzorků v krátkém čase (Mirnaghi *et al.*, 2011).



Obrázek 3.13: Vývoj konstrukčního uspořádání SPE

Vývoj přístrojové techniky, a především samotných analyzátorů, přinesl do dnešních dnů markantní zrychlení samotné analýzy, v důsledku čehož pak představuje úprava vzorku průměrně 60 % času celé analytické procedury. Tento stav vychází z takzvaného off-line uspořádání, kdy jsou běžné metody úpravy vzorku prováděny manuálně mimo analytický systém. Proto je v moderní analytice zaváděno on-line uspořádání, umožňující úpravu vzorku technologicky spojenou přímo s následujícím krokem analýzy. Tato metoda přináší výraznou úsporu času i rozpouštědel a zpřesnění úpravy, ale je mnohem náročnější na optimalizaci všech parametrů a odbornost obsluhy. Kombinace SPE–HPLC získává v současnosti velkou oblibu a začíná být běžně využívána ve vysoce specializovaných laboratořích, které zpracovávají velké množství vzorků. Instrumentální uspořádání spočívá v HPLC systému s okruhem pro SPE obsahující sorbent v kolonce a okruhem pro samotnou analýzu. Spojení s těmito okruhy je řízeno přes přepínací ventil, který řídí toky mobilních fází (obr. 3.14). Rozměry extrakčních kolonek se pohybují obvykle v rozmezí 10–20 mm  $\times$  1–4,6 mm (Hyötyläinen, 2007).



Obrázek 3.14: Schéma instrumentálního uspořádání on-line SPE-HPLC

### 3.4.4 Sorbenty pro SPE

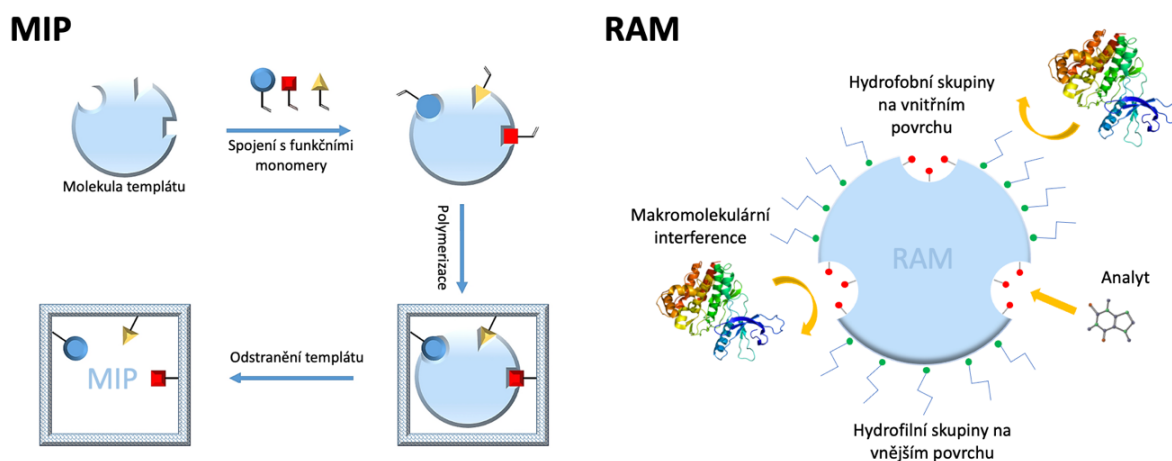
Sorbenty hrají klíčovou roli při kvalitní úpravě vzorků metodou SPE a představují oblast s vysokým vývojovým potenciálem. Extrakční sorbenty musí splňovat některé specifické nároky. Zásadní jsou chemická, termická i strukturální stabilita. Dále je to selektivita, spojená s dostatkem vazebných míst v podobě funkčních skupin a jednoznačnosti jejich zastoupení. Ze strukturálního hlediska je kladen důraz na homogenitu, vysokou porozitu, členitost povrchu, od kterých se odvíjí vysoká míra měrného povrchu poskytující dostatečnou plochu extrakčních interakcí. Nezanedbatelným faktorem je také vysoká reprodukovatelnost výroby.

Nejpoužívanější skupinou extrakčních sorbentů jsou oxidy křemíku v podobě částic nebo monolitických struktur, které jsou velmi heterogenní a mechanicky odolné. Další výhodou je poměrně vysoká extrakční účinnost a všestrannost. Avšak nízká stabilita křemičitanů mimo hodnoty pH v rozmezí 2–8 a poměrně malá extrakční specifita jsou poměrně omezujícími faktory. Tyto sorbenty jsou využívány pro extrakce polárních analytů, a to v nativní formě nebo s povrchově navázanými amino- či kyano- skupinami, které zvyšují extrakční specifitu. Naopak extrakci nepolárních analytů umožňují křemičitanů s povrchově navázanými uhlíkovými řetězci. Funkcionalizované křemičitanů ovšem vykazují na povrchu určitou část neobsazených silanových skupin, které způsobují nežádoucí sekundární interakce. Limitace křemičitanů dnes překonávají do určité míry polymerní sorbenty na bázi kopolymerů styrenu a divinylbenzenu, které mohou být povrchově modifikované totožnými skupinami. Polymerní sorbenty jsou stabilní v celém rozsahu pH a nevykazují sekundární interakce (Buszewski and Szultka, 2012).

Obecně je jedním z problémů chemické analýzy zpracování environmentálních nebo lékařských vzorků s přítomností značného množství vody či dalších polárních složek a analytů s vysokou molekulovou hmotností. Pro tyto vzorky většina neselektivních sorbentů vykazuje rozdělovací koeficienty neupřednostňující extrakci analytů, nebo naopak vykazující nevratnou extrakci. Z tohoto důvodu je trendem vývoj nových sorbentů s vysokou selektivitou/specifitou vůči cílovým analytům (Augusto *et al.*, 2013).

Molekulárně vtištěné polymerní sorbenty (MIP) se skládají z vysoce zesíťovaných polymerů, které mají předem stanovenou selektivitu pro jeden analyt nebo skupinu strukturně příbuzných analytů. Selektivita je zavedena během syntézy sorbentu použitím vhodné templátové molekuly k vytvoření specifických dutin. Vzhledem k vysoké selektivitě poskytují nižší detekční limity. MIP jsou však vhodné spíše pro extrakci analytů v podobě větších molekul (Vasapollo *et al.*, 2011).

Média s omezeným přístupem (RAM) jsou vysoce specializované sorbenty, které kombinují vyloučení velikosti s dalším retenčním mechanismem. Například RAM s vnitřním povrchem s reverzní fází se skládá z oxidu křemičitého, jehož vnitřní póry (~120 Å) jsou funkcionalizovány skupinami s reverzní fází (C18, C8, C4), zatímco vnější povrch je hydrofilní a sestává z materiálu, jako je například methylcelulóza. Velké molekuly, které nemají přístup k pórům, nejsou zachovány, zatímco menší molekuly zůstávají. Tyto typy sorbentů jsou zvláště užitečné pro odstraňování složek matrice (proteiny, nukleové kyseliny) z komplexních biologických vzorků, jakými jsou krev, sérum, moč nebo mléko (Souverain, Rudaz and Veuthey, 2004).



Obrázek 3.15: Schéma mechanismu přípravy MIP sorbentu a extrakce RAM sorbentu

Organometalické sítě (MOF) jsou novým typem vysoce selektivních sorbentů na bázi hybridních anorganicko-organických mikroporézních krystalických materiálů, které se přímo sestavují z iontů kovu s organickými linkery prostřednictvím koordinačních vazeb. MOF disponují širokou škálou materiálových kombinací, chemickou stabilitou a velmi vysokou mírou měrného povrchu. Specifická struktura a velikost pórů umožňuje selektivní adsorpci molekul malé velikosti. Navíc lze snadno dosáhnout selektivní funkcionalizace pórů nebo vnějšího povrchu (Hu, He and Chen, 2015).

Dalším stupněm ve vývoji nových forem extrakčních sorbentů jsou nanomateriály. Ty přinášejí ideální platformu nabízející unikátní strukturní vlastnosti, široký výběr využitelných materiálů, variabilitu forem a nepřeborné množství možných funkcionalizací. To jsou vlastnosti nezbytné ke zvýšení extrakční účinnosti a selektivity sorbentů. Ačkoliv by se mohlo zdát, že využití různých druhů nanočástic představuje ideální volbu, i přes výborné extrakční vlastnosti je tato forma výrazně limitována jejich integrovatelností do kompaktních sorpčních formátů, náročností výroby a cenou (Lucena *et al.*, 2011).

### 3.4.5 Nanovláknenné sorbenty pro SPE

Nanovláknena disponují pro SPE celou řadou výhod. Stejně jako nanočástice vykazují vysoký měrný povrch k jejich objemu, širokou škálou využitelných materiálů (zejména polymerů) a snadnou funkcionalizaci povrchu i hmoty celou řadou technik. Nanovláknena ovšem na rozdíl od nanočástic umožňují tvorbu kompaktních vláknenných struktur s vysokým stupněm celkové porozity a snadnou manipulovatelností. Zejména objemnější formy polymerních nanovláknenných struktur, díky zmiňované celkové porozitě v kombinaci s elasticitou a tuhostí, umožňují uniformní průtok vzorku s minimálním zpětným tlakem. Využití nanovláken v SPE tak přispívá k trendu miniaturizace, kdy i při použití menšího množství sorbentu je zachována dostatečná extrakční kapacita, což vede k úspoře času a toxických rozpouštědel (Chigome and Torto, 2011).

Napříč studii jsou nejčastěji používána polystyrenová (PS) nebo polyamidová (PA) nanovláknena vyrobená metodou elektrického zvláknění na bázi stejnosměrného proudu, umístěná zejména v kolonkách, discích a pipetovacích špičkách při off-line extrakcích. PS nanovláknena ukazují potenciál pro účinnou extrakci lipofilních analytů a analytů s aromatickými skupinami obsaženými ve většině biologicky aktivních látek. Tento polymer umožňuje hydrofobní a  $\pi$ - $\pi$  interakce podstatné pro vysokou výtěžnost cílových analytů z polárních rozpouštědel [26]. Na druhou stranu se ukazuje hydrofobnost PS jako problematická směrem k dostatečnému smáčení vodnými vzorky. Dalším limitujícím faktorem je poměrně nízká mechanická odolnost PS daná jeho křehkostí (Proskurina *et al.*, 2007). PS lze využít v kolonkách k extrakci lipofilního trazodonu z lidské plazmy, kde prokázal vysokou míru opakovatelnosti (Kang *et al.*, 2007). Nanovláknena PA6 prokazují příznivé vlastnosti pro izolaci a extrakci látek s fenolickou skupinou, jako jsou flavonoidy a antokyany. Xu a kol. popisují použití nanovláken PA6 pro extrakci docetaxelu z králičí plazmy. SPE disky s planární nanovláknennou vrstvou vykazují až 85% výtěžnost (Xu *et al.*, 2010). PA6 nanovláknena oproti PS vykazují vyšší strukturální stabilitu a lze je také omezeně využít v on-line metodách (Bagheri, Asgari and Piri-Moghadam, 2014). Dalším využívaným polymerem je PAN a jeho uhlíkové deriváty (Tavengwa *et al.*, 2016).

Avšak nanovlákná v základní formě nedokáží vyhovět všem vývojovým požadavkům moderní úpravy, proto jsou dále funkcionalizována do podoby vícesložkových kompozitů. Nejčastěji se jedná o kombinace vláken s různými nanočásticemi inkorporovanými ve hmotě, tak aby nedocházelo k jejich uvolňování a vzniku nežádoucích interferencí. Příkladem mohou být například PAN nanovlákná s inkorporovanými 10 hm. % MOF v kolonkách pro extrakci levonorgestrelu z moči (Asiabi, Mehdinia and Jabbari, 2015). Směs PAN a PC nanovláken obsahující aktivní molekuly dithionu lze velmi účinně využít pro extrakci olova z vody (Deng *et al.*, 2011). Další možností je využití nanovláken jako nosiče, jehož povrch je pokrytý souvislým povlakem. Afinitu PAN k navázání nitrilových skupin lze využít pro tvorbu kompaktního povlaku hydrazinu na povrchu nanovláken využitých pro předkoncentrování iontů Cu (II) a Pb (II) z vody (Saeed, Park and Oh, 2011).

Nanovlákná pro tvorbu pokročilých extrakčních sorbentů lze funkcionalizovat také za využití již známých principů využívaných v SPE. MIP přístup v případě PET/poly(allyl)aminových nanovláken pro selektivní vazbu trihalogenoctových kyselin. Tvorba selektivních kavit je zajištěna použitím kyseliny trifluoroctové jako templátové molekuly (Chronakis *et al.*, 2006). Jiným přístupem je využití principu imunisorbentů, kdy jsou na povrch PS nanovláken navázány například protilátky specifické k trombinu, který tak může být použit pro selektivní extrakci tohoto proteinu z plazmy (Kim *et al.*, 2011).

Nicméně trendem jsou další miniaturizace a zrychlování procesu SPE, spojené s on-line metodami a využitím vyšších tlaků, jsou kladeny náročnější požadavky i na samotné nanovlákné sorbenty. Nanovlákné struktury vyráběné běžným elektrickým zvlákňováním na principu stejnosměrného proudu nemají potřebný stupeň celkové porozity na zajištění uniformního průtoku vzorku za vysokých tlaků bez toho, aniž by docházelo k nárůstu protitlaku nebo kolapsu jejich struktury. Dalším požadavkem je potřeba nejenom vysoce porézních, ale také objemných a mechanicky odolnějších materiálů, využitelných pro účinnější systémy plnění extrakčních kolonek, nebo pro takzvané „stand-alone“ sorbenty. To vylučuje využití konvenčního elektrického zvlákňování. Proto začínají být pro výrobu extrakčních sorbentů využívány alternativní technologie, jakými jsou odstředivé zvlákňování (Vazquez, Vasquez and Lozano, 2012), elektrické zvlákňování na bázi střídavého proudu (Erben *et al.*, 2022) nebo technologie meltblown (Cabello-Alvarado *et al.*, 2022), které umožňují výrobu polymerních objemných struktur s vlákny o průměru v řádech stovek nanometrů až po jednotky mikrometrů.

### 3.5 Shrnutí teoretické části a stanovení tezí

Na základě poznatků uvedených v teoretické části lze potvrdit širokou škálu možností využití BP. Zejména skupina syntetických alifatických polyesterů představuje vhodné kandidáty pro využití v technologii meltblown. Příznivá využitelnost spočívá v jejich termoplastickém chování a v přijatelném stupni polydisperzity ( $< 2$ ) z kterého se odvíjí vhodné hodnoty MFR (100–200) taveniny. **Polymery s těmito vlastnostmi jsou zejména PLA a PCL.**

Ovšem jak dokládají dostupné studie, testováno bylo do současných dnů ve většině případů PLA a existuje pouze několik málo studií popisujících využití vysokomolekulárního PCL ve směsích s jinými polymery. **Neexistují tak v současnosti žádné dostupné zdroje popisující využití samotného PCL.**

Avšak na základě dostupných dat lze usuzovat, že samotné PCL je technologií meltblown zpracovatelné. Tento polymer je v současné době dostupný o molekulových hmotnostech v rozmezí 25 000–80 000 g/mol. Z publikovaných dat gradientu hodnot MFR pro vyšší molekulové hmotnosti je možné vyvodit předpoklad, že PLC v rozmezí 20 000–30 000 g/mol disponuje hodnotami MFR  $> 200$  při minimálním poklesu mechanických vlastností. V porovnání s PLA disponuje tavenina tohoto polymeru termickou stabilitu v širším teplotním rozmezí, což v kombinaci s nízkou teplotou tání potenciálně snižuje energetickou náročnost zpracování. Další výhodou PCL je jeho velmi dobrá elasticita, která tak vylučuje jednu z hlavních nevýhod PLA, kterou je přílišná rigidita výsledných vláken. Současná tržní cena dostupného granulátu je 500 € za kilogram, tedy v porovnání s PLA nebo dokonce technickými polymery výrazně vyšší. Tato cena je ale již racionální právě pro speciální maloobjemové produkty v takzvaných „high cost“ aplikacích, kterými se práce zabývá.

S ohledem na široké rozpětí termické stability a nízké teploty tání bude pravděpodobně třeba dosahovat vysokých poměrů tavenina/vzduch a vyšších vzdáleností tryska-kolektor pro dostatečnou míru chladnutí taveniny. Při zhodnocení technologických možností dostupného zařízení bude možné parametrické testování procesu především skrze změny teplotního nastavení a vzdálenosti tryska-kolektor. Na základě předpokládaného tokového chování PCL taveniny lze očekávat průměry výsledných vláken zejména v mikrometrických rozměrech s minimem vláken o průměru pod hranicí jednoho mikrometru.

Z výzkumů zabývajících se vývojem *in situ* scaffoldů pro regeneraci kostní tkáně vyplývá jasný trend směrem k využití kompozitních materiálů, které jsou schopny vyhovět mnoha požadavkům kladeným na tyto nosiče. **Dané požadavky jsou převážně mechano-strukturní povahy s cílem vyplnit stabilně kostní defekt, zajistit dostatečnou stimulaci okolní tkáně, a tím migraci buněk do scaffoldu.** Jeho struktura musí následně moderovat vnitřní proliferaci a dostatečnou diferenciaci buněk doprovázenou mineralizací, vaskularizací a inervací vznikající tkáně. Nedávné výzkumy ukazují, že scaffoldy nemusí za určitých podmínek nezbytně dosahovat pevností kostní tkáně, a to zejména jsou-li využívány pro nenosné defekty kavitózní povahy a jejich degradace postupuje spolu s nárůstem a mineralizací vznikající tkáně. Za těchto podmínek má význam použití polymerních vláknenných scaffoldů z dlouhodobě degradujícího PCL.

Konkrétními požadavky jsou:

- celková objemnost,
- tvarová variabilita a dobrá dělitelnost materiálu,
- vysoký stupeň celkové porozity,
- průměry pórů v rozmezí 100–200  $\mu\text{m}$ ,
- interkonektivita jednotlivých pórů,
- homogenní zastoupení mikro i nanostrukturních prvků,
- strukturální stabilita,
- Youngův modul  $>100$  kPa, dostatečná schopnost vratných deformací,
- biokompatibilita,
- dlouhodobá *in vivo* degradace nastupující po 12 měsících od implantace.

V případě sorbentů pro úpravy vzorků metodou extrakce na tuhé fázi je uplatňován podobný trend, spočívající ve využití vícesložkových kompozitních sorbentů. **Nároky na mechano-strukturální vlastnosti extrakčních sorbentů jsou do velké míry shodné se scaffoldy pro regeneraci kostní tkáně.** V případě sorbentů je však kladen větší důraz na celkovou míru porozity, hodnotu měrného povrchu a jeho chemicko-fyzikální vlastnosti. Ty pak umožňují nízký odpor proti průtoku mobilní fáze, vysokou míru extrakční účinnosti danou potřebnou plochou a potřebnou selektivitou spojenou s počtem i jednoznačností vazebných míst v podobě funkčních skupin. Většina komerčně používaných selektivních sorbentů, keramických i polymerních, je poměrně rigidních a křehkých, což je spojeno vysokou citlivostí při nešetrné manipulaci nebo nesprávném použití. Dalším požadavkem na nové extrakční sorbenty je tak vyšší míra odolnosti při manipulaci a různých podmínkách využití, daná potřebnou mírou houževnatosti a schopnosti vratné deformace. To jsou opět nároky, kterých lze docílit využitím polymerních vláknenných struktur.

Konkrétními požadavky jsou:

- celková objemnost,
- tvarová variabilita a dobrá dělitelnost materiálu,
- vysoký stupeň celkové porozity,
- vysoká míra měrného povrchu,
- strukturální homogenita,
- chemická, termická i strukturální stabilita,
- schopnost vratných deformací, houževnatost,
- vysoká hustota vazných míst a jejich jednoznačnost,
- prvotní odolnost proti hydrolytické degradaci.

**Je zřejmé, že pro docílení takto komplexního souboru požadavků není možné využít pouze jednosložkový materiál v podobě mikrovlákněné struktury vytvořené technologií meltblown, ale bude zapotřebí využití vícesložkového kompozitního systému.**

Na základě těchto podmínek je definována teze, popisující princip tvorby základního kompozitu za využití dvou rozdílných vlákněných složek směsovaných v lineárním proudu vzduchu bezprostředně po jejich zformování, kterým jsou následně unášeny a ukládány na zachytném kolektoru do podoby netkané textilie.

První ze složek tohoto kompozitu jsou PCL mikrovlákna produkovaná technologií meltblown. Ta reprezentují hlavní objemovou složku dodávající kompozitu potřebné mechanické vlastnosti. Technologie meltblown také zajistí potřebnou produktivitu výrobního procesu.

Druhou složku představují nanovlákna produkovaná elektrickým zvlákněním z téhož polymeru, která přináší potřebnou míru podpory buněčné adheze a současně zvyšuje specifický měrný povrch výsledného kompozitu.

Samotný způsob výroby je navržen jako kombinace technologie meltblown a elektrického zvláknění, jehož části jsou orientovány tak, aby se formovaná nanovlákna unášená elektrickým větrem v prostoru mezi spinneretou a protielektrodou střetávala s příčně procházejícím lineárním proudem primárního vzduchu za následného promísení s mikrovlákny. Lineární proudění vzduchu ukládající promísená nanovlákna a mikrovlákna na kolektor představuje nezbytný faktor pro zajištění vysoké míry celkové porozity a požadovaných průměrů pórů.



## 4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Experimentální část je koncipována jako komentovaný soubor devíti publikovaných prací, zaměřujících se na zpracování biodegradabilního PLC technologií meltblown a následné využití vytvořených vlákenných struktur ve tkáňovém inženýrství a analytické chemii. Tento soubor spolu s komentáři je tak rozčleněn na technologicko-materiálovou část a část aplikační, která se dále dělí na dvě oblasti. První z těchto oblastí popisuje využití vlákenných struktur ve tkáňovém inženýrství jako scaffoldů nepomáhajících regeneraci. Oblast druhá popisuje jejich využití jako extrakčních sorbentů pro předúpravu vzorků v analytické chemii.

### 4.1 Publikované práce

Soubor prací je tvořen jedním patentem a osmi vědeckými články publikovanými v impaktovaných časopisech prvního decilu/kvartilu a druhého kvartilu podle WOS-JCR, jejichž seznam přináší následující kapitola. Tyto práce jsou členěny do jedné technologické a dvou aplikačních částí tak, jak popisuje tabulka 4.1. Technologická část obsahuje před samotným komentářem patentu kapitolu představující studii zpracovatelnosti PCL technologií meltblown, na jejímž základě patent vznikl. Aplikační části začínají vždy jednou pilotní studií, která tvoří základ pro všechny následující zařazené články.

*Tabulka 4.1: Členění jednotlivých prací podle příslušných částí*

Technologicko-materiálová část	
Lukáš, 2016	
Tkáňové inženýrství	Analytická chemie
Erben, 2015	Háková, 2018
Erben, 2016	Háková, 2019
Rampichová, 2018	Šrámková, 2020
Erben, 2022	Raabová, 2020

Publikované práce jsou výsledkem mezioborové kooperace se skupinami Ústavu experimentální medicíny AV a Katedry analytické chemie Farmaceutické fakulty UK, se kterými autor úzce spolupracoval a využíval jejich zpětné vazby k vývoji materiálů, na jejichž testování se v rámci daných pracovišť částečně podílel. **Samotný významný přínos autora spočívá v návrhu a realizaci veškerých experimentálních prací spojených s technologií meltblown, kombinaci této technologie s elektrickým zvlákněním a vývojem finálního vlákenného kompozitu.** Autor také vykonával převážnou část všech testů realizovaných na svém pracovišti, a to včetně testů biologických. **Stejně tak byl zodpovědný za návrh a realizaci veškerých funkcionalizačních procesů a koncových úprav testovaného kompozitu směrem k aplikačním oblastem.** Podíl autora v rámci jednotlivých prací je uveden v následující kapitole.

Samotná technologicko-materiálová část popisuje testování zpracovatelnosti biodegradabilního PCL technologií meltblown. Výsledky zahrnují testování a identifikaci vhodného polymerního granulátu, na které navazuje stanovení technologického rámce vymezeného popisem procesních proměnných a jejich vlivu na výslednou strukturu i samotný polymer. Tato část je zakončena patentem, který popisuje způsob produkce kompozitních PCL struktur ze směsi mikro a nanovláken, a to kombinací technologií meltblown a elektrického zvlákňování.

První aplikační oblast shrnuje výsledky využití kompozitní vlákenné struktury pro regeneraci kostní tkáně, které představují tři prvoautorské a jeden spoluautorský článek. Popsáno je zejména stanovení *in vitro* biokompatibility, buněčné viability a proliferace kmenových i diferencovaných buněk v závislosti na struktuře kompozitního scaffoldu v *in vitro* prostředí. Zároveň jsou tyto testy provedeny v porovnání s vhodnými druhy referenčních materiálů. Tato část je pak zakončena ověřením biokompatibility a regenerační účinnosti *in vivo* na zvířecích modelech spolu s následným histologickým vyhodnocením.

Druhá oblast se věnuje studiu využití vlákenného kompozitu jako sorbentu pro metodu úpravy vzorků na tuhé fázi v kapalinové chromatografii a vychází ze čtyř spoluautorských článků. Ty popisují stanovení extrakční účinnosti pro vybrané druhy analytů v nízkotlakých i vysokotlakých systémech v závislosti na struktuře a materiálu sorbentu. Na to navazuje popis možnosti kombinace s 3D tiskem a také způsobu funkcionalizace kompozitního sorbentu polyfenoly. Výzkum je zakončen porovnávací studií s komerčními druhy sorbentů.

#### 4.1.1 Seznam publikovaných prací

Lukáš, D., Mikeš, P., Kuželová Košťáková, E., Pokorný, P., Novák, O., Sanetník, F., Chvojka, J., Havlíček, J., Jenčová, V., Horáková, J., Pilařová, K., **Erben, J.**, Kovačičin, J.

**Způsob a zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná, textilní kompozitní materiál obsahující polymerní nanovlákná**

*Patent* (2016), CZ 306018 B6

- Podíl autora: formulace tezí, návrh konstrukce, experimentální práce – vývoj metodiky a optimalizace podmínek, příprava podkladů pro podání přihlášky

**Erben, J.**, Pilařová., Sanetrník, F., Chvojka, J., Jenčová, V., Blažková, L., Havlíček, J., Novák, O., Mikeš, P., Prosecká, E., Lukáš, D., Kuželová Košťáková, E.

**The combination of meltblown and electrospinning for bone tissue engineering**

*Materials Letters* (2015), 143, 172 - 176 (IF<sub>2015</sub>: **2,437 – Q1**)

Citační ohlas: **29**

- Podíl autora: rešerše, návrh experimentu, výroba a charakterizace materiálů, biologické testování, příprava a revize publikace

**Erben, J.**, Jenčová, V., Chvojka, J., Blažková, L., Strnadová, K., Modrák, M., Kuželová Košťáková, E.

**The combination of meltblown technology and electrospinning – the influence of the ratio of micro and nanofibers on cell viability**

*Materials Letters* (2016), 173, 153 - 157 (IF<sub>2016</sub>: **2,572 – Q2**)

Citační ohlas: **14**

- Podíl autora: rešerše, návrh experimentu, výroba a charakterizace materiálů, příprava a revize publikace

Rampichová, M., Chvojka, J., Jenčová, V., Kubíková, T., Tonar, Z., **Erben, J.**, Buzgo, M., Daňková, J., Litvinec, A., Vocetková, K., Plecner, M., Prosecká, E., Sovková, V., Lukášová, V., Králíčková, M., Lukáš, D., Amler, E.

**The combination of nanofibrous and microfibrous materials for enhancement of cell infiltration and in vivo bone tissue formation**

*Biomedical Materials* (2018), 13(2), (IF<sub>2018</sub>: **2,897 – Q2**)

Citační ohlas: **18**

- Podíl autora: návrh, výroba a charakterizace materiálů, návrhu metodiky použití implantátů, částečná příprava publikace

**Erben, J.**, Jirkovec, R., Kalous, T., Klíčová, M., Chvojka, J.

**The combination of hydrogels with 3d fibrous scaffolds based on electrospinning and meltblown technology**

*Bioengineering* (2022), 9(11), (IF<sub>2022</sub>: 4,600 – Q2)

Citační ohlas: –

- Podíl autora: řešerše, návrh experimentu, výroba a charakterizace materiálů, příprava a revize publikace

Háková, M., Chocholoušová Havlíková L., Chvojka, J., **Erben, J.**, Solich, P., Švec, F., Šatínský, D.

**A comparison study of nanofiber, microfiber, and new composite nano/microfiber polymers used as sorbents for on-line solid phase extraction in chromatography system**

*Analytica Chimica Acta* (2018), 1023, 44-52 (IF<sub>2018</sub>: 5,256 – Q1)

Citační ohlas: 26

- Podíl autora: návrh, výroba a charakterizace materiálů, podíl na návrhu metodiky využití sorbentů, částečná příprava publikace

Háková, M., Chocholoušová Havlíková L., Chvojka, J., **Erben, J.**, Solich, P., Švec, F., Šatínský, D.

**Polycaprolactone nanofibers functionalized with a dopamine coating for on-line solid phase extraction of bisphenols, betablockers, nonsteroidal drugs, and phenolic acids**

*Microchimica Acta* (2019), 186, (IF<sub>2019</sub>: 6,232 – D1)

Citační ohlas: 16

- Podíl autora: návrh, výroba a charakterizace materiálů, vývoj funkcionalizačních postupů, částečná příprava publikace

Šrámková, H. I., Horstkotte, B., **Erben. J.**, Chvojka, J., Švec, F., Solich, P., Šatínský, D.

**3D-printed magnetic stirring cages for semidispersive extraction of bisphenols from water using polymer micro- and nanofibers**

*Analytical Chemistry* (2020), 92, 5, 3964-3971 (**IF<sub>2020</sub>: 6,986 – D1**) Citační ohlas: **16**

- Podíl autora: návrh, výroba a charakterizace materiálů, návrh způsobů kombinace s 3D tiskem, částečná příprava publikace

Raabová, H., Háková, M., Chocholoušová Havlíková, L., **Erben. J.**, Chvojka, J., Solich, P., Švec, F., Šatínský, D.

**Poly-ε-caprolactone nanofibrous polymers: a simple alternative to restricted access media for extraction of small molecules from biological matrixes**

*Analytical Chemistry* (2020), 92, 10, 6801–6805 (**IF<sub>2020</sub>: 6,986 – D1**) Citační ohlas: **7**

- Podíl autora: návrh, výroba a charakterizace materiálů, částečná příprava publikace

**Další publikace s přímou návazností na dané téma:**

Raabová, H., **Erben. J.**, Chvojka, J., Solich, P., Švec, F., Šatínský, D.

**The role of pKa, log P of analytes, and protein matrix in solid-phase extraction using native and coated nanofibrous and microfibrinous polymers prepared via meltblowing and combined meltblowing/electrospinning technologies**

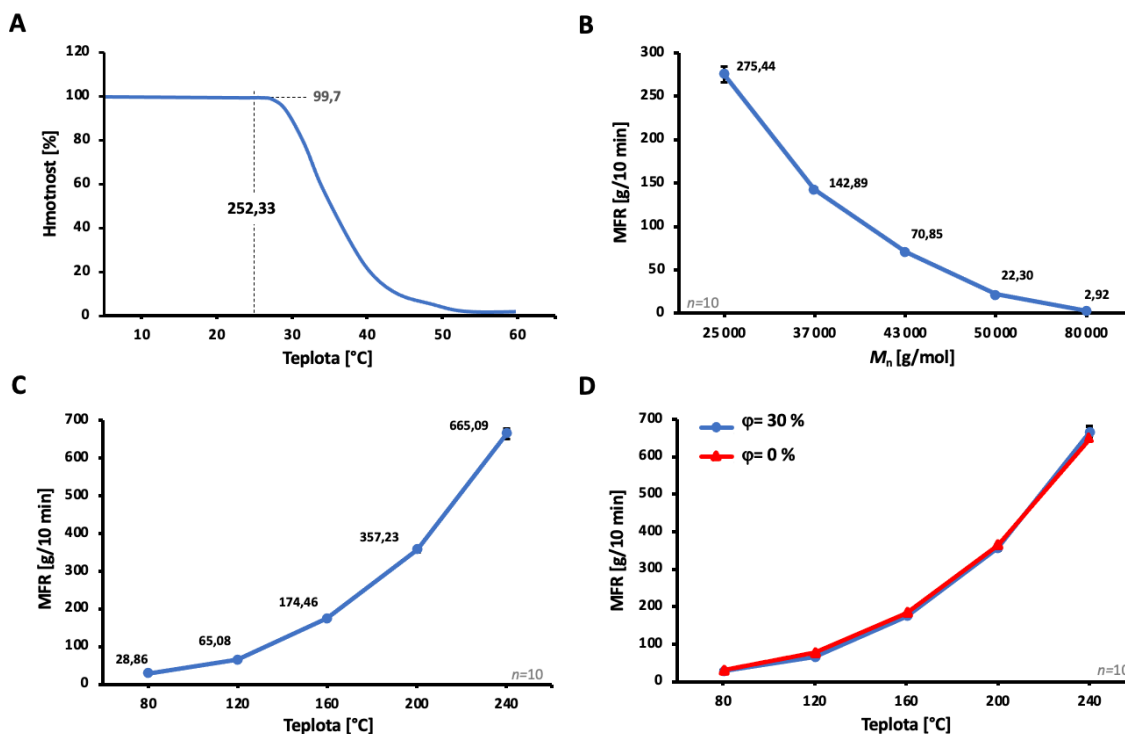
*Talanta* (2021), 232(3):122470 (**IF<sub>2021</sub>: 6,556 – Q1**) Citační ohlas: **2**

## 4.2 Studium zpracovatelnosti polykaprolaktonu technologií meltblown

V rámci technologicko-materiálové části předchází samotnému komentáři patentu shrnutí výsledků zpracovatelnosti PCL pro technologii meltblown. Tyto výsledky představují testování portfolia PCL granulátů různých molekulových hmotností s následným výběrem vhodného typu granulátu pro další experimentální práce. Samotné studium zpracovatelnosti pomocí technologie meltblown spočívalo ve stanovení základních procesních a technologických podmínek zpracování spolu s popisem vlivu vybraných parametrů na výslednou vláknennou strukturu. Vzhledem k vysokým nárokům na materiálovou stabilitu vyplývajícím z koncových aplikací je na závěr provedena kontrola případného nežádoucího vlivu zpracovatelských podmínek na vybrané charakteristiky vláknenných vrstev. Popis metodiky jednotlivých testů a měření je uveden jako příloha této práce.

### 4.2.1 Testování a výběr granulátu

Pro testování vybraných vlastností a následný výběr finálního polymeru byly použity PCL granuláty jedné výrobní řady (Polysciences, Inc.) s různými hodnotami číselné molární hmotnosti ( $M_n$ ) v rozmezí 25 000–80 000 g/mol.



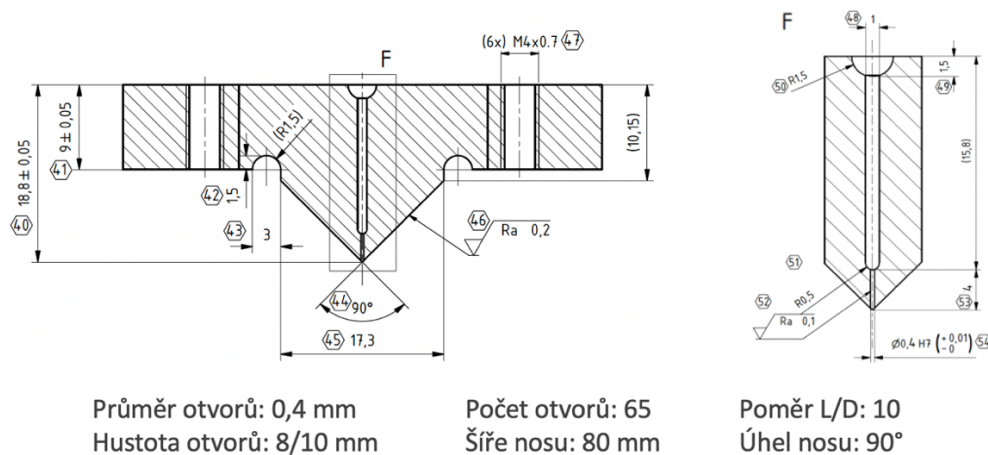
Obrázek 4.1: Termické vlastnosti PCL taveniny: A) TGA analýza termické degradace v závislosti na teplotě, B) hodnoty MFR v závislosti na číselné molární hmotnosti granulátu, C) hodnoty MFR v závislosti na teplotě, D) hodnoty MFR v závislosti na teplotě a podmínkách skladování granulátu

Index toku (MFR) těchto granulátů byl testován při teplotě 180 °C, která reprezentuje střed intervalu termické stability PCL taveniny, stanovený pomocí termogravimetrické analýzy (TGA) na obrázku 4.1A. Pouze granuláty s  $M_n$  25 000 a 37 000 g/mol, s hodnotami MFR 275,44 respektive 142,89 g / 10 min (obr. 4.1B), dosáhly tokových vlastností potřebných pro zpracování danou technologií. Na základě těchto hodnot byl pro další testování vybrán granulát s  $M_n$  25 000 g/mol. Stanovení dalších tokových vlastností vybraného polymeru proběhlo v rozmezí teplot 80–240 °C, který odpovídal intervalu termické stability taveniny (obr. 4.1A). Dostatečných tokových hodnot dosáhl granulát v teplotním rozmezí 160–240 °C, kde se hodnoty jeho MFR pohybovaly v rozmezí 174,46–665,09 g/10 min. Toto rozmezí tak předběžně vymezilo teplotní interval zpracovatelnosti vybraného PCL, potřebný pro následné parametrické studie.

Další sledovanou vlastností vybraného granulátu byl obsah vody vázané v polymeru, nezbytný pro případné stanovení sušicího procesu před zvlákněním. Nicméně granulát dlouhodobě kondicionovaný při 30% vlhkosti vzduchu obsahoval pouze 0,06 hm. % vody. Což bylo pravděpodobně způsobeno hydrofobní povahou PCL. Následné porovnání hodnot MFR granulátu kondicionovaného 48 hodin při 30% a vakuově při 0% vzdušné vlhkosti přineslo téměř shodné hodnoty se zanedbatelnými odchylkami měření (obr. 4.1D). Případné sušení nebude mít vliv na zvláknovací proces, tuto operaci tak lze oproti jiným biodegradabilním polymerům vyřadit, což výrazně zjednodušuje proces přípravy granulátu.

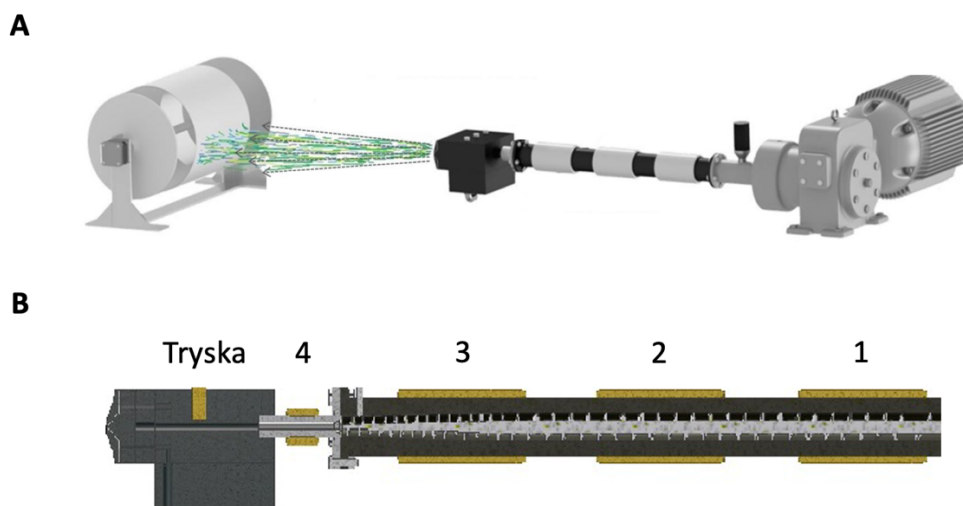
#### 4.2.2 Studium zpracovatelnosti polykaprolaktonu

Studium zpracovatelnosti polykaprolaktonu probíhalo na laboratorním zařízení meltblown (J&M Laboratories) klasického uspořádání v podobě šnekového extrudéru a slotové zvláknovací trysky s nosem typu EXXON umístěné v horizontální poloze. Základní geometrie trysky a přehled důležitých rozměrových parametrů je uveden na obrázku 4.2.



Obrázek 4.2: Geometrie zvláknovací trysky

Zařízení se skládalo ze vzduchem chlazené násypky a pěti nezávisle regulovatelných vyhřívacích zón: třech extruzních, jedné přechodové a samostatně vyhřívané zvlákňovací hlavy (obr. 4.3). Nos zvlákňovací hlavy byl odsazen 0,5 mm za čelem trysky se vzduchovými mezerami o šíři 0,6 mm. Vlákna byla zachytávána na bubnový perforovaný kolektor o průměru 350 mm. Dílčí limity představovala absence dávkovacího zubového čerpadla a účinnějšího systému dodávky primárního vzduchu, což se odrazilo na rovnoměrnosti dávkování těchto médií. Z těchto důvodů byly využívány nižší hodnoty objemových toků, které zaručovaly minimalizaci jejich oscilace.



Obrázek 4.3: Technologie meltblown: A) vizualizace použitého zařízení, B) schéma extruzní dráhy s označením jednotlivých teplotních zón

V této části práce jsou představeny výsledky třech parametrických testů, které ověřovaly vliv třech vybraných procesních parametrů na proces zvlákňování a zejména změnu strukturních parametrů výsledných vlákenných vrstev. Těmito parametry byly objemový tok polymeru a z toho vycházející hmotnostní poměr polymer/vzduch, vzdálenost tryska–kolektor a teplota vyhřívacích zón. Konstantními parametry byly objemový průtok primárního vzduchu: 10 m<sup>3</sup>/min, tlak taveniny v přechodové části: 30 bar, obvodová rychlost kolektoru: 1,5 m/min. Prvotní stanovení všech parametrů uvedených v tabulce 4.2 bylo provedeno na základě analýzy polymerního granulátu (obr. 4.1) a předběžných testů.

První parametrický test spočíval ve studiu vlivu změny objemového toku polymeru a z toho vyplývajícího hmotnostního poměru polymer/vzduch na zvlákňovací proces a změnu strukturních vlastností výsledných vlákenných vrstev. V rámci testu byly zvoleny tři rozdílné hodnoty hmotnostního průtoku polymeru tryskou, uvedené spolu s dalšími hodnotami nastavení a označením vzorků v tabulce 4.2.

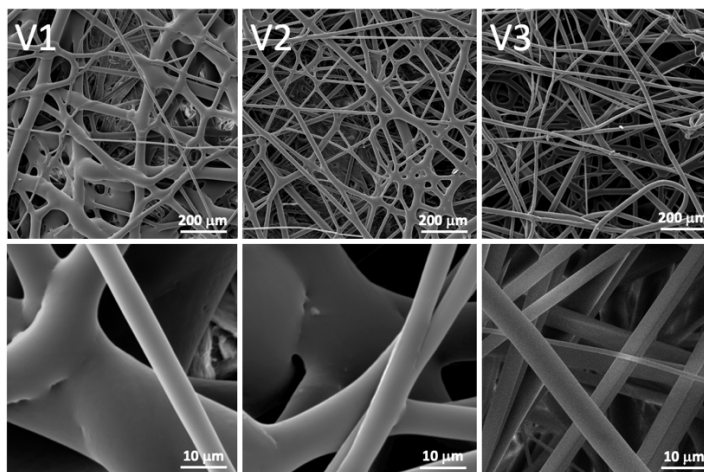


Tabulka 4.2: Procesní parametry tvorby vrstev při změně hmotnostního průtoku polymeru

Procesní parametry	V1	V2	V3
Teplotní zóna 1 [°C]	80	80	80
Teplotní zóna 2 [°C]	120	120	120
Teplotní zóna 3 [°C]	150	150	150
Teplotní zóna 4 [°C]	160	160	160
Teplota trysky [°C]	160	160	160
Teplota vzduchu [°C]	165	165	165
Objem vzduchu [m <sup>3</sup> /hod]	10	10	10
Průtok polymeru [g/min]	6	4	2
Vzdálenost T–K [cm]	60	60	60

S vyšší hodnotou hmotnostního toku polymeru docházelo k nedostatečnému ochlazení formovaných vláken a jejich ukládání do vrstvy v částečně roztaveném stavu, což se projevilo v podobě slitých a zdeformovaných vláken zejména u vzorku V1 a v menší míře u vzorku V2, jak je vidět na obrázku 4.4A. V případě hmotnostního průtoku 2 g/min u vzorku V3 již k tomuto jevu nedocházelo, průřez výsledných vláken vykazoval kruhový charakter bez větších odchylek jejich průměru po délce.

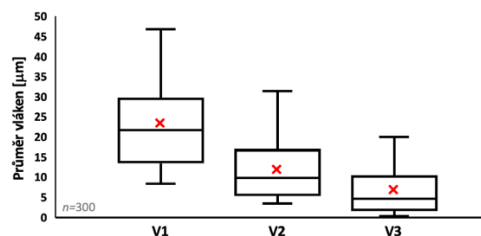
**A**



**B**

Hodnota	V1	V2	V3
$\bar{X}$ [µm]	23,63	12,59	7,50
95% IS	2,1	1,5	1,1
Min.	7,74	3,62	0,48
Max.	52,98	41,76	31,79

**C**



Obrázek 4.4: Hodnocení morfologie: A) SEM snímky vlákně struktury, B) tabulka statistických hodnot průměrů vláken, C) statistické hodnoty průměrů vláken vyjádřené krabicovým grafem ( $\bar{X}$  – aritmetický průměr; 95% IS – 95% interval spolehlivosti)

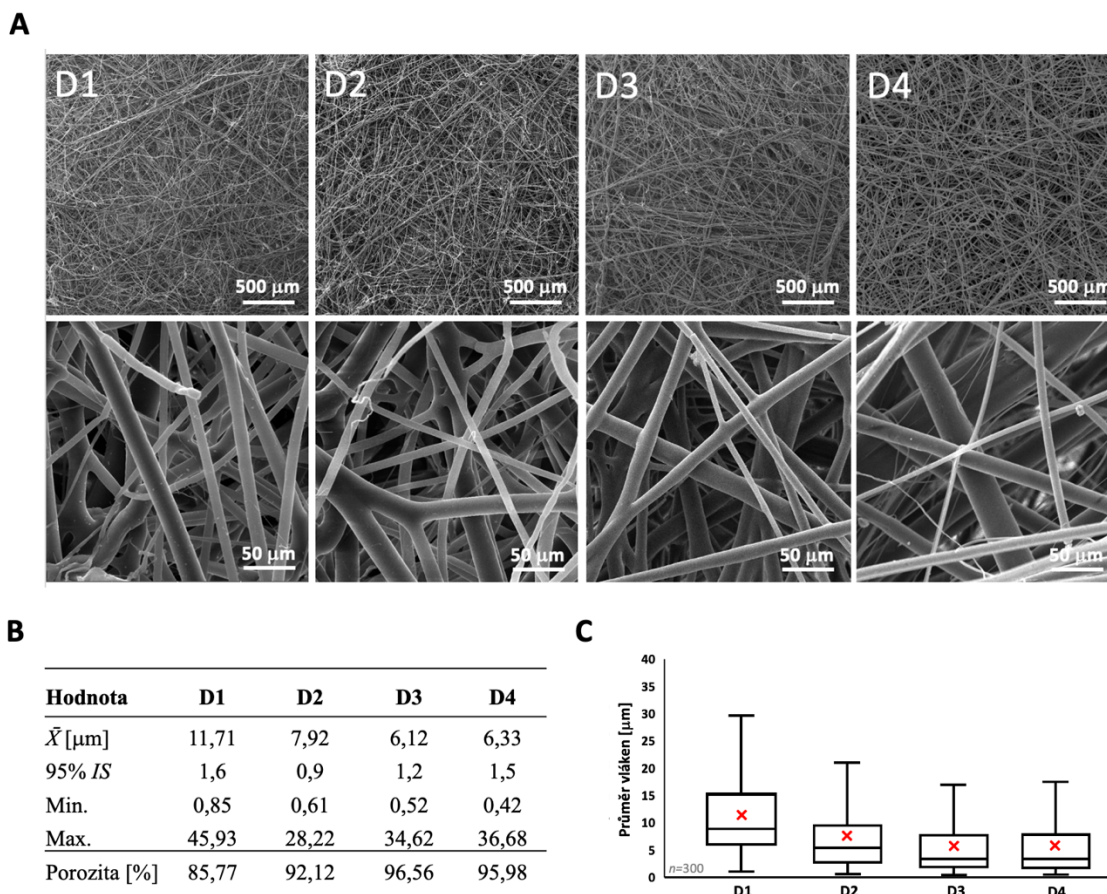
Samotná vlákna vzorku V3 byla ojednocená s hladkým povrchem. Lze tedy tvrdit, že hmotnostní tok polymeru, a tedy i hmotnostní poměr vzduch/polymer, měl zásadní vliv na formování vláken. Hodnota tohoto poměru pro vzorky V1 (~ 35) a V2 (~ 51) se ukázala jako nedostatečná a bylo třeba dosáhnout hodnoty ~ 102 v případě vzorku V3. S vyšším poměrem vzduch/polymer také významně klesaly samotné střední hodnoty průměrů vláken spolu s jejich odchylkami až na hodnotu  $7,50 \pm 1,1 \mu\text{m}$  pro V3 (obr 4.4A–B). Výsledky tedy korespondují se studiemi popisujícími zásadní vliv poměru vzduch/polymer a formativních sil na výslednou strukturu (Milligan and Haynes, 1994; Hassan *et al.*, 2013).

Druhý parametrický test zkoumal vliv změny vzdálenosti tryska–kolektor (T–K) na změnu strukturních parametrů v podobě průměrů vláken a celkové porozity výsledných vlákenných vrstev. Byly zvolené čtyři různé hodnoty vzdálenosti T–K v rozmezí 40–100 cm. S ohledem na výsledky předchozího testu byl pro další experimenty zvolen hmotnostní průtok polymeru 2 g/min (tab. 4.3).

*Tabulka 4.3: Procesní parametry tvorby vrstev při změně vzdálenosti mezi tryskou a kolektorem*

<b>Procesní parametry</b>	<b>D1</b>	<b>D2</b>	<b>D3</b>	<b>D4</b>
Teplotní zóna 1 [°C]	80	80	80	80
Teplotní zóna 2 [°C]	120	120	120	120
Teplotní zóna 3 [°C]	150	150	150	150
Teplotní zóna 4 [°C]	160	160	160	160
Teplota trysky [°C]	160	160	160	160
Teplota vzduchu [°C]	165	165	165	165
Objem vzduchu [m <sup>3</sup> /hod]	10	10	10	10
Průtok polymeru [g/min]	2	2	2	2
Vzdálenost T–K [cm]	40	60	80	100

Změna vzdálenosti T–K v intervalu 40–100 cm neměla zásadní vliv na základní charakter vláken, která byla u všech vzorků ojednocená, přímo orientovaná, převážně kruhového průřezu a hladkého povrchu, jak je patrné na obrázku 4.5A. Ovšem navýšení vzdálenosti mělo zásadní vliv na snížení střední hodnoty průměrů vláken, které bylo nejmarkantnější v intervalu 40–60 cm při poklesu průměrů vláken z  $11,71 \pm 1,6 \mu\text{m}$  na  $7,92 \pm 0,9 \mu\text{m}$ . S dalším nárůstem vzdálenosti již docházelo pouze k mírnému poklesu průměrů vláken doprovázené rozšířením jejich distribučního rozpětí (obr. 4.5B–C). Širší distribuce byla nejpravděpodobněji spojena se zvýšenou mírou rozpadu na jemnější vlákna při delší expozici silového působení primárního vzduchu a zejména v pozdější fázi letu sekundárního vzduchu (Uyttendaele and Shambaugh, 1990; Chen, Wang and Huang, 2005).



Obrázek 4.5: Hodnocení morfologie: A) SEM snímky vlákenné struktury, B) tabulka statistických hodnot průměrů vláken a porozity, C) statistické hodnoty průměrů vláken vyjádřené krabicovým grafem ( $\bar{X}$  – aritmetický průměr; 95% IS – 95% interval spolehlivosti)

S delší vzdáleností T–K vzrůstala míra celkové porozity, a to zejména v rozmezí 40–60 cm z hodnoty 85,77 % na 92,12 % (obr. 4.5B), což bylo dáno působením odporových sil sekundárního vzduchu po delší časový úsek, které vedlo k jejich většímu prostorovému rozptylu. Tento trend se v menší míře projevil i ve vzdálenosti 80 cm s nárůstem celkové porozity až na maximální hodnotu 96,56 %. Za touto vzdáleností již k nárůstu porozity nedocházelo, nejspíše v důsledku poklesu odporu sekundárního vzduchu spojeného s útlumem rychlosti primárního vzduchu ve větší vzdálenosti od kolektoru.

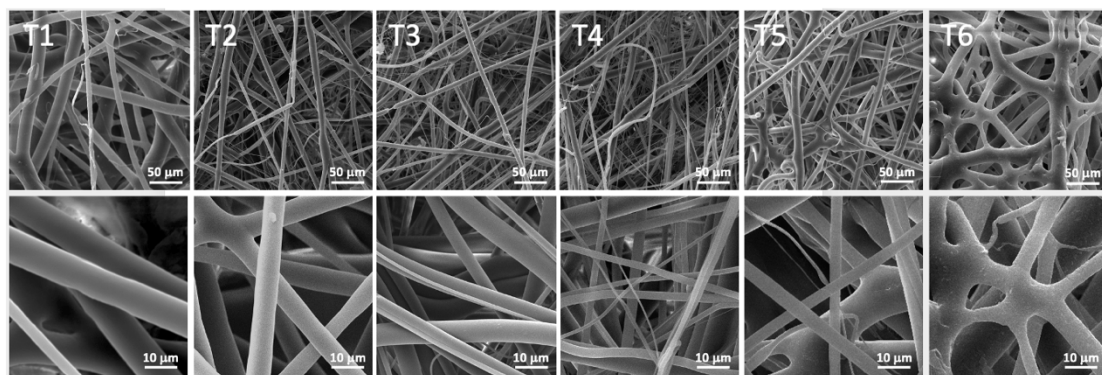
Třetí parametrická studie popisovala závislost strukturálních parametrů vlákenných vrstev na změnu teplotního nastavení vyhřívacích zón, zejména zvlákňovací trysky. Bylo otestováno šest rozdílných teplotních nastavení s teplotou trysky v rozmezí 150–210 °C, jak je uvedeno spolu s ostatními hodnotami nastavení v tabulce 4.4. Z předchozích testů byla zachována vzdálenost T–K 60 cm a hmotnostní průtok polymeru 2 g/min.

Tabulka 4.4: Procesní parametry tvorby vrstev při změně teplotního nastavení

Procesní parametry	T1	T2	T3	T4	T5	T6
Teplotní zóna 1 [°C]	80	80	80	80	80	80
Teplotní zóna 2 [°C]	120	120	120	130	130	130
Teplotní zóna 3 [°C]	140	150	150	160	160	170
Teplotní zóna 4 [°C]	150	160	170	180	190	200
Teplota trysky [°C]	150	160	170	180	200	210
Teplota vzduchu [°C]	150	165	180	190	205	210
Objem vzduchu [m <sup>3</sup> /hod]	10	10	10	10	10	10
Průtok polymeru [g/min]	2	2	2	2	2	2
Vzdálenost T-K [cm]	60	60	60	60	60	60

Výsledky posledního parametrického testu ukázaly zásadní vliv teplotního nastavení na vláknennou strukturu (obr. 4.6). Lze tak potvrdit přímý vliv teplotně závislé hodnoty MFR taveniny (obr. 4.1C) na výsledné průměry vláken, jak uvádí (Jones, 1987). Se zvyšující se teplotou trysky klesaly průměry vláken až na hodnotu  $4,28 \pm 0,8 \mu\text{m}$  při teplotě 190 °C, avšak již při širším rozpětí mezních hodnot průměrů vláken v porovnání s teplotou 180 °C.

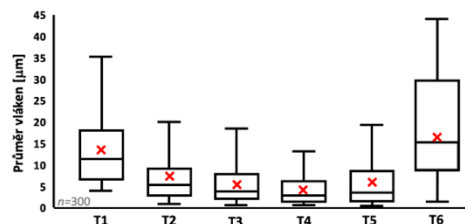
A



B

Hodnota	T1	T2	T3	T4	T5	T6
$\bar{X}$	13,56	7,19	6,07	4,28	6,76	16,55
95% IS	2,09	0,96	0,86	0,8	1,44	3,72
Min.	4,67	0,67	0,52	0,56	0,45	1,56
Max.	41,49	29,08	24,77	31,17	37,28	43,53

C



Obrázek 4.6: Hodnocení morfologie: A) SEM snímky vláknenné struktury, B) tabulka statistických hodnot průměrů vláken, C) statistické hodnoty průměrů vláken vyjádřené krabicovým grafem ( $\bar{X}$  – aritmetický průměr; 95% IS – 95% interval spolehlivosti)

Výskyt vyšších průměrů vláken při teplotě trysky 150 °C vyplýval z nedostatečných tokových vlastností taveniny při dané teplotě. Na druhé straně, slitá vlákna vyšších průměrů v případě teploty 210 °C lze spojovat s nedostatečnou mírou ochlazení formující se taveniny za daných podmínek. Tento jev se částečně projevoval také při teplotě 190 °C.

Na základě výsledků všech tří parametrických testů bylo možné sestavit technologický rámec zvláknitelnosti PCL, vymezený teplotami trysky v rozmezí 160–200 °C, vzdáleností T–K v rozmezí 60–100 cm a hmotnostním průtokem polymeru 2 g/min, od kterého se odvíjí hmotnostní poměr vzduch/polymer ~100. Tento rámec byl vymezen s ohledem na technické limitace aparatury. Zejména při využití výkonnějšího kompresoru, umožňujícího dosažení vyššího poměru vzduch/polymer, by bylo reálné zvýšit horní limit teplotního rozsahu i celkovou produktivitu procesu.

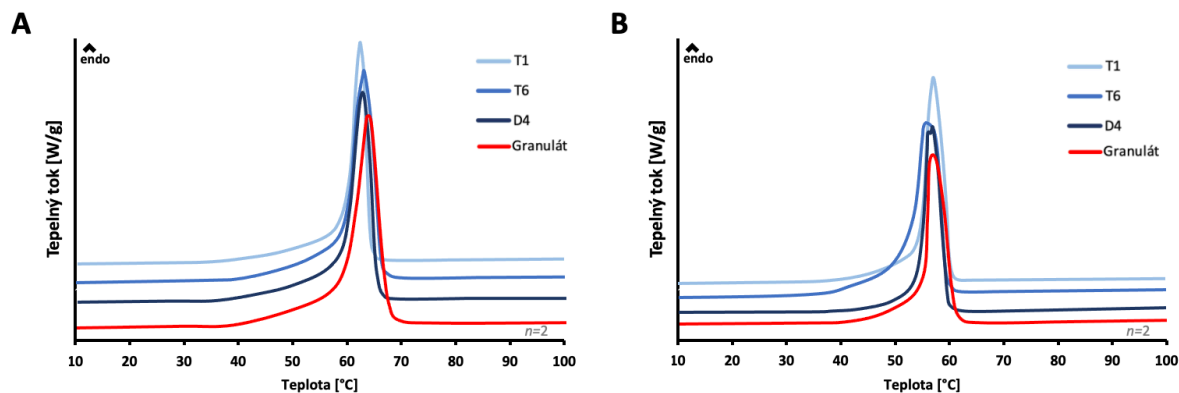
Zpracování PCL technologií meltblown bylo při všech variacích nastavení doprovázeno vznikem nezanedbatelného množství odletů vláken. Vznik odletů bývá v literatuře spojován s přílišnou mírou objemu a rychlosti primárního vzduchu. Avšak jak ukazují výsledky parametrických testů, v případě PCL nelze tyto hodnoty snížit, aniž by docházelo k výraznému poklesu kvality strukturálních charakteristik vlákenných vrstev. V případě PCL lze přisuzovat vznik odletů také číselné molární hmotnosti granulátu o hodnotě 25 000 g/mol (polydisperzita 1,33), která je v porovnání s číselnými molárními hmotnostmi jiných polymerů využívaných pro technologii meltblown výrazně nižší (například PLA s  $M_n$  66 000 g/mol). Lze vyslovit hypotézu, že délky makromolekul při této molární hmotnosti neumožňují dostatečnou míru zapletení zprostředkovávající potřebnou integritu vznikajícího vlákna, zamezující odtrhu některých fragmentů.

Charakteristickým rysem výsledných vlákenných vrstev byla poměrně široká distribuce průměrů vláken asymetrického průběhu. Na jedné straně byl charakteristický výskyt vláken s odlehlými hodnotami průměrů v desítkách mikrometrů. Na druhé straně jsou hodnoty průměrů vláken nalézající se v prvním a druhém kvartilu distribuovány na velmi krátkém intervalu v porovnání s dalšími kvartily. Tyto distribuční charakteristiky PCL vláken představují poměrně výrazný rozdíl v porovnání s polypropylenem, který vykazuje úzkou a symetrickou distribuci. Nicméně samotná střední hodnota průměrů PCL vláken oscilovala kolem 5  $\mu\text{m}$ , což v kombinaci s absencí výrazných defektů na makro a mikroskopické úrovni, vysokou mírou ojednocení a hladkým povrchem představuje typický produkt technologie meltblown.

### 4.2.3 Testování vlivu zpracování na stabilitu polymeru

S ohledem na aplikační oblasti využití vlákných vrstev, kde jsou kladeny vysoké nároky na materiálovou stabilitu, biologickou nezávadnost a predikovatelnost degradačního profilu, byly vláknenné vrstvy podrobeny vybraným testům těchto vlastností. Jednotlivé vzorky vláknenných vrstev byly vybírány pro dané testy na základě rozdílného parametru výroby, který byl sledován pro danou vlastnost materiálu jako kritický.

Metodou diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) byla hodnocena potenciální změna teploty tání, krystalického podílu polymeru ve vláknech a schopnosti krystalizace samotného polymeru. Tyto vlastnosti byly testovány v závislosti na teplotním nastavení a změně vzdálenosti T–K při výrobě vláknenných vrstev v podobě vzorků T1, T6 (tab. 4.4) a D4 (tab. 4.3). Teploty tání jednotlivých vzorků spolu s teplotou tání referenčního polymerního granulátu se v případě prvního ohřevu odrážejícího historii tváření a druhého ohřevu reprezentujícího chování samotného polymeru nelišily, jak ukazují DCS křivky a konkrétní hodnoty na obrázku 4.7. To spolu s téměř neměnnými hodnotami krystalinity druhého ohřevu v rozmezí 48,23–50,70 % ukazuje, že v případě všech vzorků nepodléhal polymer během tváření nežádoucí degradaci v podobě poklesu molární hmotnosti, jejíž změna by měla na tyto hodnoty výrazný vliv.



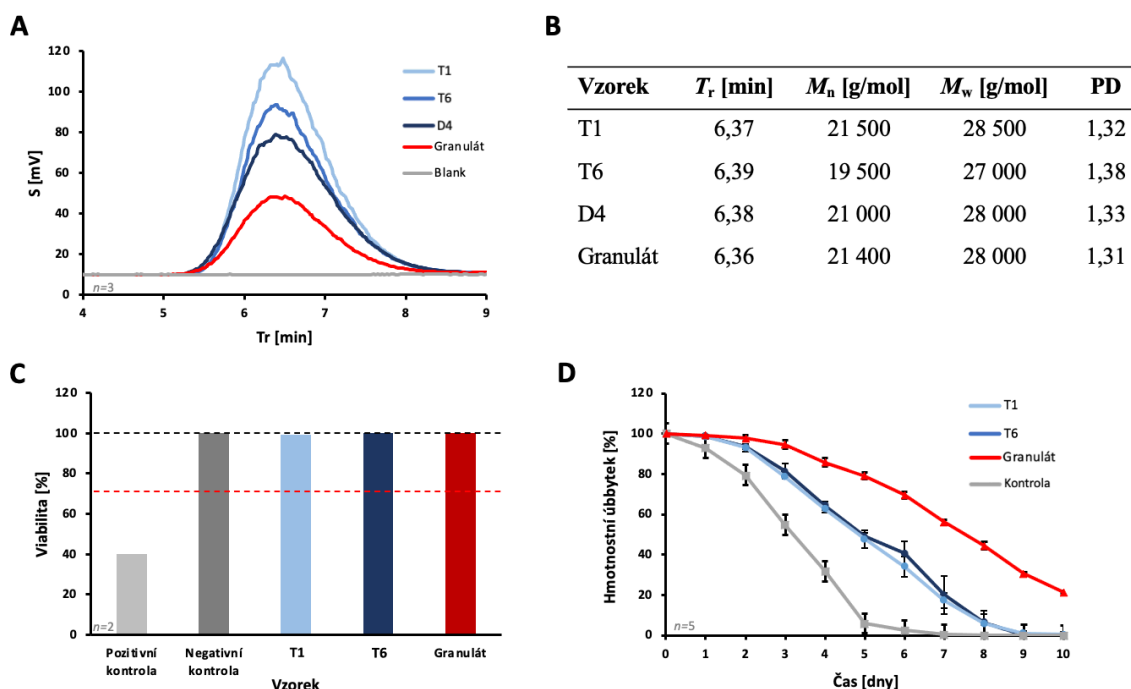
Vzorek	První ohřev			Druhý ohřev		
	$T_m$ [°C]	$\Delta H_m$ [J/g]	$\Delta X$ [%]	$T_m$ [°C]	$\Delta H_m$ [J/g]	$\Delta X$ [%]
1	62,43	87,11	62,44	57,48	70,73	50,70
3	62,87	88,36	63,34	56,19	67,29	48,23
6	62,22	88,22	63,24	57,31	69,34	49,70
Granulát	63,51	87,20	62,50	56,89	68,99	49,45

Obrázek 4.7: DCS analýza vybraných vzorků: A) DCS křivky prvního ohřevu, B) DCS křivky druhého ohřevu, C) hodnoty teploty tání ( $T_m$ ); entalpie tání ( $\Delta H_m$ ) a krystalinity ( $\Delta X$ )

Hodnoty získané z prvního ohřevu ukazovaly, že vlákna produkovaná technologií meltblown byla schopna dosáhnout podílu krystalické fáze v rozmezí 62,44–63,34 %. S ohledem na fakt, že tato hodnota korespondovala s podílem krystalické fáze polymerního granulátu, lze konstatovat, že samotná technologie neměla na hodnotu krystalického podílu vliv. Zároveň tak nedocházelo z výraznému dloužení vláken během jejich formování, které by se projevilo právě zvýšením této hodnoty.

Případný pokles molární hmotnosti totožných vzorků, který by značil nežádoucí degradaci polymeru při procesu zvlákňování, byl testován pomocí gelové permeační chromatografie (GPC). Jak ukazují křivky chromatogramu (obr. 4.8A) i odvozené hodnoty hmotnostní a početní molární hmotnosti (obr. 4.8B), u žádného vzorku nedocházelo k signifikantní změně těchto hodnot, značící degradační procesy.

Ověření cytotoxicity bylo realizováno *in vitro*, za využití výluhů vzorků T1 a T6. V případě obou vzorků přesáhla buněčná viabilita nádorových osteoblastů hranici 70 % (obr. 4.8C), což charakterizuje oba materiály jako netoxické. Finální test enzymaticky katalyzované biodegradace *in vitro* vyloučil rozdílné degradační profily u vzorků T1 a T6, jejichž křivky hmotnostního úbytku se téměř shodují (obr. 4.8D).

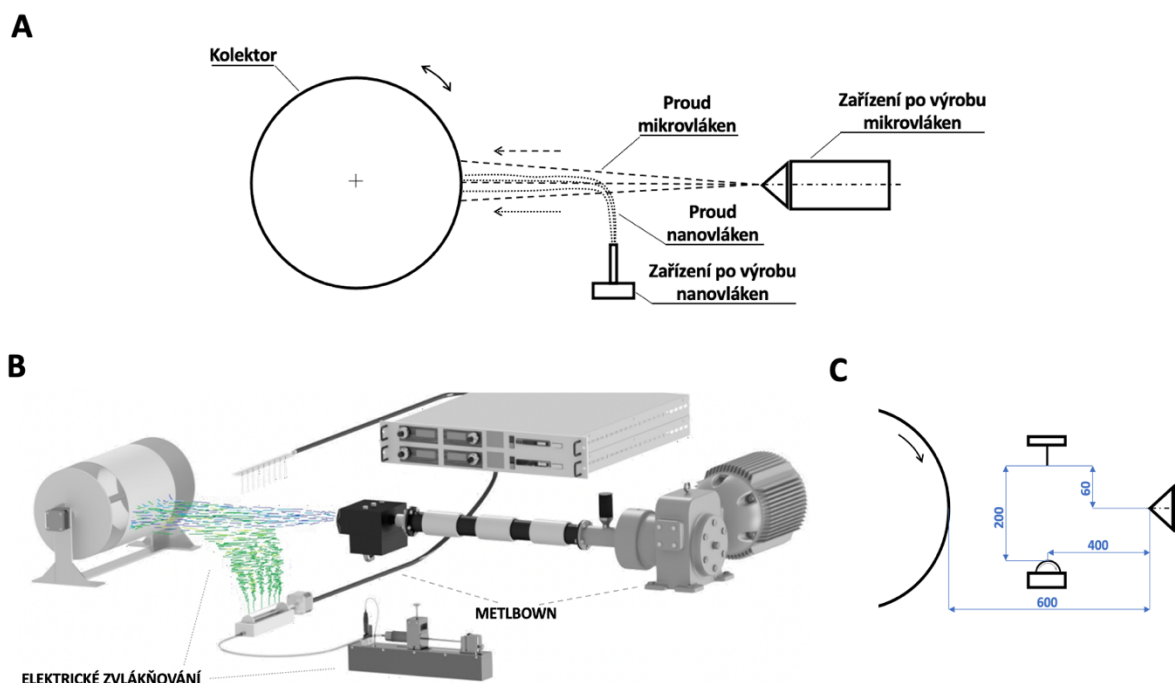


Obrázek 4.8: GPC analýza a základní biologické testy vybraných vzorků: A) křivky chromatogramů, B) hodnoty retenčního času ( $T_r$ ); číselné molární hmotnosti ( $M_n$ ); hmotnostní molární hmotnosti ( $M_w$ ) a polydisperzity (PD), C) test cytotoxicity, D) křivky hmotnostního úbytku na základě enzymaticky katalyzované degradace

### 4.3 Komentář č. 1 – Způsob a zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná, textilní kompozitní materiál obsahující polymerní nanovlákná

Výzkumný cíl směřující k následnému vytvoření patentu spočíval v návrhu způsobu výroby textilního kompozitního materiálu, který bude obsahovat nanovlákná a další vláknennou složku/ky poskytující tomuto materiálu mechanické vlastnosti a objemnost, aniž by svou přítomností omezovaly specifické vlastnosti a využití nanovláken. Dalším cílem bylo navrhnout zařízení k provádění tohoto způsobu výroby, které by dosahovalo řádově vyšší produktivity ve srovnání s klasickými technologiemi výroby nanovláken v podobě elektrického či odstředivého zvlákňování.

Navržený způsob výroby představoval proces, při kterém byl alespoň jedním zvlákňovacím prvkem (na principu odstředivého nebo elektrického zvlákňování) vytvářen objemový útvar tvořený polymerními nanovlákná a ukládaný na povrch kolektoru, na který byla současně ukládána polymerní mikrovlákná produkovaná technologií meltblown, spunbond nebo jinou technologií výroby mikrovláken (obr 4.9A). Pohyb, ukládání a promísení všech vláknenných složek zajišťoval usměrněný pohyb vzduchu či jiného plynu nebo usměrněný pohyb elektronů. Způsob popisoval ukládání vláknenné směsi na bubnový nebo pásový kolektor, který mohl být s výhodou elektricky aktivní nebo podsávaný pro účinnější ukládání vláken.



Obrázek 4.9: Zařízení pro výrobu vláknenného kompozitu: A) schéma principu, B) vizualizace reálné konfigurace zařízení, C) kotace rozmístění jednotlivých prvků



Praktická realizace způsobu a zařízení na výrobu textilního kompozitu ze směsi mikro a nanovláken spočívala v kombinaci technologií meltblown a elektrického zvlákňování nabázi stejnosměrného proudu (obr. 4.9B–C) za využití biodegradabilního polykaprolaktonu. Konfigurace technologického řešení využívala prvek elektrického zvlákňování skládající se z kladně polarizované, strunové – rotující nebo stacionární – vícejehlové spinnerety, které byl dávkován polymerní roztok pomocí počítačem řízené lineární pumpy. Proces tvorby nanovláken byl podpořen umístěním záporně polarizované hrotové protielektrody. Spinnereta a protielektroda byly vzájemně umístěny tak, aby se formovaná nanovlákná unášena elektrickým větrem v prostoru mezi spinneretou a protielektrodou střetávala s kolmo procházejícím lineárním proudem vzduchu. Proud tvořil ohřátý primární vzduch unášející a formující mikrovlákna z extrudované polymerní taveniny protlačované přes otvory zvlákňovací trysky technologie meltblown. V místě střetu obou vláknenných složek docházelo ke strhávání nanovláken lineárním prouděním, jejich následným promísením s mikrovláknem a závěrečné depozici na rotující bubnový kolektor. Samotné zařízení prodělalo v čase několik vývojových úprav, z nichž nejvýraznější byla změna spinnerety elektrického zvlákňování z rotujícího strunového válce na jehlové pole. Tato změna eliminovala nežádoucí odpařování rozpouštědla polymerního roztoku z otevřeného zásobníku strunového válce.

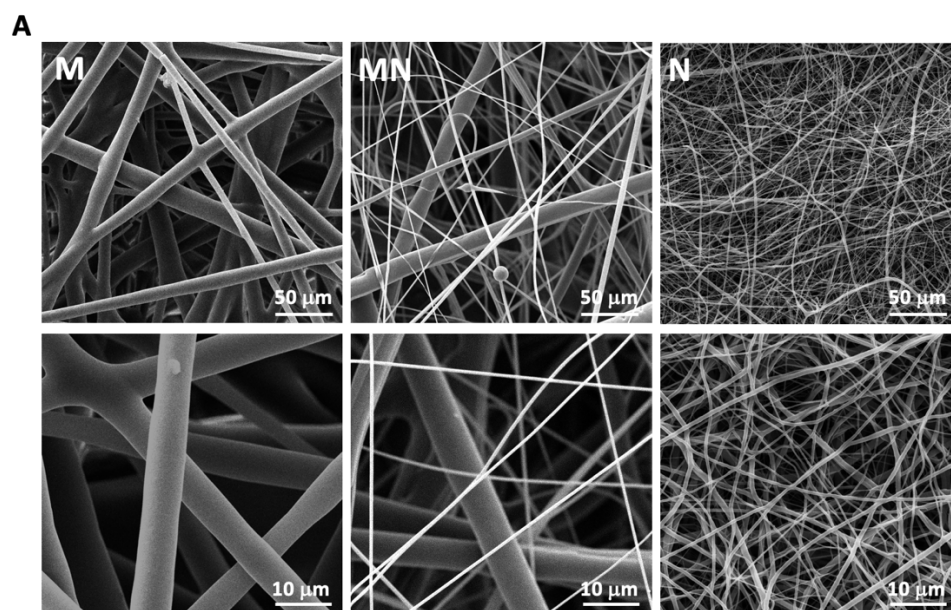
Lineární proud vzduchu umožnil depozici náhodně orientovaných ojednocených vláken do podoby objemné, vysoceporézní kompozitní struktury s homogenně promísenými vlákny obou složek. Popsaným způsobem výroby bylo možné připravit vrstvu vláknenného kompozitu v podobě pásu o šíři 100 mm bez limitované tloušťky a plošné hmotnosti v rozmezí od jednotek po stovky  $\text{g/m}^2$ . Takto připravená struktura disponovala dostatečnou mechanickou odolností umožňující snadnou manipulaci i dělení do různých tvarů bez následné deformace, jak ukazuje obrázek 4.10.



Obrázek 4.10: Proporční variace disků vyřezaných z vláknenného kompozitu

Typický proces výroby využíval k produkci mikrovláknenné složky zařízení meltblown popsané v kapitole 4.2.2 za procesních podmínek stanovených pro výrobu vzorku T3 v kapitole 4.2.2. Nanovláknenná složka byla produkována za využití kladně polarizované spinnerety v podobě válce (35 × 150 mm) osazeného čtveřicí ocelových strun o průměru 0,1 mm při napětí 35 kV, který rotoval rychlostí 50 ot/min. Polymerní roztok (16 hm % PCL ve směsi chloroformu a ethanolu o hmotnostním poměru 9:1) byl pumpami dávkován do prostoru spinnerety rychlostí 50 ml/hod. Formovaná nanovláknna putovala směrem k záporně polarizované elektrodě osazené ocelovými hroty (4 × 50 mm) při napětí 20 kV. Přesné rozmístění jednotlivých prvků elektrického zvlákňování popisuje obrázek 4.9C. Elektrické zvlákňování v této konfiguraci dosahovalo produktivity 1 g/hod.

Proces výroby trvající 60 minut umožnil tvorbu vrstvy vláknenného kompozitu o tloušťce 4 mm při produktivitě 100 g/hod. Obrázek 4.11A představuje SEM snímky struktury výsledného kompozitu – MN, samotné mikrovláknenné – M a nanovláknenné složky – N.



**B**

	M	MN	N
Průměr vláken [ $\mu\text{m}$ ]	$6,07 \pm 0,9$	$3,86 \pm 1,5$	$0,71 \pm 0,1$
Průměr pórů [ $\mu\text{m}$ ]	$89,57 \pm 41,1$	$48,85 \pm 16,2$	$1,27 \pm 0,2$
Celková porozita [%]	96,41	95,62	74,88
Specifický měrný povrch [ $\text{g}/\text{m}^2$ ]	0,3	0,3	2,5
Četnost zastoupení nanovláken [%]	2	30	85

Obrázek 4.11: Struktura a vlastnosti výsledného vláknenného kompozitu i jednotlivých složek, A) SEM snímky struktury, B) vybrané strukturální parametry

SEM snímky ukazovaly výrazný rozdíl v morfologii struktury samotné mikrovlákně i nanovlákně složky a finálního kompozitu, kde byla jasně patrná přítomnost obou složek v podobě kompaktní směsi ojednocených, náhodně orientovaných nanovláken a mikrovláken. Výsledný kompozit si zachovával vysoce porézní charakter mikrovlákně složky (obr. 4.11B) při 30% početním zastoupení nanovláken ve struktuře. Přítomnost nanovlákně složky snížila střední hodnotu průměrů pórů z  $89,75 \pm 41,1 \mu\text{m}$  pro mikrovlákně složku na  $48,85 \pm 16,2 \mu\text{m}$  v případě výsledného kompozitu. Avšak kompozit neobsahoval nanovlákná v takové míře, aby měla vliv na zvýšení hodnoty specifického měrného povrchu, která byla stejně jako v případě mikrovláken  $0,3 \text{ g/m}^2$ .

Patent tak představuje v porovnání s konvenčními metodami tvorby samotných nanovláken řádově produktivnější způsob výroby polymerního vlákněného kompozitu, který obsahuje směs mikrovláken a nanovláken při zachování užitečných vlastností obou složek. Další nespornou výhodou je materiálová variabilita elektrického zvlákňování, která umožňuje zpracování širokého spektra polymerů různých vlastností pro tvorbu vlákně složky. To lze využít k tvorbě mnoha materiálových kombinací jednotlivých složek se specifickými vlastnostmi. Otevřená konstrukce výrobního zařízení navíc poskytuje dostatečný prostor k případnému začlenění nového prvku pro tvorbu další složky.

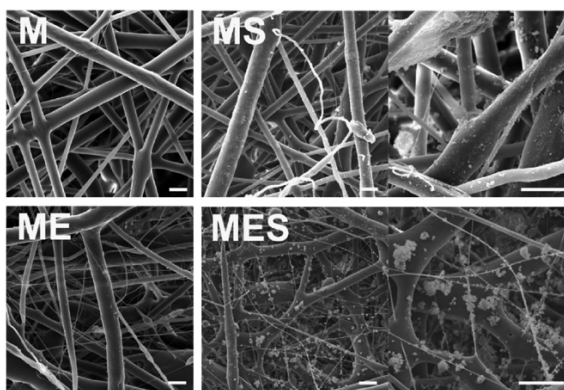
Výsledný vlákněný kompozit, vyrobený z biodegradabilního polykaprolaktonu, představuje velmi perspektivní materiálovou základnu, která díky kombinaci vhodných strukturních, mechanických a materiálových vlastností splňuje ve velké míře nároky kladené na materiály pro tvorbu scaffoldů ve tkáňovém inženýrství kosti i extrakčních sorbentů v analytické chemii.

#### 4.4 Komentář č. 2 – The combination of meltblown and electrospinning for bone tissue engineering

Tato práce byla pilotní studií využití PCL mikrovláken vyrobených technologií meltblown jako scaffoldů pro tkáňové inženýrství kosti (TIK). Do té doby nebyla publikována žádná studie popisující využití vláken v dané oblasti, i pouze s minoritním podílem PCL produkovaných touto technologií. Cíl spočíval v základním *in vitro* testování připravených scaffoldů při kontaktu s buňkami linie lidských nádorových osteoblastů MG 63. Testy byly zaměřené na stanovení míry buněčné viability a proliferace v závislosti na zastoupení jednotlivých vlákenných složek v připravených scaffoldech a jejich funkcionalizovaných variant. Dílčí cíl této práce tak spočíval ve vývoji metody funkcionalizace vlákenných scaffoldů.

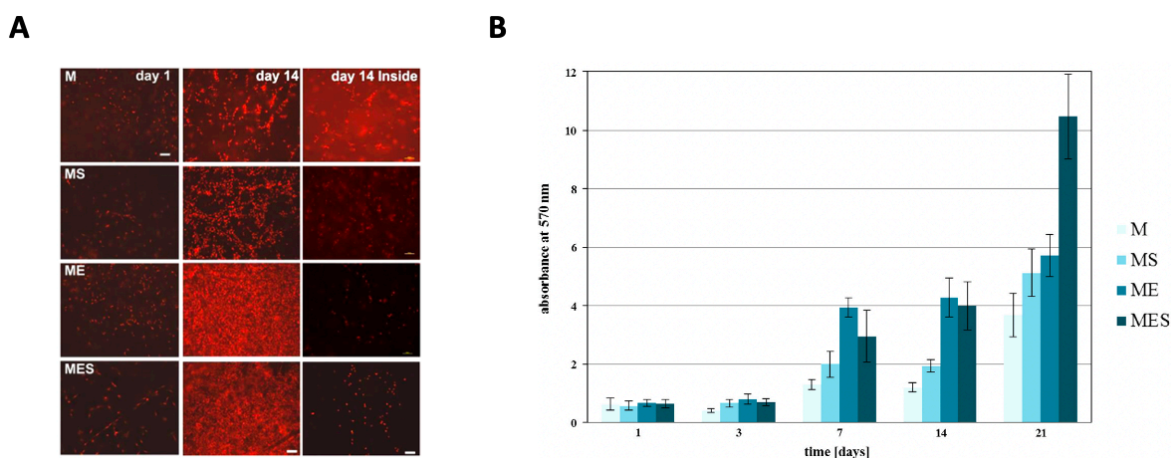
Na základě současných vývojových trendů a nároků na scaffoldy pro TIK byl navržen způsob funkcionalizace spočívající v adici bioaktivní složky zvyšující míru osteoindukce nejen svou chemickou podstatou, ale také schopností vytvářet nanostrukturní topografické prvky. Samotná realizace spočívala v pokrytí povrchu vláken nanočásticemi biokeramické složky nativní kostní tkáně na bázi hydroxyapatitu (HA), realizované v průběhu výroby scaffoldu rovnoměrným vibračním uvolňováním nanočástic do proudu primárního vzduchu. Nízká hmotnost nanočástic umožňovala jejich plynulé unášení proudem vzduchu, homogenní promísení s vlákny a rovnoměrnou depozici na povrchu vláken v celém objemu výsledné struktury (obr 4.11). Výsledný podíl nanočástic HA ve struktuře scaffoldu byl stanoven na 10 hm. %.

Pro testování byly připraveny čtyři strukturálně rozdílné skupiny vlákenných PCL scaffoldů (obr. 4.11) v podobě disků o průměru 15 mm a tloušťce 5 mm. První skupinu představovaly scaffoldy tvořené pouze mikrovlákny produkovanými technologií meltblown – M. Druhou skupinou byly mikrovlákna s HA nanočásticemi – MS. Další skupinou byl kompozitní scaffold ze směsi mikrovláken a nanovláken – ME a jako poslední kompozitní scaffold s HA nanočásticemi – MES.



Obrázek 4.11: SEM snímky struktury testovaných scaffoldů, měřítko 20  $\mu\text{m}$

Výsledky biologického testování jednoznačně prokázaly biokompatibilitu i schopnost podpory buněčné proliferace u všech testovaných skupin. Míra buněčné adheze bezprostředně po začátku kultivace scaffoldů dosahovala podobných hodnot pro všechny testované skupiny. Jasně prokazatelný byl vliv jednotlivých složek scaffoldu na buněčnou viabilitu a proliferaci. Nicméně od 7. dne testování se začal projevovat vliv jednotlivých složek. Kompozitní scaffoldy, obsahující nanovláknna, vykazovaly signifikantní zvýšení buněčné viability (obr. 4.12B) ve srovnání se scaffoldy obsahující pouze mikrovláknna. Zejména na základě výsledků metabolického MTT testu byl také od 7. testovacího dne prokazatelný příznivý vliv nanočástic HA na buněčnou viabilitu. Fluorescenční mikroskopie ukázala, že všechny čtyři skupiny scaffoldů umožňovaly díky své porozitě určitou míru proliferace buněk do své vnitřní struktury i při statické kultivaci, a tím splnily základní předpoklad umožňující vznik objemného tkáňového celku. Během samotné kultivace scaffoldů ve vodném médiu nedocházelo k deformaci základní geometrie ani mikroskopické struktury, což bylo potvrzeno následným SEM snímkováním.



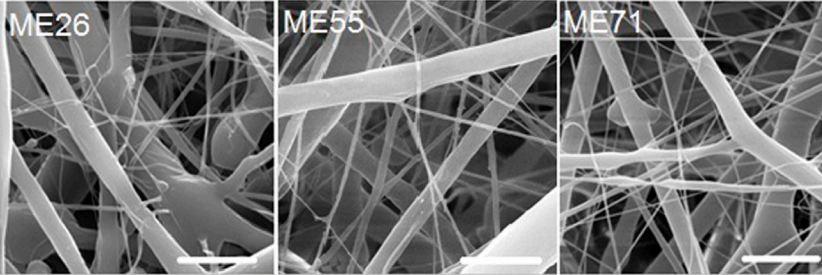
Obrázek 4.12: Výsledky biologického testování, A) fluorescenční mikroskopie, B) hodnoty MTT testu buněčné viability

Výsledky této práce potvrdily základní předpoklady kompozitních vláknenných scaffoldů pro jejich využití při regeneraci kostní tkáně, kterými byly vyloučená cytotoxicita a zároveň prokázaná biokompatibilita, schopnost podpory buněčné adheze, viability a proliferace. Dosaženými výsledky byla také potvrzena funkčnost stanoveného konceptu tvorby vícesložkového vláknenného kompozitu, který vykazoval synergickou kombinaci unikátních vlastností mikrovláknenné i nanovláknenné složky pro tkáňové inženýrství. Spolu s tím byl vyvinut a úspěšně otestován jednoduchý a rychlý postup funkcionalizace, který prokazatelně zvyšoval bioaktivitu testovaných scaffoldů.

#### 4.5 Komentář č. 3 – The combination of meltblown technology and electrospinning – the influence of the ratio of micro and nanofibers on cell viability

Náplní této práce, která přímo navazovala na přechodící pilotní studii, bylo parametrické testování změny poměru mikrovláken a nanovláken kompozitního scaffoldu na míru viability a vnitřní proliferace lidských nádorových osteoblastů.

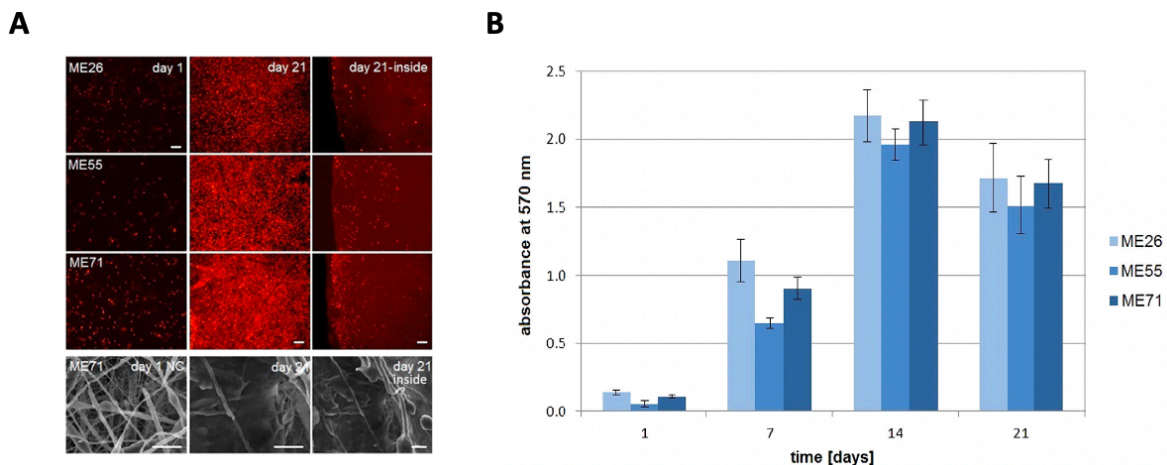
Pro testování byly připraveny tři totožné skupiny scaffoldů, lišící se pouze obsahem nanovláken, kterého bylo docíleno změnou hmotnostního průtoku PCL taveniny zvláknovací tryskou technologie meltblown při procesu výroby vláknenného kompozitu. Scaffoldy určené k testování obsahovaly nanovláknina o četnostním zastoupení 26 % – ME26, 55 % – ME55 (strukturně totožný se vzorkem ME z předešlé studie) a 71 % – ME71. Obsah nanovláken zásadně ovlivňoval velikost pórů, kdy se zvyšujícím obsahem nanovláken klesala střední hodnota průměrů pórů jednotlivých skupin (obr. 4.13). V případě vzorku ME26 docházelo k částečné delaminaci testovacích disků, způsobené pravděpodobně depozicí příliš ochlazených vláken v důsledku vysokého hmotnostního poměru tavenina/vzduch v kombinaci s vysokou objemností vrstev.



	ME26	ME55	ME71
Production time [min]	30	60	120
Speed of extruder screw [rpm]	15	7.5	3.7
Average pore diameter [ $\mu\text{m}$ ]	87.9 $\pm$ 293.4	48.1 $\pm$ 141.7	35.5 $\pm$ 90.2
Nanofibers volume fraction [%]	0.5	1	2
Nanofibers numerical fraction [%]	26	55	71

Obrázek 4.13: SEM snímky struktury scaffoldů s různým obsahem nanovláken a hodnoty vybraných strukturních charakteristik, měřítko 20  $\mu\text{m}$

Biologické testování proběhlo podle stejné metodiky jako v případně pilotní studie a prokázalo vliv obsahu nanovláken v kompozitním scaffoldu. Jak ukazují snímky fluorescenční mikroskopie a výsledky metabolického MTT testu, vyšší obsah nanovláken měl příznivý vliv na míru buněčné viability a proliferace, projevující se výrazněji od 7. dne testování (obr. 4.14). Výsledky MTT testu byly ovšem zkráceny dekompozicí vzorků ME26, které pak poskytovaly větší plochu pro povrchovou buněčnou proliferaci.



Obrázek 4.14: Výsledky biologického testování, A) fluorescenční a SEM mikroskopie, B) hodnoty MTT testu buněčné viability

Podle snímků fluorescenční mikroskopie došlo 21. den kultivace k pokrytí povrchové struktury scaffoldu konfluentní vrstvou buněk, což potvrdily také SEM snímky s dobře patrnou kompaktní vrstvou buněk na povrchu. Vzorky ME71 umožňovaly přes nejnižší střední hodnoty průměrů pórů také nejvyšší míru povrchové proliferace ale také proliferace vnitřní. 21. den bylo patrné významné množství buněk proliferujících od okraje do vnitřní struktury scaffoldu.

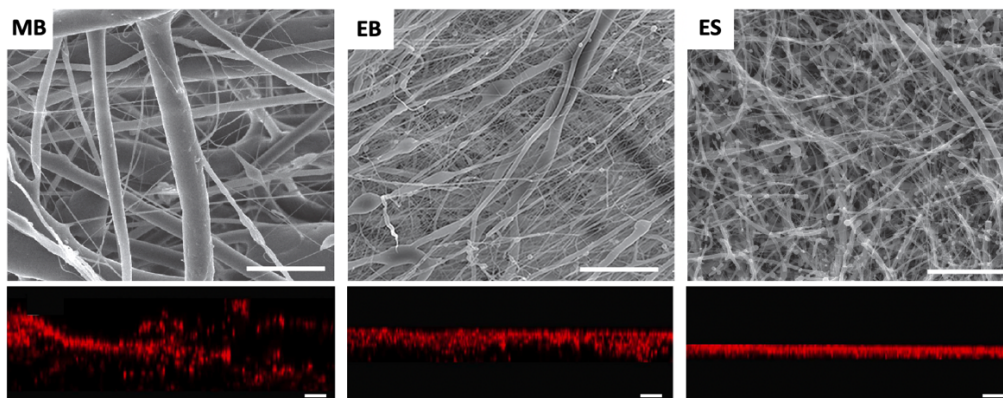
Výsledky vyšší míry vnitřní buněčné proliferace póry o průměru v řádech nižších desítek mikrometrů v porovnání se vzorky ME26, ME55 a M z předešlé studie, které disponovaly vyššími průměry pórů, jsou v rozporu s publikovanými výzkumy, které uvádějí jako optimální póry o průměru v rozsahu 100–200  $\mu\text{m}$ . Pozorovaný jev může být důsledkem vysokého stupně celkové porozity scaffoldu (~ 95 %) s množstvím pórů vymezených pouze jednotlivými nanovláknky, které nepředstavují pro buňky výraznou prostorovou překážku, ale naopak adhezní bod.

Tato práce tak s ohledem na dosažené výsledky prokázala příznivý vliv vyššího obsahu nanovláken v kompozitním scaffoldu na buněčnou viabilitu a povrchovou i vnitřní proliferaci. Na základě výsledků tak bylo možné optimalizovat strukturní parametry scaffoldu pro dosažení vyšší účinnosti podpory tkáňové obnovy.

#### 4.6 Komentář č. 4 – The combination of nanofibrous and microfibrinous materials for enhancement of cell infiltration and in vivo bone tissue formation

V rámci tohoto článku bylo provedeno komplexní *in vitro* testování kompozitních scaffoldů v kombinaci s mezenchymálními kmenovými buňkami, které, na rozdíl od již diferencovaných osteoblastů, umožňovaly detailnější studium osteogenních vlastností. Na *in vitro* testy navazovala dlouhodobá *in vivo* studie účinnosti kompozitních scaffoldů pro *in situ* regeneraci kostní tkáně v uměle vytvořeném, nenosném defektu hlavice femuru králíka.

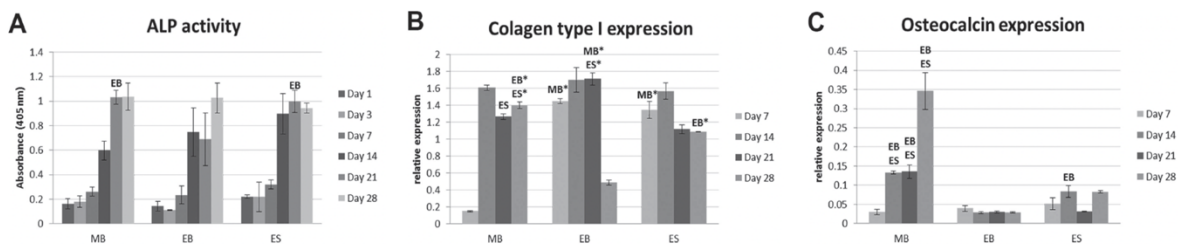
Pro *in vitro* testy byly kromě PCL kompozitních scaffoldů ze směsi mikrovláken a nanovláken – MB, připraveny dvě srovnávací skupiny PCL scaffoldů s rozdílnou strukturální morfologií (obr. 4.15). Tyto skupiny byly zvoleny tak, aby oproti předchozím studiím umožnily srovnání kompozitu se scaffoldy obsahujícími čistě nanovláčennou složku. Jednu skupinu představovala nanovláčna ukládaná proudem vzduchu – EB a druhou byla nanovláčenná struktura vyrobená klasickým elektrickým zvláčkňováním (technologie Nanospider) – ES.



Obrázek 4.15: SEM snímky struktury testovaných scaffoldů a snímky z fluorescenční konfokální mikroskopie zobrazující vnitřní proliferaci buněk, měřítko 50  $\mu\text{m}$

Hodnota buněčné viability a proliferace byla během 28 dnů kultivace pro všechny tři skupiny velmi podobná. Pouze MB scaffoldy vykazovaly s ohledem na větší průměry pórů nejnižší míru počáteční adheze. Na druhou stranu MB scaffoldy umožňovaly nejvyšší míru vnitřní proliferace, při které hloubka buněčné penetrace dosahovala 14. den testování 200  $\mu\text{m}$ , oproti 50  $\mu\text{m}$  v případě EB. Míra osteogenní diferenciace kmenových buněk, stanovená na základě aktivity alkalické fosfatázy – ALP, dosahovala v průběhu 28 dnů velmi podobných hodnot u všech tří skupin (Obr. 4.16A). Osteoindukční schopnost scaffoldů byla stanovena mírou exprese kolagenu typu I a osteokalcinu jako hlavních proteinových markerů kostní ECM.

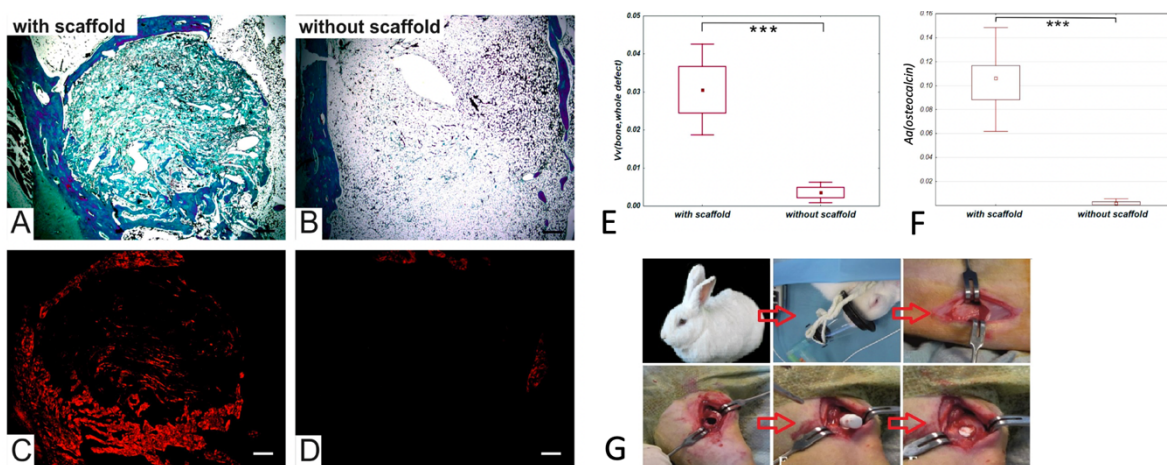




Obrázek 4.16: Výsledky *in vitro* testů osteogenity, A) aktivita alkalické fosfatázy, B) exprese kolagenu I, C) exprese osteokalcinu

Maximálních hodnot exprese kolagenu dosahovaly buňky bez významnějších rozdílů u scaffoldů MB a EB (obr. 4.16B). Avšak míra exprese osteokalcinu kompozitního MB dosahovala od 14. dne několikanásobně vyšších hodnot v porovnání s ostatními skupinami (obr. 4.16C). Výsledky *in vitro* testů tak prokázaly nesporné výhody kompozitních scaffoldů plynoucí zejména z jejich mechano-strukturních charakteristik.

Stanovení *in situ* regeneračního potenciálu kompozitního scaffoldu proběhlo na základě *in vivo* testu, spočívajícího v implantaci scaffoldu ( $6 \times 10$  mm) do kostního defektu kritické velikosti ( $6 \times 10$  mm) v kondylu femuru králíka (obr. 4.16G) po dobu 70 dnů. Zvířecí modely byly rozdělené na dvě skupiny po osmi jedincích. První skupině byl defekt vyplněn scaffoldem, druhá – kontrolní skupina zahrnovala jedince s defektem bez implantovaného scaffoldu. Kompozitní scaffoldy vykazovaly během implantace velmi dobrou stabilitu a manipulovatelnost. Během 70 dnů po implantaci nebyly u žádného ze zvířecích modelů zaznamenány známky zánětu nebo jiné komplikace spojené s hojením. Jedinci obou skupin dosáhly během 70 dnů srovnatelných hmotnostní přírůstků.



Obrázek 4.16: Histologické vyhodnocení, A–D) histologické řezy explantované tkáně, měřítko  $500 \mu\text{m}$ , E–F) kvantitativní vyhodnocení regeneračního potenciálu, G) postup implantace

Zatímco kostní defekty kontrolní skupiny nevyplněné scaffoldem obsahovaly pouze tukovou tkáň, u druhé skupiny byla pozorována tvorba nové kostní tkáně (obr. 4.16A–D). Ve skupině s vyplněným defektem došlo k preferenční depozici kostní tkáně v zevním kompartmentu defektu, reprezentované kolagenem typu I (obr. 4.16C). Regenerace kostní tkáně tak postupovala dle očekávání od okraje defektu, což potvrzovalo osteokonduktivní schopnost scaffoldu vyvolat migraci endogenních buněk z okolní tkáně do své struktury. Navíc byla zaznamenána přítomnost nově vytvořených kapilár, nezbytných pro tvorbu plnohodnotné kostní tkáně.

Objemová frakce nové kostní tkáně (obr. 4.16E) byla větší u defektů vyplněných scaffoldem – 2,8 %, než u nevyplněných defektů – 0,2 % ( $p < 0,001$ ). Nově vytvořená kostní trámčina reprezentovaná osteokalcinem byla také preferenčně tvořena kolem vláken scaffoldu ve vnějším kompartmentu defektu (obr. 4.16A). Plošná frakce osteokalcinu (obr. 4.16F) v defektu byla větší ve vzorcích se scaffoldem – 10,4 %, než u nevyplněných defektů – 0,2 % ( $p < 0,001$ ). Navíc byla zaznamenána přítomnost nově vytvořených kapilár, nezbytných pro tvorbu plnohodnotné kostní tkáně.

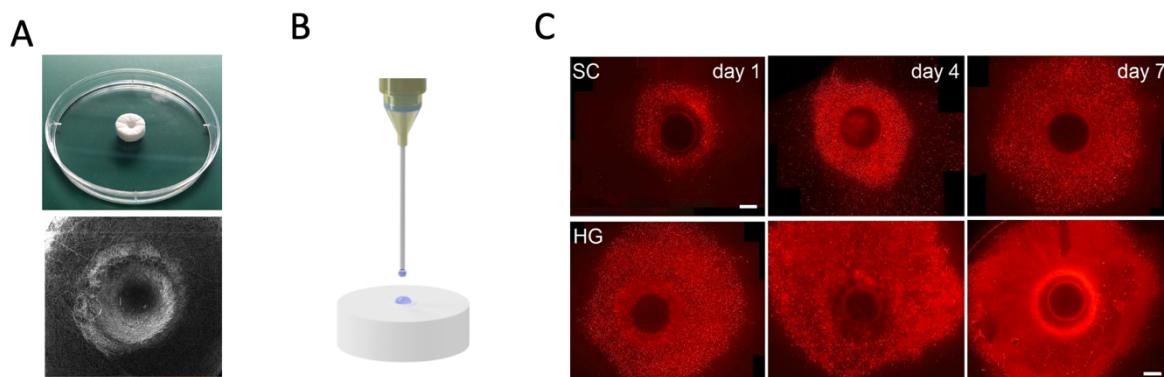
Výsledky této studie ukázaly, že kompozitní scaffoldy vykazují všechny literaturou popisované vlastnosti nezbytné pro vyvolání účinné regenerace kostní tkáně. *In vitro* testy prokázaly z těchto vlastností vysokou míru osteoindukce a vnitřní proliferace buněk do vlákně struktury. V případě *in vivo* studie prokázaly implantované scaffoldy schopnost osteokondukce, která vedla k novotvorbě plnohodnotné, vaskularizované kostní tkáně.

#### 4.7 Komentář č. 5 – The combination of hydrogels with 3D fibrous scaffolds based on electrospinning and meltblown technology

Závěrečná práce z oblasti tkáňového inženýrství studovala možnosti kombinace kompozitních vlákenných scaffoldů s hydrogelovou složkou, která by vedla ke zvýšení regenerační účinnosti. Studie tak reflektovala jeden z vývojových trendů v podobě tvorby kompozitního scaffoldu, jehož tuhá porézní struktura je prosycena hydrogelovou maticí. Hlavním cílem této studie bylo zhodnocení benefitů, které přináší kombinace kompozitní scaffold-hydrogel-biotisk pro podporu buněčné adheze, viability a proliferace *in vitro*. Dílčí cíl představovala identifikace nejvhodnějšího hydrogelu z testovaného portfolia.

V rámci této práce bylo využito portfolio komerčně dostupných hyaluronanových hydrogelů (ESI.BIO), síťovaných thiol-reaktivním PEG činidlem: základní hydrogel bez dalších přísad – GH, hydrogel obohacený heparinem – HP nebo kolagenem typu I – C. Portfolio doplňoval referenční polyethylenglykolový hydrogel síťovaný UV – PEG. Samotný experiment spočíval v povrchové i vnitřní injektáži definovaného množství vybraných hydrogelů obsahujících suspenzi lidských nádorových osteoblastů. Injektáž definovaného objemu hydrogelu při konstantní rychlosti, tlaku a teplotě byla zajištěna díky využití CNC biotiskárny s vyhřívanou hlavou.

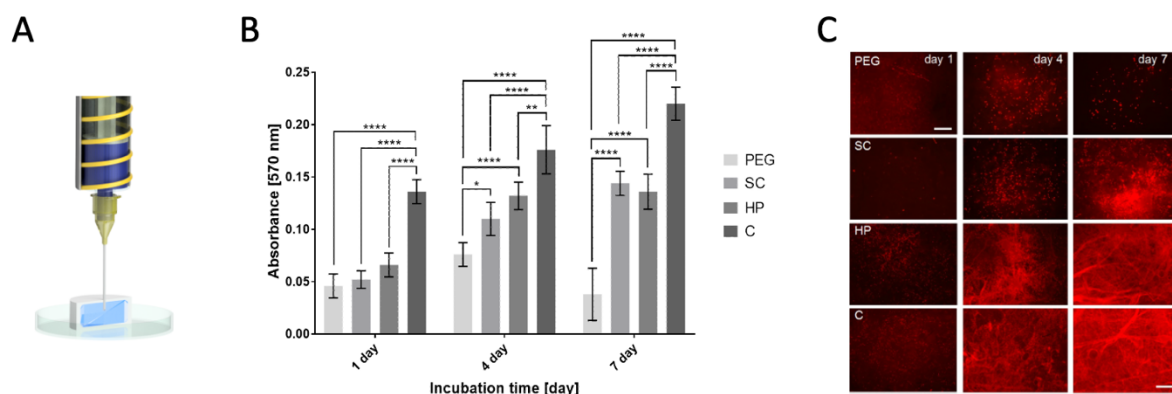
V první fázi byl porovnáván konvenční způsob povrchového osazení scaffoldu (disk 15 × 5 mm) buňkami – SC se způsobem povrchové injektáže stejného množství buněk suspendovaných v hydrogelu – HG (obr. 4.17). Osazení oběma způsoby probíhalo na normované ploše vymezené středovou kavitou o průměru 3,5 mm.



Obrázek 4.17: Porovnání osazení scaffoldu buňkami konvenčním způsobem a s využitím hydrogelu, A) testovací disk scaffoldu a detail středové kavity, B) vizualizace povrchové injektáže, C) fluorescenční mikroskopie proliferujících buněk, měřítko 1 mm

V případě hydrogelu docházelo k vyšší míře buněčné adheze bezprostředně po osazení. Hydrogel také příznivě podporoval povrchovou proliferaci reprezentovanou širším migračním rádiusem buněk od středové kavity 4. i 7. testovací den (obr. 4.17C). Bylo patrné, že hydrogel s buněčnou suspenzí bezprostředně po injektáži smáčel strukturu a migroval podél vláken, napomáhal tak počáteční konsolidaci a širší distribuci buněk rovnoměrně po struktuře scaffoldu.

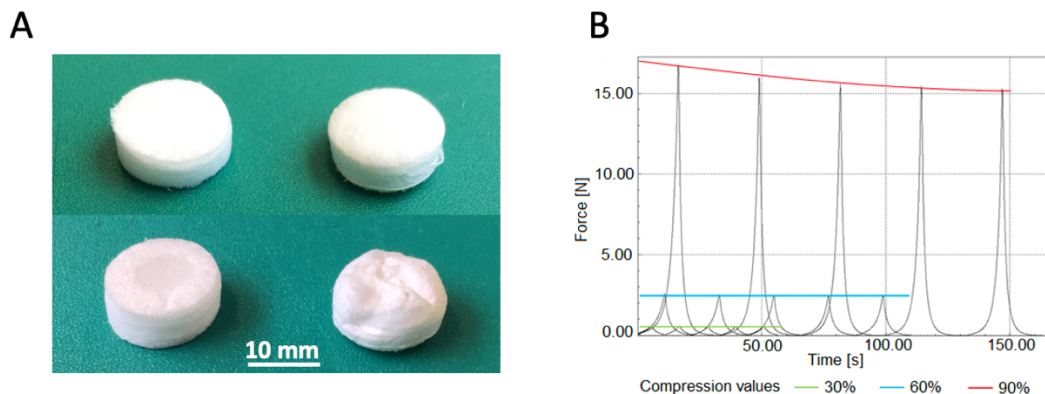
Mezi jednotlivým hydrogely, injektovanými společně s buněčnou suspenzí do vnitřní struktury scaffoldu, byly pozorovány výrazné rozdíly v podpoře buněčné viability a vnitřní proliferace (obr. 4.18). Jako naprosto nevhodný byl vyhodnocen hydrogel PEG s nejnižšími hodnotami dosahované viability. Naopak nejvyšší míru buněčné viability a vnitřní proliferace poskytoval hydrogel C, který umožňoval 7. den téměř konfluentní vyplnění vnitřní struktury scaffoldu.



Obrázek 4.18: Porovnání účinku jednotlivých hydrogelů A) vizualizace vnitřní injektáže, B) hodnoty MTT testu buněčné viability, C) fluorescenční mikroskopie vnitřní proliferace buněk, měřítko 500 μm

V průběhu dalších *in vitro* testů, které zahrnovaly již pouze hydrogel C a referenční skupinu, bylo 7. den kultivace pozorováno jen minimum mrtvých buněk ve vnitřní struktuře scaffoldu, jejichž podíl dosahoval 10 %. Hydrogel tedy umožňoval potřebnou saturaci buněk kyslíkem i nutrienty v celém objemu. Následná mikrotomografická analýza prokázala homogenní prosycení vlákněné struktury hydrogelem bez vniku nežádoucích kavit.

Jedním ze základních parametrů, které umožňovaly účinnou kombinaci kompozitních scaffoldů s hydrogelem, byla jejich mechanická odolnost. Kompozitní scaffoldy nepodléhaly při kontaktu s hydrogelem tvarovému kolapsu, který byl naopak jasně patrný u scaffoldů tvořených pouze vzduchem ukládanými nanovláknky z téhož polymeru.



Obrázek 4.19: Stabilitní testy, A) tvarová stálost po injektáži hydrogelu (kompozitní scaffold vlevo, nanovláknenný scaffold vpravo), B) schopnost vratné deformace v závislosti na míře cyklického namáhání

Potřebná míra mechanických vlastností byla demonstrována také cyklickými testy vratných deformací, která prokázaly, že kompozitní scaffoldy jsou schopné plného zotavení při opakovaném 60% stlačení (obr. 4.19B).

Výsledky této práce prokázaly, že zakomponování vhodné hydrogelové složky do struktury kompozitních scaffoldů zvyšuje jejich bioaktivní potenciál, v podobě vyšší míry počáteční buněčné adheze a proliferace v dalším průběhu *in vitro* kultivace. Benefit hydrogelové složky se projevoval vyšší buněčnou aktivitou zejména ve vnitřní struktuře, která bývá v případě objemných scaffoldů kritickým faktorem z důvodu obtížné saturace dostatečným množstvím kyslíku a nutrientů. Hydrogel, který byl schopný homogenně vyplnit vláknennou strukturu v celém průřezu, tuto saturaci zajišťoval díky vysokému obsahu vodné složky a nízké hustotě vnitřních vazeb. Nejlepších výsledků dosahoval hyaluronanový hydrogel s obsahem kolagenu typu I, tedy jedné ze základních složek kostní ECM. Ukázalo se, že tento přístup umožňuje dostatečná mechanická stabilita kompozitních scaffoldů, které se na rozdíl od čistě nanovláknenných scaffoldů při kontaktu s hydrogolem nedeformovaly. Práce představila benefity plynoucí z tohoto přístupu, avšak pouze na základě elementárních *in vitro* testů, a bude tak nezbytné tyto výsledky verifikovat další sérií podrobnějších experimentů.

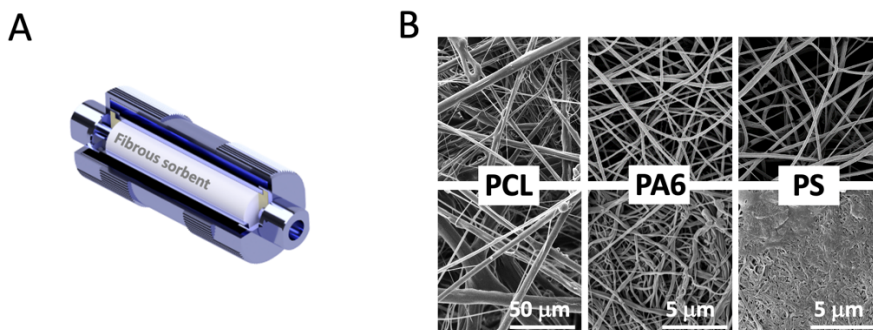
#### **4.8 Komentář č. 6 – A comparison study of nanofiber, microfiber, and new composite nano/microfiber polymers used as sorbents for on-line solid phase extraction in chromatography system**

Zcela první využití vlákenného kompozitu ze směsi mikrovláken a nanovláken jako sorbentu pro úpravu vzorků v analytické chemii bylo realizováno v rámci pilotní studie, kterou představuje tato práce. Cílem bylo studium využitelnosti kompozitu v úpravě vzorků metodou extrakce na tuhé fázi (SPE) pro kapalinové chromatografie při porovnání s dalšími vlákennými sorbenty. Velmi malé množství do té doby publikovaných studií zabývajících se využitím nanovláken jako extrakčních sorbentů se však z důvodu velmi nedostatečných mechanických vlastností nanovláken omezovalo pouze na oblast klasických nízkotlakých off-line metod. Jak již bylo popsáno, současným standardem v SPE se však stávají on-line vysokotlaké metody, pro které byl testovaný kompozit navržen. Proto probíhalo zcela nově toto testování ve vysokotlakém on-line režimu přepínání kolon, který byl součástí vysokotlaké kapalinové chromatografie (HPLC).

Studie se skládala ze dvou na sebe navazujících fází. Pro jednotlivé fáze byly používány různé sady vlákenných sorbentů. V rámci první fáze proběhlo pro jednotlivé sorbenty stanovení základních procesních charakteristik on-line extrakce (složení mobilní fáze, rychlosti průtoku, extrakční časy) různých druhů analytů s rozdílnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. V této fázi byl vlákenný kompozit – PCL porovnáván s polyamidovými – PA6, polystyrenovými – PS, polyvinylidenfluoridovými – PVDF nanovláknými vyrobenými elektrickým zvlákňováním a s komerčním monolitickým sorbentem – C18.

Prvním krokem bylo ověření stability sorbentů umístěných po dobu 24 hodin v ultrazvukové lázni o teplotě 35 °C, obsahující organická rozpouštědla mobilní fáze, kterými byly methanol, etanol, acetonitril a voda. Kompozitní sorbent vykazoval výraznou nestabilitu v acetonitrilu, která však zanikla při snížení teploty na 20 °C.

Při plnicích testech extrakčních kolonek (10 × 4,6 mm) se výrazně projevila mechanická odolnost v kombinaci s objemností kompozitního sorbentu, která umožňovala velmi dobrou manipulovatelnost, rychlost procedury a homogenní vyplnění prostoru bez nežádoucích mrtvých objemů. Naproti tomu PA6 a PS sorbenty bylo nutné zdlouhavě skládat a pěstovat, což stejně nezaručilo homogenní vyplnění prostoru. Další limitací nanovláken spojenou s nedostatečnou hodnotou jejich celkové porozity bylo přílišný nárůst zpětného tlaku při zapojení do systému, který překračoval maximální pracovní limit 10 MPa. Z tohoto důvodu musel být pro další testování snížen objem zaplnění kolonky nanovláknými sorbenty na mez, která dostatečně snížila pracovní tlak.



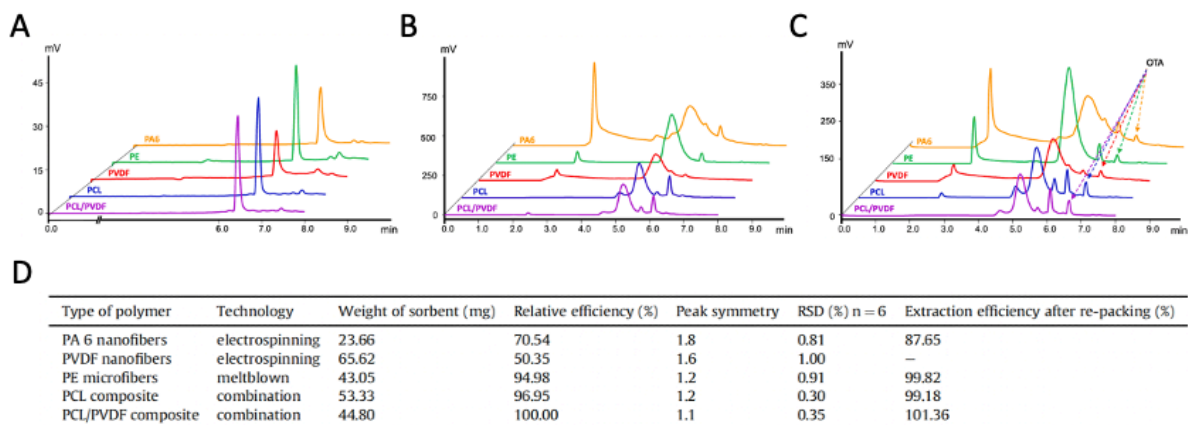
Obrázek 4.20: Plnicí testy, A) vizualizace umístění sorbentu v extrakční kolonce), B) SEM snímky struktury jednotlivých sorbentů před a po extrakci

Ovšem i při snížení tlaku docházelo k částečné (PA6) nebo kompletní deformaci vlákně struktury. Naproti tomu se hodnota zpětného tlaku u kompozitního sorbentu pohybovala v rozmezí 4–5 MPa a nedocházelo k žádným změnám vlákně struktury (obr. 4.20).

Pro předběžný test základních extrakčních vlastností byly vybrány modelové analyty na bázi pyretroidů a insekticidů s rozdílnými hodnotami disociační konstanty i rozdělovacího koeficientu. Nanovlákně sorbent PA6 i kompozitní sorbent vykazovaly srovnatelnou extrakční účinnost a vyšší selektivitu v případě lipofilních analytů. Nicméně kompozitní sorbent dosahoval vyšší reprodukovatelnosti výsledků mezi jednotlivými náplněmi a delší životnost. Při následném porovnání kompozitního sorbentu s komerčním monolitem C18 na reálných vzorcích říční vody a půdy vykazoval kompozitní sorbent srovnatelnou extrakční účinnost a lepší separaci interferencí.

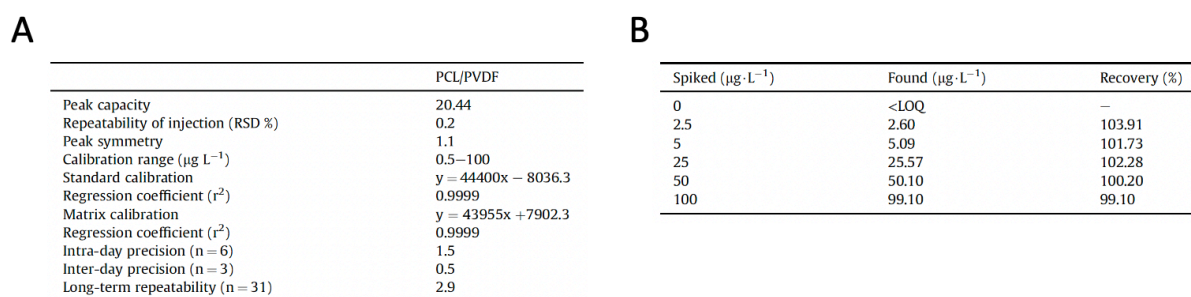
Druhá fáze spočívala v testování pěti druhů vlákně sorbentů pro stanovení mykotoxinu ochratoxinu – OTA v reálných vzorcích piva, na které navazovala validace metody za využití nejúčinnějšího sorbentu. Oproti první fázi byly připraveny dva druhy kompozitních sorbentů. Klasický, s mikrovlákně i nanovlákně složkou z PCL – PCL/PCL, a druhý, obsahující nanovlákně složku z polyvinylidenfluoridu – PCL/PVDF. Dále byla jako referenční sorbenty použita PA6 a PVDF nanovlákně a polyethylenová mikrovlákně – PE.

Obě varianty kompozitního sorbentu dosahovaly v porovnání s ostatními sorbenty výrazně lepších extrakčních vlastností (obr. 4.21). Avšak kompozitní sorbent PCL/PVDF dosahoval díky lipofilnější nanovlákně složce vyšších extrakčních účinností a symetrie píku. Zároveň umožňoval nevyšší míru přečistění balastní matrice. Naproti tomu kompozitní sorbent PCL/PCL vykazoval lepší opakovatelnost. Hodnoty extrakčních vlastností nanovlákně sorbentů byly opět negativně ovlivněny jejich kolabující strukturou. Pro finální validaci metody byl zvolen kompozitní sorbent PCL/PVDF.



Obrázek 4.21: Porovnání extrakční vlastností, A) chromatogramy standardizovaného roztoku OTA, B) chromatogramy pivní matrice, C) chromatogramy pivní matrice s OTA, D) hodnoty extrakčních vlastností

Během validačních testů byla stanovena relativní směrodatná odchylka (RSD %) opakovatelnosti nástřiku při relativní směrodatné odchylce (RSD %) 0,2 % pro 10 po sobě jdoucích analýz. Dlouhodobá opakovatelnost při 31 analýzách realizovaných v různé dny byla stále pouze 2,9 %, tedy výrazně pod hranicí 5 %, která umožňuje standardizovanou validovatelnost analytické metody. Struktura kompozitního sorbentu nevykazovala patrné změny ani po 230 analýzách. Vysoká míra opakovatelnosti i při extrémně dlouhém využití byla významným benefitem ve srovnání s klasickými komerčními sorbenty, které jsou určeny pouze pro jednu analýzu.



Obrázek 4.22: Validace metody, A) validační charakteristiky, B) extrakční účinnost v závislosti na koncentraci kalibračního rozsahu

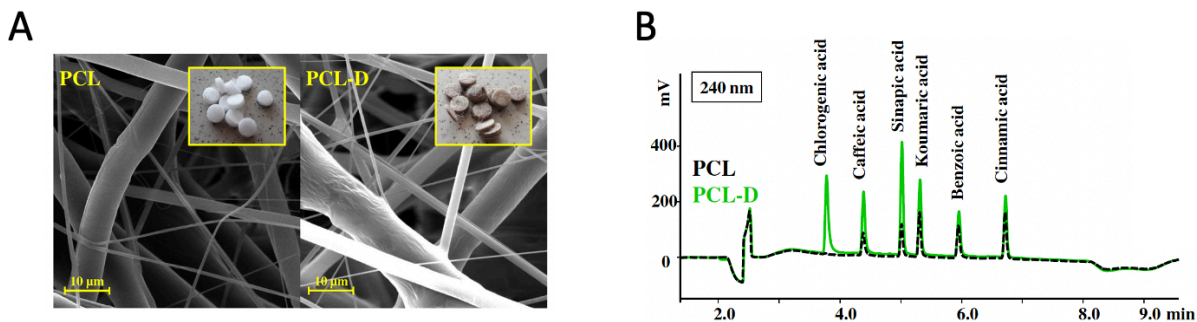
Výsledky pilotní studie prokázaly nesporné výhody kompozitního sorbentu ve srovnání s klasickými nanovláčnými materiály, spočívající zejména v jejich mechano-strukturních vlastnostech. Kompozitní sorbent dosahoval srovnatelných extrakčních vlastností jako komerční C18 sorbent při prokazatelně lepší dlouhodobé stabilitě a schopnosti zadržování interferencí.



#### 4.9 Komentář č. 7 – Polycaprolactone nanofibers functionalized with a dopamine coating for on-line solid phase extraction of bisphenols, betablockers, nonsteroidal drugs, and phenolic acids

Předchozí pilotní studie ukázala, že kompozitní sorbenty mají velmi dobré extrakční vlastnosti v případě nepolárních analytů. To bylo dáno hydrofobním charakterem PCL. Cílem této práce bylo stanovit jednoduchou metodu funkcionizace kompozitních sorbentů, vedoucí ke zvýšení jejich hydrofility, která umožní efektivnější extrakci polárnějších analytů. V rámci práce byl vyvinut funkcionizační postup spočívající v tvorbě souvislé vrstvy polydopaminu na povrchu vláken sorbentu. Dopamin byl vybrán z řady polyfenolických sloučenin schopných velmi účinně tvořit hydrofilní povlaky pro svou silnou afinitu k aminovým, esterovým a thiolovým skupinám substrátu. Samotný protokol tvorby povlaku spočíval v takzvaném „*in situ* dip coatingu“ vzorků v mírně alkalické polymerační lázni.

Pro testování v on-line SPE HPLC systému byly připraveny dva typy kompozitního sorbentu: klasický kompozitní sorbent – PCL a kompozitní sorbent funkcionizovaný polydopaminem, označený jako – PCL-D (obr. 4.23A). Základní extrakční vlastnosti byly testovány pro několik skupin modelových analytů z řad lipofilních bisfenolů hydrofilních fenolových kyselin, nesteroidních antiflogistik kyselého charakteru a betablokátorů alkalického charakteru. Následně byly podrobněji analyzovány extrakční opakovatelnosti na reálných vzorcích říční vody, lidského séra a moči.



Obrázek 4.23: Porovnání extrakčních vlastností, A) struktura kompozitních sorbentů, B) porovnání chromatogramů obou sorbentů pro vybrané fenolové kyseliny

Hydrofilní dopaminový povlak sorbentu podle očekávání zvýšil schopnost extrakce polárnějších analytů ze skupiny fenolových kyselin. Nejmarkantnější rozdíl byl v případě kyseliny chlorogenové, u které byl pozorován záchyt pouze na funkcionizovaném sorbentu (obr. 4.23B). Naopak rozdílná acidobazicitu analytů neměla na extrakci výrazný vliv.

Oba testované sorbenty vykazovaly podobnou stabilitu a opakovatelnost pro všechny analyty, která dosahovala hodnot RSD pod 5 % při deseti 10 po sobě jdoucích analýzách. Nicméně doplňkové testy opakovatelnosti v závislosti na stáří sorbentů prokázaly, že sorbenty dosahovaly požadované přesnosti extrakce do 18 měsíců od data výroby při skladování za běžných atmosférických podmínek. Závěrečné testování na reálných vzorcích prokázalo benefity v případě betablokátorů v moči, kde funkcionalizovaný sorbent dosahoval vyšší extrakční účinnosti i přečištění od interferencí.

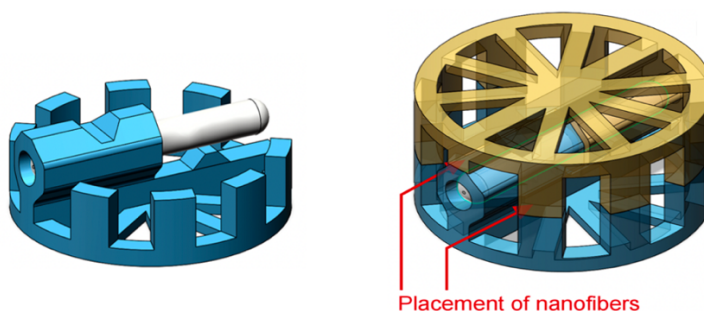
Práce potvrdila významné benefity funkcionalizace kompozitních sorbentů polydopaminovým povlakem pro skupiny polárnějších analytů. Navržená funkcionalizační metoda představuje jednoduchý a relativně levný způsob zvýšení extrakčních vlastností kompozitních sorbentů. Zároveň představuje univerzální platformu, která může být v budoucnu modifikovaná změnou nebo začleněním dalších molekul přinášejících specifické vlastnosti.

#### 4.10 Komentář č. 8 – 3D-printed magnetic stirring cages for semidispersive extraction of bisphenols from water using polymer micro- and nanofibers

Analýza environmentálních vzorků bývá často spojena s nutností jejich úpravy při obsahu analytů v koncentracích pod detekčními limity současných metod. V těchto případech musí být za účelem předkoncentrování a čištění upraveno poměrně velké množství vzorku, což vylučuje použití vysokotlakých on-line technik. Jedním z přístupů úpravy velkoobjemových vzorků metodou SPE bývá extrakce míchací tyčinkou potaženou sorpční vrstvou. Tento přístup je ale obtížně kombinovatelný s vláknými sorbenty. Cílem této práce byl vývoj míchací klece vyrobené pomocí 3D tisku, která umožňovala integraci vlákného sorbentu pro nízkotlakou off-line úpravu vzorků pro analýzu bisfenolů z říčních vod.

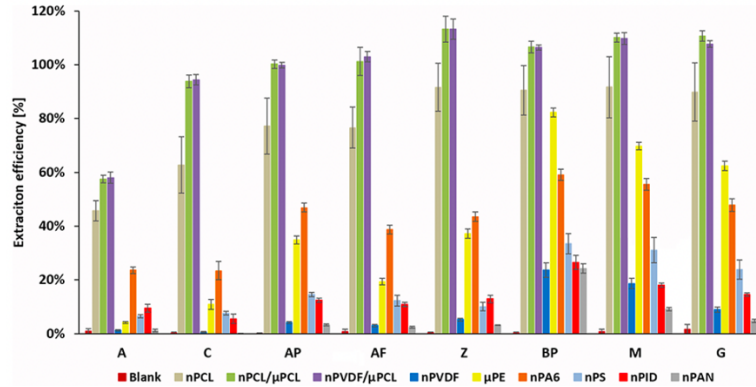
Pro testy byl použit klasický kompozitní sorbent s mikrovláknou i nanovláknou složkou z PCL – PCL/PCL a kompozitní sorbent obsahující nanovláknou složku z PVDF – PCL/PVDF. Dále byly jako referenční sorbenty použity nanovlákné vrstvy z polyamidu – PA6, polyvinylidenfluoridu – PVDF, polykaprolaktonu – PCL, polyimidu – PID, polyakrylonitrilu – PAN, polystyrenu – PS a polyethylenová mikrovlákna – PE.

Míchací klec byla navržena v podobě pouzdra z dvou identických rotačních protikusů spojených vloženou míchací tyčinkou, které obsahovalo dva oddělené prostory pro vložení vlákného sorbentu (obr. 4.24). Klec byla vyrobena technologií FDM 3D tisku z různých polymerních materiálů, které v průběhu výzkumu podléhaly další selekci. Optimální míra rotace klece ve vodných vzorcích byla s ohledem na její stabilitu stanovena na 300 ot/min.



Obrázek 4.24: Konstrukční model míchací klece

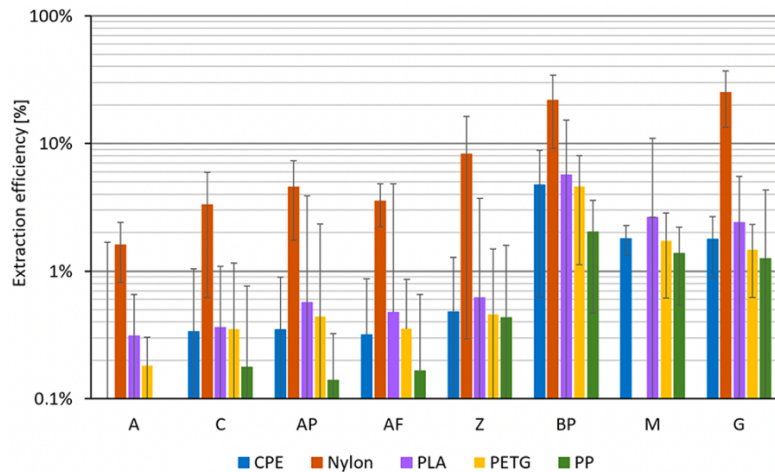
Nejprve bylo provedeno stanovení extrakční účinnosti jednotlivých sorbentů ze směšného standardu bisfenolů. Sorbenty byl umístěny v míchací kleci vyrobené z PLA. Nejvyšší extrakční účinnosti dosahovaly oba kompozitní sorbenty, následované nanovlákným PCL a pak dalšími sorbenty v pořadí podle hodnot extrakční účinnosti na obrázku 4.25.



Obrázek 4.25: Porovnání extrakčních účinností jednotlivých sorbentů

Oba kompozitní sorbenty a mikrovláknový sorbent PE jako jedině během extrakce nepodléhaly výraznější deformaci a kompletně vyplňovaly příslušný prostor. Celkově byly výsledky extrakční účinnosti příznivější pro kompozitní sorbent PCL/PCL, který tak byl vybrán pro další testy.

Dalším kritickým faktorem byla identifikace vhodného tiskového polymeru, který vykazoval nejmenší extrakční kapacitu bisfenolů z vysoce koncentrovaného směsného standardu. U všech testovaných materiálů byla pozorována významná retence bisfenolu BP. Nejnižší extrakční kapacitou bisfenolů vykazovaly klece z PP s max. 2 % (obr. 4.26). S ohledem na vysokou úroveň koncentrace použitého standardu bylo možné PP považovat za inertní. PP byl po následném vyloučení přítomnosti obsahu dalších interferenčních látek v tiskové struně vybrán pro další výzkum.



Obrázek 4.26: Míra extrakce jednotlivých bisfenolů tiskovými materiály

Finální testy extrakčních vlastností ukázaly, že potřebná extrakce analytů ze 100 ml vzorku trvala při použití 50 mg sorbentu 50 minut a následná eluce v methanolu 35 minut, což bylo výrazně méně než časy potřebné v případě klasických extrakčních tyčinek. Míchací pouzdro s totožnou náplní bylo možné použít pro pět extrakčních cyklů při procedurální opakovatelnosti po 5 % RSD. Tato metoda umožňovala limity detekce a kvantifikace bisfenolů v rozsahu 0,1–2,1 respektive 0,4–7,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Míchací klec vytvořená metodou 3D tisku tak v kombinaci s kompozitním sorbentem představovala výhodný technologicko-materiálový koncept pro tvorbu účinné metody úpravy velkoobjemových environmentálních vzorků pro následné analýzy. Představená metoda umožňuje využití v rozmanité řadě aplikací včetně stanovení dalších analytů a potenciálně také pro manipulaci s jinými kapalnými matricemi.

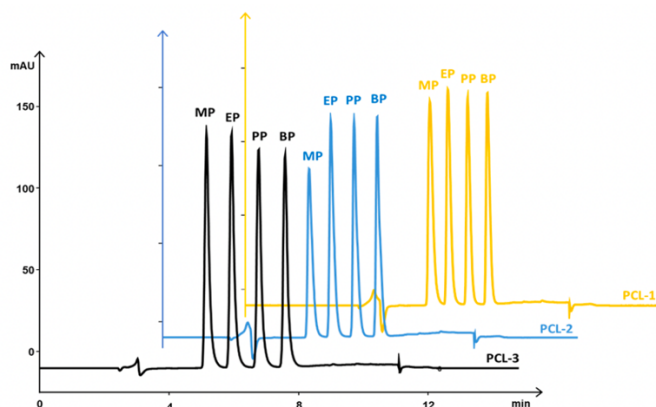
#### **4.11 Komentář č. 9 – Poly- $\epsilon$ -caprolactone nanofibrous polymers: a simple alternative to restricted access media for extraction of small molecules from biological matrixes**

Dosavadní práce byly zaměřeny převážně na studium extrakčních vlastností kompozitních sorbentů pro úpravu potravinářských a environmentálních vzorků v podobě jednodušších vodných matric. Dalším logickým krokem bylo ověření jejich využitelnosti pro biologické vzorky představované komplexními matricemi s vysokým obsahem vysokomolekulárních lipidových a proteinových interferencí. V současné době jsou pro tyto typy matric používány vysoce selektivní RAM sorbenty s omezeným přístupem popsané v kapitole 3.4.4. Tento druh sorbentů je však finančně nákladný a omezený svou chemickou stabilitou i nízkou univerzálností. Cílem této práce tak bylo studium využitelnosti kompozitních vláknenných sorbentů pro extrakci analytů z komplexní biologické matrice v podobě kravského mléka a lidského séra s modelovými analyty v podobě methyl-, ethyl-, propyl- a butylparabenu.

Studium spočívalo v testování extrakčních vlastností klasického PCL kompozitního sorbentu umístěného do tří rozdílných typů extrakčních kolonek, lišících se rozměry vnitřní kavity:  $4,6 \times 25$  mm – PCL 1;  $4,6 \times 10$  mm – PCL 2 a  $2,3 \times 20$  mm – PCL 3. Různé typy kolonek byly porovnávány s komerčním RAM sorbentem ADS RP-C18.

Před testováním reálných matric byl základní princip separace nízkomolekulární analytů a vysokomolekulárních proteinových interferencí testován na modelovém vzorku sérového albuminu. V tomto případě se potvrdil základní předpoklad spočívající v rozdílné intenzitě navázání analytů a proteinů na povrch sorbentu. Proteinové interference tak mohly být velmi účinně vymyty ze sorbentu před závěrečnou elucí analytů na kolonu. Účinnost a rychlost separace proteinových interferencí byla srovnatelná s komerčním RAM sorbentem.

Podle výsledků testování reálných matric v on-line systému byly kompozitní sorbenty účinnější v případě lidského séra. U mléka vykazovaly kolonky PCL 1 a PCL 3 přítomnost zbytkových interferencí spojených s nárůstem zpětného tlaku, což bylo spojeno s vyšším obsahem proteinů v porovnání se sérem. Nedokonalé přečištění od interferencí vedlo zejména k prodloužení času zadržení a celkové analýzy, avšak celková symetrie a ojednocení píků jednotlivých parabenů tím nebyla ovlivněna (obr. 4.27). Geometrie PCL 2 tedy vykazovala nejlepší výsledky, dané dostatečným průřezem a minimalizací kapilárního jevu, zabráňující nadměrnému nárůstu zpětného tlaku. Kolonka PCL 2 dosahovala v případě obou matric extrakční účinnosti v rozmezí 90–100 %.



Obrázek 4.27: Symetrie píků jednotlivých parabenů po extrakci testovanými kolonkami

Opět byla potvrzena vysoká stabilita kompozitního sorbentu, který i po provedení více než 300 extrakcí vykazoval totožnou symetrii píků a opakovatelnost extrakce s hodnotou RSD pod 5 %.

Dosažené výsledky potvrdily, že je možné v případě některých matric nahradit RAM levnější variantou v podobě vlákenného kompozitního sorbentu, který je navíc díky svým mechanickým vlastnostem méně náchylný k poškození při nešetrné manipulaci.

## 5 ZÁVĚR

Předložená disertační práce reprezentuje ucelený soubor výsledků zabývajících se zpracováním biodegradabilního PCL technologií meltblown do podoby mikrovláken a následným návrhem způsobu výroby vlákenného kompozitu využívající tato vlákna jako svou základní složku. Další výsledky popisují využití těchto vlákenných kompozitů jako základu pro vývoj tkáňových nosičů i extrakčních sorbentů a studium jejich využití v regeneraci kostní tkáně a v předúpravě vzorků pro kapalinové chromatografie. Konkrétní výsledky, které přinesla tato práce, jsou:

- **První zveřejněný výzkum dokládající zpracovatelnost samotného PCL technologií meltblown do podoby mikrovlákněné struktury** s vlastnostmi typickými pro tuto technologii. Zpracovatelnost PCL byla přímo závislá na hodnotě jeho molekulové hmotnosti a s úspěchem bylo možné využít PCL s  $M_n$  25 000 g/mol, které dosahovalo tokových vlastností vhodných pro tuto technologii. Na základě výsledků jednotlivých parametrických testů byl stanoven technologický rámec vymezující procesní podmínky, které umožnily produkci mikrovláken s průměry v rozmezí 4–7  $\mu\text{m}$ . Mikrovlákna vyrobená za těchto podmínek nevykazovala projevy degradačních procesů v podobě změny molekulové hmotnosti nebo krystalinity.
- Na základě těchto poznatků byl vyvinut a patentován způsob výroby polymerního vlákenného kompozitu, založený na kombinaci elektrického zvláknování a technologie meltblown. **Tento způsob umožňuje tvorbu vysoce porézní struktury z homogenně dispergované směsi mikrovláken a nanovláken při zachování užitečných vlastností obou složek.** Vysoká porozita, objemnost a homogenita promísení vlákenných složek byla v souladu s tezemi zajištěna depozicí vláken pomocí usměrněného proudu vzduchu. Patent tak představuje v porovnání s konvenčními metodami tvorby samotných nanovláken řádově produktivnější způsob výroby polymerního vlákenného kompozitu se srovnatelnými nebo lepšími vlastnostmi.
- Vlákenný kompozit obsahující obě složky z PCL vykazuje i při 95% porozitě dobrou strukturální stabilitu a schopnost vratných deformací, které umožňují snadnou manipulaci. Kompozit zaručuje snadnou dělitelnost a lze jej velmi jednoduše a rychle tvarově přizpůsobovat s ohledem na koncové využití, což je nezbytná vlastnost například pro augmentaci kostních defektů různých tvarů a velikostí. Výsledná struktura dosahuje četnostního obsahu nanovláken 55 % a středních hodnot průměrů jednotlivých pórů v rozmezí 50–80  $\mu\text{m}$ .



- Základní *in vitro* experimenty s nádorovými osteoblasty ukazují, že vlákenný kompozit s obsahem mikrovláken a nanovláken je schopen jako scaffold podporovat buněčnou adhezi, viabilitu a proliferaci účinněji v porovnání se strukturami tvořenými pouze jednou ze složek. Tato schopnost lze dále podpořit jednoduchou funkcionalizací spočívající v homogenním pokrytí povrchu jednotlivých vláken nanočásticemi hydroxyapatitu nebo prosycením celého objemu struktury vhodným hydrogelem. V případě *in vitro* kultivace s mezenchymálními kmenovými buňkami prokázal kompozitní scaffold osteoindukční vlastnosti v podobě podpory osteogenní diferenciace a exprese kostní extracelulární matrix.
- **Scaffold implantovaný do kostního defektu v kondylu femuru králíka po dobu 70 dnů umožnil *in situ* novotvorbu plnohodnotné, vaskularizované kostní tkáně.** Dosažení takto příznivých výsledků v regeneraci kostní tkáně umožnily zejména mechano-strukturní vlastnosti vlákenného kompozitu.
- Vlákenný kompozit byl testován v analytické chemii jako sorbent pro úpravu vzorků metodou extrakce na tuhé fázi v kapalinových chromatografiích. Při zapojení ve vysokotlakém on-line okruhu přepínání kolon prokazoval na rozdíl od nanovláken potřebnou míru strukturální stability a dosahoval lepších extrakčních vlastností. Výsledky ukazují velmi dobré extrakční účinnosti, zejména pro nepolární skupiny analytů z jednodušších environmentálních i komplexních biologických matic.
- **Kompozitní sorbent dosahoval srovnatelných extrakčních vlastností jako komerční C18 i RAM sorbenty při prokazatelně lepší dlouhodobé stabilitě a schopnosti zadržování interferencí.** Tyto výsledky, spolu s opakovatelností jednotlivých cyklů pod 5 % RSD, vyhovují mezinárodním standardům pro využití v reálných analytických metodách.
- Pro kompozitní sorbent byla navržena metoda funkcionalizace na principu potažení povrchu vláken polydopaminem *in situ* v polymerační lázni. Výsledky potvrdily pozitivní vliv polydopaminového povlaku na účinnost extrakce polárnějších analytů.

Tato práce přinesla soubor inovativních procesů, vedoucí k tvorbě vlákenného kompozitního materiálu s vysokým užitným potenciálem ve tkáňovém inženýrství i analytické chemii. Tento materiál poskytl doposud základ pro vznik téměř tří desítek vědeckých publikací, patentů a užitných vzorů. Prokázané vlastnosti a dosažené výsledky se setkávají s velmi dobrým přijetím vědecké i průmyslové sféry, na základě kterého již probíhá intenzivní snaha o komercializaci v oblasti analytické chemie.

## 6 PERSPEKTIVY BUDOUCÍHO VÝZKUMU

Charakter této práce, spočívající v novosti technologicko-materiálových kombinací, výsledných struktur i jejich následných aplikací, přinesl převážně výsledky fundamentálního charakteru. Tyto výsledky je třeba v budoucnu dále rozvíjet nebo objasnit některé principy vzniku pozorovaných jevů. Budoucí výzkumy vycházející z této práce by se tak měly věnovat těmto tématům:

- Doposud realizované testy zpracovatelnosti polykaprolaktonu technologií meltblown byly limitované celou řadou faktorů a je třeba provést další parametrické studie při vyšším rozsahu průtokového objemu primárního vzduchu a stabilnějších dodávkách polymerní taveniny. V budoucnu by měl být prověřen také vliv změny geometrie trysky a průměrů zvlákňovacích otvorů či možnost zpracování jiným typem technologie, nabízí se například prstencová konstrukce technologie BIAX.
- Samotné kompozitní vlákenné struktury poskytují možnosti budoucího výzkumu spočívající v širokém portfoliu využitelných materiálů a koncových aplikací. Další výzkum by tak měl být zaměřen na nové kombinace polymerních materiálů jednotlivých složek kompozitu, a to biodegradabilních i nedegradabilních. Nové varianty vlákenného kompozitu přinášející rozdílné specifické vlastnosti by mohly být slibnými materiály nejen pro nové typy scaffoldů nebo sorbentů, ale také biologických a průmyslových filtrů.
- V případě tkáňového inženýrství je třeba realizovat další *in vitro* a *in vivo* testy v rámci kterých bude popsáno degradační chování kompozitních scaffoldů v závislosti na podmínkách kultivace nebo implantace. V rámci testů by měl být kladen důraz na analýzu změn mechanických i materiálových vlastností a jejich dopad na okolní tkáň.
- Část práce věnující se analytické chemii prokázala, že kompozitní sorbenty s hodnotou měrného povrchu  $0,3 \text{ m}^2/\text{g}$  jsou schopné dosahovat srovnatelných extrakčních vlastností jako komerční monolitické sorbenty s měrným povrchem  $\sim 250 \text{ m}^2/\text{g}$ . Budoucí výzkum by měl směřovat k objasnění tohoto fenoménu a cílit zejména na porovnání hustoty vazných bodů i kvality vznikajících vazeb na povrchu jednotlivých sorbentů.

## 7 SEZNAM LITERATURY

Agarwal, R. and García, A.J. (2015) 'Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 94, pp. 53–62. doi:10.1016/j.addr.2015.03.013.

Alaswad, S.O., Mahmoud, A.S. and Arunachalam, P. (2022) 'Recent Advances in Biodegradable Polymers and Their Biological Applications: A Brief Review', *Polymers*, 14(22), p. 4924. doi:10.3390/polym14224924.

Albertsson, A.-C. and Varma, I.K. (2003) 'Recent developments in ring opening polymerization of lactones for biomedical applications', *Biomacromolecules*, 4(6), pp. 1466–1486. doi:10.1021/bm034247a.

Ali, A.H. (2022) 'High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): A review', *Annals of Advances in Chemistry*, 6(1), pp. 010–020. doi:10.29328/journal.aac.1001026.

Amini, A.R. *et al.* (2012) 'Optimally Porous and Biomechanically Compatible Scaffolds for Large-Area Bone Regeneration', *Tissue Engineering. Part A*, 18(13–14), pp. 1376–1388. doi:10.1089/ten.tea.2011.0076.

Anitha, A. *et al.* (2017) 'Electrospun Yarn Reinforced NanoHA Composite Matrix as a Potential Bone Substitute for Enhanced Regeneration of Segmental Defects', *Tissue Engineering Part A*, 23(7–8), pp. 345–358. doi:10.1089/ten.tea.2016.0337.

Arraiza, A.L. *et al.* (2007) 'Rheological Behavior and Modeling of Thermal Degradation of Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) and Poly(L-Lactide)', *International Polymer Processing*, 22(5), pp. 389–394. doi:10.3139/217.2067.

Asiabi, M., Mehdinia, A. and Jabbari, A. (2015) 'Preparation of water stable methyl-modified metal–organic framework-5/polyacrylonitrile composite nanofibers via electrospinning and their application for solid-phase extraction of two estrogenic drugs in urine samples', *Journal of Chromatography A*, 1426, pp. 24–32. doi:10.1016/j.chroma.2015.11.036.

Augusto, F. *et al.* (2013) 'New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction', *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 43, pp. 14–23. doi:10.1016/j.trac.2012.08.012.

- Avérous, L. (2013) ‘Synthesis, Properties, Environmental and Biomedical Applications of Polylactic Acid’, *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics*, pp. 171–88. doi:10.1016/B978-1-4557-2834-3.00009-4.
- Badawy, M.E.I. *et al.* (2022) ‘A review of the modern principles and applications of solid-phase extraction techniques in chromatographic analysis’, *Analytical Sciences*, 38(12), pp. 1457–1487. doi:10.1007/s44211-022-00190-8.
- Bagheri, H., Asgari, S. and Piri-Moghadam, H. (2014) ‘On-line Micro Solid-Phase Extraction of Clodinafop Propargyl from Water, Soil and Wheat Samples Using Electrospun Polyamide Nanofibers’, *Chromatographia*, 77(9), pp. 723–728. doi:10.1007/s10337-014-2660-6.
- Bharadwaz, A. and Jayasuriya, A.C. (2020) ‘Recent trends in the application of widely used natural and synthetic polymer nanocomposites in bone tissue regeneration’, *Materials Science and Engineering: C*, 110, p. 110698. doi:10.1016/j.msec.2020.110698.
- Bhat, G. and Malkan, S. (2007) ‘Polymer-laid web formation’, in *Handbook of Nonwovens*, pp. 143–200. doi:10.1533/9781845691998.143.
- Bodaghi, H. and Sinangil, M. (2006) ‘Meltblown nonwoven webs including nanofibers and apparatus and method for forming such meltblown nonwoven webs’. Available at: <https://patents.google.com/patent/US20060084341/en> (Accessed: 4 August 2023).
- Brang, J., Wilkie, A. and Haggard, J. (2008) ‘Method and apparatus for production of meltblown nanofibers’.
- Bresee, R.R. and Ko, W.-C. (2003) ‘Fiber Formation during Melt Blowing’, *International Nonwovens Journal*, os-12(2), pp. 1558925003os–1200209. doi:10.1177/1558925003os-1200209.
- Bresee, R.R. and Qureshi, U.A. (2005) ‘Influence of Processing Conditions on Melt Blown Web Structure. Part III — Water Quench’, *International Nonwovens Journal*, os-14(4), pp. 1558925005os–1400404. doi:10.1177/1558925005os-1400404.
- Breuls, R.G.M., Jiya, T.U. and Smit, T.H. (2008) ‘Scaffold Stiffness Influences Cell Behavior: Opportunities for Skeletal Tissue Engineering’, *The Open Orthopaedics Journal*, 2(1). doi:10.2174/1874325000802010103.

Burkersroda, F. von, Schedl, L. and Göpferich, A. (2002) 'Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion', *Biomaterials*, 23(21), pp. 4221–4231. doi:10.1016/S0142-9612(02)00170-9.

Buszewski, B. and Szultka, M. (2012) 'Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review', *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42(3), pp. 198–213. doi:10.1080/07373937.2011.645413.

Cabello-Alvarado, C. *et al.* (2022) 'Non-woven fabrics based on Nylon 6/carbon black-graphene nanoplatelets obtained by melt-blowing for adsorption of urea, uric acid and creatinine', *Materials Letters*, 320, p. 132382. doi:10.1016/j.matlet.2022.132382.

Chen, T., Wang, X. and Huang, X. (2005) 'Effects of Processing Parameters on the Fiber Diameter of Melt Blown Nonwoven Fabrics', *Textile Research Journal*, 75(1), pp. 76–80. doi:10.1177/004051750507500114.

Chen, X. *et al.* (2017) 'Hierarchically ordered polymer nanofiber shish kebabs as a bone scaffold material', *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 105(6), pp. 1786–1798. doi:10.1002/jbm.a.36039.

Chigome, S. and Torto, N. (2011) 'A review of opportunities for electrospun nanofibers in analytical chemistry', *Analytica Chimica Acta*, 706(1), pp. 25–36. doi:10.1016/j.aca.2011.08.021.

Chronakis, I.S. *et al.* (2006) 'Generation of Molecular Recognition Sites in Electrospun Polymer Nanofibers via Molecular Imprinting', *Macromolecules*, 39(1), pp. 357–361. doi:10.1021/ma052091w.

Cristofaro, F. *et al.* (2018) 'Influence of the nanofiber chemistry and orientation of biodegradable poly(butylene succinate)-based scaffolds on osteoblast differentiation for bone tissue regeneration', *Nanoscale*, 10(18), pp. 8689–8703. doi:10.1039/C8NR00677F.

Darney, P.D. *et al.* (1989) 'Clinical evaluation of the Capronor contraceptive implant: Preliminary report', *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 160(5, Part 2), pp. 1292–1295. doi:10.1016/S0002-9378(89)80015-8.

Deng, J. *et al.* (2011) 'A nanofiber functionalized with dithizone by co-electrospinning for lead (II) adsorption from aqueous media', *Journal of Hazardous Materials*, 196, pp. 187–193. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.09.016.

- Determan, A.S. *et al.* (2004) ‘Encapsulation, stabilization, and release of BSA-FITC from polyanhydride microspheres’, *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 100(1), pp. 97–109. doi:10.1016/j.jconrel.2004.08.006.
- Dorozhkin, S.V. (2018) ‘Calcium Orthophosphate (CaPO<sub>4</sub>) Scaffolds for Bone Tissue Engineering Applications’, *Journal of Biotechnology and Biomedical Science*, 1(3), pp. 25–93. doi:10.14302/issn.2576-6694.jbbs-18-2143.
- Dutton, K. (2008) ‘Overview and Analysis of the Meltblown Process and Parameters’, *Journal of Textile and Apparel, Technology and Management*, 6.
- Dzierzkowska, E. *et al.* (2021) ‘Effects of Process Parameters on Structure and Properties of Melt-Blown Poly(Lactic Acid) Nonwovens for Skin Regeneration’, *Journal of Functional Biomaterials*, 12(1), p. 16. doi:10.3390/jfb12010016.
- Eliasz, N. (2019) ‘Corrosion of Metallic Biomaterials: A Review’, *Materials*, 12(3), p. 407. doi:10.3390/ma12030407.
- Ellison, C.J. *et al.* (2007) ‘Melt blown nanofibers: Fiber diameter distributions and onset of fiber breakup’, *Polymer*, 48(11), pp. 3306–3316. doi:10.1016/j.polymer.2007.04.005.
- Erben, J. *et al.* (2022) ‘New polyamide 6 nanofibrous sorbents produced via alternating current electrospinning for the on-line solid phase extraction of small molecules in chromatography systems’, *Microchemical Journal*, 174, p. 107084. doi:10.1016/j.microc.2021.107084.
- Feng, P. *et al.* (2018) ‘A Multimaterial Scaffold With Tunable Properties: Toward Bone Tissue Repair’, *Advanced Science*, 5(6), p. 1700817. doi:10.1002/advs.201700817.
- Fumes, B.H. *et al.* (2015) ‘Recent advances and future trends in new materials for sample preparation’, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, pp. 9–25. doi:10.1016/j.trac.2015.04.011.
- Gentile, P. *et al.* (2014) ‘An Overview of Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-Based Biomaterials for Bone Tissue Engineering’, *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), pp. 3640–3659. doi:10.3390/ijms15033640.
- Gunatillake, P., Mayadunne, R. and Adhikari, R. (2006) ‘Recent developments in biodegradable synthetic polymers’, *Biotechnology Annual Review*, 12, pp. 301–347. doi:10.1016/S1387-2656(06)12009-8.

Gunatillake, P.A. and Adhikari, R. (2003) 'Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering', *European Cells & Materials*, 5, pp. 1–16; discussion 16. doi:10.22203/ecm.v005a01.

Hao, X. and Zeng, Y. (2019) 'A Review on the Studies of Air Flow Field and Fiber Formation Process during Melt Blowing', *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 58(27), pp. 11624–11637. doi:10.1021/acs.iecr.9b01694.

Harvey, E.J., Henderson, J.E. and Vengallatore, S.T. (2010) 'Nanotechnology and bone healing', *Journal of Orthopaedic Trauma*, 24 Suppl 1, pp. S25-30. doi:10.1097/BOT.0b013e3181ca3b58.

Hasani-Sadrabadi, M.M. *et al.* (2019) 'Hierarchically Patterned Polydopamine-Containing Membranes for Periodontal Tissue Engineering', *ACS nano*, 13(4), pp. 3830–3838. doi:10.1021/acsnano.8b09623.

Hassan, M.A. *et al.* (2013) 'Fabrication of nanofiber meltblown membranes and their filtration properties', *Journal of Membrane Science*, 427, pp. 336–344. doi:10.1016/j.memsci.2012.09.050.

Hassan, M.A., Khan, S.A. and Pourdeyhimi, B. (2016) 'Fabrication of micro-meltblown filtration media using parallel plate die design', *Journal of Applied Polymer Science*, 133(7). doi:https://doi.org/10.1002/app.42998.

Hoda, N. *et al.* (2021) 'Effect of Process Parameters on Fiber Diameter and Fiber Distribution of Melt-Blown Polypropylene Microfibers Produced by Biax Line', *Fibers and Polymers*, 22(1), pp. 285–293. doi:10.1007/s12221-021-9155-5.

Hu, B., He, M. and Chen, B. (2015) 'Nanometer-sized materials for solid-phase extraction of trace elements', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(10), pp. 2685–2710. doi:10.1007/s00216-014-8429-9.

Hu, C. *et al.* (2019) 'Bioinspired surface modification of orthopedic implants for bone tissue engineering', *Biomaterials*, 219, p. 119366. doi:10.1016/j.biomaterials.2019.119366.

Hyötyläinen, T. (2007) 'Principles, developments and applications of on-line coupling of extraction with chromatography', *Journal of Chromatography. A*, 1153(1–2), pp. 14–28. doi:10.1016/j.chroma.2006.11.102.

- Igwe, J.C., Mikael, P.E. and Nukavarapu, S.P. (2014) 'Design, fabrication and in vitro evaluation of a novel polymer-hydrogel hybrid scaffold for bone tissue engineering', *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 8(2), pp. 131–142. doi:10.1002/term.1506.
- Jafari, M., Shim, E. and Joijode, A. (2021) 'Fabrication of Poly(lactic acid) filter media via the meltblowing process and their filtration performances: A comparative study with polypropylene meltblown', *Separation and Purification Technology*, 260, p. 118185. doi:10.1016/j.seppur.2020.118185.
- Jakus, A.E. *et al.* (2016) 'Hyperelastic "bone": A highly versatile, growth factor-free, osteoregenerative, scalable, and surgically friendly biomaterial', *Science Translational Medicine*, 8(358), pp. 358ra127-358ra127. doi:10.1126/scitranslmed.aaf7704.
- Jin, K. *et al.* (2018) 'Melt-Blown Cross-Linked Fibers from Thermally Reversible Diels–Alder Polymer Networks', *ACS Macro Letters*, 7(11), pp. 1339–1345. doi:10.1021/acsmacrolett.8b00685.
- Jin, K. *et al.* (2019) 'Mechanically Robust and Recyclable Cross-Linked Fibers from Melt Blown Anthracene-Functionalized Commodity Polymers', *ACS Applied Materials & Interfaces*, 11(13), pp. 12863–12870. doi:10.1021/acsam.9b00209.
- Jones, A.M. (1987) *A Study of Resin Melt Flow Rate And Polydispersity Effects On The Mechanical Properties of Melt Blown Polypropylene Webs*, *Book of Papers*. Nottingham, England (Fourth International Conference on Polypropylene Fibers and Textiles).
- Kalil, B. (2020) 'Meltblown Nonwovens Markets: COVID-19 Impact Analysis An Overview, Review, and Forecast of the Global Stand-Alone Meltblown Markets'. INDA - Association of the Nonwoven Fabrics Industry.
- Kamin, Z. *et al.* (2019) 'MELT BLOWING PROCESS CONDITIONS FOR NANOFIBERS OF POLYMERS FOR OIL-WATER SEPARATION IN MARINE OIL SPILLS CLEAN-UP APPLICATIONS: A SHORT REVIEW', *Journal of Mechanical Engineering Research and Developments*, 42, pp. 205–210. doi:10.26480/jmerd.05.2019.205.210.
- Kang, X. *et al.* (2007) 'The investigation of electrospun polymer nanofibers as a solid-phase extraction sorbent for the determination of trazodone in human plasma', *Analytica Chimica Acta*, 587(1), pp. 75–81. doi:10.1016/j.aca.2007.01.021.



Kann, Y. (2009) *Bio-based, biodegradable melt blown nonwovens produced from polyhydroxy butyrate (PHB) copolymers*. doi:10.13140/RG.2.2.18324.91521.

Karageorgiou, V. and Kaplan, D. (2005) 'Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis', *Biomaterials*, 26(27), pp. 5474–5491. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.02.002.

Karger, B.L. (1997) 'HPLC: Early and Recent Perspectives', *Journal of Chemical Education*, 74(1), p. 45. doi:10.1021/ed074p45.

Kim, J.H. *et al.* (2011) 'Aptamers-on-nanofiber as a novel hybrid capturing moiety', *Journal of Materials Chemistry*, 21(48), pp. 19203–19206. doi:10.1039/C1JM13558A.

Klopp, L.S. *et al.* (2008) 'Comparison of a caprolactone/lactide film (mesofol) to two polylactide film products as a barrier to postoperative peridural adhesion in an ovine dorsal laminectomy model', *Spine*, 33(14), pp. 1518–1526. doi:10.1097/BRS.0b013e31817886e0.

Koons, G.L., Diba, M. and Mikos, A.G. (2020) 'Materials design for bone-tissue engineering', *Nature Reviews Materials*, 5(8), pp. 584–603. doi:10.1038/s41578-020-0204-2.

Krucińska, I. *et al.* (2013) 'Application of melt-blown technology for the manufacture of temperature-sensitive nonwoven fabrics composed of polymer blends PP/PCL loaded with multiwall carbon nanotubes', *Journal of Applied Polymer Science*, 127(2), pp. 869–878. doi:10.1002/app.37834.

Kumbar, S., Laurencin, C. and Deng, M. (2014) *Natural and Synthetic Biomedical Polymers*. Elsevier. doi:10.1016/C2011-0-07330-1.

Langer, R. and Vacanti, J.P. (1993) 'Tissue Engineering', *Science*, 260(5110), pp. 920–926. doi:10.1126/science.8493529.

Łatwińska, M. *et al.* (2016) 'PLA and PP Composite Nonwoven with Antimicrobial Activity for Filtration Applications', *International Journal of Polymer Science*, 2016, p. e2510372. doi:10.1155/2016/2510372.

Latwinska, M., Sójka-Ledakowicz, J. and Kudzin, M. (2015) 'Influence of poly(3-hydroxybutyrate) addition on the properties of poly(lactic acid) nonwoven obtained by the melt-blown technique', *Polimery*, 60, pp. 486–491. doi:10.14314/polimery.2015.486.

- Li, L. *et al.* (2019) ‘Biomimetic Scaffolds: 3D Molecularly Functionalized Cell-Free Biomimetic Scaffolds for Osteochondral Regeneration (Adv. Funct. Mater. 6/2019)’, *Advanced Functional Materials*, 29(6), p. 1970036. doi:10.1002/adfm.201970036.
- Li, X. *et al.* (2014) ‘Biocomposites reinforced by fibers or tubes as scaffolds for tissue engineering or regenerative medicine’, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 102(5), pp. 1580–1594. doi:10.1002/jbm.a.34801.
- Lin, Y.-Y. *et al.* (2013) ‘Coating die design for suspensions: A NOVEL IDEA TO THE DESIGN OF A COATING DIE FOR SUSPENSIONS’, *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 8(1), pp. 115–129. doi:10.1002/apj.1636.
- Lucena, R. *et al.* (2011) ‘Potential of nanoparticles in sample preparation’, *Journal of Chromatography A*, 1218(4), pp. 620–637. doi:10.1016/j.chroma.2010.10.069.
- Malkan, S. and Wadsworth, L. (1991) ‘Review on melt blowing technology’, *International Nonwovens Bulletin*, 2, pp. 46–52.
- Manavitehrani, I. *et al.* (2016) ‘Biomedical Applications of Biodegradable Polyesters’, *Polymers*, 8(1), p. 20. doi:10.3390/polym8010020.
- Masini, J.C. and Svec, F. (2017) ‘Porous monoliths for on-line sample preparation: A review’, *Analytica Chimica Acta*, 964, pp. 24–44. doi:10.1016/j.aca.2017.02.002.
- Matsugaki, A. *et al.* (2015) ‘Quantitative regulation of bone-mimetic, oriented collagen/apatite matrix structure depends on the degree of osteoblast alignment on oriented collagen substrates’, *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, 103(2), pp. 489–499. doi:10.1002/jbm.a.35189.
- McCulloch, J.G. (1999) ‘The History of the Development of Melt Blowing Technology’, *International Nonwovens Journal*, os-8(1), pp. 1558925099OS–800123. doi:10.1177/1558925099OS-800123.
- McMurry, J.E. (2010) *Fundamentals of Organic Chemistry, 7th Edition*. 7th edition. Australia ; United States: Cengage Learning.
- Middleton, J.C. and Tipton, A.J. (2000) ‘Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices’, *Biomaterials*, 21(23), pp. 2335–2346. doi:10.1016/S0142-9612(00)00101-0.
- Milligan, M.W. and Haynes, B.D. (1994) ‘Air Drag on Monofilament Fibers – Meltblowing Application’, *American Society of Mechanical Engineers [Preprint]*, (54).

- Mirnaghi, F.S. *et al.* (2011) ‘Optimization of the Coating Procedure for a High-Throughput 96-Blade Solid Phase Microextraction System Coupled with LC–MS/MS for Analysis of Complex Samples’, *Analytical Chemistry*, 83(15), pp. 6018–6025. doi:10.1021/ac2010185.
- Moy, J., Limaye, A. and Arinzeh, T.L. (2020) ‘Fibrous scaffolds for bone tissue engineering’, in *Artificial Protein and Peptide Nanofibers: Design, Fabrication, Characterization, and Applications*. Elsevier, pp. 351–382. doi:10.1016/B978-0-08-102850-6.00015-2.
- Müller, D.H. and Krobjilowski, A. (2001) ‘Meltblown Fabrics from Biodegradable Polymers’, *International Nonwovens Journal*, os-10(1), pp. 1558925001os–1000106. doi:10.1177/1558925001os-1000106.
- Murphy, C.M., Haugh, M.G. and O’Brien, F.J. (2010) ‘The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering’, *Biomaterials*, 31(3), pp. 461–466. doi:10.1016/j.biomaterials.2009.09.063.
- Nayak, R. (2012) ‘Fabrication and characterization of polypropylene nanofibers by melt electrospinning and meltblowing’. RMIT University, Australia.
- Nema, T., Chan, E.C.Y. and Ho, P.C. (2010) ‘Application of silica-based monolith as solid phase extraction cartridge for extracting polar compounds from urine’, *Talanta*, 82(2), pp. 488–494. doi:10.1016/j.talanta.2010.04.063.
- O’Brien, F.J. (2011) ‘Biomaterials & scaffolds for tissue engineering’, *Materials Today*, 14(3), pp. 88–95. doi:10.1016/S1369-7021(11)70058-X.
- Olszta, M.J. *et al.* (2007) ‘Bone structure and formation: A new perspective’, *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 58(3), pp. 77–116. doi:10.1016/j.mser.2007.05.001.
- Ötles, S. and Kartal, C. (2016) ‘Solid-Phase Extraction (SPE): Principles and Applications in Food Samples’, *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria*, 15(1), pp. 5–15. doi:10.17306/J.AFS.2016.1.1.
- Plotka-Wasyłka, J. *et al.* (2015) ‘Miniaturized solid-phase extraction techniques’, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 73, pp. 19–38. doi:10.1016/j.trac.2015.04.026.
- Pobloth, A.-M. *et al.* (2018) ‘Mechanobiologically optimized 3D titanium-mesh scaffolds enhance bone regeneration in critical segmental defects in sheep’, *Science Translational Medicine*, 10(423), p. eaam8828. doi:10.1126/scitranslmed.aam8828.

Preti, R. (2016) 'Core-Shell Columns in High-Performance Liquid Chromatography: Food Analysis Applications', *International Journal of Analytical Chemistry*, 2016, p. 3189724. doi:10.1155/2016/3189724.

Proskurina, N.A. *et al.* (2007) 'A combination of solid-phase extraction on hypercrosslinked polystyrene with HPLC determination of furan derivatives in transformer oils', *Russian Journal of Physical Chemistry A*, 81(3), pp. 424–427. doi:10.1134/S0036024407030235.

Reddi, A. h. (2000) 'Morphogenesis and Tissue Engineering of Bone and Cartilage: Inductive Signals, Stem Cells, and Biomimetic Biomaterials', *Tissue Engineering*, 6(4), pp. 351–359. doi:10.1089/107632700418074.

Rezwan, K. *et al.* (2006) 'Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering', *Biomaterials*, 27(18), pp. 3413–3431. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.039.

Rimmer, C.A. (2019) 'Salvatore Fanali, Paul R. Haddad, Colin F. Poole, Marja-Liisa Riekkola (Eds.): Liquid chromatography: fundamentals and instrumentation, 2nd ed.', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411(13), pp. 2745–2746. doi:10.1007/s00216-019-01728-y.

Robinson, R.A. and Watson, M.L. (1952) 'Collagen-crystal relationships in bone as seen in the electron microscope', *The Anatomical Record*, 114(3), pp. 383–409. doi:10.1002/ar.1091140302.

Saeed, K., Park, S.-Y. and Oh, T.-J. (2011) 'Preparation of hydrazine-modified polyacrylonitrile nanofibers for the extraction of metal ions from aqueous media', *Journal of Applied Polymer Science*, 121(2), pp. 869–873. doi:10.1002/app.33614.

Samir, A. *et al.* (2022) 'Recent advances in biodegradable polymers for sustainable applications', *npj Materials Degradation*, 6(1), pp. 1–28. doi:10.1038/s41529-022-00277-7.

Schemitsch, E.H. (2017) 'Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size!', *Journal of Orthopaedic Trauma*, 31 Suppl 5, pp. S20–S22. doi:10.1097/BOT.0000000000000978.

Sengupta, D., Waldman, S.D. and Li, S. (2014) 'From In Vitro to In Situ Tissue Engineering', *Annals of Biomedical Engineering*, 42(7), pp. 1537–1545. doi:10.1007/s10439-014-1022-8.

Sharma, C. *et al.* (2016) 'Fabrication and characterization of novel nano-biocomposite scaffold of chitosan–gelatin–alginate–hydroxyapatite for bone tissue engineering', *Materials Science and Engineering: C*, 64, pp. 416–427. doi:10.1016/j.msec.2016.03.060.

Shen, M. *et al.* (2023) 'Are biodegradable plastics a promising solution to solve the global plastic pollution?', *Environmental Pollution*, 263, p. 114469. doi:10.1016/j.envpol.2020.114469.

Shen, Q. *et al.* (2013) 'Pipette tip solid-phase extraction and ultra-performance liquid chromatography/mass spectrometry based rapid analysis of picrosides from *Picrorhiza scrophulariiflora*', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 80, pp. 136–140. doi:10.1016/j.jpba.2013.03.002.

Sims, N.A. and Martin, T.J. (2014) 'Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit', *BoneKEY Reports*, 3, p. 481. doi:10.1038/bonekey.2013.215.

Sisson, A.L., Ekinici, D. and Lendlein, A. (2013) 'The contemporary role of  $\epsilon$ -caprolactone chemistry to create advanced polymer architectures', *Polymer*, 54(17), pp. 4333–4350. doi:10.1016/j.polymer.2013.04.045.

Skoog, D.A. *et al.* (2014) *Fundamentals of analytical chemistry*. 9th ed. [instructions ed.]. Belmont: Brooks/Cole : Cengage Learning.

Soltani, I. and Macosko, C.W. (2018) 'Influence of rheology and surface properties on morphology of nanofibers derived from islands-in-the-sea meltblown nonwovens', *Polymer*, 145, pp. 21–30. doi:10.1016/j.polymer.2018.04.051.

Souverain, S., Rudaz, S. and Veuthey, J.-L. (2004) 'Restricted access materials and large particle supports for on-line sample preparation: an attractive approach for biological fluids analysis', *Journal of Chromatography B*, 801(2), pp. 141–156. doi:10.1016/j.jchromb.2003.11.043.

Sun, M. *et al.* (2018) 'Effects of Matrix Stiffness on the Morphology, Adhesion, Proliferation and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells', *International Journal of Medical Sciences*, 15(3), pp. 257–268. doi:10.7150/ijms.21620.

Takizawa, T. *et al.* (2018) 'Titanium Fiber Plates for Bone Tissue Repair', *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 30(4). doi:10.1002/adma.201703608.

Tang, S.L.P. and Mukhopadhyay, S.K. (2006) 'Melt-blown lyocell: Influence of solution characteristics on fibre properties', *The Journal of The Textile Institute*, 97(1), pp. 39–47. doi:10.1533/joti.2005.0211.

Tavengwa, N.T. *et al.* (2016) 'Miniaturized pipette-tip-based electrospun polyacrylonitrile nanofibers for the micro-solid-phase extraction of nitro-based explosive compounds', *Journal of Separation Science*, 39(24), pp. 4819–4827. doi:10.1002/jssc.201600730.

Thurman, E.M. and Snavely, K. (2000) 'Advances in solid-phase extraction disks for environmental chemistry', *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 19(1), pp. 18–26. doi:10.1016/S0165-9936(99)00175-2.

Tian, Z., Pan, L. and Pan, Q. (2019) 'Polypropylene grafted with maleic anhydride and styrene as a compatibilizer for biodegradable poly(propylene carbonate)/polypropylene', *Journal of Engineered Fibers and Fabrics*, 14, p. 1558925019849714. doi:10.1177/1558925019849714.

Uyttendaele, M.A.J. and Shambaugh, R.L. (1990) 'Melt blowing: General equation development and experimental verification', *AIChE Journal*, 36(2), pp. 175–186. doi:10.1002/aic.690360203.

Vaananen, H.K. *et al.* (2000) 'The cell biology of osteoclast function', *Journal of Cell Science*, 113(3), pp. 377–381. doi:10.1242/jcs.113.3.377.

Vadas, D. *et al.* (2018) 'Application of Melt-Blown Poly(lactic acid) Fibres in Self-Reinforced Composites', *Polymers*, 10(7), p. 766. doi:10.3390/polym10070766.

Vasapollo, G. *et al.* (2011) 'Molecularly Imprinted Polymers: Present and Future Prospective', *International Journal of Molecular Sciences*, 12(9), pp. 5908–5945. doi:10.3390/ijms12095908.

Vazquez, B., Vasquez, H. and Lozano, K. (2012) 'Preparation and characterization of polyvinylidene fluoride nanofibrous membranes by forcespinning<sup>TM</sup>', *Polymer Engineering & Science*, 52(10), pp. 2260–2265. doi:10.1002/pen.23169.

Vroman, I. and Tighzert, L. (2009) 'Biodegradable Polymers', *Materials*, 2(2), pp. 307–344. doi:10.3390/ma2020307.

Wang, M.O. *et al.* (2015) ‘Evaluating 3D-printed biomaterials as scaffolds for vascularized bone tissue engineering’, *Advanced Materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 27(1), pp. 138–144. doi:10.1002/adma.201403943.

Ward, Gregory F. (2001) ‘Meltblown nanofibres for nonwoven filtration applications’, *Filtration & Separation*, 38(9), pp. 42–43. doi:10.1016/S0015-1882(01)80540-1.

Webb, K., Hlady, V. and Tresco, P.A. (1998) ‘Relative importance of surface wettability and charged functional groups on NIH 3T3 fibroblast attachment, spreading, and cytoskeletal organization’, *Journal of Biomedical Materials Research*, 41(3), pp. 422–430. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(19980905)41:3<422::AID-JBM12>3.0.CO;2-K.

Wennerberg, A. (1998) ‘The importance of surface roughness for implant incorporation’, *International Journal of Machine Tools and Manufacture*, 38(5), pp. 657–662. doi:10.1016/S0890-6955(97)00114-4.

Wente, V.A. (1954) ‘Manufacture of Superfine Organic Fibers, United Department of Commerce’. Office of Technical Services Report No. PB111437, NRL 4364.

Wickramasinghe, M.L., Dias, G.J. and Premadasa, K.M.G.P. (2022) ‘A novel classification of bone graft materials’, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 110(7), pp. 1724–1749. doi:10.1002/jbm.b.35029.

Woodruff, M.A. and Hutmacher, D.W. (2010) ‘The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century’, *Progress in Polymer Science*, 35(10), pp. 1217–1256. doi:10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002.

Xiang, Y., Liu, Y. and Lee, M.L. (2006) ‘Ultrahigh pressure liquid chromatography using elevated temperature’, *Journal of Chromatography. A*, 1104(1–2), pp. 198–202. doi:10.1016/j.chroma.2005.11.118.

Xiao, H. *et al.* (2015) ‘Study on correlation of filtration performance and charge behavior and crystalline structure for melt-blown polypropylene electret fabrics’, *Journal of Applied Polymer Science*, 132(47). doi:10.1002/app.42807.

Xu, Q. *et al.* (2010) ‘Development and validation of a nylon6 nanofibers mat-based SPE coupled with HPLC method for the determination of docetaxel in rabbit plasma and its application to the relative bioavailability study’, *Journal of Chromatography B*, 878(26), pp. 2403–2408. doi:10.1016/j.jchromb.2010.07.011.

- Yang, Z., Best, S.M. and Cameron, R.E. (2018) 'The apatite forming ability of micro- and nanocomposites of  $\alpha$ -Tricalcium phosphate/poly (D,L-lactide-co-glycolide)', *Materials Technology*, 33(12), pp. 803–809. doi:10.1080/10667857.2018.1505067.
- Yu, B. *et al.* (2014) 'Effects of Poly( $\epsilon$ -caprolactone) on Structure and Properties of Poly(lactic acid)/Poly( $\epsilon$ -caprolactone) Meltblown Nonwoven', *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 53(17), pp. 1788–1793. doi:10.1080/03602559.2014.935396.
- Zhang, C., Mcadams II, D.A. and Grunlan, J.C. (2016) 'Nano/Micro-Manufacturing of Bioinspired Materials: a Review of Methods to Mimic Natural Structures', *Advanced Materials*, 28(30), pp. 6292–6321. doi:10.1002/adma.201505555.
- Zhang, D. *et al.* (2002) 'Development and characterization of poly(trimethylene terephthalate)-based bicomponent meltblown nonwovens', *Journal of Applied Polymer Science*, 83(6), pp. 1280–1287. doi:10.1002/app.2295.
- Zhang, H. *et al.* (2021) 'Binary Structured Polypropylene/Polyethylene Glycol Micro-nanofibrous Membranes with Enhanced Water and Air Permeability', *Fibers and Polymers*, 22(1), pp. 69–76. doi:10.1007/s12221-021-9077-2.
- Zhang, T. *et al.* (2017) 'Effect of matrix stiffness on osteoblast functionalization', *Cell Proliferation*, 50(3), p. e12338. doi:10.1111/cpr.12338.
- Zhang, X. *et al.* (2019) 'Aligned electrospun cellulose scaffolds coated with rhBMP-2 for both in vitro and in vivo bone tissue engineering', *Carbohydrate Polymers*, 213, pp. 27–38. doi:10.1016/j.carbpol.2019.02.038.
- Zhao, R. (Rongguo) (2002) 'Melt Blown Dies: A Hot Innovation Spot', *International Nonwovens Journal*, os-11(4), pp. 1558925002OS–01100409. doi:10.1177/1558925002OS-01100409.
- Zhou, C. *et al.* (2018) 'Collagen Functionalized With Graphene Oxide Enhanced Biomimetic Mineralization and in Situ Bone Defect Repair', *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10(50), pp. 44080–44091. doi:10.1021/acsami.8b17636.
- Zinn, M., Witholt, B. and Egli, T. (2001) 'Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 53(1), pp. 5–21. doi:10.1016/s0169-409x(01)00218-6.



## 8 VÝSTUPY KANDIDÁTA VE VZTAHU K ŘEŠENÉ PROBLEMATICE

### Články

Erben, J., Pilarova, K., Sanetrnik, F., Chvojka, J., Jencova, V., Blazkova, L., Havlicek, J., Novak, O., Mikes, P., Prosecka, E., Lukas, D., Kuzelova Kostakova, E. (2015) *The combination of meltblown and electrospinning for bone tissue engineering*. Materials Letters, 143, 172 - 176, DOI: 10.1016/j.matlet.2014.12.100

Erben, J., Jencova, V., Chvojka, J., Blazkova, L., Strnadova, K., Modrak, M., Kuzelova Kostakova, E. (2016) *The combination of meltblown technology and electrospinning – The influence of the ratio of micro and nanofibers on cell viability*. Materials Letters, 173, 153 - 157, DOI: 10.1016/j.matlet.2016.02.147

Rampichova, M., Chvojka, J., Jencova, V., Kubikova, T., Tonar, Z., Erben, J., Buzgo, M., Dankova, J., Litvinec, A., Vocetkova, K., Plecner, M., Prosecka, E., Sovkova, V., Lukasova, V., Kralickova, M., Lukas, D., Amler, E. (2018) *The combination of nanofibrous and microfibrinous materials for enhancement of cell infiltration and in vivo bone tissue formation*. Biomedical Materials, 13(2), DOI: 10.1088/1748-605X/aa9717

Hakova, M., Chocholousova Havlikova, L., Chvojka, J., Erben, J., Solich, P., Svec, F., Satinsky, D. (2018) *A comparison study of nanofiber, microfiber, and new composite nano/microfiber polymers used as sorbents for on-line solid phase extraction in chromatography system*. Analytica Chimica Acta, 1023, 44 - 52, DOI: 10.1016/j.aca.2018.04.023

Sramkova, H. I., Rozas, C. L., Horstkotte, B., Hakova, M., Erben, J., Chvojka, J., Svec, F., Solich, P., Garcia-Campana, A., Satinsky, D. (2019) *Screening of extraction properties of nanofibers in a sequential injection analysis system using a 3D printed device*. Talanta, 197, DOI: 10.1016/j.talanta.2019.01.050

Hakova, M., Chocholousova Havlikova, L., Svec, F., Solich, P., Erben, J., Chvojka, J., Satinsky, D. (2019) *Novel nanofibrous sorbents for the extraction and determination of resveratrol in wine*. Talanta, 206, DOI: 10.1016/j.talanta.2019.120181

Hakova, M., Chocholousova Havlikova, L., Solich, P., Svec, F., Chvojka, J., Erben, J., Satinsky, D. (2019) *Polycaprolactone nanofibers functionalized with dopamine coating: A new sorbent for on-line solid phase extraction of bisphenols, betablockers, nonsteroidal drugs, and phenolic acids*. Microchimica Acta, 186, DOI: 10.1007/s00604-019-3846-2

Sramkova, H. I., Horstkotte, B., Erben, J., Chvojka, J., Svec, F., Solich, P., Satinsky, D. (2020) *3D-printed magnetic stirring cages for semi-dispersive extraction of bisphenols from water using polymer micro- and nanofibers*. Analytical Chemistry, 92, 5, 3964-3971 DOI: 10.1021/acs.analchem.9b05455

Raabova, H., Hakova, M., Chocholousova Havlikova, L., Erben, J., Chvojka, J., Solich, P., Svec, F., Satinsky, D. (2020) *Poly-ε-caprolactone nanofibrous polymers: A simple alternative to restricted access media for extraction of small molecules from biological matrixes*. Analytical Chemistry, 92, 10, 6801–6805, DOI:10.1021/acs.analchem.0c00544

Hakova, M., Valachovic, A., L., Erben, J., Chvojka, J., Solich, P., Svec, F., Satinsky, D. (2020) *On-line polydopamine coating as a new way to functionalize fibrous sorbent for solid phase extraction*. Talanta, 219, DOI: 10.1016/j.talanta.2020.121189

Raabova, H., Erben, J., Chvojka, J., Solich, P., Svec, F., Satinsky, D. (2021) *The role of pKa, log P of analytes, and protein matrix in solid-phase extraction using native and coated nanofibrous and microfibrinous polymers prepared via meltblowing and combined meltblowing / electrospinning technologies*. Talanta, 232, DOI: 10.1016/j.talanta.2021.122470

Kholova, A., Lhotska, I., Erben, J., Chvojka, J., Svec, F., Solich, P., Satinsky, D. (2021) *Comparison study of nanofibers, composite nano/microfiber materials, molecularly imprinted polymers, and core-shell sorbents used for on-line extraction-liquid chromatography of ochratoxins in Tokaj wines*. Microchemical Journal, 170(13), DOI: 10.1016/j.microc.2021.106680

Raabová, H., Chocholoušová Havlíková, L., Erben, J., Chvojka, J., Švec, F., Šatinský, D., Chvojka, J. (2021) *Polycaprolactone Composite Micro/Nanofibrous Material as an Alternative to Restricted Access Media for Direct Extraction and Separation of Non-Steroid Anti-Inflammatory Drugs from Human Serum Using Column-Switching Chromatography*. Nanomaterials, 11(10):2669, DOI: 10.3390/nano11102669

Kholova, A., Lhotska, I., Erben, J., Chvojka, J., Svec, F., Solich, P., Satinsky, D. (2022) *Comparing adsorption performance of microfibers and nanofibers with commercial molecularly imprinted polymers and restricted access media for extraction of bisphenols from milk coupled with liquid chromatography*. Talanta, 252, DOI: 10.1016/j.talanta.2022.123822

Erben, J., Jirkovec, R., Kalous, T., Klicova, M., Chvojka, J. (2022) *The Combination of Hydrogels with 3D Fibrous Scaffolds Based on Electrospinning and Meltblown Technology*. Bioengineering, 9(11):660, DOI: 10.3390/bioengineering9110660

Kholova, A., Lhotska, I., Erben, J., Chvojka, J., Svec, F., Solich, P., Satinsky, D. (2023) *Comparison of nanofibers, microfibers, nano/microfiber graphene doped composites, molecularly imprinted polymers, and restricted access materials for on-line extraction and chromatographic determination of citrinin, zearalenone, and ochratoxin A in plant-based milk beverages*. Microchemical Journal, 191, 108937, DOI: 10.1016/j.microc.2023.108937

### **Patenty a užité vzory**

Chvojka, J., Lukáš, D., Kuželová Košťáková, E., Mikeš, P., Klápš'ová, A., Erben, J., Zálešáková, D. *Kryt kůže nebo rány, který obsahuje canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty, polymerní nanovlákná a/nebo mikrovlákná obsahující canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty, a způsob výroby polymerních nanovláken a/nebo mikrovláken obsahujících canabidiol a/nebo jeho derivát/deriváty*. Patent, PS4029CZ, 16.6.2015

Chvojka, J., Mikeš, P., Sanetník, F., Erben, J., Lukáš, D. *Způsob výroby prostorově tvarované vrstvy polymerních nanovláken a způsob pokrývání prostorově tvarovaného povrchu tělesa prostorově tvarovanou vrstvou polymerních nanovláken*. Patent, CZ 305569 B6, 4.11.2015

Lukáš, D., Mikeš, P., Kuželová Košťáková, E., Pokorný, P., Novák, O., Sanetník, F., Chvojka, J., Havlíček, J., Jenčová, V., Horáková, J., Blažková, L., Pilařová, K., Erben, J., Kovačičin, J. *Způsob a zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná, textilní kompozitní materiál obsahující polymerní nanovlákná*. Patent, CZ 306018 B6, 11.5.2016

Chvojka, J., Novák, O., Lukáš, D., Pokorný, P., Sanetník, F., Erben, J., Jirkovec, R. *Způsob pro výrobu vlákenného nosiče obsahujícího biokompatibilní hydrogel a nosič obsahující biokompatibilní hydrogel připravený tímto způsobem*. Patent, CZ 309728 B6, 23.8.2023

Lukáš, D., Mikeš, P., Kuželová Košťáková, E., Pokorný, P., Novák, O., Sanetník, F., Chvojka, J., Havlíček, J., Jenčová, V., Horáková, J., Blažková, L., Pilařová, K., Erben, J., Kovačičin, J. *Zařízení pro výrobu kompozitního textilního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná*. Užité vzor, CZ 28190 U1, 13.5.2015

## **Projekty**

- 2013–2015 Nanovláknenné materiály pro tkáňové inženýrství. MPO CZ.1.05 / 3.1.00 / 14.0308, student spoluřešitel
- 2017–2019 Nanovláknenné polymery jako perspektivní sorbenty pro on-line extrakci v chromatografických systémech. GAČR 17-08738S, student spoluřešitel
- 2020–2022 Nanovláknenné polymery s funkcí materiálů s omezeným přístupem pro on-line chromatografické extrakce komplexních matic. GAČR 20-19297S, spoluřešitel
- 2023–2025 Nanovláknena jako pokročilé extrakční materiály v chromatografické analýze. GAČR 23-05586S, spoluřešitel
- 2023–2026 Nanovláknenné extrakční sorbenty pro chromatografické analýzy. TAČR TREND, FW06010698, spoluřešitel

## **Mezinárodní prezentace výsledků**

NANOCON – international conference on nanomaterials: 3D micro-nano fibrous scaffold prepared by meltblown in combination with electrospinning for the bone tissue engineering. Poster presentation, Brno, Czech Republic, 2014

Summer school of regenerative Nano-Medicine – From Advanced Delivery Systems to Electronic-Based Devices: Three-dimensional micro- nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering. Poster presentation, Tel Aviv, Israel, 2016

Hydra XII Summer School on Stem Cells Biology: Fibrous three dimensional scaffolds for preparation of thymus organoid, Poster presentation, Hydra, Greece, 2016

NART – international conference of nanofibers, applications and related technologies: Fibrous three dimensional scaffolds for creation of thymus organoid – T cells immunotherapy. Poster presentation, Liberec, Czech Republic, 2017

## **Ocenění**

1st Prize of The International Théophile Legrand Textile Innovation Award: Fibrous three dimensional scaffolds for preparation of thymus organoid – T cells immunotherapy. 2019

Cena ministra pro vynikající studenty a absolventy: Za vývoj nanovláknenných kompozitů pro tkáňové inženýrství a analytickou chemii. 2022

## 9 PŘÍLOHY

### Seznam příloh

Příloha 1: Způsob a zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná, textilní kompozitní materiál obsahující polymerní nanovlákná

Příloha 2: The combination of meltblown and electrospinning for bone tissue engineering

Příloha 3: The combination of meltblown technology and electrospinning – the influence of the ratio of micro and nanofibers on cell viability

Příloha 4: The combination of nanofibrous and microfibrinous materials for enhancement of cell infiltration and in vivo bone tissue formation

Příloha 5: The combination of hydrogels with 3d fibrous scaffolds based on electrospinning and meltblown technology

Příloha 6: A comparison study of nanofiber, microfiber, and new composite nano/microfiber polymers used as sorbents for on-line solid phase extraction in chromatography systém

Příloha 7: Polycaprolactone nanofibers functionalized with a dopamine coating for on-line solid phase extraction of bisphenols, betablockers, nonsteroidal drugs, and phenolic acids

Příloha 8: 3D-printed magnetic stirring cages for semidispersive extraction of bisphenols from water using polymer micro- and nanofibers

Příloha 9: Poly- $\epsilon$ -caprolactone nanofibrous polymers: a simple alternative to restricted access media for extraction of small molecules from biological matrixes

Příloha 10: Metodiky vybraných testů

## **Příloha 1**

# PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

## 306 018

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

*D04H 1/728* (2012.01)  
*B82B 3/00* (2006.01)  
*B82B 1/00* (2006.01)  
*D01D 5/08* (2006.01)

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2014-947**  
(22) Přihlášeno: **22.12.2014**  
(40) Zveřejněno: **22.06.2016**  
**(Věstník č. 25/2016)**  
(47) Uděleno: **11.05.2016**  
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **22.06.2016**  
**(Věstník č. 25/2016)**

(56) Relevantní dokumenty:

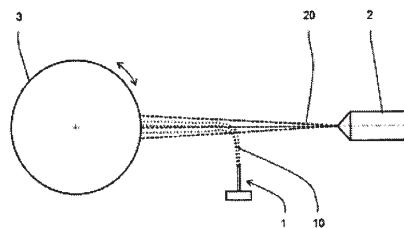
CN 103147226 A; CN 102443870B B; US 7309849 B2; CZ 304137 B6; CZ 2009-149 A.

(73) Majitel patentu:  
Technická univerzita v Liberci, Liberec 1, CZ

(72) Původce:  
prof. RNDr. David Lukáš, CSc., Liberec 6, CZ  
Ing. Petr Mikeš, Ph.D., Mníšek u Liberce, CZ  
doc. Ing. Eva Kuželová Košťáková, Turnov, CZ  
Ing. Pavel Pokorný, Ph.D., Frýdlant v Čechách, CZ  
Ing. Ondřej Novák, Ph.D., Liberec 5, CZ  
Bc. Filip Sanetník, Liberec 1, CZ  
Ing. Jiří Chvojka, Ph.D., Liberec 2, CZ  
Ing. Jiří Havlíček, CSc., Hradec Králové, CZ  
Ing. Věra Jenčová, Ph.D., Liberec 6, CZ  
Mgr. Jana Horáková, Jablonné v Podještědí, CZ  
Ing. Lenka Blažková, Jablonec nad Nisou, CZ  
Mgr. Kateřina Pilařová, Ústí nad Labem, CZ  
Ing. Jakub Erben, Vrchlabí, CZ  
Bc. Jan Kavačičin, Turnov, CZ

(74) Zástupce:  
Ing. Dobroslav Musil, patentová kancelář, Ing.  
Dobroslav Musil, Zábřdovická 11, 615 00 Brno

kombinuje výhodné vlastnosti polymerních nanovláken (10), zejména jejich velký měrný povrch, vysokou sorpční kapacitu, mikronové či submikronové mezivláknenné prostory s výhodnými mechanickými vlastnostmi mikrovláken (20). Vynález se dále týká také zařízení k provádění tohoto způsobu a kompozitního textilního materiálu vyrobeného tímto způsobem a obsahujícího polymerní nanovlákná (10) uložená na povrchu a mezi mikrovlákný (20) nebo mezi dvěma vrstvami mikrovláken (20).



(54) Název vynálezu:  
**Způsob a zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná, textilní kompozitní materiál obsahující polymerní nanovlákná**

(57) Anotace:  
Při způsobu výroby kompozitního textilního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná (10) s alespoň jedním zvláknovacím prvkem (1), na principu odstředivého zvláknování nebo elektrického zvláknování, vytváří objemový útvar tvořený polymerními nanovlákný (10), který se ukládá na povrch kolektoru (3), na který se současně ukládají také mikrovlákná (20) vytvořená technologií melblown a/nebo spunbond a/nebo elektrostatického zvláknování. Přitom na povrchu kolektoru (3) vzniká kompozitní textilní materiál, který

**CZ 306018 B6**

## **Způsob a zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovláknna, textilní kompozitní materiál obsahující polymerní nanovláknna**

### 5 Oblast techniky

Vynález se týká způsobu pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovláknna.

- 10 Vynález se dále týká také zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovláknna. Kromě toho se vynález dále týká také tohoto textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovláknna.

### 15 Dosavadní stav techniky

Do současné doby bylo vyvinuto několik postupů pro výrobu nanovláken, tj. vláken o průměru pod 1 mikrometr, které jsou založeny na různých fyzikálních nebo chemických procesech. Nejvýznamnějším z nich, a v současné době také jediným, který je schopen vyrábět nanovláknna v průmyslovém měřítku, je elektrostatické zvlákňování využívající stejnosměrné napětí, při kterém se nanovláknna formují silovým působením elektrického pole vytvořeného mezi alespoň jednou sběrnou elektrodou a alespoň jednou zvlákňovací elektrodou z roztoku nebo taveniny polymeru. Přitom je výhodné, pokud je zvlákňovací elektroda tvořená tělesem protáhlého tvaru – např. dle CZ 294 274, nebo pokud obsahuje protáhlý zvlákňovací prvek/prvky – např. dle CZ 299 549 po kruhové dráze se pohybující nebo dle CZ 300 345 statickou nebo ve směru své délky se pohybující strunu, atd., a roztok nebo tavenina polymeru se zvlákňuje z povrchu této zvlákňovací elektrody, resp. jejího zvlákňovacího prvku/prvků, neboť v takových případech se dosahuje nejvyšší rovnoměrnosti vytvářené vrstvy polymerních nanovláken.

30 V CZ 304 137 pak byla navržena modifikace tohoto procesu, u které se elektrické pole pro elektrostatické zvlákňování vytváří mezi zvlákňovací elektrodou, na kterou se přivádí střídavé napětí, a ionty vzduchu a/nebo plynu vytvořenými a/nebo přivedenými do jejího okolí. Podle aktuální fáze střídavého napětí se pak na zvlákňovací elektrodě vytváří polymerní nanovláknna s opačným elektrickým nábojem a/nebo s úseky s opačným elektrickým nábojem, která po svém vzniku v důsledku působení elektrostatických sil vytváří objemový útvar, který se volně pohybuje ve směru gradientu elektrických polí směrem od zvlákňovací elektrody. Dle teoretických srovnání dosahuje tato varianta až několikanásobně vyššího výkonu než varianty založené na stejnosměrném napětí.

40 Kromě těchto postupů založených na využití silového působení elektrického pole je dále známý také způsob pro výrobu nanovláken založený na využití odstředivé síly, kdy je roztok nebo tavenina polymeru vytlačován/vytlačována odstředivou silou z otvorů vytvořených v plášti rotujícího tělesa ve tvaru disku (viz např. DE 102005048939) nebo válce (viz např. JP 2008/127 726).

45 Nevýhodou nanovláken vytvářených kterýmkoliv z výše popsanych postupů je to, že je nelze díky jejich velmi nízké pevnosti a soudržnosti využít samostatně, a vždy je nutné je, obvykle již během výroby, ukládat na vhodné podpůrné materiály (např. textilii, papír, kovovou nebo plastovou fólii nebo mřížku, apod.), které jim poskytují požadované mechanické vlastnosti, avšak současně svou přítomností značně omezují jejich reálné využití. Bez uložení na podkladový materiál, případně po sejmutí z něj, se nanovláknna díky svému velkému měrnému povrchu (obvykle ještě v kombinaci se zbytkovým elektrickým nebo elektrostatickým nábojem) a z toho vyplývající vysoké adhezi samovolně shlukují a velmi ochotně ulpívají na okolních předmětech, takže manipulace s nimi a jejich případné využití, je díky tomu značně problematické. Pokud se pak tyto shluky použijí pro přípravu kompozitních materiálů, nezaručují vytvoření struktur



s obvykle požadovaným rovnoměrným rozložením nanovláken, a tedy ani s rovnoměrným rozložením vlastností, resp. parametrů.

5 Cílem vynálezu je navrhnout způsob pro výrobu textilního kompozitního materiálu, který by obsahoval polymerní nanovlákná a další složku/složky, která/ktelé by tomuto materiálu poskytovaly požadované mechanické vlastnosti a morfologii, aniž by však svou přítomností omezovaly reálné využití tohoto materiálu, specifických vlastností nanovláken, nebo přístup k nanovláknům.

10 Kromě toho je cílem vynálezu navrhnout zařízení k provádění tohoto způsobu a textilní kompozitní materiál, který by obsahoval nanovlákná a přitom měl vhodné mechanické vlastnosti pro praktické využití.

#### Podstata vynálezu

15 Cíle vynálezu se dosáhne způsobem výroby kompozitního textilního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná, při kterém se alespoň jedním zvlákňovacím prvkem (na principu odstředivého zvlákňování nebo elektrického zvlákňování) vytváří objemový útvar tvořený polymerními nanovláknými, který se ukládá na povrch kolektoru, na který se současně ukládají také mikrovlákná vytvořená technologií meltblown a/nebo spunbond a/nebo elektrostatického zvlákňování a/nebo  
20 jinou technologií pro výrobu mikrovláken. Přitom na povrchu kolektoru vzniká kompozitní textilní materiál, který kombinuje výhodné vlastnosti polymerních nanovláken – zejména jejich velký měrný povrch, vysokou sorpční kapacitu, mikronové či submikronové mezivláknenné prostory, apod. s výhodnými mechanickými vlastnostmi mikrovláken, díky čemuž je možné s ním velmi  
25 dobře manipulovat nebo ho dále zpracovávat.

Objemový útvar tvořený polymerními nanovláknými a mikrovláknými se přitom na povrchu kolektoru ukládají navzájem nezávisle, nebo se objemový útvar tvořený polymerními nanovláknými před uložením na povrchu kolektoru paralelizuje mezní vrstvou vytvořenou proudem vzduchu nebo plynu  
30 nesoucího nebo usměrňujícího mikrovlákná s těmito mikrovláknými, přičemž v obou případech se polymerní nanovlákná a mikrovlákná na povrch kolektoru ukládají do samostatných, střídajících se, vrstev.

V jiné variantě tohoto způsobu se do objemového útvaru tvořeného polymerními nanovláknými před jeho uložením na povrchu kolektoru zanáší mikrovlákná vytvořená technologií meltblown a/nebo spunbond a/nebo elektrostatického zvlákňování. V takovém případě se polymerní nanovlákná zachytávají a ukládají na povrchu mikrovláken a spojují se s nimi, čímž se vytváří směs  
35 polymerních nanovláken a mikrovláken, která se poté ukládá na kolektor nebo se odvádí do místa jejího dalšího zpracování a/nebo využití.

40 Kromě toho se cíle vynálezu dosáhne také zařízením pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná, které obsahuje alespoň jeden zvlákňovací prvek pro výrobu objemového útvaru tvořeného polymerními nanovláknými, jehož podstata spočívá v tom, že do prostoru výroby polymerních nanovláken a/nebo formování objemového útvaru tvořeného  
45 polymerními nanovláknými je vyústěna alespoň jedna tryska zařízení pro výrobu mikrovláken technologií meltblown a/nebo spunbond a/nebo elektrostatického zvlákňování a/nebo jinou technologií pro výroby mikrovláken.

V jedné variantě je pak proti trysce/tryskám zařízení pro výrobu mikrovláken technologií meltblown a/nebo spunbond a/nebo elektrostatického zvlákňování a/nebo jiného způsobu výroby  
50 mikrovláken na opačné straně zvlákňovacího prvku/prvků uspořádan pohyblivý nebo statický kolektor pro uložení vytvořeného kompozitního textilního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná, nebo odvod vytvořeného kompozitního textilního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná.

55

5 Kolektor je pak s výhodou vytvořený jako elektricky vodivý, přičemž je uzemněný, takže umožňuje odvod elektrického náboje z polymerních nanovláken a/nebo mikrovláken, nebo je propojený se zdrojem elektrického napětí o opačné polaritě než tryska/trysky zařízení pro výrobu mikrovláken, v důsledku čehož jsou k němu mikrovlákná a případně vytvořená směs polymerních nanovláken a mikrovláken přitahována.

10 V jiné variantě provedení obsahuje kolektor elektricky vodivé prvky vzájemně oddělené elektricky nevodivými prvky nebo vzduchovými mezerami, přičemž tyto elektricky vodivé prvky jsou uzemněné, nebo jsou alespoň některé z nich propojené se zdrojem elektrického napětí o opačné polaritě než tryska/trysky zařízení pro výrobu mikrovláken. Mikrovlákná a/nebo nanovlákná se přitom s výhodou formují kolmo na tyto elektricky vodivé prvky.

15 V některých případech je pro dosažení požadovaného pohybu polymerních nanovláken a/nebo mikrovláken nutné, aby byl prostor ve směru pohybu mikrovláken za pro vzduch průchozím kolektorem, a/nebo vnitřní prostor dutého kolektoru s pro vzduch průchozím pláštěm, propojen se zdrojem podtlaku. Případně může být na opačné straně zvlákňovacího prvku/prvků, než na které je vyústěna tryska/trysky zařízení pro výrobu mikrovláken technologií meltblown a/nebo spunbond a/nebo elektrostatického zvlákňování, nebo proti zvlákňovacímu prvku/prvkům uspořádána podtlaková tryska nebo vedení propojené s podtlakovou tryskou pro odvod vytvářeného textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná do místa jejího dalšího zpracování a/nebo využití.

20 Cíle vynálezu se dále dosáhne také kompozitním textilním materiálem obsahujícím polymerní nanovlákná, u kterého jsou polymerní nanovlákná uložena na povrchu a mezi mikrovlákná.

25 Polymerní nanovlákná přitom mohou být uspořádána do vrstvy uložené na vrstvě mikrovláken nebo mezi dvěma vrstvami mikrovláken, nebo s nimi mohou tvořit homogenní nebo v podstatě homogenní směs.

30 V obou variantách pak může v případě potřeby být v materiálu polymerních nanovláken a/nebo mikrovláken a/nebo v mezivlákných prostorech polymerních nanovláken a/nebo mikrovláken zakomponována alespoň jedna vhodná přídavná látka, která nanovláknům a/nebo mikrovláknům poskytuje výhodné vlastnosti a/nebo zvláštní efekt.

### 35 Objasnění výkresů

Na přiloženém výkrese je na obr. 1 znázorněno schéma jedné varianty zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná podle vynálezu a princip jeho funkce, na obr. 2 schéma druhé varianty zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná podle vynálezu a princip jeho funkce, na obr. 3 SEM snímek textilního kompozitního materiálu vytvořeného způsobem podle vynálezu při zvětšení 1000x, na obr. 4 SEM snímek textilního kompozitního materiálu vytvořeného jinou variantou způsobu podle vynálezu při zvětšení 10000x, na obr. 5 SEM snímek textilního kompozitního materiálu vytvořeného jinou variantou způsobu podle vynálezu při zvětšení 4990x, na obr. 6 SEM snímek textilního kompozitního materiálu vytvořeného jinou variantou způsobu podle vynálezu při zvětšení 100x, na obr. 7 SEM snímek textilního kompozitního materiálu vytvořeného jinou variantou způsobu podle vynálezu při zvětšení 5000x, na obr. 8 schéma třetí varianty zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná podle vynálezu a princip jeho funkce, a na obr. 9 SEM snímek textilního kompozitního materiálu vytvořeného variantou způsobu podle vynálezu dle obr. 8, při zvětšení 500x.

Příklady uskutečnění vynálezu

5 Zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná podle  
 vynálezu obsahuje alespoň jeden zvlákňovací prvek 1, kterým je ve variantách znázorněných na  
 obr. 1, obr. 2 a obr. 8 zvlákňovací elektroda pro výrobu polymerních nanovláken zvlákňováním  
 roztoku nebo taveniny polymeru v elektrickém poli způsobem dle CZ 304 137, kdy se elektrické  
 pole, resp. elektrická pole, vytváří mezi alespoň jednou zvlákňovací elektrodou, na kterou se  
 10 z neznázorněného zdroje přivádí střídavé napětí, a ionty vzduchu a/nebo plynu vytvořenými ioni-  
 zací vzduchu a/nebo plynu v blízkosti zvlákňovací elektrody a/nebo přivedenými, resp. průběžně  
 přiváděnými či přitaženými resp. průběžně přitahovanými do jejího okolí. Ve variantách znázor-  
 něných na obr. 1, obr. 2 a obr. 8 je tato zvlákňovací elektroda tvořená statickou trubičkou, avšak  
 v dalších, neznázorněných variantách může být tvořená v podstatě libovolným jiným statickým  
 15 tělesem (např. jehlou, tryskou, lištou, strunou, atd.) nebo libovolným pohybujícím se tělesem  
 (např. rotujícím podlouhlým tělesem, válcem, diskem, spirálou, prstencem, atd., nebo ve směru  
 své délky nebo po kruhové dráze se pohybující strunou nebo skupinou strun, atd.).

20 V jiné, neznázorněné variantě provedení zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu  
 podle vynálezu pak může být zvlákňovací prvek 1 tvořen zvlákňovací hlavou pro výrobu poly-  
 merních nanovláken odstředivým zvlákňováním. Tato hlava přitom obsahuje dutý plášť ve tvaru  
 válce nebo disku, případně jiného tělesa, který je perforovaný množstvím otvorů, ze kterých je  
 roztok nebo tavenina polymeru vytvářející polymerní nanovlákná vytlačována/vytlačována odstře-  
 divou silou vznikající při jeho rotaci. V jiné variantě odstředivého zvlákňování se může zvlákňo-  
 25 vat i z povrchu rotující plochy. Působení odstředivé síly může být v případě potřeby doplněno  
 působením pomocného proudu vzduchu/plynu a/nebo pomocného elektrického pole vytvořeného  
 mezi zvlákňovací hlavou a kolektorem pro ukládání vytvářených nanovláken.

30 Do prostoru, ve kterém se vytváří polymerní nanovlákná 10 a/nebo do prostoru, ve kterém se  
 formují do objemového útvaru (jak bude detailněji popsáno níže) je pak vyústěna alespoň jedna  
 tryska 2 zařízení pro výrobu mikrovláken 20 technologií meltblown a/nebo spunbond a/nebo  
 elektrostatického zvlákňování a/nebo jinou známou technologií. Proti ústí této trysky/trysek 2 je  
 na opačné straně zvlákňovacího prvku 1 uspořádán kolektor 3 tvořený ve variantě znázorněné na  
 obr. 1 otáčejícím se válcem, a ve variantě znázorněné na obr. 2 pohybujícím se nekonečným pá-  
 sem, který je určen pro ukládání vytvářeného textilního kompozitního materiálu. Povrch tohoto  
 35 kolektoru 3, resp. jeho prvků je s výhodou vytvořen z materiálu, ke kterému má tento kompozitní  
 materiál co nejmenší přílnavost, tj. např. z polytetrafluoretylenu (PTFE, teflon), apod., aby bylo  
 možné ho z něj snadno a bez poškození sejmut. V jiných variantách provedení pak může mít  
 kolektor 3 libovolný jiný tvar či konstrukci, přičemž může na svém povrchu obsahovat elektricky  
 vodivé prvky uspořádané např. rovnoběžně s jeho podélnou osou, oddělené vzájemně elektricky  
 40 nevodivými prvky nebo vzduchovými mezerami (např. ve smyslu článku Dan LI, Yuliang Wang  
 and Younan Xia: Electrospinning of Polymeric and Ceramic Nanofibers as Uniaxially Aligned  
 Arrays, Nano Letters 2003, Vol. 3, No. 8, p. 1167–1171) nebo může být tvořen např. kontinuálně,  
 krokově, případně vratně se pohybujícím nekonečným pásem vhodného elektricky vodivého  
 nebo elektricky nevodivého materiálu, případně skupinou nebo nekonečným pásem obsahujícím  
 45 elektricky vodivé prvky vzájemně oddělené vzduchovou mezerou nebo prvky z elektricky nevo-  
 divého materiálu (např. ve smyslu US 2 123 992 nebo WO 2008/062 264, apod.), pohyblivou  
 nebo statickou mřížkou, případně v podstatě libovolným jiným pohyblivým nebo statickým  
 prvkem/prvky průchozím nebo neprůchozím pro vzduch. Pokud je kolektor 3 vytvořen z elek-  
 50 tricky vodivého materiálu, nebo pokud obsahuje prvky pro ukládání textilního kompozitního  
 materiálu z elektricky vodivého materiálu, je výhodné pokud je, resp. jeho prvky jsou, uzem-  
 něn/uzemněny, takže umožňují odvod případného zbytkového elektrického náboje uloženého  
 v polymerních nanovláknách 10 a/nebo mikrovláknách 20, nebo pokud je na něj přivedeno napětí  
 opačné polarity, než je napětí přiváděné na trysku/trysky 2 zařízení pro výrobu mikrovláken 20.

5 Ve variantě provedení znázorněné na obr. 1 je kolektor 3 uložen svou podélnou osou na vodorovné rovině procházející ústím trysky 2, případně vedle sebe uspořádaných trysek 2 pro výrobu mikrovláken 20, avšak dle potřeby může být svou osou uložen pod nebo naopak nad touto rovinou. Prostor za kolektorem 3 a/nebo vnitřní prostor dutého kolektoru 3 s pláštěm průchozím pro vzduch (např. perforovaným nebo tvořeným mřížkou nebo obsahujícím vzduchové mezery oddě-  
lující jeho elektricky vodivé prvky, apod.) je pak s výhodou propojen s neznázorněným zdrojem podtlaku, který svým působením přitahuje vytvářená polymerní nanovlákná 10 a mikrovlákná 20 k povrchu kolektoru 3 a přitlačuje je k němu.

10 V případě potřeby může být kolektor 3 nahrazen jiným prostředkem pro odvod vytvářeného textilního kompozitního materiálu do místa jeho dalšího použití nebo zpracování, jako např. neznázorněnou podtlakovou tryskou, resp. vedením propojeným s podtlakovou tryskou, apod. Taková podtlaková tryska nebo s ní propojené vedení jsou s výhodou uloženy na opačné straně zvlákňovacího prvku 1, než na které je vyústěná tryska/tryska 2 pro výrobu mikrovláken 20, avšak v neznázorněných variantách provedení může být tato tryska nebo toto vedení uložena/uloženo na  
15 opačné straně zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná 10 než zvlákňovací prvek/prvky 1.

20 V dalších, neznázorněných variantách provedení může být do prostoru mezi zvlákňovací prvek/prvky 1 a ústí trysky/trysek 2 pro výrobu mikrovláken dále vyústěna alespoň jedna doplňková vzduchová/plynová tryska pro vhodné usměrnění a/nebo urychlení pohybu polymerních nanovláken 10 a/nebo mikrovláken 20 a/nebo směsi polymerních nanovláken 10 a mikrovláken 20, která případně také napomáhá tuhnutí polymerních nanovláken 10 a/nebo mikrovláken 20 jejich ochlazením a/nebo odvodem par rozpouštědla.

25 Při provozu zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná 10 podle vynálezu osazeného alespoň jedním zvlákňovacím prvkem 1 tvořeným zvlákňovací elektrodou pro výrobu polymerních nanovláken 10 zvlákňováním roztoku nebo taveniny polymeru v elektrickém poli způsobem dle CZ 304 137 se na tuto zvlákňovací elektrodu přivádí  
30 střídavé napětí a elektrické pole, resp. elektrická pole pro zvlákňování se vytváří mezi touto zvlákňovací elektrodou a ionty vzduchu a/nebo plynu vytvořenými ionizací vzduchu a/nebo plynu v blízkosti zvlákňovací elektrody a/nebo přivedenými, resp. průběžně přiváděnými či přitáženými, resp. průběžně přitahovanými do jejího okolí. Silovým působením těchto elektrických polí se pak na povrchu roztoku nebo taveniny polymeru na povrchu zvlákňovací elektrody vytváří tzv. Taylorovy kužely, ze kterých se následně vydlužují jednotlivá polymerní nanovlákná 10.  
35 Střídavé napětí na zvlákňovací elektrodě, resp. periodická změna polarizace zvlákňovací elektrody přitom nedovolí systému vzduch (plyn) – zvlákňovaný roztok nebo tavenina polymeru dosáhnout trvale rovnovážného stavu distribuce iontů vzduchu/plynu, takže zvlákňování může probíhat se stálým výkonem v podstatně libovolně dlouho. Přitom se dle teoretických odhadů i experimentů ukazuje, že výkon tohoto typ elektrostatického zvlákňování je několikanásobně (cca až 5krát či  
40 dokonce až 10krát) větší než u elektrostatického zvlákňování při použití stejnoměrného napětí. Vytvářená polymerní nanovlákná 10 se přitom výhodně formují do objemového útvaru, který se pohybuje ve směru gradientu vytvářených elektrických polí směrem od zvlákňovací elektrody.

45 Na zvlákňovací elektrodu se s výhodou přivádí střídavé napětí o velikosti 10 až 70 kV, s frekvencí 35 až 400 Hz.

50 Při provozu zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná 10 podle vynálezu osazeného zvlákňovacím prvkem 1 tvořeným zvlákňovací hlavou pro výrobu nanovláken odstředivým zvlákňováním vytváří polymerní nanovlákná 10 objemový útvar, který se pohybuje směrem od této hlavy v důsledku své setrvačnosti případně doplněné alespoň jedním pomocným proudem vzduchu/plynu a/nebo působením pomocného elektrického pole.

Do objemového útvaru tvořeného polymerními nanovláknými 10 a pohybujícího se směrem od zvlákňovacího prvku 1 se z trysky/trysek 2 zařízení pro výrobu mikrovláken 20 přivádí mikrovlákná 20, na kterých se polymerní nanovlákná 10 zachytávají, ukládají a případně je (alespoň částečně) obalují, a vytváří tak s nimi kompozitní, samonosný materiál textilního charakteru, s v podstatě homogenním uspořádáním polymerních nanovláken 10 a mikrovláken 20 (viz např. obr. 3, 5, 6, 7). Polymerní nanovlákná 10 a/nebo mikrovlákná 20 přitom mohou v případě potřeby být, díky vhodnému vzájemnému uspořádání jednotlivých prvků zařízení podle vynálezu, v okamžiku kontaktu alespoň částečně v plastickém, resp. ne zcela ztuhlém stavu, díky čemuž se oba typy vláken velmi snadno a současně velmi pevně spojují. Takto vytvořený textilní kompozitní materiál se přitom díky kinetické energii mikrovláken 20 a případně i působení proudu vzduchu nebo jiného plynu, který je vytváří a/nebo unáší, a případně i elektrické přitažlivosti (např. pokud je kolektor 3 nebo jeho elektricky vodivé prvky elektricky nabitý a mikrovlákná se vytváří elektrostatickým zvlákňováním), pohybuje směrem ke kolektoru 3, na který se ukládá. Takto vytvořený textilní kompozitní materiál pak v sobě kombinuje výhodné vlastnosti polymerních nanovláken 10 – tj. např. velký měrný povrch, vysokou sorpční kapacitu, mikronové či submikronové mezivláknenné prostory, apod. s výhodnými mechanickými vlastnostmi mikrovláken 20, díky čemuž je možné s ním velmi dobře manipulovat. Vzhledem k tomu, že kolektor 3 nemusí být ve většině případů elektricky nabitý, resp. ani elektricky aktivní, a textilní kompozitní materiál se tak k němu pohybuje díky své setrvačnosti a/nebo v důsledku působení alespoň jednoho proudu vzduchu/plynu, nedochází při uložení větší vrstvy textilního kompozitního materiálu na něm k jeho „odstínění“, takže vytvářený textilní kompozitní materiál se na kolektor 3 ukládá po celou dobu stejně ochotně, resp. se stejnou intenzitou. Díky tomu lze připravit vrstvu tohoto textilního kompozitního materiálu s v podstatě libovolnou požadovanou tloušťkou a/nebo tento materiál kombinovat s alespoň jednou vrstvou libovolného vhodného materiálu a vytvářet tak vícevrstvý materiál.

Jako kolektor 3 je možné použít také přímo materiál nebo výrobek, na kterém má být vytvořený textilní kompozitní materiál uložený během svého použití.

Jak se během experimentů ukazuje, vytváří se při použití technologie meltblown pro výrobu mikrovláken 20 určitý malý podíl nanovláken (cca kolem 1 %), které jsou z hlediska výroby mikrovláken 20 zanedbatelné, avšak z hlediska výsledného textilního kompozitního materiálu a jeho výsledných vlastností hrají nezanedbatelnou roli.

Vhodným uspořádáním jednotlivých prvků zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná 10 podle vynálezu, jejich počtu a nastavením jednotlivých technologií je pak možné s využitím tohoto zařízení vytvářet textilní kompozitní materiál s v podstatě libovolným podílem polymerních nanovláken 10 a mikrovláken 20, dle požadavků a předpokládané aplikace. Polymerní nanovlákná 10 a/nebo mikrovlákná 20 přitom mohou být vytvořena ze stejného nebo odlišného materiálu, případně mohou být polymerní nanovlákná 10 (např. při využití většího počtu zvlákňovacích prvků 1) a/nebo mikrovlákná 20 (při využití většího počtu trysek 2) vytvářena postupně nebo průběžně z různých materiálů. Kromě toho mohou v případě potřeby polymerní nanovlákná 10 a/nebo mikrovlákná 20 ve své struktuře obsahovat (nano)částice vhodné přídavné látky, které, nebo jejichž prekurzor, se před zvlákňováním přidají do roztoku nebo taveniny polymeru (viz např. CZ 300 797), a při zvlákňování se zakomponují do struktury vytvářených nanovláken 10 a/nebo mikrovláken 20. Kromě toho nebo v kombinaci s tím se mohou do polymerních nanovláken 10 a/nebo mikrovláken 20 a/nebo do jejich směsi přidávat alespoň jedním neznázorněným dávkovacím zařízením částice alespoň jedné kapalné a/nebo pevné přídavné, resp. aktivní látky, dle předpokládaného použití textilního kompozitního materiálu, které se pak ukládají ve struktuře vytvářeného textilního kompozitního materiálu.

V dalších neznázorněných variantách provedení mohou být jednotlivé prvky zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná 10 podle vynálezu uspořádány jinak, než je znázorněno ve variantách na obr. 1, obr. 2 a obr. 8, přičemž vytváření polymerních nanovláken 10 může probíhat v podstatě libovolně (šikmo) nahoru, (šikmo) do boku, nebo

(šikmo) dolů, a vytváření mikrovláken 20 pak podle toho (šikmo) do boku, nebo (šikmo) nahoru nebo (šikmo) dolů, s výhodou tak, aby mikrovlákná 20 pronikala do objemového útvaru tvořeného polymerními nanovláknými 10 pod pravým nebo libovolným ostrým úhlem. V každém případě se však kompozitní materiál tvořený směsí polymerních nanovláken 10 a mikrovláken 20 vytvoří ještě před dopadem na kolektor 3, a po dopadu na něj se již jeho struktura a rozložení jednotlivých složek, resp. typů vláken nemění.

Výhodou přípravy polymerních nanovláken 10 prostřednictvím střídavého napětí nebo odstředivé síly je to, že vytvořený objemový útvar polymerních nanovláken 10 je elektricky neutrální (buď nenese žádný elektrický náboj, nebo se elektrické náboje v jeho různých částech navzájem vyruší), a zejména to, že tyto procesy umožňují vytvářet polymerní nanovlákná 10 v několikanásobně větším množství než elektrostatické zvlákňování s využitím stejnoměrného napětí, což umožňuje také stejným poměrem zvýšit kapacitu použití technologie/technologií pro výrobu mikrovláken 10, a dosáhnout několikanásobně vyšší produktivity.

Níže jsou pro názornost uvedeny konkrétní příklady provedení zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná 10 podle vynálezu a podmínky jeho provozu, s popisem a fotografiemi připravených textilních kompozitních materiálů.

20

#### Příklad 1

Pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná 10 se použilo zařízení podle vynálezu, které obsahovalo jeden zvlákňovací prostředek 1 tvořený zvlákňovací elektrodou ve tvaru trubičky uspořádanou pro zvlákňování směrem nahoru (obr. 1), na kterou se přivádělo střídavé napětí o velikosti 50 kV a frekvenci 50 Hz. Ve vertikální vzdálenosti 20 cm nad ústím této zvlákňovací elektrody a v horizontální vzdálenosti 51 cm od něj byla vyústěna jedna tryska 2 zařízení pro výrobu mikrovláken 20 technologií meltblown, proti které byl na opačné straně zvlákňovacího prostředku 1 v horizontální vzdálenosti 17 cm od ústí zvlákňování elektrody uložen otočný válcový kolektor 3 vytvořený z elektricky nevodivého materiálu. Tlak vzduchu dodávaného do trysky 2 pro výrobu mikrovláken 20 byl 10 Psi.

SEM snímek takto vytvořeného textilního kompozitního materiálu je na obr. 3.

35

#### Příklad 2

Pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná 10 se použilo stejné zařízení podle vynálezu se stejným nastavením jako v příkladu 1, s tím rozdílem, že tlak vzduchu dodávaného do trysky 2 pro výrobu mikrovláken 20 byl 20 Psi.

SEM snímek takto vytvořeného textilního kompozitního materiálu je na obr. 4, ze kterého je zřejmé, že zvýšení tlaku vzduchu při výrobě mikrovláken vedlo k vytvoření svazků polymerních nanovláken 10 a mikrovláken 20.

45

#### Příklad 3

Pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná 10 se použilo stejné zařízení podle vynálezu se stejným nastavením jako v příkladu 1, s tím rozdílem, že vzduch dodávaný do trysky 2 pro výrobu mikrovláken 20 měl teplotu 204,44 °C.

SEM snímek takto vytvořeného textilního kompozitního materiálu je na obr. 5, ze kterého je zřejmé, že zvýšení teploty vzduchu při výrobě mikrovláken 20 vedlo ke spojování mikrovláken 20 a polymerních nanovláken 10 prostřednictvím pevných kontaktů.

55

## Příklad 4

5 Pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná 10 se použilo stejné zařízení podle vynálezu se stejným nastavením jako v příkladu 1, s tím rozdílem, že vertikální vzdálenost trysky 2 zařízení pro výrobu mikrovláken 20 technologií meltblown nad ústím 20 zvlákňovací elektrody byla 10 cm.

10 SEM snímek takto vytvořeného textilního kompozitního materiálu je na obr. 6, ze kterého je zřejmé, že zmenšení vertikální vzdálenosti trysky 2 zařízení pro výrobu mikrovláken 20 nad ústím zvlákňovací elektrody vedlo k vytvoření orientované struktury obsahující polymerní nanovlákná 10 a mikrovlákná 20.

15

## Příklad 5

Pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná 10 se použilo stejné zařízení podle vynálezu se stejným nastavením jako v příkladu 4, s tím rozdílem, že 20 vzduch dodávaný do trysky 2 pro výrobu mikrovláken 20 měl teplotu 93,3 °C.

SEM snímek takto vytvořeného textilního kompozitního materiálu je na obr. 7, ze kterého je zřejmé, že zvýšená teplota vzduchu při výrobě mikrovláken 20 nebyla dostatečná k vytvoření pevných kontaktů mezi polymerními nanovlákná 10 a mikrovlákná 20.

25

Ve variantě zařízení pro výrobu kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná 10 podle vynálezu znázorněné na obr. 8, jsou tryska/trysky 2 zařízení pro výrobu mikrovláken 20 a zvlákňovací prvek/prvky 1 pro výrobu polymerních nanovláken 10 uspořádány tak, že vytvářená polymerní nanovlákná 10 nevstupují do proudu mikrovláken 20, ale jsou strhávána mezní vrstvou vytvořenou proudem vzduchu/plynu nesoucího mikrovlákná 20. V takovém případě překvapivě nedochází k míšení polymerních nanovláken 10 s mikrovlákná 20 a vytvoření směsi, ale k paralelizaci polymerních nanovláken 10 s mikrovlákná 20, přičemž se oba typy vláken na kolektoru 3 ukládají do samostatných vrstev – viz příklad 6 a obr. 9.

35

## Příklad 6

Pro výrobu textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná 10 se použilo zařízení podle vynálezu, které obsahovalo jeden zvlákňovací prostředek 1 tvořený zvlákňovací elektrodou ve tvaru trubičky uspořádanou pro zvlákňování směrem nahoru (obr. 8), na kterou se 40 přivádělo střídavé napětí o velikosti 50 kV a frekvenci 50 Hz. Ve vertikální vzdálenosti 20 cm nad ústím této zvlákňovací elektrody a v horizontální vzdálenosti 55 cm od něj byla vyústěna jedna tryska 2 zařízení pro výrobu mikrovláken 20 technologií meltblown, proti které byl na opačné straně zvlákňovacího prostředku 1 v horizontální vzdálenosti 17 cm od ústí zvlákňování 45 elektrody uložen otočný válcový kolektor 3 vytvořený z elektricky nevodivého materiálu. Tlak vzduchu dodávaného do trysky 2 pro výrobu mikrovláken 20 byl 8 Psi.

Polymerní nanovlákná 10 byla v tomto případě strhávána mezní vrstvou vytvořenou proudem 50 vzduchu nesoucího mikrovlákná 20. Na obr. 9 je SEM snímek takto vytvořeného textilního kompozitního materiálu, ze kterého je zřejmé že polymerní nanovlákná 10 i mikrovlákná 20 se na povrchu podkladu ukládala do samostatných, střídajících se, vrstev.

V jiné, neznázorněné variantě provedení zařízení pro výrobu kompozitního materiálu obsahujícího 55 polymerní nanovlákná podle vynálezu, jsou tryska/trysky 2 zařízení pro výrobu mikrovláken 20 a zvlákňovací prvek/prvky 1 pro výrobu polymerních nanovláken uspořádány zcela odděleně,

přičemž každý typ vláken se na kolektor 3 nanáší samostatně a případně i v jiném místě kolektoru 3, což vede k vytváření vrstev samostatných polymerních nanovláken 10 a mikrovláken 20, podobně jako v předchozí variantě. Přitom je výhodné, pokud je např. kolektor 3 uložen nad zvlákňovacím prvkem/prvky 1 pro výrobu polymerních nanovláken 10, takže polymerní nanovláčka 10 se na něj ukládají bez nutnosti jejich usměrňování a/nebo nesení např. proudem vzduchu/plynu, a mikrovláčka 20 se k němu pohybují působením proudu vzduchu/plynu použitého pro jejich výrobu a/nebo elektrického pole vytvořeného mezi tryskou/tryskami 2 zařízení pro výrobu mikrovláken 20 a kolektorem 3. V jiném prostorovém uspořádání a/nebo v případě potřeby je však možné i polymerní nanovláčka unášet a/nebo usměrňovat ke kolektoru 3 proudem vzduchu/plynu, a/nebo, v případě, kdy během jejich výroby dojde k jejich nabití elektrickým nábojem, elektrickým polem, resp. přivedením elektrického náboje opačné polaritě na kolektor 3.

Textilní kompozitní materiál podle vynálezu v kterékoliv variantě má celou řadu využití, přičemž jako nejvhodnější se v současné době jeví jeho využití jako scaffoldu, resp. nosiče pro osazení živými buňkami pro tkáňové inženýrství, popř. krytu ran. Tomuto využití pak musí odpovídat použité materiály polymerních nanovláken 10 a mikrovláken 20, a případně i přídavné, resp. aktivní látka/látky zakomponované v materiálu polymerních nanovláken 10 a/nebo mikrovláken 20, a/nebo v mezivláčkenných prostorech textilního kompozitního materiálu.

Dalším významným využitím textilního kompozitního materiálu podle vynálezu je i oblast filtrace, přičemž tento materiál umožňuje zkonstruovat vláknenný filtr o vyšší porózitě a tudíž nižších nárocích na tlakové spády. Mikrovláčka 20 přitom vytvářejí tužší kostru filtru a polymerní nanovláčka 10 významně zvyšují jeho efektivitu při hloubkové filtraci.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob výroby kompozitního textilního materiálu obsahujícího polymerní nanovláčka (10), při kterém se alespoň jedním zvlákňovacím prvkem (1) vytváří objemový útvar tvořený polymerními nanovláčkami (10), **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že tento objemový útvar tvořený polymerními nanovláčkami (10) se ukládá na povrch kolektoru (3), na který se současně ukládají také mikrovláčka (20) vytvořená technologií meltblown a/nebo spunbond a/nebo elektrostatického zvlákňování.

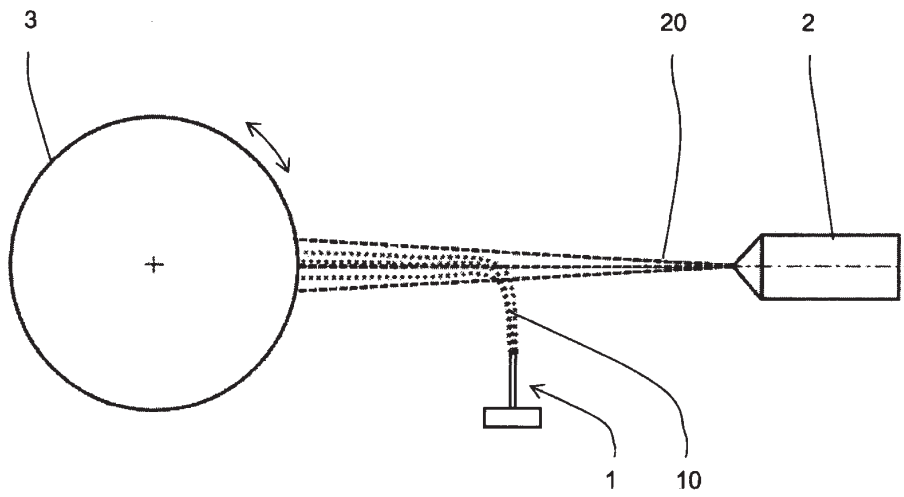
2. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že objemový útvar tvořený polymerními nanovláčkami (10) a mikrovláčkami (20) se na povrchu kolektoru (3) ukládají navzájem nezávisle do samostatných, střídajících se, vrstev.

3. Způsob podle nároku 1, **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že objemový útvar tvořený polymerními nanovláčkami (10) se před uložením na povrchu kolektoru (3) paralelizuje mezní vrstvou vytvořenou proudem vzduchu nebo plynu nesoucího nebo usměrňujícího mikrovláčka (20) s těmito mikrovláčkami (20), přičemž polymerní nanovláčka (10) a mikrovláčka (20) se na povrch kolektoru (3) ukládají navzájem nezávisle do samostatných, střídajících se, vrstev.

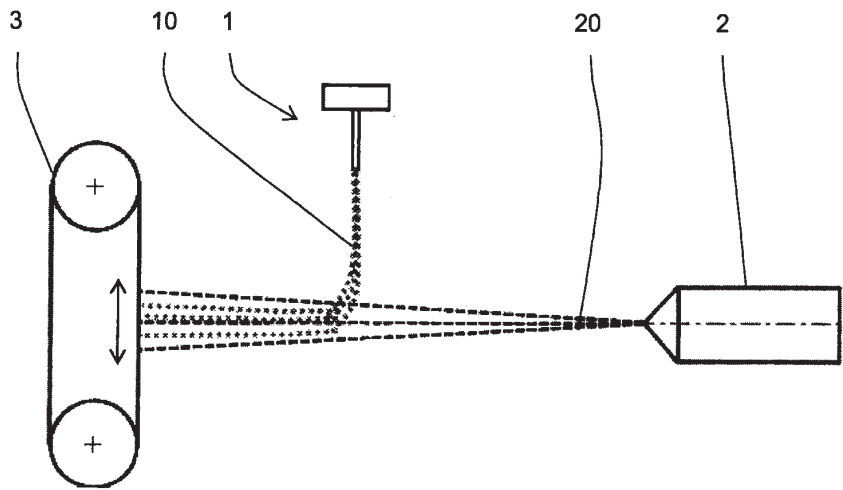
4. Způsob výroby kompozitního textilního materiálu obsahujícího polymerní nanovláčka (10), při kterém se alespoň jedním zvlákňovacím prvkem (1) vytváří objemový útvar tvořený polymerními nanovláčkami (10), **v y z n a č u j í c í s e t í m**, že do objemového útvaru tvořeného polymerními nanovláčkami (10) se před jeho uložením na povrchu kolektoru (3) zanášejí mikrovláčka (20) vytvořená technologií meltblown a/nebo spunbond a/nebo elektrostatického zvlákňování, přičemž polymerní nanovláčka (10) se zachytávají a ukládají na povrchu mikrovláken (20) a spojují se s nimi, čímž se vytváří směs polymerních nanovláken (10) a mikrovláken (20), která se poté ukládá na kolektor (3) nebo se odvádí do místa jejího dalšího zpracování a/nebo využití.



5. Zařízení pro výrobu textilního kompozitního materiálu podle libovolného z nároků 1 až 4, obsahujícího polymerní nanovlákná (10), které obsahuje alespoň jeden zvlákňovací prvek (1) pro výrobu objemového útvaru tvořeného polymerními nanovláknými (10), **vyznačující se tím**, že do prostoru výroby polymerních nanovláken (10) a/nebo formování objemového útvaru tvořeného polymerními nanovláknými (10) je vyústěna alespoň jedna tryska (2) zařízení pro výrobu mikrovláken (20) technologií meltblown a/nebo spunbond a/nebo elektrostatického zvlákňování.
6. Zařízení podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že proti trysce/tryskám (2) zařízení pro výrobu mikrovláken (20) technologií meltblown a/nebo spunbond a/nebo elektrostatického zvlákňování je na opačné straně zvlákňovacího prvku/prvků (1) uspořádán pohyblivý nebo statický kolektor (3) pro uložení vytvořeného kompozitního textilního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná (10), nebo odvod vytvořeného kompozitního textilního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná (10).
7. Zařízení podle nároku 6, **vyznačující se tím**, že kolektor (3) je elektricky vodivý, a je uzemněný, nebo je propojený se zdrojem elektrického napětí o opačné polaritě než tryska/trysky (2) zařízení pro výrobu mikrovláken (20).
8. Zařízení podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že kolektor (3) obsahuje elektricky vodivé prvky vzájemně oddělené elektricky nevodivými prvky nebo vzduchovými mezerami, přičemž tyto elektricky vodivé prvky jsou uzemněné, nebo jsou alespoň některé z nich propojené se zdrojem elektrického napětí o opačné polaritě než tryska/trysky (2) zařízení pro výrobu mikrovláken (20).
9. Zařízení podle libovolného z nároků 5 až 8, **vyznačující se tím**, že prostor ve směru pohybu mikrovláken (20) za pro vzduch průchozím kolektorem (3) a/nebo vnitřní prostor dutého kolektoru (3) s pro vzduch průchozím pláštěm je propojen se zdrojem podtlaku.
10. Zařízení podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že na opačné straně zvlákňovacího prvku/prvků (1), než na které je vyústěna tryska/trysky (2) zařízení pro výrobu mikrovláken (20) technologií meltblown a/nebo spunbond a/nebo elektrostatického zvlákňování, nebo proti zvlákňovacímu prvku/prvkům (1) je uspořádána podtlaková tryska nebo vedení propojené s podtlakovou tryskou pro odvod vytvářeného textilního kompozitního materiálu obsahujícího polymerní nanovlákná (10).
11. Kompozitní textilní materiál vytvořený způsobem podle libovolného z nároků 1 až 4 na zařízení podle libovolného z nároků 5 až 10, obsahující polymerní nanovlákná (10), **vyznačující se tím**, že polymerní nanovlákná (10) jsou uložena na povrchu a mezi mikrovláknými (20).
12. Kompozitní textilní materiál vytvořený způsobem podle libovolného z nároků 1 až 4 na zařízení podle libovolného z nároků 5 až 10, obsahující polymerní nanovlákná (10), **vyznačující se tím**, že polymerní nanovlákná (10) jsou uspořádána do vrstvy uložené na vrstvě mikrovláken (20) nebo mezi dvěma vrstvami mikrovláken (20).
13. Kompozitní textilní materiál podle nároku 11 nebo 12, **vyznačující se tím**, že v materiálu polymerních nanovláken (10) a/nebo mikrovláken (20) a/nebo v mezivlákných prostorech polymerních nanovláken (10) a/nebo mikrovláken (20) je zakomponována alespoň jedna přídavná látka.



Obr. 1



Obr. 2



Obr. 3

## **Příloha 2**



## The combination of meltblown and electrospinning for bone tissue engineering



Jakub Erben<sup>a</sup>, Katerina Pilarova<sup>a</sup>, Filip Sanetrnik<sup>a</sup>, Jiri Chvojka<sup>a</sup>, Vera Jencova<sup>a</sup>, Lenka Blazkova<sup>a</sup>, Jiri Havlicek<sup>a</sup>, Ondrej Novak<sup>a</sup>, Petr Mikes<sup>a</sup>, Eva Prosecka<sup>b</sup>, David Lukas<sup>a</sup>, Eva Kuzelova Kostakova<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Technical University of Liberec, Liberec, Czech Republic

<sup>b</sup> Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences, Praha, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 September 2014

Accepted 4 December 2014

Available online 29 December 2014

#### Keywords:

Meltblown

Electrospinning

Tissue Engineering

Polycaprolactone

### ABSTRACT

Materials combining meltblown and electrospinning products with hydroxyapatite powder as potential scaffolds for bone tissue engineering are presented here. The combination of these technologies and parameters and final micro-nanofibrous products are introduced too. The in-vitro testing compared meltblown material, meltblown material with sputtered particles, meltblown material combined with electrospun fibers, meltblown material combined with electrospun fibers and sputtered particles. All the fibrous materials are produced from polycaprolactone. The first in-vitro tests showed the high potential of developed composite materials in bone tissue engineering. The structure of the tested materials allows osteoblasts to proliferate into the sample inner structure with the significant contribution of nanofiber content to cell proliferation.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Meltblown is a nonwoven technology which produces fine fibers (1–5 μm) typically from thermoplastic fiber forming polymers by extrusion through a die containing small orifices. Then the fibers are rapidly attenuated by converging streams of hot air and subsequently blown by high-velocity air onto a collector [1]. The technology is very usable and its products are used in many technical, hygienic and medical applications such as filtration media, sorption pads, diapers, breathing masks, disposable cloth and others. The basic polymers used for meltblown nonwoven production are polypropylene [1,2], polyethylene [3], polystyrene [4], polyethylene terephthalate [1,5], polylactic acid [6], polybutylene terephthalate [1] and others. With the exception of polylactic acid, these polymers are not biodegradable and they cannot be used as scaffolds for tissue engineering. Nevertheless, structurally, meltblown materials are suitable for the bone or knee cartilage scaffold due to the small diameter of their fibers, random orientation of fibers, three-dimensional structure, high porosity, optimal pore size etc. [7].

Electrospinning is generally a well known technology for polymer nanofibrous materials production with respect to their application in

biomedical applications [8]. There are many publications confirming their appropriateness as scaffolds for tissue engineering [9,10]. The combination of electrospun materials and particles like hydroxyapatite either inside fibers [11] or in between fibers [12,13] was observed and proposed.

This study aims to fabricate a novel composite material for bone tissue engineering consisting of microfibers produced by meltblown technology ensuring an optimal three-dimensional porous structure and sufficient mechanical properties, electrospun nanofibers for good cell adhesion [14,15] and particles enhancing the biological activity and mineralization of regenerated bone tissue. The production is continuous and all technologies are composed into one step. No additional bonding, shaping etc. is necessary. The successful preliminary in-vitro tests of the scaffolds prepared by the method are described here. The results showed that the composite materials significantly promoted proliferation, viability and cell adhesion compared to simple meltblown materials.

### 2. Experimental part

**Materials:** Poly-ε-caprolactone (PCL;  $M_{ww}$  45,000; Sigma Aldrich), chloroform (Penta), ethanol (Et-OH; Penta), hydroxyapatite (HA; calcium hydroxyphosphate;  $M_{ww}$  502.31; powder; Sigma Aldrich) were used for the composite materials production.

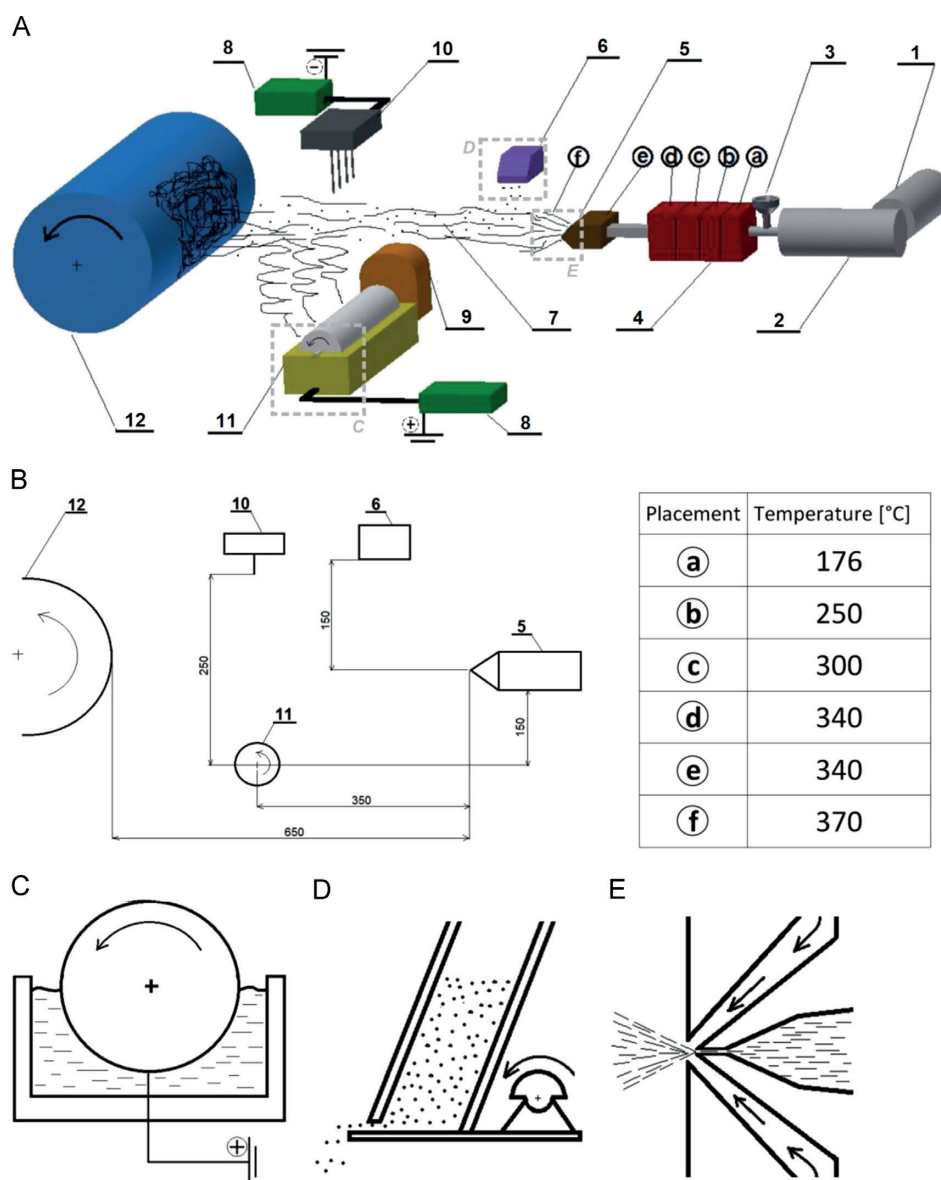
\* Corresponding author. Tel.: +420 48 535 3233.

E-mail address: [eva.kostakova@tul.cz](mailto:eva.kostakova@tul.cz) (E. Kuzelova Kostakova).

**Scaffold fabrication:** A solution of 16 wt% PCL in chloroform/ethanol (9:1 by weight) was prepared for electrospinning. The scheme of production equipment set-up with optimal conditions is shown in Fig. 1. The whole set-up consists of a meltblown device (laboratory equipment J&M Laboratories, USA), electrospinning device (needleless roller electrospinning) and sputtering device. The meltblown extruder screw rotated at 40 rpm, which means 100 g of polymer per 1 h and air velocity at 20 cm from meltblown die was  $20 \text{ m s}^{-1}$ . The meltblown die length is 15 cm. The spinning of electrospin roller was 50 rpm, diameter was 30 mm and length 15 cm. The roller charging was 35 kV positive and collector charging 20 kV negative.

The sputtering device based on vibration principle consists of three electric motors with the cam amounting to a total length of 15 cm, the movements of which force the powder to fall from a gap of 1 mm. The study compares four different materials: (i) meltblown material (M); (ii) meltblown material with sputtered particles (MS); (iii) meltblown material combining with electrospun fibers (ME); (iv) meltblown material combining with electrospun fibers and sputtered particles (MES). Ambient temperature and relative humidity were 23 °C; 45% during all experiments.

**Characterization:** Dry scaffolds were sputter-coated with gold and then observed by a scanning electron microscopy (SEM, Tescan



**Fig. 1.** Scheme of the combination of meltblown and electrospinning with integration of particles in-situ into the producing fibrous material: scheme of whole set-up (A); proportion description in millimeters and optimal temperature set-up (B); details of needle-less electrospinning spinning electrode (C), sputtering device (D) and meltblown die (E) set-ups.

Vega 3SB Easy Probe). The biocompatibility of the material, cell proliferation and ability to migrate into the structure of scaffold was tested *in vitro* using MG-63 osteoblasts.

**In-vitro testing: In-vitro culture of MG-63 osteoblasts:** Human osteoblasts (MG63) were maintained in EMEM (Eagle's minimal Essentials medium; ATCC) with 10% (v/v) FBS (fetal bovine serum; Lonza) and 1% penicillin/streptomycin/amfotericin B (Lonza). Cells (the second passage culture) were cultivated in an incubator (37 °C/5% CO<sub>2</sub>). The medium was changed 3 times a week.

**Sample preparation, cell seeding:** Discs (diameter 15 mm, thickness 5 mm) were cut from meltblown layers, they were then sterilized (70% Et-OH, 30 min) and washed in PBS (phosphate buffered saline) (pH 7.4) prior to cell seeding. MG63 cells were seeded ( $1 \times 10^5$  cells per sample) on scaffolds placed in 24-well tissue culture plates.

**MTT assay for the cell proliferation:** Cell proliferation was monitored after 1, 3, 7, 14 and 21 days by MTT assay (quantitative colorimetric assay for mammalian cell survival and proliferation based on the reduction of tetrazolium salt by living cells). A 250  $\mu$ l solution of MTT (2 mg/ml in PBS; pH 7.4) was added to 750  $\mu$ l of sample medium (EMEM) and incubated with the sample for 3 h at 37 °C/5% CO<sub>2</sub>. Formazane crystals were solubilized with isopropyl alcohol. Absorbance of the formazane solution was measured at 570 nm (reference at 650 nm).

**Microscopy analysis (SEM and fluorescence):** After 1, 3, 7 and 14 days of cell seeding, the cell-cultured scaffolds were processed for microscopy analysis. The scaffolds were fixed by 2.5% glutaraldehyde and dehydrated with upgrading concentrations of Et-OH (60%, 70%, 80%, 90% and 100%). Samples were analyzed by scanning electron microscope and image analysis software (NIS Elements, Nikon). The cells were fixed in frozen methanol for 15 min, washed in PBS and stained with propidium iodide for 15 min in the dark. Then the layers were washed in PBS and analyzed using a fluorescence microscope (NICON Eclipse Ti-E). A splitting of the samples in half through the thickness allow to observe cell behavior inside the materials.

### 3. Results and discussion

The resulting materials without HA particles (M and ME) had a surface density of 250 g<sup>-2</sup>. When the density of PCL is 1.145 g cm<sup>-3</sup>

and the thickness of materials is 5 mm then porosity is about 95%. The weight percentage of HA was 10%, thus the final surface density of materials with HA particles (MS and MES) was 275 g<sup>-2</sup>. Morphology characteristics were studied by SEM visualization, see Fig. 2 and image analysis. The average electrospun fiber diameter was  $732 \pm 292$  nm. Average meltblown fiber diameter was  $6.5 \pm 4.4$   $\mu$ m. Nanofibers (fibers with diameter below 1  $\mu$ m) volume fraction estimation in ME materials compared to other fibers was 1% and nanofibers numerical fraction compared to the number of other fibers was 56%. In contrast, nanofibers volume fraction estimation in M materials compared to other fibers was 0.1% and nanofibers numerical fraction compared to the number of other fibers was 9%.

**In-vitro tests:** The pictures from microscopy and MTT assay data reveal similar rates of adhered MG-63 osteoblasts in all kinds of tested materials. However, from the 7th day after cell seeding differences in the cell proliferation rates had been observed. Osteoblasts on samples containing electrospun fibers (ME, MES) showed a significant increase in proliferation (Fig. 3). Also sputtered particles (MS, MES) seem to have a positive effect on the proliferation rate compared to materials without sputtered particles (M, ME). Images showing materials inside (Fig. 3) confirm osteoblasts proliferation into the inner structure of the materials with a significantly higher rate in materials containing nanofibers (ME, MES). Many studies have investigated the effect of porosity on bone tissue regeneration *in vivo* or bone cells adhesion and proliferation *in vitro* [16,17]. It was observed that high porosity and large pores of materials enhanced bone ingrowth and the osteointegration of the scaffold after implantation *in vivo* and enhanced cell proliferation and migration into scaffold *in vitro* [18–20].

### 4. Conclusions

A novel scaffold produced by combining meltblown and electrospinning technology with in-situ particle integration in-between fibers was developed. The scaffold has sufficient surface properties and a porous structure. This scaffold is beneficial for cell growth, adhesion and proliferation and may be served as bone substitutes in tissue engineering application. Further studies are focused on its implantation into animal models for the investigation of its behavior *in vivo*.

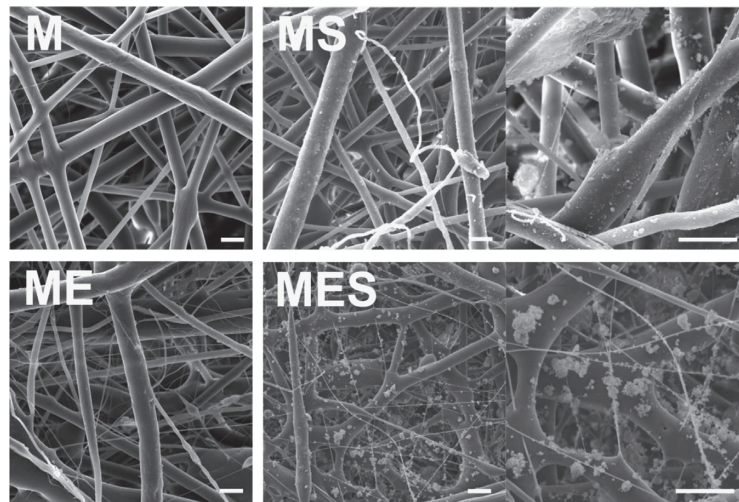
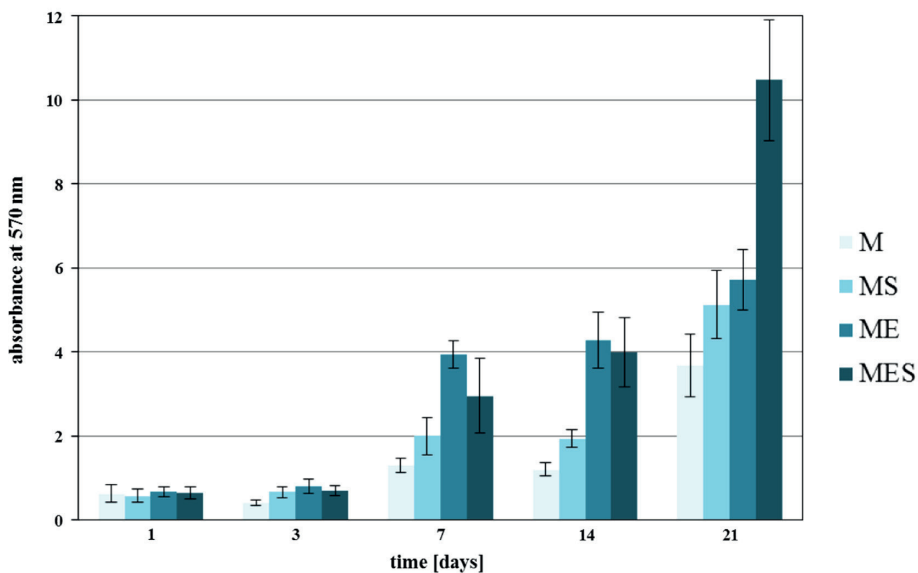
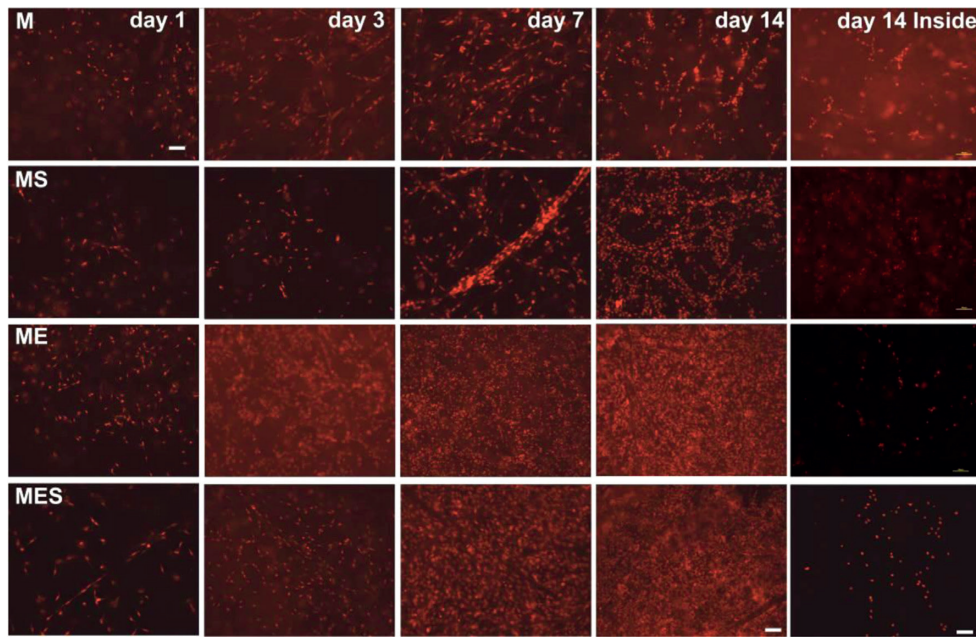


Fig. 2. Scaffold morphology observed by SEM for all four tested materials, the scale bar is 20  $\mu$ m.



**Fig. 3.** Fluorescent microscopy images (upper part) of MG-63 cells on the materials (external view) in days 1, 3, 7 and 14. Images are composed of 100 images captured by motorized microscope stage with a changing focus in the z axis of the 1  $\mu$ m distance. Fluorescence microscopy images of MG-63 cells on the inner surface of tested materials in day 14 (day 14 inside) presented here as basic views. Cell proliferation on the scaffolds was determined by MTT assay (bottom). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

**Acknowledgment**

The research was supported by the project Nanofiber Materials for Tissue Engineering, reg. no. CZ.1.05/3.1.00/14.0308, which is co-financed by the European Social Fund and the State Budget of the Czech Republic and by the Ministry of Education, Youth and Sports in the framework of the targeted support of the National Programme for Sustainability I LO 1201 and the

OPR&DIproject “Centre for Nanomaterials, Advanced Technologies and Innovation”, CZ.1.05/2.1.00/01.0005.

**References**

- [1] Russell SJ. Handbook of nonwovens. Wood head Publishing in Textiles; 2007.
- [2] Gutarowska B, Michalski A. Fibers Text East Eur 2009;17:23–8.
- [3] Sun CQ, Zhang D, Liu YB, Xiao RJ. Appl Polym Sci 2004;93:2090–4.
- [4] Tan DH, et al. J Non-newtonian Fluid Mech 2010;165:892–900.



- [5] Zhang D, Sun C, Xiao JH. *Text Res J* 2006;76:261–5.
- [6] Shi B, Palfery DJ. *Polym Environ* 2010;18:122–7.
- [7] Leipzig NC, Athanasiou KA. Cartilage Regeneration. In: Wnek GE, Bowlin GL, editors. *Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering*, vol. 1. Marcel Dekker; 2004. p. 283–91.
- [8] Wenjing L, Sun J, Xingyu JJ. *Mater Chem B* 2014;2:2369–80.
- [9] Sun B, Long YZ, Zhang HD, Li MM, Duvail JL, Jjiang XY, Yin HL. *Prog Polym Sci* 2014;39:862–90.
- [10] Leung V, Ko F. *Polym Adv Technol Spec Issue: Rev* 2011;22:350–65.
- [11] Silva CSR, Luz GM, Gamboa-Marinez TC, Mano JF, Gomez Ribelles JL, Gomez Tejedor JA. *J Macromol Sci Part B: Phys* 2014;53:5.
- [12] Gandhimathi C, Venugopal J, Ravichandran R, Sundararajan S, Suganya S, Ramakrishna S. *Macromol Biosci* 2013;13:696–706.
- [13] Kim HW, Lee HH, Knowles JC. *J Biomed Mater Res* 2006;79:643–9.
- [14] Liang D, Hsiao BS, Chu B. *Adv Drug Delivery Rev* 2007;59:1392–412.
- [15] Pham QP, Sharma U, Mikos AG. *Tissue Eng* 2006;12:1197–211.
- [16] Hulbert SF, Young FA, Mathews RS, Klawitter JJ, Talbert CD, Stelling FH. *J Biomed Mater Res* 1970;4:433–56.
- [17] Kuboki Y, Takita H, Kobayashi D, Tsuruga E, Inoue M, Murata M, et al. *J Biomed Mater Res* 1998;39:190–9.
- [18] Karageorgiou V, Kaplan D. *Biomaterials* 2005;26:5474–91.
- [19] Rampichová M, Buzgo M, Chvojka J, Prosecká E, Kofronová O, Amler E. *Cell Adhes Migr* 2014;8:36–41.
- [20] Rampichová M, Chvojka J, Buzgo M, Prosecká E, Mikeš P, Vyslouzilová L, Tvrđík D, Kochová P, Gregor T, Lukáš D, Amler E. *Cell Prolif* 2013;46:23–37.

## **Příloha 3**



## The combination of meltblown technology and electrospinning – The influence of the ratio of micro and nanofibers on cell viability



Jakub Erben\*, Vera Jencova, Jiri Chvojka, Lenka Blazkova, Katerina Strnadova, Miroslav Modrak, Eva Kuzelova Kostakova

Technical University of Liberec, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 December 2015  
Received in revised form  
3 February 2016  
Accepted 27 February 2016  
Available online 2 March 2016

#### Keywords:

Meltblown technology  
Electrospinning  
Scaffold  
Nanofibers  
Tissue engineering  
Polycaprolactone

### ABSTRACT

This study describes the production, testing and characterization of biodegradable scaffolds for bone tissue, which consist of the exact ratio of meltblown microfibers and nanofibers produced through the electrostatic field. All fibrous materials were produced from polycaprolactone. Three kinds of materials were prepared in the experiment with the same area density and with different well-defined ratio of microfibers as a mechanical component and nanofibers as a cells adherent component. All prepared materials showed optimum porosity of the inner structure for cell proliferation and in comparison to the materials with nanofibers they had good mechanical properties. Important structural properties and homogeneity of each material were observed by electron microscopy and analyzed by image analysis. The effect of various ratios of microfibers and nanofibers on adhesion and proliferation of osteoblasts *in-vitro* was characterized.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Electrospinning is a technology used for the production of polymer nanofibrous materials from polymer solutions or melts. This technique is thoroughly described in literature [1] and the nanofibrous materials prepared by electrospinning are suitable for tissue engineering as scaffolds [1,2]. The structure of nanofibrous mats is appropriate for cell adhesion and proliferation [2–4]. However, mechanical properties of these mats are often not adequate. The mechanical properties can be improved by a combination of electrospinning with another nonwoven technology which produces microfibers, typically 1–7  $\mu\text{m}$  in diameter [6]. The meltblown technology produces fibers from polymer melt by extrusion through a die with small orifices [5].

This article is based on our previous research [7], where the basic development of the first composite materials for bone tissue engineering had been presented. These materials consist of nanofibers and microfibers with confirmed mechanical functionality and with excellent performance properties for cell proliferation [8–10]. The aim of this follow-up study is to describe the rate of cell viability, depending on the ratio of micro and nanofibers in the composite. The results have shown that the cell viability increases with the increasing content of nanofibers in the composite while

maintaining the required structural properties. Based on the obtained results we can therefore determine the critical value of the smallest possible content of nanofibers in the composite. On the other hand, the composite shows mechanical instability beyond this critical value of nanofibers.

### 2. Experimental part

#### 2.1. Materials

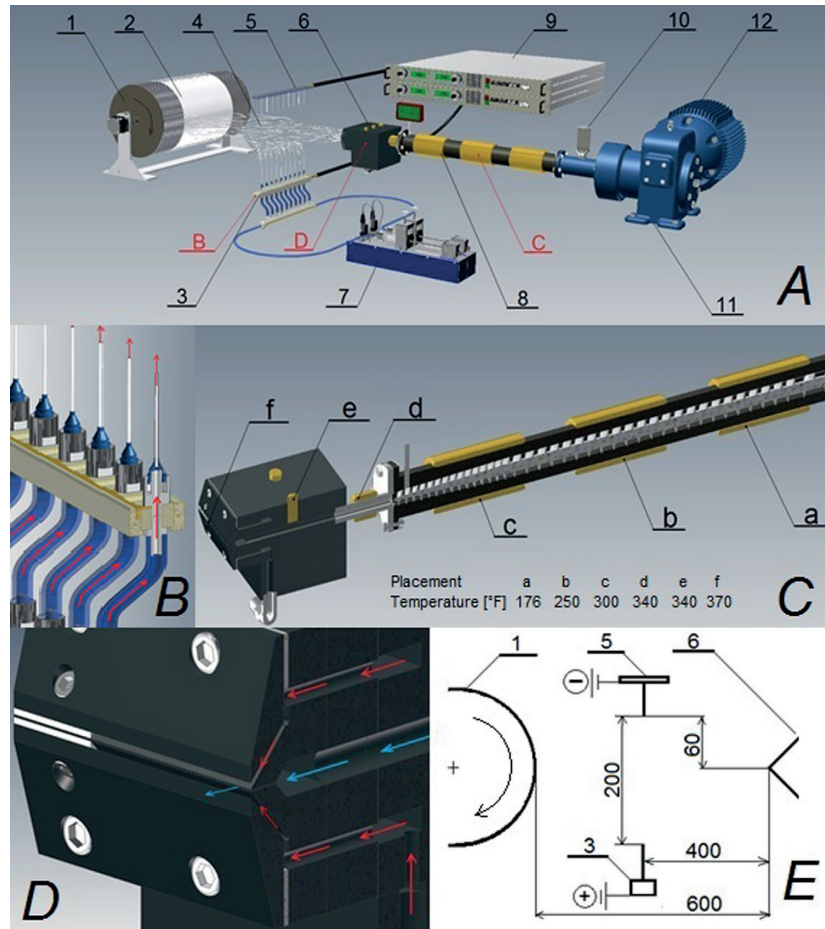
Poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL; Mw 45,000; Sigma Aldrich), absolute ethanol (Penta Chemicals) and chloroform (Penta Chemicals) were used for the composite materials production.

#### 2.2. Scaffold fabrication

Solution of 16 wt% polycaprolactone (PCL) in chloroform/ethanol (9:1) was prepared for the electrospinning process. The scheme of the production equipment set-up in optimal conditions is shown in Fig. 1. The set-up was composed of a meltblown device (J&M Laboratories), an electrospinning device (a multi needle spinner and a countervailing pressure cylinder) and computer-controlled pumps. The meltblown extruder screw rotated at 3–15 rpm for 30–120 min, respectively (depending on the ratio of micro- and nanofibers in the sample). 100 g of polymer per sample was always extruded. Air velocity was  $20 \text{ ms}^{-1}$  at 200 mm from a

\* Corresponding author.

E-mail address: [erben.jakub@gmail.com](mailto:erben.jakub@gmail.com) (J. Erben).



**Fig. 1.** The scheme of the combination of meltblown technology and electrospinning: the scheme of the overall set-up (A); detail of the multi needle spinning electrode (B); the meltblown die and extruder with heating zones – the optimal temperature set-up (C); the detail of meltblown die (D); the device proportion description in millimeters (E).

meltblown die. The meltblown die length was 100 mm. The needle spinner had adjustable spacing and a number of needles. There were 10 needles with a diameter of 1.2 mm with the spacing of 25 mm. The polymer dosage was 70 ml/h. The spinner was charged up to 35 kV positive and the collector 20 kV negative. Fibers were deposited on an intercepting drum collector which rotated at 4 rpm. The study compares three materials containing nanofibers with the numerical ratio in the composite: 1) 26% (ME26); 2) 55% (ME55); 3) 71% (ME71). The ratio represents the number of nanofibers relative to the total number of all fibers (micro and nano). The ratio was calculated from three SEM images for each sample. The ratio of micro and nanofibers in the composite was only influenced by changing the meltblown extruder rotation speed. Production and structural variables for all three created samples are shown in Fig. 2. During all experiments, the ambient temperature and relative humidity were set to 23 °C; 45%.

A: 1 – drum collector, 2 – composite fiber layer, 3 – multi needle spinner, 4 – airstream with fibers, 5 – needle collector, 6 – meltblown die, 7 – pumps, 8 – extruder, 9 – high voltage sources, 10 – hopper, 11 – transmission, 12 – engine.

### 2.3. Morphology characterization

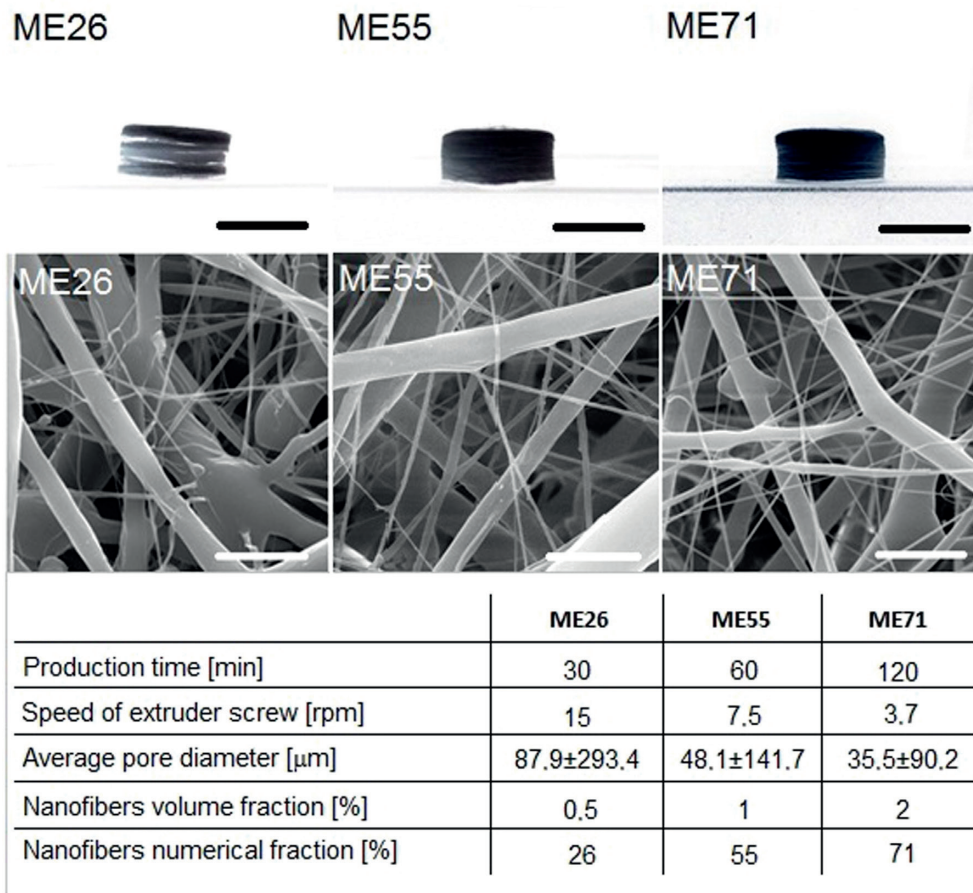
The dry samples were sputter coated with gold (5 nm) and observed by a scanning electron microscope (SEM, Tescan Vega 3SB). The biocompatibility of the material, cell proliferation and ability of the cells to migrate into the structure of scaffold were tested *in-vitro* by means of MG-63 osteoblasts.

### 2.4. In-vitro testing of MG-63 osteoblasts

Human osteoblasts–MG63 (ATCC) were maintained in EMEM (ATCC) with 10% (v/v) FBS (Lonza) and 1% penicillin/streptomycin/amphotericin B (Lonza). The cells were cultivated in the incubator (37 °C/5% CO<sub>2</sub>). The medium was changed 3 times a week. The second passage culture was used for the experiments.

### 2.5. Sample preparation, cell seeding

The discs of a diameter of 15 mm and thickness of 5 mm were cut from prepared layers. Discs were sterilized (70% ethanol, 30 min) and washed in PBS (pH 7.4) prior to the cell seeding.



**Fig. 2.** The upper part – scaffold contour for all three tested materials observed by a projector, the scale bars are 10 mm long. The middle part – scaffold morphology observed by SEM scale bar is 20  $\mu\text{m}$ . The lower part describes the production and structural variables for all three created samples.

MG63 cells were seeded ( $1 \times 10^5$  cells per sample) on scaffolds placed in 24-well tissue culture plates.

#### 2.6. MTT assay for the cell proliferation

Cell proliferation was monitored after 1, 7, 14 and 21 days by MTT assay. A 250  $\mu\text{l}$  of MTT solution (2 mg/ml in PBS pH 7.4) was added to 750  $\mu\text{l}$  of a medium (EMEM) and incubated with a sample for 3 h at 37  $^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ . Formazane crystals were solubilized with isopropyl alcohol. Absorbance of the formazane solution was measured at 570 nm (ref. wavelength at 650 nm).

#### 2.7. Microscopy analysis (SEM and fluorescence)

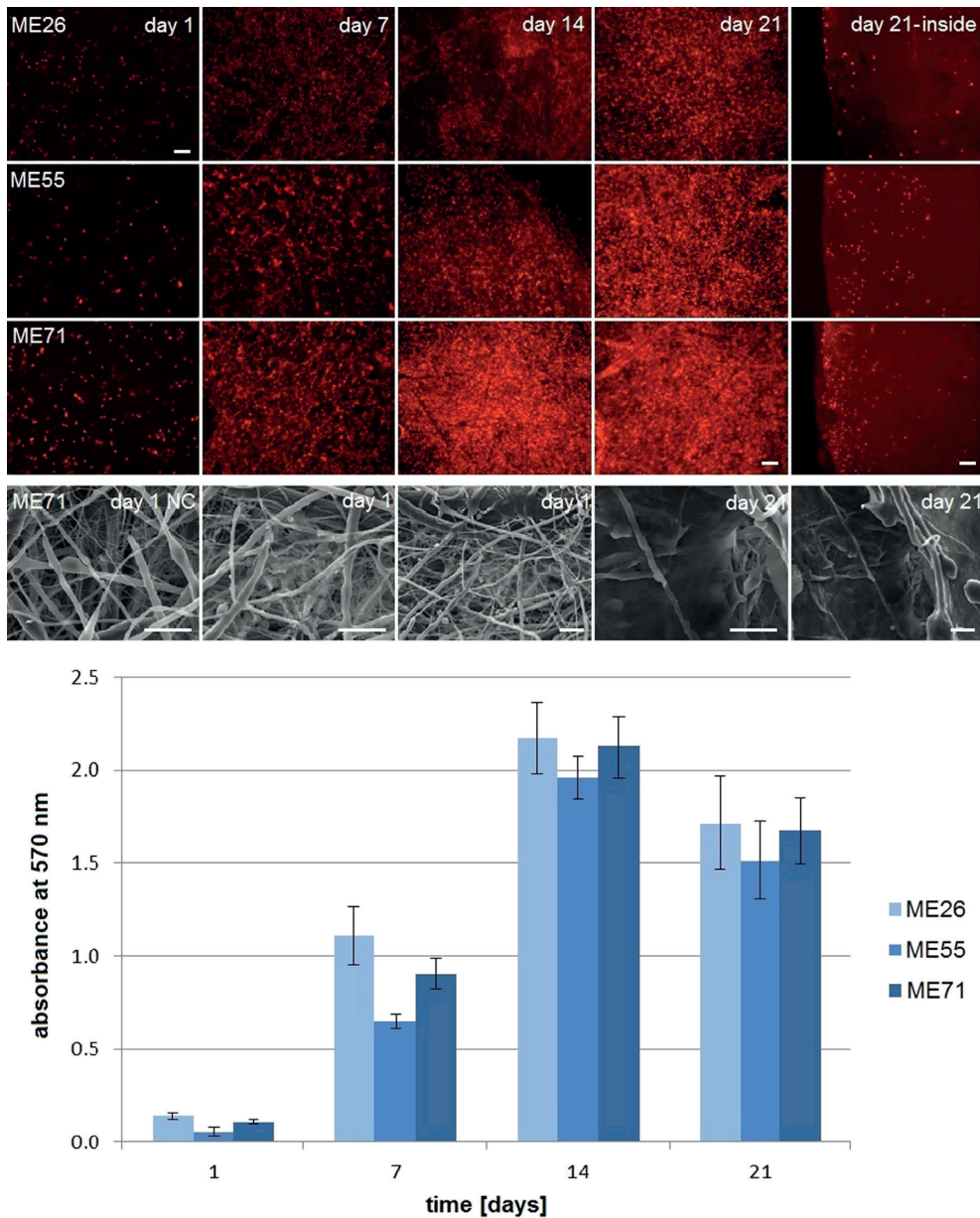
After day 1 and 21 after the cell seeding, the cell-cultured scaffolds were processed for microscopy analysis. The scaffolds were fixed by 2.5% glutaraldehyde and dehydrated with upgrading concentrations of ethanol (60–100%). The samples were analyzed by SEM (TescanVega 3SB) and image analysis software (NIS Elements, Nikon). For fluorescence microscopy (FM) the cells were fixed in ice – cold methanol for 15 min at 4  $^\circ\text{C}$ , washed in PBS and stained with propidium iodide for 15 min in the dark. Then the samples were washed in PBS and analyzed by means of a fluorescence microscope (NICON Eclipse). Splitting of the samples into halves allowed us to observe the cell behavior inside the materials.

### 3. Results and discussion

Each sample had the same area density of  $250 \text{ g}^{-2}$ . When the density of PCL is  $1.145 \text{ g cm}^{-3}$  and the thickness of all three materials was 5 mm with the same 95% porosity. Morphology characteristics of the materials (fibers and pores diameters) were studied by SEM. The produced fibrous structures (Fig. 2) were analyzed by the image analysis software. Overall, the average electrospun fiber diameter was  $701 \pm 227 \text{ nm}$  and the meltblown fibers diameter was  $7.1 \pm 4.9 \mu\text{m}$  in all samples. The volume fraction of nanofibers in all three materials was compared with micro fibers, these fractions were 0.5%, 1% and 2%. The numerical ratios of nanofibers and microfibers were 26%, 55% and 71%. The contour projection of samples ME55 and ME71 (Fig. 2) showed very good shape integrity of these two samples in comparison to the sample ME26, which was disintegrated to layers of irregular thickness. The sample ME26 with the numerical ratio of the nanofibers of 26% was thus unsuitable in terms of mechanical properties (Fig. 3).

#### 3.1. In-vitro tests

The images from FM showed a similar degree of adhered cells on the first day of testing. From the 7th to 21st testing day the sample with the highest ratio of nanofibers (ME71) showed the highest rate of cell proliferation. Generally, microscopy shows that



**Fig. 3.** FM images (upper part) of MG-63 cells on the materials (external view) on days 1, 7, 14 and 21. Images from a FM composed of 100 images was captured by a motorized microscope stage with a changing focus in the z axis of the 1  $\mu$ m distance, the scale bar was 100  $\mu$ m. FM images of MG-63 cells on the inner surface of the tested materials on day 21 (day 21 included) are presented here as basic views. Cell proliferation on the scaffolds was determined by MTT assay (lower part).

together with the increasing ratio of nanofibers in the composite the cell proliferation and confluence colonization of material increase as well. Proliferation into the inner structure was observed mainly from the edges into the center of the materials, and was similar in extent for all tested samples. The results from MTT assay showed contradictory results compared to the microscopy of the ME26 sample, where this material showed the highest cell viability. However, this was caused by shape disintegration. The samples made from this material were disintegrated to individual layers with different thickness. In comparison with other samples,

these layers provided a higher surface area for cell proliferation. Therefore, the results from MTT assay for material ME26 should be taken as relevant.

#### 4. Conclusion

Various materials with controllable ratio of micro and nanofibers and their manufacturing technology have been developed. In this article we have demonstrated the beneficial effect of the

increasing ratio of nanofibers in the composite on the cell proliferation. The critical limit of the minimal ratio of nanofibers in the composite has been determined. The composite with lower nanofiber content disintegrates. On the basis of these results from *in-vitro* testing, we propose the ME71 composite as most suitable for bone tissue engineering. Further studies will include *in-vivo* tests and tests of manufacture reproducibility.

#### Acknowledgment

The research was supported by the project “Nanofiber materials for tissue engineering”, Reg. no. CZ.1.05/3.1.00/14.0308, which is co-financed by the European Social Fund and the State Budget of the Czech Republic.

#### References

- [1] D. Lukáš, A. Sarkar, L. Martinová, K. Vodsedálková, D. Lubasová, J. Chaloupek, P. Pokorný, P. Mikeš, J. Chvojka, M. Komárek, Physical principles of electrospinning, *Text. Prog.* 41 (2) (2009) 59–140.
- [2] Z.M. Huang, Y.Z. Zhang, M. Kotaki, S. Ramakrishna, A review on polymer nanofibers by electrospraying and their applications in nanofibers, *Compos. Sci. Technol.* 63 (2003) 2223–2253.
- [3] S. Guceri, Y.G. Gogotsi, V. Kuznetsov, *Nanoeng. Nanofibrous Mater.* (2003) 97–106.
- [4] T.L. Cato, Y. Khan, *Polymer/Calcium Phosphate Scaffolds for Bone Tissue Engineering, Scaffold Tissue Eng.* (2006) 253–282, ISBN: 1-4020-2549-1.
- [5] S.J. Russell, *Handbook of nonwovens*, ISBN: 978-1-185573-603-0, 2007, pp 172–185.
- [6] B. Gutarowska, A. Michalski, *Fiber. Text. East. Eur.* 17 (2009) 23–28.
- [7] J. Erben, K. Pilarova, F. Sanetnik, J. Chvojka, V. Jencova, L. Blazkova, J. Havlicek, O. Novak, P. Mikes, E. Prosecka, D. Lukas, E. Kuzelova Kostakova, The combination of meltblown and electrospinning for bone tissue engineering, *Mater. Lett.* 143 (2015) 172–176 (WoS).
- [8] S.J. Hollister, Porous scaffold design for tissue engineering, *Nat. Mater.* 4 (2005) 518–524.
- [9] G. Wei, P.X. Ma, Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials* 25 (2004) 4749–4757.
- [10] S. Fransiska, M.H. Ho, C.H. Li, J.L. Shih, S.W. Hsiao, D.V.H. Thien, To enhance protein production from osteoblasts by using micro-patterned surfaces, *Biochem. Eng. J.* 78 (2013) 120–127.

## **Příloha 4**



## Biomedical Materials



### PAPER



# The combination of nanofibrous and microfibrous materials for enhancement of cell infiltration and *in vivo* bone tissue formation

RECEIVED  
2 June 2017

REVISED  
5 October 2017

ACCEPTED FOR PUBLICATION  
31 October 2017

PUBLISHED  
24 January 2018

M Rampichová<sup>1,2,5</sup> , J Chvojka<sup>3</sup>, V Jenčová<sup>3</sup>, T Kubíková<sup>4</sup>, Z Tonar<sup>4</sup>, J Erben<sup>3</sup>, M Buzgo<sup>1,5</sup> , J Daňková<sup>2</sup>, A Litvinec<sup>2</sup>, K Vocetková<sup>1,2</sup>, M Plencner<sup>2</sup>, E Prosecká<sup>2</sup>, V Sovková<sup>2</sup>, V Lukášová<sup>2</sup>, M Králíčková<sup>4</sup>, D Lukáš<sup>3</sup> and E Amler<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> University Center for Energy Efficient Buildings (UCEEB), Czech Technical University in Prague, Třinecká 1024, 273 43, Buštěhrad, Czechia

<sup>2</sup> Laboratory of Tissue Engineering, Institute of Experimental Medicine, Czech Academy of Sciences, Vídeňská 1083, 142 40, Prague, Czechia

<sup>3</sup> Technical University of Liberec, Department of Nonwovens and Nanofibrous Materials, Studentská 2, Liberec 461 17, Czechia

<sup>4</sup> Department of Histology and Embryology and Biomedical Center, Faculty of Medicine in Pilsen, Charles University, Karlovarská 48, 301 00, Pilsen, Czechia

<sup>5</sup> Authors to whom any correspondence should be addressed.

E-mail: [michala\\_rampichova@labdemo.cz](mailto:michala_rampichova@labdemo.cz) and [buzgo@labdemo.cz](mailto:buzgo@labdemo.cz)

**Keywords:** melt-blown, electrospinning, electroblowing, 3D fibers, bone regeneration, *in vivo*, mesenchymal stem cells

Supplementary material for this article is available [online](#)

### Abstract

Fibrous scaffolds are desired in tissue engineering applications for their ability to mimic extracellular matrix. In this study we compared fibrous scaffolds prepared from polycaprolactone using three different fabrication methods, electrospinning (ES), electro-blowing and melt-blown combined with ES. Scaffolds differed in morphology, fiber diameters and pore sizes. Mesenchymal stem cell adhesion, proliferation and osteogenic differentiation on scaffolds was evaluated. The most promising scaffold was shown to be melt-blown in combination with ES which combined properties of both technologies. Microfibers enabled good cell infiltration and nanofibers enhanced cell adhesion. This scaffold was used for further testing in critical sized defects in rabbits. New bone tissue formation occurred from the side of the treated defects, compared to a control group where only fat tissue was present. Polycaprolactone fibrous scaffold prepared using a combination of melt-blown and ES technology seems to be promising for bone regeneration. The practical application of results is connected with enormous production capacity and low cost of materials produced by melt-blown technology, compared to other bone scaffold fabrication methods.

### 1. Introduction

Scaffolds for tissue engineering applications have to resemble the physiological conditions of native extracellular matrix (ECM). The ECM of most tissues has a fibrous structure with randomly organized fibers on a nano- and micrometer scale. Morphology and biochemistry of ECM essentially influence cell behavior (Kim *et al* 2013). Different technologies were used to imitate the structure of ECM. The most common technology used to produce ultrathin fibrous scaffold in tissue engineering is electrospinning (ES) (Sill and von Recum 2008).

ES is a technology, where a high voltage is used for the production of fibers from polymer solutions. ES

has advantages over other nanostructuring methods in experimental setup simplicity, a common physical principle enabling the processing of a wide range of polymers and already up-scaled equipment. Moreover, the process and the produced nanofibers can be controlled via coupled parameters, including electric field intensity, viscosity and molecular weight of the polymer, and used solutions (Sill and von Recum 2008). Fibers prepared using ES have dimensions in the range of nano- to micrometers and random organization. Moreover, the fibrous layers are highly porous and have an enormous surface to volume ratio, mimicking the structure of native ECM. Electrospun nanofibers prepared from a number of polymers were successfully used in biomedical

applications (Plencner *et al* 2014, Park *et al* 2016). On the other hand, electrospun layers also have some disadvantages. Beside high voltage and use of organic solvents, which can be highly toxic, limited pore size and thickness also belong to their main disadvantages. Therefore, electrospun layers have a sheet-like structure enabling only limited cell penetration prior to fiber degradation (Rampichova *et al* 2013).

To overcome the limitations of electrospun fibers, different strategies were studied to modify the conventional ES process. Possibilities to prepare electrospun layers with a higher pore size are ES using i.e. electrostatic repulsion (Cai *et al* 2013). Nevertheless, the pores of the scaffolds may be increased by the introduction of sacrificial co-fibers or leachable structures made of water soluble material. Upon interaction with biological fluids, the water soluble component is solubilized and the mean pore size increases. The leachable material may be either polymers (e.g., polyethylene oxide), inorganic crystals (i.e. NaCl) (Park *et al* 2016) or ice crystals (Simonet *et al* 2007). An alternative approach is based on altered deposition of electrospun fibers. Besides utilization of special collectors (Vaquette and Cooper-White 2011, Rampichova *et al* 2013), electro-blowing (EB) technology is a simple option which does not alter the ES process significantly. EB technology is based on combining the ES process with air flow. Using the technology enhances the production rate of the ES process, where morphology of the fibrous layer is dependent on the air temperature (Um *et al* 2004). Fibrous layers from different polymers, such as hyaluronic acid (Um *et al* 2004), poly (tetrafluoroethylene) (PTFE) (Ju *et al* 2016) were successfully prepared.

Nevertheless, additional methods for the production of 3D fibrous implants were recently reported for biomedical applications. These techniques, such as centrifugal spinning or melt-blown, benefit from high production capacity and avoid the use of high voltage. Centrifugal ES is based on the formation of fibers from polymeric solution or melt using high centrifugal forces produced by fast rotation of the spinning capillary. The technique enables formation of submicron fibers for tissue engineering (Rampichova *et al* 2014, Buzgo *et al* 2017, Rampichova *et al* 2017). In the case of the melt-blown process, polymer is melted and extruded through the nozzles. Subsequently, polymer is hit by a high speed stream of hot air. The temperature of air stream is typically the same to temperature of melted polymer. Fibers are carried by the stream of air, are elongated and stretch to very fine fibers. Melt-blown fibers were prepared from a variety of polymers, such as poly(butylene terephthalate), polypropylene, and polystyrene nanofibers (Ellison *et al* 2007). Meltblown was used for tissue engineering as a high-throughput alternative to ES. Polylactic acid (PLA) was used for adipogenic and osteogenic differentiation of human adipose derived stem cells (Tuin *et al* 2016).

Fibrous materials also attract much attention in the field of bone tissue engineering. The main advantages of these materials are fiber size, high porosity and pore interconnections. The structure of scaffolds mimics the ECM. Compared to other scaffold types, such as foams, the pores in fibrous scaffolds are highly interconnected and do not hamper diffusion of nutrients and waste products. Fibrous scaffolds were successfully used for bone tissue engineering applications. Lee *et al* implanted fibrous scaffold prepared from poly (lactide-co-glycolic acid) (PLGA) using ES with immobilized bone-forming peptide 1 (BFP1) into the calvarial defect of mice (Lee *et al* 2013). The study showed a significant improvement in bone tissue healing. Yang *et al* studied the potential of poly(lactic-co-glycolic acid)/poly( $\epsilon$ -caprolactone) scaffold prepared using wet-ES to regenerate bone tissue via the endochondral pathway (Yang *et al* 2013). Scaffolds seeded by rat bone marrow cells were differentiated *in vitro* for 4 weeks. Subsequently, they were implanted to animals and after 8 weeks histological analysis was performed. Extensive bone tissue formation was shown in the implanted scaffold.

The aim of the current study was to compare three different production methods—ES, electroblowing and meltblown. All scaffolds were prepared from the same polymer, but exhibited different stereological and material properties. Comparison of osteogenic properties of these materials were not performed before. Poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL) was used as a biocompatible material, widely successfully used in tissue engineering applications (Rampichova *et al* 2013, Plencner *et al* 2014, Wang *et al* 2014). Scaffolds prepared using ES, EB and a combination of melt-blown and ES (MB) were characterized and further tested *in vitro* using mesenchymal stem cells (MSCs). Electroblowing and meltblow/ES process are novel approaches for formation of bone implants and enable overcoming of limitations connected with use of electrospun scaffolds. The most promising scaffold was chosen for *in vivo* testing on a model of critical sized bone defects in laboratory rabbits.

## 2. Methods

### 2.1. Sample preparation

Three different kinds of fibrous scaffolds were prepared from poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL)(Mw 45 000; Sigma Aldrich) using three different technologies. The first technology combined melt-blown and ES technology (MB). The second technology was EB and the third, ES. For the ES process, a solution of 16 wt% PCL in chloroform/ethanol (9:1 by weight) was used.

The set-up of the MB technology consisted of a laboratory-scale melt-blown device (J&M Laboratories, USA) and an ES device (needleless wire spinner). The melt-blown technology used PCL pellets melted at temperatures 176, 250, 300, and 340 °F. The

melt-blown extruder screw rotated at 7.5 rpm, which means the consumption was equal to 100 g of polymer per 1 h. The melt-blown die length was 75 mm with 60 orifices, each 0.4 mm in diameter. The distance of the melt-blown die from the collector was 600 mm. The fibers generated by ES were mixed with melt blown fibers by laminar airflow with a velocity  $20 \text{ ms}^{-1}$ . The spinner was situated at 300 mm distance from the melt-blown die and at 300 mm distance from the drum collector. The drum collector rotated at 4 rpm. The ES device with the wire electrode (diameter 30 mm, length 150 mm) rotated at 12 rpm. The roller was charged at 35 kV positive and the collector charged at 15 kV negative. The experiment parameters were set at a temperature of  $23^\circ\text{C}$  and relative humidity of 45%.

The same polymeric solution was used for the EB and ES process. The device for EB consisted of an ES device with a rotating wire electrode (30 mm diameter, 150 mm in length). The roller rotated with a velocity of 12 rpm and was positively charged at 35 kV. The needle collector was negatively charged (10 kV) and placed at 200 mm distance vertically. The consumption of polymer was  $100 \text{ ml h}^{-1}$ . The prepared fibers were taken out with linear air flow with a velocity of  $15 \text{ m s}^{-1}$  at 200 mm distance from the air jet (proportions  $80 \times 15 \text{ mm}$ ), and collected on the drum collector rotated at 4 rpm. Experiment parameters were set at a temperature of  $23^\circ\text{C}$  and relative humidity of 45%.

The ES process was performed on a laboratory-scale machine Nanospider NS1W500U. PCL (Mw 45 000; Sigma Aldrich) was diluted to a concentration 16 wt% in chloroform/ethanol (9:1 by weight). The experiment parameters were set at  $22^\circ\text{C}$  and a relative humidity of 52%. The spinning wire was positively charged at 50 kV, a collector was negatively charged at 10 kV. The production speed was  $10 \text{ mm min}^{-1}$ .

## 2.2. Sample characterization

Scanning electron microscopy (SEM) was used for the detection of the samples' morphology. Samples were sputtered with a 5 nm layer of gold and analyzed using a SEM (Tescan, VEGA3 SB easy probe). The diameters of the microfibers and nanofibers, and diameters of pores were measured using the Image J program. The median was determined for electrospun fibers and meltblown fibers separately. The porosity was measured by NiS Elements as a function of the overall surface to the surface fibers. The average values were determined from 1000 measurements.

## 2.3. Cell cultivation and scaffold seeding

Scaffolds were prepared in form of round patches with 6 mm diameter and sterilized using ethylene oxide. The samples were seeded with  $35 \times 10^3$  pig MSCs per sample (purchased from the Institute of Animal Physiology and Genetics AS CR v.v.i., Liběchov, CZ).

The cells were isolated from bone blood, as was described elsewhere (Prosecka et al 2011). Cells were cultured in osteogenic differentiation media: minimal essential medium (Sigma Aldrich), supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS; Sigma Aldrich), antibiotics ( $100 \text{ I.U. ml}^{-1}$  Penicilin/ $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  Streptomycin),  $10 \text{ nM } \beta$ -Glycerol phosphate disodium salt (Sigma Aldrich),  $100 \text{ nM}$  dexamethasone (Medochemie) and  $40 \mu\text{g ml}^{-1}$  ascorbic acid-2-phosphate (Sigma Aldrich). The medium was changed every 3–4 d.

## 2.4. Cell viability analysis

MTS assay (CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay; Promega) was used to probe cell metabolic activity. MTS solution ( $20 \mu\text{l}$ ) was added to  $100 \mu\text{l}$  of the sample medium. The microplate was incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 2 h. The absorbance was read in clean microplates ( $100 \mu\text{l}$ ) using microplate reader at 490 nm and reference wavelength 690 nm.

## 2.5. Analysis of cell proliferation

Quantification of DNA was used as a measure for determination of cellular proliferation. The samples were analyzed using Picogreen method (Quant-iT<sup>™</sup> dsDNA Assay Kit; Life Technologies). The scaffolds were lysed by freeze-thawing (3 cycles with rough vortexing) in  $200 \mu\text{l}$  of cell lysis solution (0.2% v/v Triton X-100, 10 mM Tris (pH 7.0), and 1 mM EDTA). For analysis,  $10 \mu\text{l}$  of samples was added to  $200 \mu\text{l}$  of Picogreen reagent solution. The fluorescence intensity was recorded on multimode fluorescence reader (Synergy HT,  $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 525 \text{ nm}$ ). Results were evaluated using the calibration curve of the standards in the kit.

## 2.6. Visualization of cell adhesion and proliferation on scaffolds

Cell adhesion on days 1, 7, and 14 was detected using DiOC6(3) staining. Samples were fixed with frozen methanol ( $-20^\circ\text{C}$ ) for 10 min. Subsequently, the fluorescent probe 3,3'-diethyloxacarbocyanine iodide (DiOC6(3), Invitrogen,  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  in phosphate buffered saline (PBS); pH 7.4) was added and incubated with the samples for 45 min at room temperature to visualize the membranes. Subsequently, cell nuclei were stained using propidium iodide (PI;  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$  in PBS, 10 min). The scaffolds were washed with PBS, and visualized using confocal microscopy (ZEISS LSM 5 DUO, PI:  $\lambda_{\text{ex}} = 561 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 630\text{--}700 \text{ nm}$ ; DiOC6(3):  $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 505\text{--}550 \text{ nm}$ ).

## 2.7. RNA isolation and qRT-PCR analysis

The total RNA was isolated using the Qiagen RNA mini-kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the protocol provided by the manufacturer. Reverse transcription (RT) was performed using the RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo

**Table 1.** Primers used for qPCR analysis.

Gene	Primer	Primersequence	UPL probe
GAPDH	Left	Acagacagccgtgtgtcc	28
	Right	Accttcaccatcgctgtctca	
Osteocalcin	Left	Gagctggctgatcacatcg	79
	Right	Ctgcgaggtctaggctatgc	
Collagen I	Left	Atgttcagctttgtggacctc	15
	Right	Cttctctggccctctct	

Scientific, Waltham, MA, USA) with 80 ng of the total RNA. Transcript levels were evaluated using quantitative real-time RT-PCR. QRT-PCR was performed using the Light Cycler 480 II real-time PCR system (Roche, Basel, Switzerland) with LC 480 TaqMan Master and TaqMan probes (universal Probe Library, Roche) following the protocols of the manufacturer. The genes whose expression was analyzed by qRT-PCR are listed in table 1. Primers were purchased from Generi Biotech (Czech Republic). All samples were run in triplicates. The thermos-cycling parameters were 95 °C for 10 min; 95 °C for 10 s, 60 °C for 10 s (45 cycles); and 40 °C for 1 min. All samples were scaled relative to the median of the GAPDH expression level, which was used as an endogenous control gene.

### 2.8. Detection of alkaline phosphatase activity

Activity of alkaline phosphatase was measured using 1-Step™ PNPP kit (Thermo Scientific, USA). PNPP reagent (100 µl) was added to samples and incubated for 30 min. The reaction was stopped by adding 2N NaOH. Absorbance of samples was recorded by microplate reader at 405 nm.

### 2.9. In vivo studies of bone defect regeneration

Melt-blown/electrospun scaffold, which was evaluated as the most suitable scaffold for bone tissue regeneration, was tested *in vivo* to determine its regenerative potential. Scaffolds were implanted into the critical sized defects in the femur of New Zealand white rabbits. 16 male New Zealand white rabbits, 3 months old, weight approximately 3.0 kg, were obtained from a conventional breed (Velaz, Czech Republic) and bred in standard cages without bedding. The rabbits were fed ad libitum using standard granular mixture for rabbits (TM-MaK 1, Bergman, CR). The Ethical Principles and Guidelines for Scientific Experiments on Animals were respected throughout the study. The maintenance and handling of the experimental animals followed EU Council Directive (86/609 EEC), and the animals were treated in accordance with the principles of Care and Use of Animals. The investigation was approved by the Expert Committee of the Institute of Physiology, Academy of Sciences, Prague, CR, and conformed to Czech Animal Protection Law No. 246/92 The surgical procedure was conducted under general anesthesia using Ketamine (35 mg Kg<sup>-1</sup>) and

Xylazine (2 mg kg<sup>-1</sup>) and subsequently inhalation of O<sub>2</sub> + 1.5%–2.0% Halothane during surgery. In lateral femoral condyles, a critical size defect 6 mm in diameter was made using a drill. The depth of the defect was 10 ± 0.5 mm. Animals were divided into two groups. Group I (control group) reached 8 animals and the defects were left empty without any treatment. Defects of Group II (tested group, 8 animals) were filled with melt-blown scaffolds. Scaffolds were cut into a cylinder shape with 6 mm in diameter and 10 mm in height and sterilized using ethylene oxide. Antibiotics (10 mg kg<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> i.m. of Marbocyl 2%) and analgesics (0.1 mg kg<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup> s.c. of Meloxydil 5 ad us.vet.) were administered during the first 5 d. Rabbits were not limited in their movement after surgery. Euthanasia of the rabbits was performed 70 d later, and the femoral condyles were examined. All of the harvested samples were fixed in 4% phosphate buffered formaldehyde.

### 2.10. Histological processing

All of the fixed samples were demineralized in 5% solution of nitric acid (Merci, Brno, Czech Republic) for 7 d. After 7 d, nitric acid was neutralized by 5% solution of sodium sulfate for 1 h and subsequently immersed in physiological solution for 24 h. Every sample was cut in the center of the defect perpendicular to its longitudinal axis into two equal parts (13 × 13 × 5 mm). Tissue blocks were processed individually. Twelve sections of each sample were stained using four different histological methods: hematoxylin-eosin, Verhoeff's hematoxylin with green trichrome (Kocova 1970), picosirius red and immunohistochemical detection of osteocalcin. Picosirius red (Direct Red 80, Sigma Aldrich, Munich, Germany) diluted in saturated picric acid solution was used to visualize the type I collagen (Lattouf et al 2014). Circular polarizing filter (Hama, Monheim, Germany) crossed with a quarterwave λ/4 filter below the analyzer filter (U-GAN, Olympus, Tokyo, Japan) mounted on the Olympus CX41 microscope (Olympus, Tokyo, Japan) was used. The presence of osteocalcin was assessed in immunohistochemical sections using mouse monoclonal antibodies (OCG3, concentration 10 µg ml<sup>-1</sup>, Cambridge, USA) and visualization based on diaminobenzidine (N-Histofine, Nichirei Biosciences INC., Tokyo, Japan).

Methodology of the histological evaluation was described in detail elsewhere (Prosecka et al 2014). Briefly, the volume of bone and the volume of type I collagen was quantified in four micrographs per tissue block (2× objective). Quantification of bone volume in the defect was done using the point grid estimations and the Cavalieri principle (Mouton 2002). Ellipse software (ViDiTo, Košice, Slovakia) with a point grid was used. The defects were divided into three compartments (the outer, the middle, the central compartment) using three concentric circles with diameter 6, 4, and 2 mm (table 2). To test which of the

**Table 2.** Outer, middle, and central compartment of bone defect under examination (Prosecka et al 2014).

Parameter	Compartment		
	Outer	Middle	Central
Circle diameter (mm)	6	4	2
Area per section (mm <sup>2</sup> )	15.71	9.42	3.14
Volume in 4 sections (mm <sup>3</sup> )	3.142	1.884	0.628
Volume fraction	0.552	0.331	0.114

compartments was preferentially occupied by bone tissue, we divided the total number of points hitting the bone tissue by the volume fraction of each compartment within the examined volume of the defect. Thus, we calculated the expected number of points (Pexp) hitting the bone tissue within each volume-occupying compartment, provided that the bone tissue had regenerated equally within all three compartments. The ratio between the observed number of points hitting the bone tissue (Pobs) and Pexp was the relative deposition index (RDI = Pobs/Pexp), which was used to compare the compartments. For uniform bone regeneration, RDI was equal to 1, but for preferential bone growth, the index was >1. We then calculated the partial chi-squared values for each pair using the following equation: (Pobs—Pexp)<sup>2</sup>/Pexp. Total chi-squared values were compared with the chi-squared distribution to test the null hypothesis, stating that the distribution pattern among the compartments was random. Our study had two degrees of freedom (supplementary table 1 is available online at [stacks.iop.org/BMM/13/025004/mmedia](https://stacks.iop.org/BMM/13/025004/mmedia)).

Five micrographs per tissue block were taken using a 10× objective for evaluation of osteocalcin-positive osteoblasts and newly formed bone matrix. These were quantified using a stereological point grid and expressed as an area fraction of osteocalcin positivity.

### 2.11. Statistical analysis

Quantitative data are presented as mean ± standard deviation. Average values were determined from at least 3 independently prepared samples. Results were evaluated statistically using one-way analysis of variance and Student–Newman–Keuls test (SigmaStat 12.0, Systat). The data from the histological analysis were processed with Statistica Base 9.1 (Stat-Soft, Inc., Tulsa, OK, USA). Testing of the randomness of bone distribution among compartments was based on the chi-squared distribution. The Mann–Whitney U test was used to test the quality of population medians among the groups in the study. All results were considered statistically significant if *p* was <0.05.

## 3. Results

### 3.1. Scaffold preparation and characterization

Three different fibrous scaffolds were prepared from the same material, but using different technologies.

Fibrous layers were visualized using SEM (figure 1) and fibers and pore diameters are evaluated using Image J software (table 3, figure 2). The use of the melt-blown technology in combination with ES resulted in a formation of fibers with an average diameter of  $4.46 \pm 5.34 \mu\text{m}$ . Nanofibers were represented in 15.4%, microfibers in 84.6%. Scaffold was highly porous with porosity 94% and an average pore diameter of  $22.4 \pm 9.8 \mu\text{m}$ . EB technology resulted in fluffy scaffolds with an average fibers diameter of  $1.56 \pm 0.83 \mu\text{m}$ . Nanofibers were represented in 20.7%, microfibers in 79.3%. Porosity of EB scaffold was 86% with open pores  $9.4 \pm 4.13 \mu\text{m}$  on average. ES technology produced a two-dimensional sheet-like structure with significantly thinner fibers compared to MB and EB ( $0.4 \pm 0.4 \mu\text{m}$ ) and smaller pores ( $0.9 \pm 0.63 \mu\text{m}$ ). Nanofibers were represented in 92.7%, microfibers in 7.3%. Porosity of the layer was 74%.

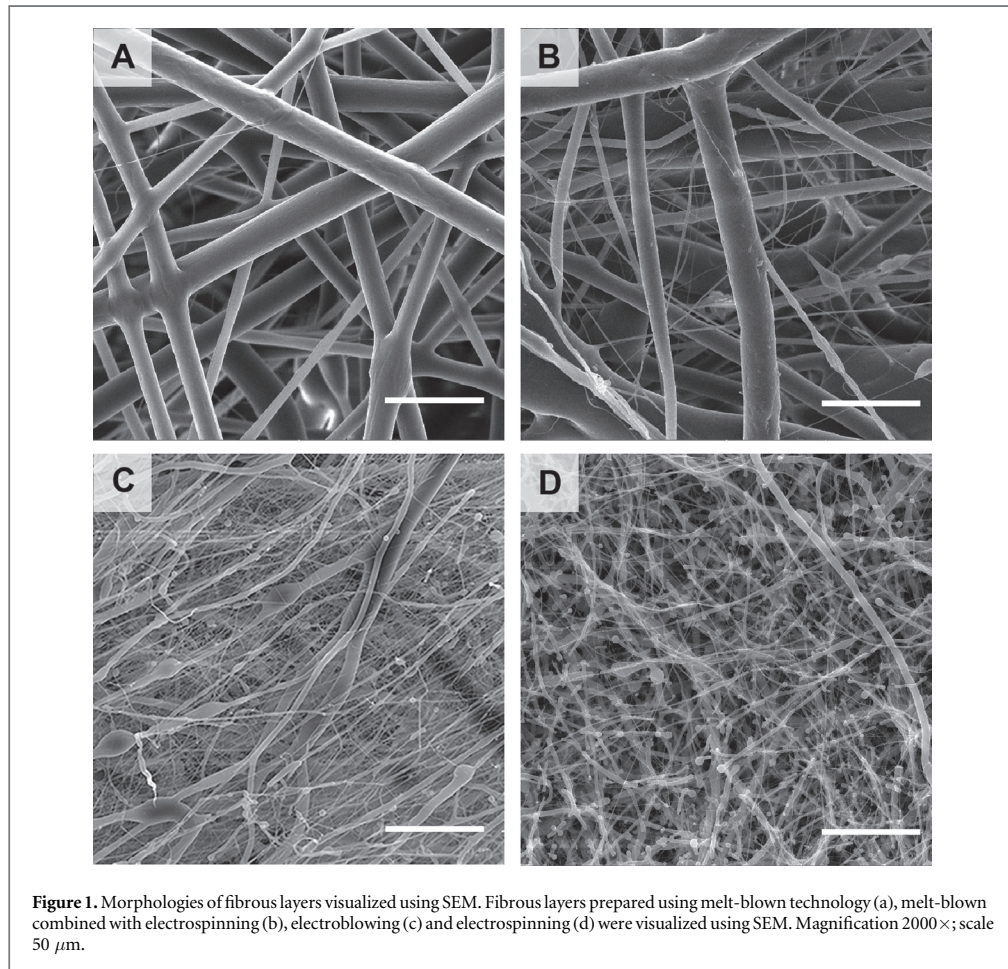
### 3.2. MSCs viability and proliferation on the scaffolds

Cells proliferated and were viable on all the samples during the 28 d of the experiment (figure 3). The lowest cell adhesion was visible on the EB sample. Cells started to considerably proliferate on MB and EB samples on day 7. There was no significant increase in the cell number detected on these two samples in the rest of the experiment. The majority of the cells were detected on MB on days 14 and 28. Metabolic activity of cells was lowest on EB on days 1 and 3. Then the viability started to grow fast on EB and was similar on all samples on day 7. On day 14, the highest metabolic activity was seen on EB. No differences were seen among the samples in the subsequent days of the experiment.

### 3.3. Proliferation and penetration of the cells into scaffolds

Confocal fluorescence microscopy (figure 4) and SEM (figure 5) were used to visualize the distribution of MSCs on scaffolds. Diametrically, the opposite picture of distribution was seen in the case of MB and ES. In the case of MB, the cells adhered to the fibers and penetrated through big, interconnected pores to a depth of  $200 \mu\text{m}$ . In the following days, MSCs started to spread on the fibers and proliferated. The maximum depth of penetration was detected on day 14 and was  $250 \mu\text{m}$  (figure 6). The depth of penetration was confirmed by z-stack image, which shows cells distributed across scaffold.

On the other hand, in the case of ES, cells adhered and grew only on the surface of the scaffolds. Cells proliferated well on the sample and reached a confluence on day 14. From this time point, the cells slowed down their proliferation. Cells did not penetrate through the nanofibrous ES layer at all, and the maximum measured depth was around  $50 \mu\text{m}$ . The cells in

**Table 3.** Fiber and pore diameters evaluated from SEM.

	Fiber diameters ( $\mu\text{m}$ )				
	Mean	Standard deviation	Minimum	Maximum	95% interval SP
ES	0.4	0.4	0.08	4.91	0.0240
EB	1.56	0.83	0.3	8	0.0514
MB	4.46	5.34	0.34	39.72	0.3292
	Pore diameters ( $\mu\text{m}$ )				
	Mean	Standard deviation	Minimum	Maximum	95% interval SP
ES	0.9	0.63	0.14	7.24	0.0269
EB	9.4	4.13	0.88	24.13	0.2733
MB	22.34	9.8	1.32	68.8	0.5287

z-stack image show only superficial growth of cells on scaffolds.

EB possessed combined properties of both the previous scaffolds. MSCs adhered on fibers and spread around them. The average depth of penetration was around 100  $\mu\text{m}$ . From day 14, the cells started to form

layers and reached confluence on day 21. The z-stack image shows higher penetration rate compared to ES, but lower compared to MB.

### 3.4. Osteogenic differentiation of MSCs on the scaffolds

Osteogenic differentiation of MSCs was detected as the activity of ALP (figure 7(a)) and using qPCR (figures 7(b), (c)). Activity of ALP grew simultaneously on all samples until day 14. Afterwards, a decrease in ALP activity was detected on EB. No difference among the groups was detected on day 28.

Osteocalcin (OCN) (figure 7(c)) and collagen type I (Coll) (figure 7(b)) were detected using real-time PCR analysis as proteins typical for bone ECM and, therefore typical markers of osteogenic differentiation. MSCs on MB showed prolonged expression of Coll. Cells started produce Coll on day 14 and the expression was highest on day 28. Cells on EB already produced Coll on day 7. The expression was highest on day 21, when it was higher than both the other samples. Rapid decrease in Coll expression was detected on day 28. ES showed stable expression of Coll during the whole experiment. A different pattern was shown

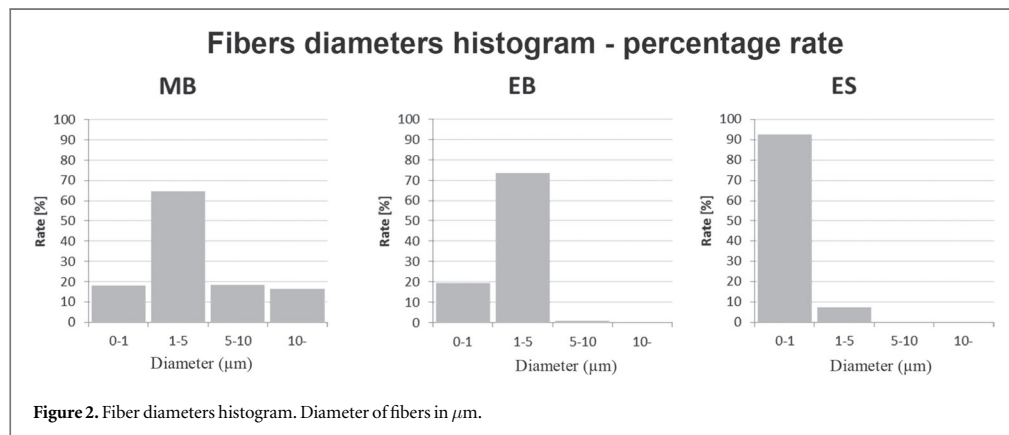


Figure 2. Fiber diameters histogram. Diameter of fibers in  $\mu\text{m}$ .

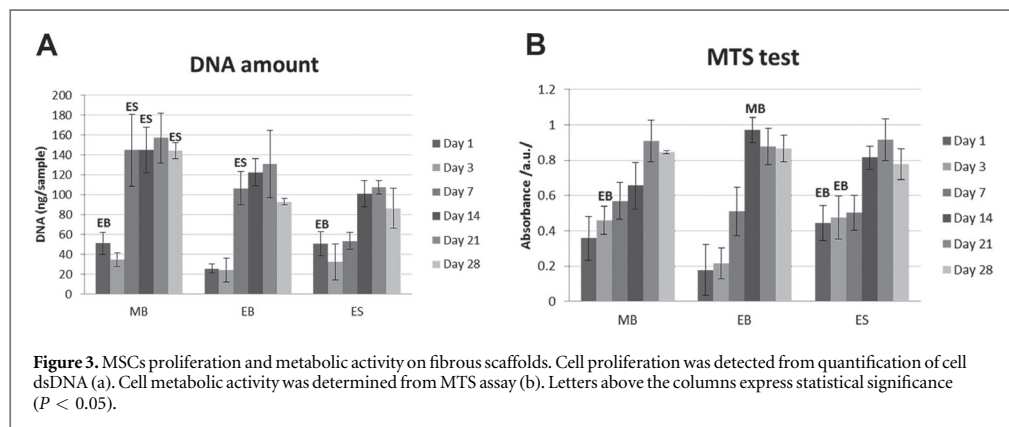


Figure 3. MSCs proliferation and metabolic activity on fibrous scaffolds. Cell proliferation was detected from quantification of cell dsDNA (a). Cell metabolic activity was determined from MTS assay (b). Letters above the columns express statistical significance ( $P < 0.05$ ).

in expression of OCN. Expression was low on all the samples on day 7. From day 14, the expression grew on MB and was highest during the rest of the experiment, with the maximum on day 28.

### 3.5. *In vivo* regeneration of critical sized bone defects using MB scaffold

Based on the results of *in vitro* studies, where MB scaffold showed the best cell proliferation and osteogenic differentiation, this scaffold was used for further *in vivo* testing on a rabbit model. Bone regeneration was tested in a critical sized defect in femur condyle for 70 d. The scaffold showed good manipulation during the surgical procedure. There was no evidence of any inflammation or any complication of healing. All defects in both groups were completely filled with newly formed tissue. Joint cavities were without any sign of inflammation. All animals survived to the date of scheduled euthanasia.

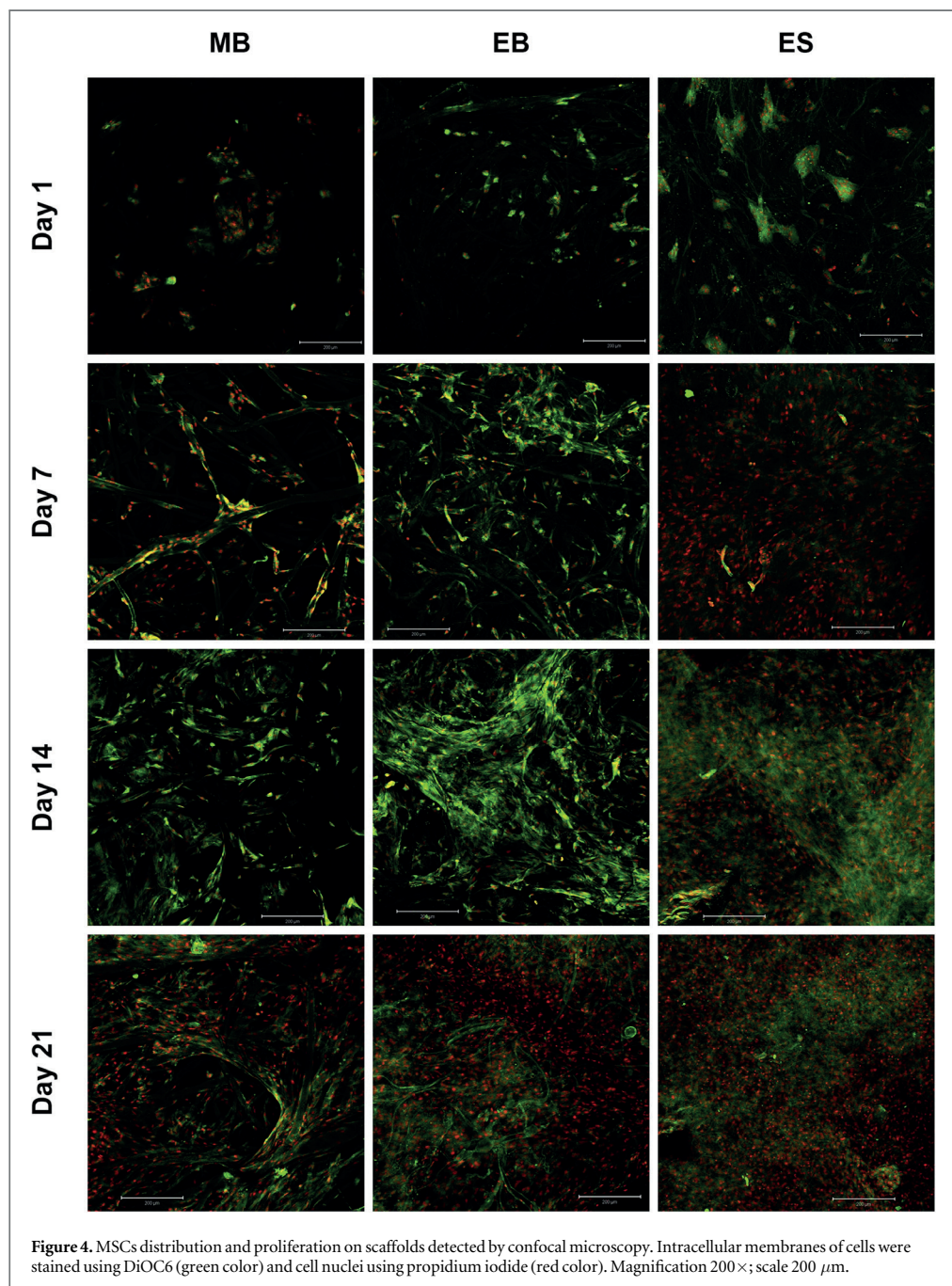
### 3.6. Histological evaluation of regenerated bone defects

While bone defects without scaffolds (control group) mostly healed with adipose tissue only, there was a visible formation of bone tissue in the treated group

(figures 8, 9). In the group with scaffold, there was preferential bone deposition in the outer compartment of the experimental defect ( $\text{RDI} > 1$ ). Healing of the defect started from the margins of the defect. Newly formed bone trabeculae were found around the fibers of scaffold (supplementary figure 4), preferentially in the outer compartment of the defect. Moreover, newly formed capillaries were found, which are essential for successful bone healing (supplementary figure 5).

The volume fraction of bone within the defect was greater in samples with scaffold (2.8%) than in samples without scaffold (0.2%) ( $p < 0.05$ ). The volume fraction of bone within the outer compartment (V1) was greater in samples with scaffold (4.8%) than in samples without scaffold (0.3%) ( $p < 0.001$ ). Differences of bone volume fraction in the middle (V2) and central (V3) compartments were not significant. The area fraction of osteocalcin within the defect was greater in samples with scaffold (10.4%) than in samples without scaffold (0.2%) ( $p < 0.001$ ). Positive correlation of  $V_v(\text{bone})$  with  $V_v(\text{collagen I})$  was 0.96 ( $p < 0.05$ ).

Between-group comparison of area fraction of osteocalcin is presented in figure 10(A). The largest area fraction of osteocalcin was in the group with



scaffold (0.104), rather than in the group without scaffold (0.002) ( $p < 0.001$ ).

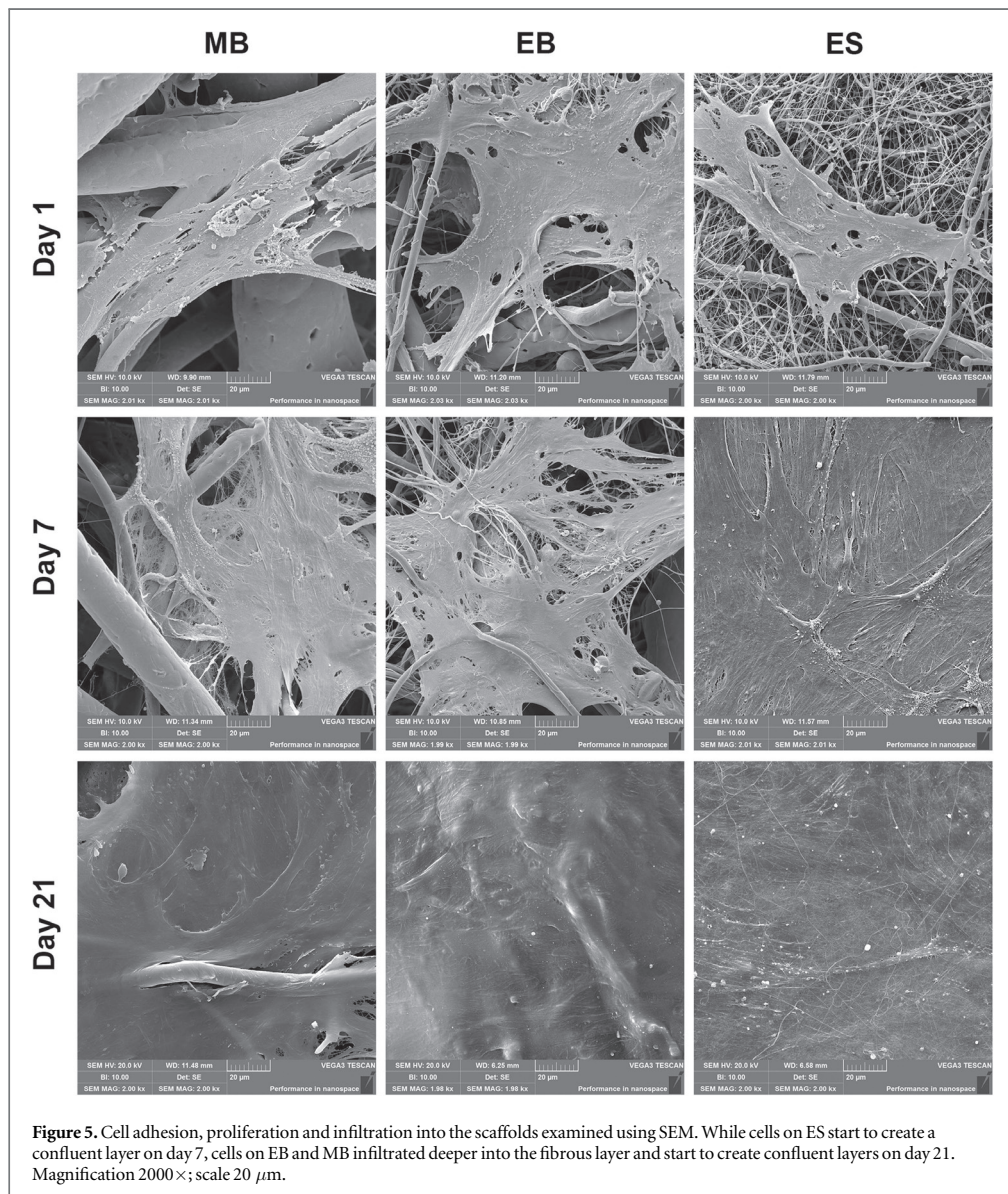
#### 4. Discussion

Polymeric nano- and microfibers are known to be excellent scaffold for cell adhesion and proliferation. In the current study we have compared fibrous scaffolds prepared by diverse techniques. Melt-

blown/ES was used to prepare nanomicrofibrous scaffolds with a higher proportion of microfibers. ES and EB were used for the preparation of nano/microfibrous scaffold with a dominant fraction of nanofibers.

The samples were tested for bone tissue engineering potential on model of MSCs. MSCs have multipotent potential and could be differentiated to bone, cartilage, fat, tendon, muscle and additional cell types. Physiologically, they play a dominant role in fracture

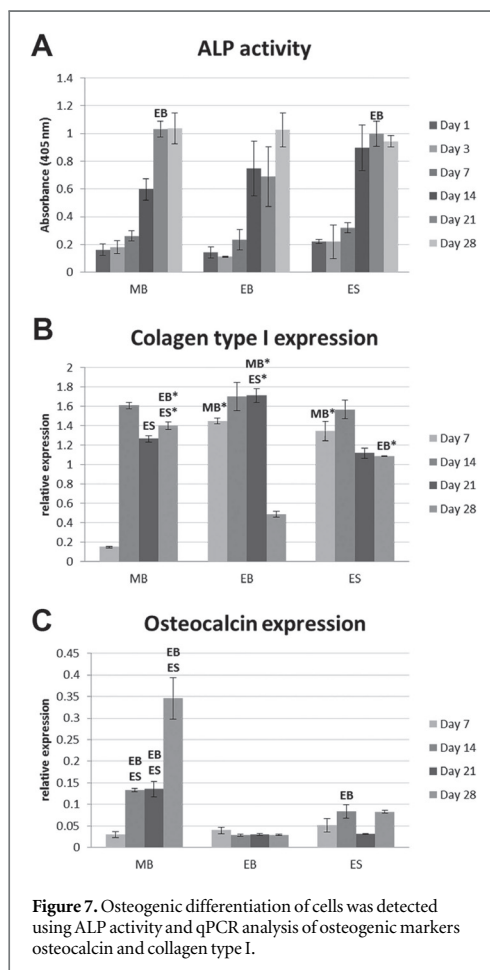
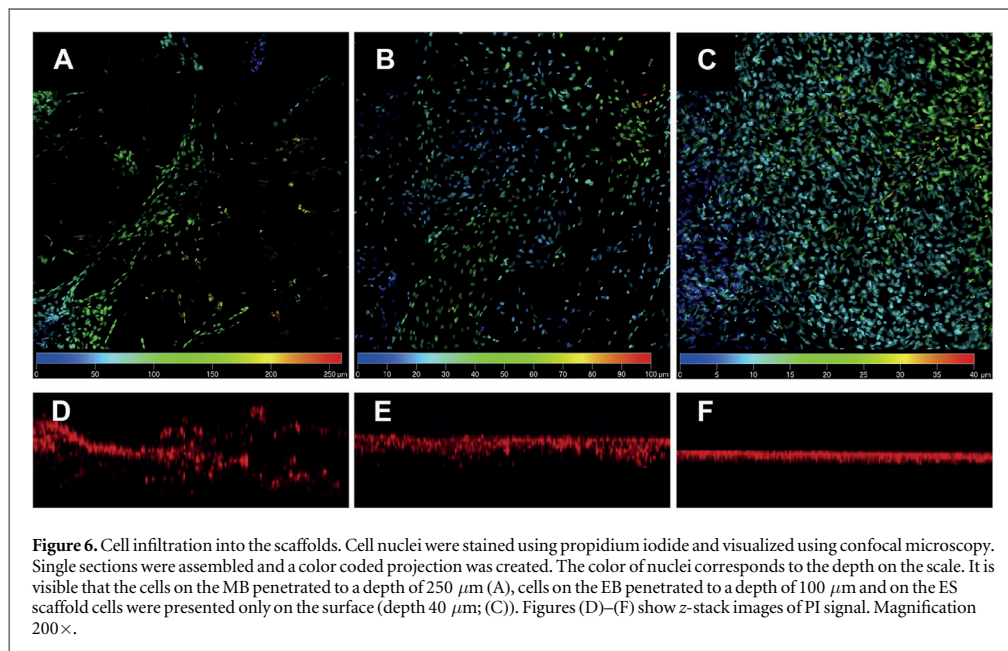




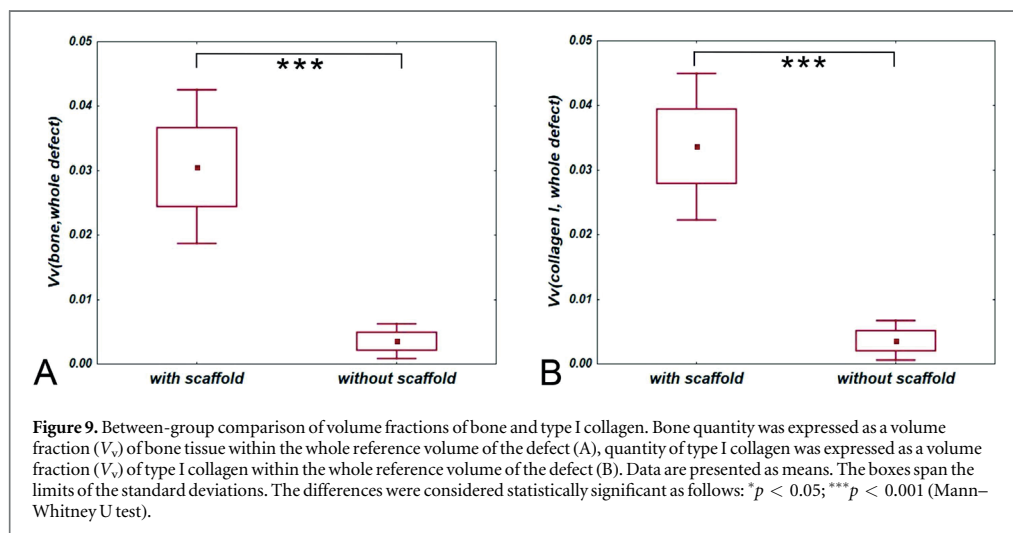
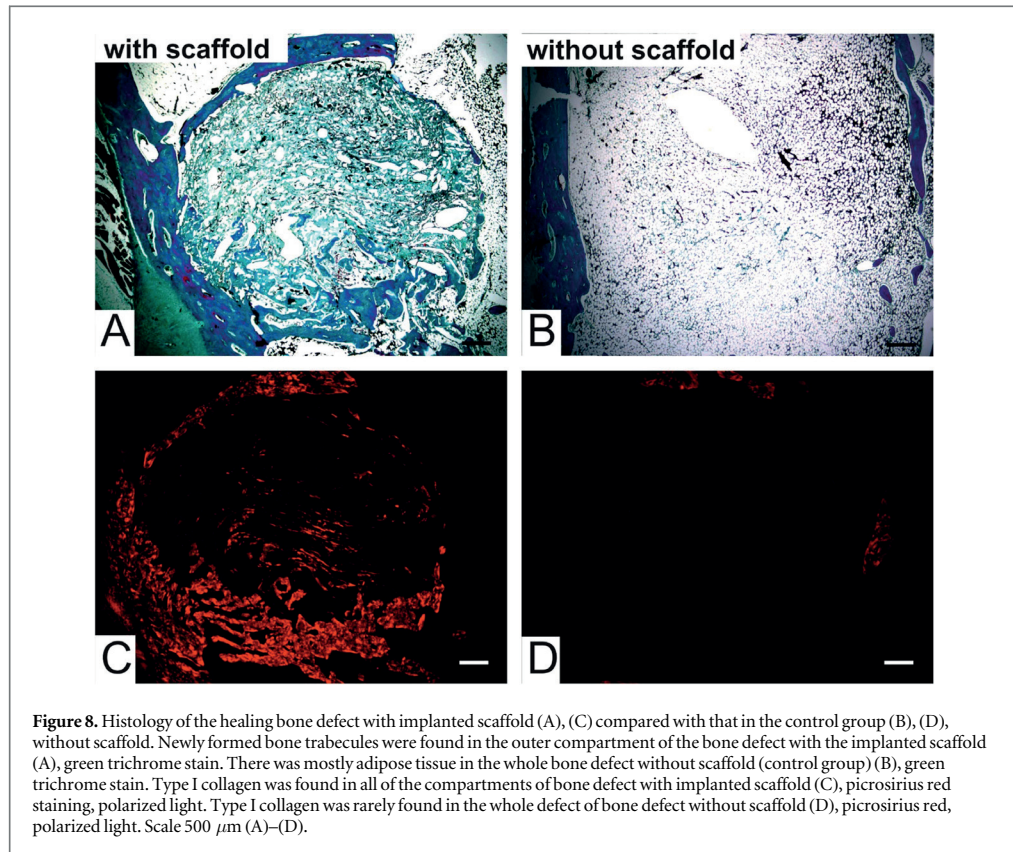
restoration. During fracture healing they migrate to the defect site and differentiate to chondroblasts and osteoblasts. In addition, they play an important immunomodulatory function and help to regulate the immune system response in the fracture (Granero-Molto *et al* 2009). MSCs could be simply isolated from patients, and due to low immunogenicity, could be used for cell therapy. The evaluation of the MSC response to different scaffold types is therefore essential for *in vitro* comparison and selection for further *in vivo* studies. The osteogenic differentiation of MSCs on PCL scaffolds was confirmed in various studies. Li *et al* tested an electrospun nanofibrous PCL scaffold for its ability to support and maintaining of stemness *in vitro* (Li *et al* 2005). It was shown that in specific

differentiation media, cells were able to differentiate into adipogenic, chondrogenic and osteogenic lineages.

In the current study, the scaffolds prepared by different techniques had diverse morphological and stereological properties. The structure of scaffolds varied in 3D structure, pore size and ratio of nano- and microfibrillar fractions. While ES resulted in the formation of a layer where mostly nanofibers were represented (more than 90%), the melt-blown prepared layer was composed mostly from microfibrils. Around 20% of nanofibers, which were represented in MB, mostly originate from ES. The rationale for using a combination of both nanofibers and microfibrils comes from the observed beneficial effect on cell adhesion and proliferation. Liu *et al* combined in their

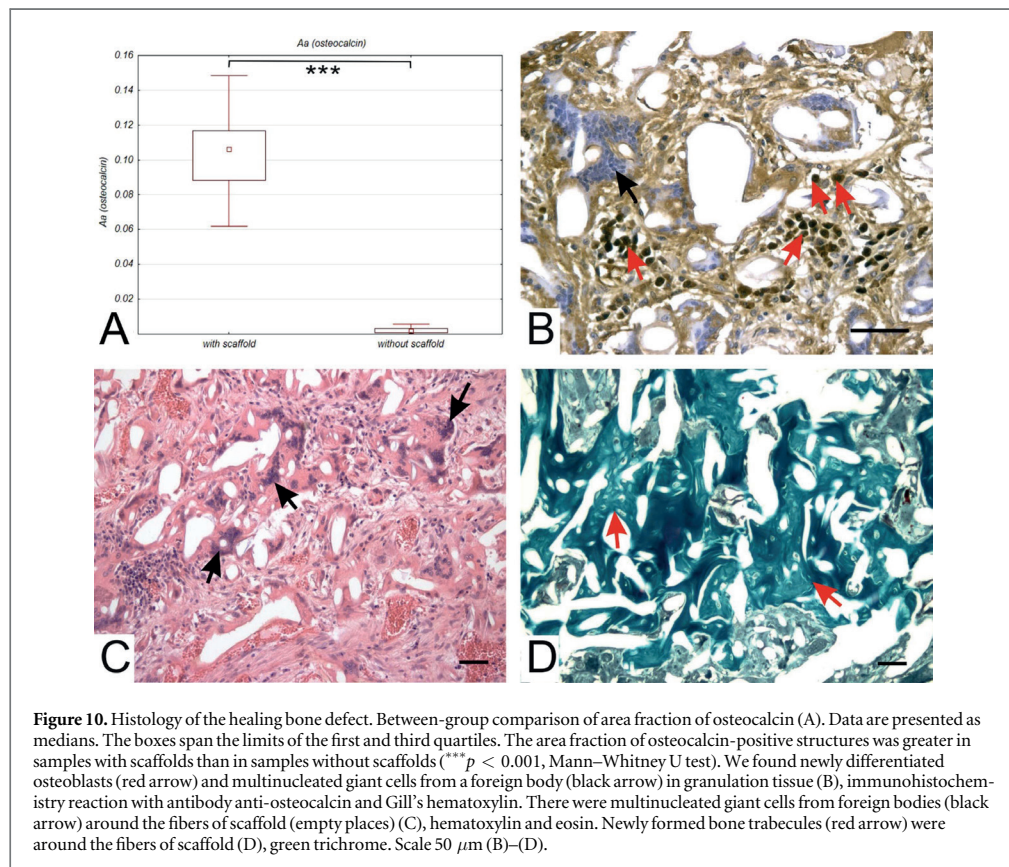


study layered nano-on-micro matrix, which simulated ECM, for the cultivation of human pluripotent stem cells (Liu *et al* 2017). Erben *et al* developed a method where melt-blown technology was combined with ES (Erben *et al* 2016). While melt-blown technology gave rise to microfibers, which served as a porous mechanical support, electrospun nanofibers enhanced cell adhesion. Moreover, it was possible to regulate the ratio of both fibers. It was shown that a bigger representation of nanofibers in scaffold supported MG-63 cell proliferation. On the other hand, Pham *et al* presented in their study, PCL electrospun scaffolds with a different representation of nano- and microfibers. It was shown that increasing the nanofibrous section did not improved cell adhesion, and, moreover limited cell infiltration (Pham *et al* 2006). The materials also distinctively differed in pore size. While the ES layer showed small pores (with maximum pore size 7.24  $\mu\text{m}$ ), MB showed big pores, which enabled cell penetration into the deep part of the scaffold (maximum pore size 68.8  $\mu\text{m}$ ). Good cell infiltration to the MB scaffold was clearly visible from confocal microscopy, where cells were detected even in a depth of 250  $\mu\text{m}$ . On the other hand, in the case of ES, cells grew only on the surface of the nanofibrous layer (maximal depth 40  $\mu\text{m}$ ). Big open pores are essential for successful scaffold for bone substitution. Pores have to be big enough to enable cell infiltration and vascular ingrowth. The minimal pore size for foam scaffolds was shown to be around 100  $\mu\text{m}$  (Dawson *et al* 2008), optimal pore sizes are even bigger. Prosecka *et al* compared collagen foam scaffolds with different porosity and pore size. Optimal pore size for cell growth was shown to be 400  $\mu\text{m}$  (Prosecka *et al* 2011).



On the other hand, the limitation of foam scaffolds is limited permeability between pores. Cells are closed in cavities of pores, which are big enough to enable the cells to proliferate, but communication between the pores is possible only with the degradation of scaffolding material. In the case of fibrous scaffolds, cells can adhere on fibers and freely proliferate around them into the depth of the scaffold.

The *in vitro* study showed that all prepared scaffolding materials are suitable for MSC growth. The best cell adhesion was expected on the nanofibrous ES scaffold, but the cell adhesion on the MB was comparable. Moreover, the cells proliferated well on the MB scaffold and the amount of cells was the highest compared to ES from day 7. A higher number of cells on the MB scaffold enhanced the osteogenesis, which was



proved using detection of specific gene expression. This could be connected with the deeper cell penetration to MB scaffolds. The cells had more space for proliferation, resulting in higher overall DNA concentration. Nevertheless, the presence of nanofibrous fraction from ES allowed proper cell adhesion, comparable with other fabrication methods. On the other hand, small pores of ES layer prevented penetration of cells into the scaffold and enabled their growth on the surface of the scaffold only, until the confluency was reached.

The osteogenic differentiation was most dominant on the MB scaffolds. The faster differentiation may be connected with the larger space for cell growth. Several authors have described the enhancement of osteogenic differentiation on the 3D scaffolds with a larger surface area (Grayson *et al* 2008, Lode *et al* 2008). In addition, the relationship between cell shape and differentiation lineage was described. The results show, that well adhered flat MSCs were differentiated into osteogenic lineage, while less adhere and round cells differentiated into adipocytes (McBeath *et al* 2004). The data in the current study correlate with our previous observation (Rampichova *et al* 2013). MSCs were cultured on randomly organized and structured PCL nanofibers (Rampichova *et al* 2013). Structured PCL scaffolds enable better cellular penetration into the

scaffold and enhanced the MSCs osteogenic differentiation. The mechanism behind the improved osteoinductive properties may be connected with lower cell density across scaffolds.

The importance of scaffold stereology for MSC osteogenic differentiation was clearly demonstrated in a variety of studies. Faia-Torres *et al* prepared PCL pore size gradients on a film with roughness from  $\sim 0.5$  to  $4.7 \mu\text{m}$  and peak distance varying from 214 to  $33 \mu\text{m}$ . The optimal surface roughness for the fastest and strongest osteogenic differentiation was found to be in the range of an average roughness 2.1– $3.1 \mu\text{m}$  and mean distance between peaks 71.1– $48.1 \mu\text{m}$ . This is in good correlation with the results of our study, where the strongest osteogenic differentiation was seen on the MB scaffold. The MB scaffolds showed similar fiber thickness and pore size.

The *in vitro* testing showed that among tested scaffold, MB had the highest potential for application as bone scaffold. The potential to regenerate the critical bone defect on a rabbit model was evaluated. The results of *in vivo* testing showed formation of new bone tissue in defects treated with MB scaffold. In the group with scaffold, the fraction of bone, the fraction of type I collagen and the fraction of osteocalcin were greater than in the control group without scaffold, which clearly demonstrated enhanced bone formation

promoted by the scaffold. Bone trabecules were newly formed preferentially in the outer compartment of the treated defects, but in greater quantity than in samples without scaffold. While the samples with scaffolds healed with bone trabecules, at least in their outer compartment, the defects without scaffolds healed only with adipose tissue in all compartments. Preferential formation of bone tissue in the outer compartment is typical for cell-free therapy, where cells from bone blood have to infiltrate the scaffold from the side of the defect (Prosecka *et al* 2014). Pore size and interconnections were shown to be critical parameters for vessel infiltration and new bone tissue formation (Mastrogiacomo *et al* 2006). The results of the *in vivo* study show successful bone regeneration comparable with foam (Prosecka *et al* 2014), and are comparable to the results obtained in our current study.

In addition, compared to other studies, MB scaffolds implanted in the present study were made of PCL with a shorter degradation time. The degradation rate of polymeric material is a key parameter for bone substitutes. The degradation rate must be adjusted to mechanically support the cells in growth to give them enough time to synthesize a sufficient amount of ECM to support them. On the other hand, it must be fast enough to make a place for the newly formed tissue. The most frequently used PCL for biomedical applications has Mw 80 kDa, which was described to degrade in a range of months to years. Homopolymers of PCL degrade in the range of 2–4 years, depending on the initial molecular weight (Woodruff and Hutmacher 2010). Yao *et al* combined PCL fibers with PLA, which improved the scaffold mechanical properties and also MSCs osteogenic differentiation *in vitro* and bone formation *in vivo* (Yao *et al* 2017). In the current study, 45 kDa PCL was used for the preparation of scaffolding material to accelerate scaffold degradation. Despite the knowledge on the effect of the fibers under study on bone healing and remodeling after 10 weeks, a detailed comparison of previous time points, showing the inflammatory, maturation, and the remodeling phases, is lacking. This represents a limitation of the present study and would deserve a more detailed study, together with a definition of time-dependent curve of the scaffold degradation.

An advantage of melt-blown, is a high production capacity already proven for the development of diverse non-woven fabrics. The technology in the current manuscript enables formation of  $100 \text{ g m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ . The production is much higher than of ES and electroblowing technology. Since the higher production rate decreases the price of scaffold, the MB scaffolds were the most cost-efficient from all the tested systems. The non-woven structure with randomly oriented fibers and reproducible process ensures stable mechanical and stereological properties between diverse batches necessary for industrial production. Nevertheless, in

combination with biocompatible and widely tested polymer—polycaprolactone, the technology enables fast transition to practical application.

## 5. Conclusion

The combination of microfibers and nanofibers prepared using the melt-blown/ES method was shown to be the most stimulating for hMSCs adhesion, proliferation and osteogenic differentiation. Properties of microfibrillar scaffolds with big open pores enhanced cell infiltration compared to nanofibrillar scaffolds prepared using ES and EB technology. On the other hand, the nanofibrillar component of the scaffold helped cell adhesion. The meltblown/electrospun scaffold showed new bone tissue formation of the critical sized defect of rabbits. Based on our result, and because of the big production capacity of melt-blown technology and PCL of FDA-approved quality, the meltblown/electrospun scaffold seems to be very promising for bone regeneration.

## Acknowledgments

This project was supported by Grant Agency of Charles University (Grants Nos. 1262414 and 512216), the Czech Science Foundation Grant No. 15-15697S the Ministry of Education, Youth, and Sports of the Czech Republic (Research Programs NPU I: LO1508 and NPU I:LO1309), the Ministry of Interior of the Czech Republic (program BV III/1-VS, No. VI20152018010) and Czech Health Research Council (15-33094A, 16-29680A, 16-28637A).

## ORCID iDs

M Rampichová  <https://orcid.org/0000-0001-9608-3370>

M Buzgo  <https://orcid.org/0000-0002-0822-3319>

## References

- Buzgo M, Rampichova M, Vocetkova K, Sovkova V, Lukasova V, Douplik M, Mickova A, Rustichelli F and Amler E 2017 Emulsion centrifugal spinning for production of 3D drug releasing nanofibres with core/shell structure *RSC Adv.* **7** 1215–28
- Cai S, Xu H, Jiang Q and Yang Y 2013 Novel 3D electrospun scaffolds with fibers oriented randomly and evenly in three dimensions to closely mimic the unique architectures of extracellular matrices in soft tissues: fabrication and mechanism study *Langmuir* **29** 2311–8
- Dawson JI, Wahl D A, Lanham S A, Kanczler J M, Czernuszka J T and Oreffo R O C 2008 Development of specific collagen scaffolds to support the osteogenic and chondrogenic differentiation of human bone marrow stromal cells *Biomaterials* **29** 3105–16
- Ellison C J, Phatak A, Giles D W, Macosko C W and Bates F S 2007 Melt blown nanofibers: fiber diameter distributions and onset of fiber breakup *Polymer* **48** 3306–16

- Erben J, Jencova V, Chvojka J, Blazkova L, Strnadova K, Modrak M and Kostakova E K 2016 The combination of meltblown technology and electrospinning—the influence of the ratio of micro and nanofibers on cell viability *Mater. Lett.* **173** 153–7
- Granero-Molto F, Weis J A, Miga M I, Landis B, Myers T J, O'Rear L, Longobardi L, Jansen E D, Mortlock D P and Spagnoli A 2009 Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing *Stem Cells* **27** 1887–98
- Grayson W L, Bhumiratana S, Cannizzaro C, Chao P H, Lennon D P, Caplan A I and Vunjak-Novakovic G 2008 Effects of initial seeding density and fluid perfusion rate on formation of tissue-engineered bone *Tissue Eng. A* **14** 1809–20
- Ju J, Kang W, Li L, He H, Qiao C and Cheng B 2016 Preparation of poly (tetrafluoroethylene) nanofiber film by electro-blown spinning method *Mater. Lett.* **171** 236–9
- Kim J et al 2013 Designing nanotopographical density of extracellular matrix for controlled morphology and function of human mesenchymal stem cells *Sci. Rep.* **3** 3552
- Kocova J 1970 Overall staining of connective tissue and the muscular layer of vessels *Folia Morphol.* **18** 293–5
- Lattouf R, Younes R, Lutomski D, Naaman N, Godeau G, Senni K and Changotade S 2014 Picrosirius red staining: a useful tool to appraise collagen networks in normal and pathological tissues *J. Histochem. Cytochem.* **62** 751–8
- Lee Y J, Lee J H, Cho H J, Kim H K, Yoon T R and Shin H 2013 Electrospun fibers immobilized with bone forming peptide-1 derived from BMP7 for guided bone regeneration *Biomaterials* **34** 5059–69
- Li W J, Tuli R, Huang X, Laquerriere P and Tuan R S 2005 Multilineage differentiation of human mesenchymal stem cells in a three-dimensional nanofibrous scaffold *Biomaterials* **26** 5158–66
- Liu L et al 2017 Nano-on-micro fibrous extracellular matrices for scalable expansion of human ES/iPS cells *Biomaterials* **124** 47–54
- Lode A, Bernhardt A and Gelinsky M 2008 Cultivation of human bone marrow stromal cells on three-dimensional scaffolds of mineralized collagen: influence of seeding density on colonization, proliferation and osteogenic differentiation *J. Tissue. Eng. Regen. Med.* **2** 400–7
- Mastrogiacomo M, Scaglione S, Martinetti R, Dolcini L, Beltrame F, Cancedda R and Quarto R 2006 Role of scaffold internal structure on *in vivo* bone formation in macroporous calcium phosphate bioceramics *Biomaterials* **27** 3230–7
- McBeath R, Pirone D M, Nelson C M, Bhadriraju K and Chen C S 2004 Cell shape, cytoskeletal tension, and RhoA regulate stem cell lineage commitment *Dev. Cell* **6** 483–95
- Mouton P 2002 Principles and practices of unbiased stereology *An Introduction for Bioscientists* (Baltimore, MD: Johns Hopkins University Press)
- Park Y R, Ju H W, Lee J M, Kim D K, Lee O J, Moon B M, Park H J, Jeong J Y, Yeon Y K and Park C H 2016 Three-dimensional electrospun silk-fibroin nanofiber for skin tissue engineering *Int. J. Biol. Macromol.* **93** 1567–74
- Pham Q P, Sharma U and Mikos A G 2006 Electrospun poly (epsilon-caprolactone) microfiber and multilayer nanofiber/microfiber scaffolds: characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration *Biomacromolecules* **7** 2796–805
- Plencner M et al 2014 Abdominal closure reinforcement by using polypropylene mesh functionalized with poly-epsilon-caprolactone nanofibers and growth factors for prevention of incisional hernia formation *Int. J. Nanomed.* **9** 3263–77
- Prosecka E et al 2011 Optimized conditions for mesenchymal stem cells to differentiate into osteoblasts on a collagen/hydroxyapatite matrix *J. Biomed. Mater. Res. A* **99** 307–15
- Prosecka E et al 2015 Collagen/hydroxyapatite scaffold enriched with polycaprolactone nanofibers, thrombocyte-rich solution and mesenchymal stem cells promotes regeneration in large bone defect *in vivo* *J. Biomed. Mater. Res. A* **103** 671–82
- Rampichova M, Buzgo M, Chvojka J, Prosecka E, Kofronova O and Amler E 2014 Cell penetration to nanofibrous scaffolds: forcespinning(R), an alternative approach for fabricating 3D nanofibers *Cell Adhes. Migration* **8** 36–41
- Rampichova M, Buzgo M, Mickova A, Vocetkova K, Sovkova V, Lukasova V, Filova E, Rustichelli F and Amler E 2017 Platelet-functionalized three-dimensional poly-epsilon-caprolactone fibrous scaffold prepared using centrifugal spinning for delivery of growth factors *Int. J. Nanomed.* **12** 347–61
- Rampichova M et al 2013 Elastic three-dimensional poly (epsilon-caprolactone) nanofiber scaffold enhances migration, proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells *Cell Proliferation* **46** 23–37
- Sill T J and von Recum H A 2008 Electrospinning: applications in drug delivery and tissue engineering *Biomaterials* **29** 1989–2006
- Simonet M, Schneider O D, Neuenschwander P and Stark W J 2007 Ultraporous 3D polymer meshes by low-temperature electrospinning: use of ice crystals as a removable void template *Polym. Eng. Sci.* **47** 2020–6
- Tuin S A, Pourdeyhimi B and Lobo E G 2016 Creating tissues from textiles: scalable nonwoven manufacturing techniques for fabrication of tissue engineering scaffolds *Biomed. Mater.* **11** 015017
- Um I C, Fang D, Hsiao B S, Okamoto A and Chu B 2004 Electrospinning and electro-blowing of hyaluronic acid *Biomacromolecules* **5** 1428–36
- Vaquette C and Cooper-White J J 2011 Increasing electrospun scaffold pore size with tailored collectors for improved cell penetration *Acta Biomater.* **7** 2544–57
- Wang Z et al 2014 The effect of thick fibers and large pores of electrospun poly(epsilon-caprolactone) vascular grafts on macrophage polarization and arterial regeneration *Biomaterials* **35** 5700–10
- Woodruff M A and Huttmacher D W 2010 The return of a forgotten polymer-polycaprolactone in the 21st century *Prog. Polym. Sci.* **35** 1217–56
- Yang W, Yang F, Wang Y, Both S K and Jansen J A 2013 *In vivo* bone generation via the endochondral pathway on three-dimensional electrospun fibers *Acta Biomater.* **9** 4505–12
- Yao Q, Cosme J G, Xu T, Miskuz J M, Picciani P H, Fong H and Sun H 2017 Three dimensional electrospun PCL/PLA blend nanofibrous scaffolds with significantly improved stem cells osteogenic differentiation and cranial bone formation *Biomaterials* **115** 115–27

## **Příloha 5**

Article

# The Combination of Hydrogels with 3D Fibrous Scaffolds Based on Electrospinning and Meltblown Technology

Jakub Erben <sup>\*</sup>, Radek Jirkovec , Tomas Kalous, Marketa Klicova  and Jiri Chvojka

Department of Nonwovens and Nanofibrous Materials, Faculty of Textile Engineering, Technical University of Liberec, 461 17 Liberec, Czech Republic

<sup>\*</sup> Correspondence: jakub.erben@tul.cz; Tel.: +420-48-535-3230

**Abstract:** This study presents the advantages of combining three-dimensional biodegradable scaffolds with the injection bioprinting of hydrogels. This combination takes advantage of the synergic effect of the properties of the various components, namely the very favorable mechanical and structural properties of fiber scaffolds fabricated from polycaprolactone and the targeted injection of a hydrogel cell suspension with a high degree of hydrophilicity. These properties exert a very positive impact in terms of promoting inner cell proliferation and the ability to create compact tissue. The scaffolds were composed of a mixture of microfibers produced via meltblown technology that ensured both an optimal three-dimensional porous structure and sufficient mechanical properties, and electrospun nanofibers that allowed for good cell adhesion. The scaffolds were suitable for combination with injection bioprinting thanks to their mechanical properties, i.e., only one nanofibrous scaffold became deformed during the injection process. A computer numerical-control manipulator featuring a heated printhead that allowed for the exact dosing of the hydrogel cell suspension into the scaffolds was used for the injection bioprinting. The hyaluronan hydrogel created a favorable hydrophilic ambience following the filling of the fiber structure. Preliminary in vitro testing proved the high potential of this combination with respect to the field of bone tissue engineering. The ideal structural and mechanical properties of the tested material allowed osteoblasts to proliferate into the inner structure of the sample. Further, the tests demonstrated the significant contribution of printed hydrogel-cell suspension to the cell proliferation rate. Thus, the study led to the identification of a suitable hydrogel for osteoblasts.

**Keywords:** electrospinning; meltblown; bioprinting; scaffold; hydrogels; nanofibers



**Citation:** Erben, J.; Jirkovec, R.; Kalous, T.; Klicova, M.; Chvojka, J. The Combination of Hydrogels with 3D Fibrous Scaffolds Based on Electrospinning and Meltblown Technology. *Bioengineering* **2022**, *9*, 660. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9110660>

Academic Editor: Xiaohu Xia

Received: 6 October 2022

Accepted: 4 November 2022

Published: 7 November 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Tissue engineering is a field that aims to replace, regenerate, or repair damaged tissue [1]. To complete these aims, tissue engineering uses fiber scaffolds [2]; however, these fibrous scaffolds can also be combined with hydrogels to form a composite scaffold [3]. In this study, we chose bioprinting technology to create a composite composed of a fibrous system and a hydrogel. The research aims to demonstrate the functionality of a bioprinting technology that combines hydrogel bioinks containing a cell culture and a 3D cell scaffold. Bioprinting comprises a technology for the transformation of single layers into two- or three-dimensional structures [4]. Moreover, this technology can also be used to print (inject) materials deep into scaffolds or to print material onto scaffolds [5]. Bioprinting technology can, therefore, be employed to create scaffolds, tissues, and organs. Bioprinting technology uses cells as one of the building blocks; cells can be printed together with the culture medium or with biomaterial-based hydrogels, for example, on alginate or hyaluronic acid. Cells comprise the basic structural, functional, and biological units of all living organisms. By combining cells with hydrogels, it is possible to control or develop the properties of the resulting tissue or organ [4,6,7]. One of a number of potential bioprinting options comprises extrusion technology using a computer numeric control (CNC) printer with



a three-axis extrusion printhead. Multicellular aggregates are deposited during printing within a bioink-supporting medium according to a computer-generated template and in accordance with the topology of the required biological structure [8,9]. Hydrogels are used as bioinks that provide cells with an environment that features sufficient hydrophilicity, biocompatibility, and mechanical properties. Bioinks exert a favorable effect on cell migration and viability [10]. Bioprinting technology makes use of synthetic hydrogels, e.g., based on polyethylene glycol, and hydrogels fabricated from natural sources, such as hyaluronan [11].

As mentioned above, bioprinting can be used to print materials into or onto a scaffold surface. Several technologies can manufacture scaffolds in tissue engineering. One of the most widely used technologies for the production of scaffolds is electrospinning [12]. Electrospinning technology is used to produce polymeric nanofiber materials from polymer solutions or melts [13]. Nanofibrous materials prepared via electrospinning technology are suitable for tissue engineering in the form of scaffolds due mainly to their structure, which serves to support cell adhesion and proliferation [14–16]. However, the disadvantage of these materials concerns their insufficient mechanical properties, which rule out their effective use in combination with hydrogels. The mechanical properties can be enhanced, however, by combining electrospinning with meltblown technology. The meltblown technology is not very used for scaffold formation in tissue engineering, but as we have shown in our study, it is suitable for scaffold formation [17,18]. Meltblown technology produces microfibers with a diameter of 1–10  $\mu\text{m}$  by extruding a polymer melt through a nozzle with holes of a diameter of tenths of a millimeter, followed by intense blowing of hot air [19,20].

The research aims to demonstrate the functionality of a bioprinting technology that combines hydrogel bioinks containing a cell culture and a 3D cell scaffold. Moreover, the research also aims to prove the biocompatibility of the individual components and the beneficial impact of this combination on enhanced cell viability and proliferation and cellular seeding. A biodegradable composite material was selected as a suitable 3D scaffold consisting of a mixture of microfibers and nanofibers [17] at a precisely defined ratio [18]. The scaffold was fabricated in one single step. Commercial hydrogels obtained from a single supplier, characterized by very low viscosity prior to crosslinking (the premise for the efficient penetration of the hydrogels into fine fibrous structures), were used for testing purposes. The hydrogels were based mainly on hyaluronan, which has previously yielded interesting results in combination with human bone osteoblasts [21–23].

The results proved the biocompatibility of the injected hydrogel bioinks with the scaffolds. Compared to the scaffold alone, the combination with printed hydrogels resulted in a higher rate of adherent cells immediately following application, enhanced cell viability, and proliferation throughout the structure [24–26].

Since the scaffold was developed primarily for the regeneration of bone tissue, one of the objectives of this study was to find a hydrogel that is suitable for its combination with bone osteoblasts. Based on supportive research [27], the maximum cell viability—as expected—was attained employing a combination of hyaluronan hydrogel supplemented with collagen.

## 2. Materials and Methods

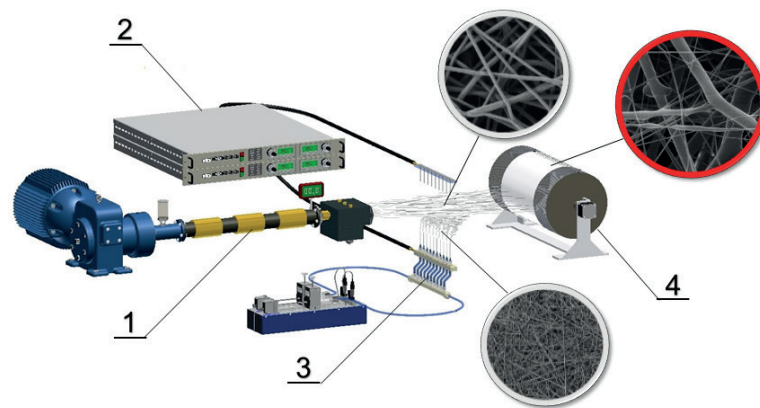
### 2.1. Materials

3D micro-nanofibrous Scaffold—Poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL; Mw 45,000; Sigma Aldrich, Taufkirchen, Germany), absolute ethanol, and chloroform (both Penta Chemicals, Czech Republic). Hydrogel HyStem<sup>®</sup>-Basic—pure thiol hyaluronan with thiol-reactive polyethylene glycol crosslinker, and deionized water (ESI.BIO, Alameda, CA, USA). Hydrogel HyStem<sup>®</sup>-C—Thiol hyaluronan with incorporated collagen, thiol-reactive polyethylene glycol crosslinker, and deionized water (ESI.BIO, USA). Hydrogel HyStem<sup>®</sup>-HP—Thiol hyaluronan with incorporated heparin, thiol-reactive polyethylene glycol crosslinker, and deionized water (ESI.BIO, USA). The employed hyaluronan hydrogels are crosslinked within 20 min after the addition of the crosslinker. Hydrogel PEGgel—polyethylene glycol

diacrylate with Ciba PEGcure UV photoinitiator, crosslinked by UV radiation (ESI.BIO, USA).

## 2.2. Scaffold Preparation

A solution of 16wt% PCL in chloroform/ethanol (9:1) was prepared for the electrospinning process. The scheme of the production equipment set-up is shown in Figure 1. The set-up was composed of a meltblown device (J&M Laboratories, Duluth, GA, USA), an electrospinning device (a multi-needle spinner and a countervailing pressure cylinder), and computer-controlled pumps. The meltblown extruder loading was 100g of polymer per hour. The air velocity was  $20 \text{ ms}^{-1}$  at 200 mm from a meltblown die. The meltblown die length was 100 mm with 65 orifices with a diameter of 0.4 mm. The needle spinner had 10 needles with a diameter of 1.2 mm with a spacing of 25 mm. The polymer dosage was 70 mL/h. The spinner was charged up to 35 kV positive and the collector 14 kV negative. Fibers were deposited on an intercepting drum collector with a diameter of 350 mm that rotated at 4 rpm.



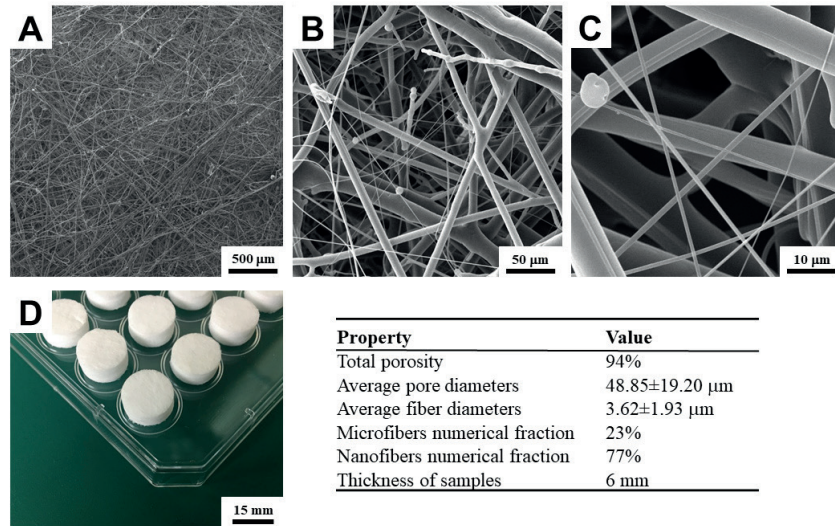
**Figure 1.** Scheme of a combination of meltblown and electrospinning technology for the production of a 3D scaffold: 1—extruder, 2—high voltage power supply, 3—multi needle spinner, 4—drum collector.

A single PCL 3D scaffold sheet with a numerical ratio of nanofibers (fiber diameter  $\leq 1000 \text{ nm}$ ) and microfibers (fiber diameter  $\geq 1000 \text{ nm}$ ) of 1:3 was produced for the basic biocompatibility test and subsequent identification of the best hydrogel for bone osteoblasts. The ratio of nanofibers and microfibers was selected from our results from a previous study [17]. The ratio of micro and nanofibers in the scaffold is influenced only by changing the meltblown extruder rotation speed. The layer thickness was 6 mm. The complete structural properties and SEM images of the material are shown in Figure 2.

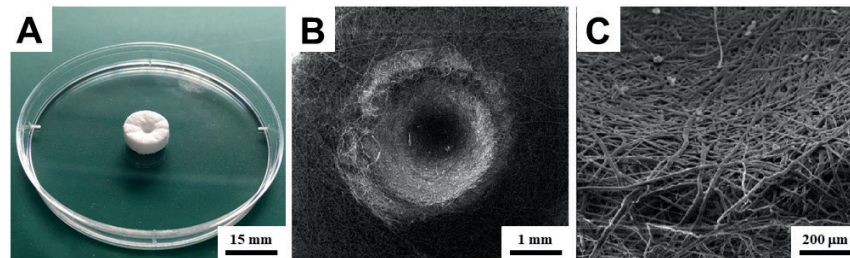
The gravimetric method was used for the determination of the total porosity. The size of the cut samples of PCL scaffolds was  $100 \times 100 \text{ mm}$  and the thickness was measured using a 49-63 bench micrometer (TMI, New Castle, DE, USA) with a pressure of 400 Pa according to the standard EDANA testing method—NWSP 120.1.R0 (15). The weight and volume of the measured samples in relation to the density of the PLC ( $1.145 \text{ g/cm}^3$ ) were used for the final calculation.

Disks with a diameter of 15 mm were cut out of the fibrous layer (Figure 2). For the first biocompatibility test, holes with a diameter of 3 mm and a depth of 1.5 mm were pressed into the disks (Figure 3). These holes were pressed for a better capture of the surface printing of the bioink drops, particularly to prevent their disintegration immediately after printing and subsequent uneven impregnation into the scaffold structure. Without significantly altering its structural properties, the material permits the insertion of holes (Figure 3). For the second test, comparing the effect of different bioink hydrogels printed directly into the

interior of the scaffold, disks of the same size without holes were used. The samples were sterilized with low temperature (37 °C) ethylene oxide for 12 h and subsequently ventilated for three days in a sterile environment. Before bioprinting, they were rinsed three times in phosphate buffer (pH 7.4).



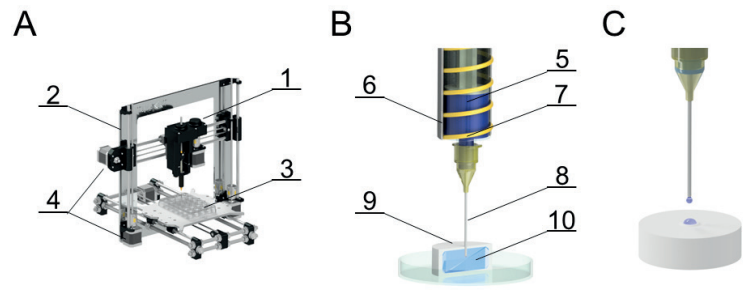
**Figure 2.** Manufactured 3D scaffolds combining micro- and nanofibers. (A–C)—scaffold morphology observed with SEM. (D)—the image of scaffolds in the form of discs. Table—structural parameters of the material [17].



**Figure 3.** Three-dimensional scaffolds with a pressed trap hole. (A)—image of scaffolds with a pressed hole. (B)—SEM image of a pressed hole. (C)—SEM detail image of the hole wall.

2.3. Bioprinting Device

A three-axis CNC extrusion bioprinter was designed for bioprinting (Figure 4). The printer enables the printhead movement in two x- and z-axes with a precision of 0.1 mm, and a y-axis underlay with a precision of 0.01 mm. The maximum working space is 200 × 200 × 200 mm, the maximum feed rate is 19 mm/s in the x- and y-axes, and 6.4 mm/s in the z-axis. The printhead includes a 2 mL heated print reservoir with a maximum dosing rate of 0.6 mL/s. A minimum theoretical dosing rate is 0.01 μL/s, where for a 0.6 mm diameter needle, the minimum possible pushed drop of the medium is 1.85 μL. A step motor with a 1.8°/step resolution was selected as the printhead piston and individual travels drive. All movements are controlled by the Repetier-Host computer software or by means of a g-code to ensure complete automation of the process. This code can be obtained, for example, from computer-aided design (CAD) software.



**Figure 4.** Overall diagram of the bioprinter (A); printhead diagram (B); printhead detail (C). (A) 1—printhead, 2—frame, 3—well plate, 4—x and z axis drive, 5—printing medium, 6—case, 7—heating spiral, 8—needle, 9—fiber scaffold sample, 10—extruded medium inside the scaffold.

Bioprinting was performed in a sterile flowbox with laminar airflow. Prior to printing, all parts of the bioprinter were sterilized with 70% ethanol and UV-C radiation.

#### 2.4. Bioink Preparation for Printing

All applied hydrogels had undergone the same preparation process in a sterile environment. After defrosting to ambient temperature, the deionized water (DW) polymer and DW crosslinker were mixed at the 4:1 ratios. A cell pellet formed after centrifugation of the cell suspension and suction of the culture medium was subsequently added to the polymer and DW solution. The pellet contained  $9.6 \times 10^5$  human bone osteoblasts—MG63 (ATCC, Manassas, VA, USA). Thus prepared cell suspension was stirred for 15 s on a vortex. The cells were after the twelfth passage. The polymer, DW, and cell solution were subsequently mixed with a 1:4 crosslinker and DW solution. Hydrogel bioinks at a concentration of  $3.3 \times 10^4$  cells/100  $\mu\text{L}$  were thus produced. After mixing the hyaluronan hydrogels solution with the crosslinker solution, spontaneous crosslinking occurred after 20 min. After application, Hydrogel PEGgel was subsequently crosslinked with UV light at 365 nm and  $0.13 \text{ W/m}^2$  for 15 min.

#### 2.5. Bioprinting

In the first test, the bioink surface printing consisting of a basic hyaluronan hydrogel (Hydrogel HyStem<sup>®</sup>-Basic) and human osteoblasts (MG63),  $3.3 \times 10^4$  cells/100  $\mu\text{L}$  was realized. It was a surface print in the form of one 50  $\mu\text{L}$  drop in each hole pressed on a scaffold tablet (HG). Bioink was heated in the reservoir head at  $37^\circ\text{C}$  and was extruded at a rate of 50  $\mu\text{L/s}$  ( $1.65 \times 10^4$  cells per hole). The extruded drop filled the hole in parallel with the surrounding surface of the scaffold within two minutes, and the remainder was evenly charged into the scaffold structure as a regular half-sphere. Twenty minutes after its preparation, the bioink was spontaneously crosslinked after printing. Cells were seeded by conventional pipetting of the standard EMEM medium with  $1.65 \times 10^4$  cells per hole (SC) on the second set of scaffolds with holes. This set, seeded with cells in a conventional manner, served as a reference.

In the second test, several bioinks were printed in the interior of the scaffolds. Three types of media—Hydrogel HyStem<sup>®</sup>-C, Hydrogel HyStem<sup>®</sup>-HP, Hydrogel PEGgel in admixture with human osteoblasts (MG63),  $3.3 \times 10^4$  cells/100  $\mu\text{L}$ —were used. A total of 200  $\mu\text{L}$  of bioink were pressed with a needle into the center of each scaffold disk, 3.5 mm below the surface. Bioink heated in the reservoir head at  $37^\circ\text{C}$  and was extruded at a speed of 50  $\mu\text{L/s}$  again. In the case of printing bioink to the structure of the scaffold, 50  $\mu\text{L/s}$  is the maximal value; at an increased speed there was an increased resistance to the extrusion of the hydrogel and its leakage along the needle outside the scaffold observed. During bioink printing, the scaffolds had to be fixed in the culture well by an insert, which prevents the scaffold from lifting along with the needle. After 20 min of their preparation, bioinks with C and HP hydrogels crosslinked their structures spontaneously. After printing, the

bioink containing PEG hydrogel was crosslinked for 15 min by means of UV radiation at a wavelength of 365 nm. For comparison, a further set of scaffolds was seeded with cells by conventional surface pipetting of the standard EMEM medium with  $6.6 \times 10^4$  cells per sample.

The final test analyzed the scaffolds with an internally printed medium in more detail, which obtained the best results in the previous test—Hydrogel HyStem<sup>®</sup>-C. A set of scaffolds seeded with cells by conventional surface pipetting of the classical cell medium was selected as a comparative. Cell counts, bioink volume, and all other variables and methodology were the same as in the previous test.

All cell-seeded materials placed in a 24-well culture plate were subsequently filled by 1.5 mL of culture medium and placed in an incubator. For both tests, a needle of 0.6 mm in diameter and 25 mm in length was used to extrude the medium. The entire bioprinting was carried out in a sterile flowbox at 22 °C and humidity of 55%.

#### 2.6. *In Vitro Cultivation*

Scaffolds with human osteoblasts—MG63 M12 (ATCC, Manassas, VA, USA)—were maintained in eagle's minimum essential medium (EMEM, Manassas, VA, ATCC, USA) culture medium with 10% FBS (Lonza Biotec, Kourim, Czech Republic) and 1% antibiotics mixture—penicillin/streptomycin/emfotericin B (Lonza Biotec, Kourim, Czech Republic). The cells were cultivated in an incubator (37 °C/5% CO<sub>2</sub>). The medium was changed three times a week—1.5 mL per well.

#### 2.7. *Bioink Distribution Analysis*

The Bioink distribution of the sample structure was analyzed after it was printed into the interior of the structure—200 µL/sample. For the analysis, the computed tomography (CT) method was performed by a microtomograph (SKYSCAN 1272, Bruker, Billerica, MA, USA) and 3D visualization software (SKYSCAN 1.1.9). The sample was shot in x-, y- and z-axis, at 60 kV voltage, 166 µA current, and 648 ms exposure. The scanning rate was 5 µm per frame. Afterwards, the images were reconstructed into a 3D model.

#### 2.8. *MTT Assay for the Cell Proliferation*

Cell viability was monitored after 1, 4, and 7 days using the MTT Assay. For each test day, the MTT Assay of 4 samples was evaluated. Prior to the test, each sample was removed from the well, rinsed with PBS and transferred to another culture plate to avoid distortion of the results by cells that adhered outside the scaffold. Subsequently, 250 µL of MTT solution (2 mg/mL in PBS pH 7.4) was added to 750 µL of medium (EMEM) and incubated together with the defragmented samples (divided into individual laminas) for 3 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Formazan crystals were dissolved in isopropyl alcohol. After release of all formazan, the sample fragments were thoroughly shaken on the vortex. To remove impurities, the resulting solution was subsequently centrifuged for 2 min at 4000 rpm. The absorption of formazan solution was measured by a spectrophotometer (BioTek EL808, Winooski, VT, USA) at a wavelength of 570 nm (reference wavelength was 650 nm).

#### 2.9. *Fluorescent Staining*

All fluorescence staining of cells in the samples was performed on the 1st, 4th, and 7th day after the scaffolds had been seeded with cells. Prior to initiating the staining protocol, samples had always been rinsed with PBS intensively in order to remove already-dead cells. For the propidium iodide (PI) staining, the cells on the scaffold were fixed in frozen methanol (−20 °C) for 15 min at 4 °C, washed with PBS, and subsequently maintained for 15 min in solution of PI in the dark.

For quantitative cell viability analysis after 1, 4, and 7 days the Live-Dead staining by Calcein AM (Thermo Fisher Scientific) and Ethidium homodimer-1 (EthD-1, Thermo Fisher Scientific) were used. Calcein AM and EthD-1 were diluted in PBS to concentrations of 0.5 µg·mL<sup>−1</sup> and 2.0 µg·mL<sup>−1</sup>, respectively. The cell-laden scaffold was washed by PBS

and subsequently incubated for 30 min at 37 °C in the dark and after that was again washed with PBS.

#### 2.10. Fluorescent Microscopy Analysis

Immediately after staining samples, an analysis by means of fluorescence microscopy was carried out. Then the stained samples were rinsed with PBS and observed under a fluorescence microscope (NIKON Eclipse Ti-E, Nikon Imaging, Zbraslav, Czech Republic). The final image creation consisted of composing a picture from images taken with z-axis microscope autofocus at step 1 µm. Snapshot ranges were determined by focusing on the minimum and maximum relief of the surface of the sample. The range and therefore the number of frames were always different for each sample. The surface of the samples was analyzed in the direction of the insertion of bioink—OUTSIDE, and the interior of the samples approximately in the middle of the tablet in the direction of the insertion of bioink—INSIDE. The inside of the sample could be analyzed because the employed micro/nanofibrous scaffolds are made up so that their laminate structure is rigid. After staining the cells with fluorescence, the sample was divided along the mid-lamina into two halves, and then FLM cell migration was possible to be observed 3 mm below the surface.

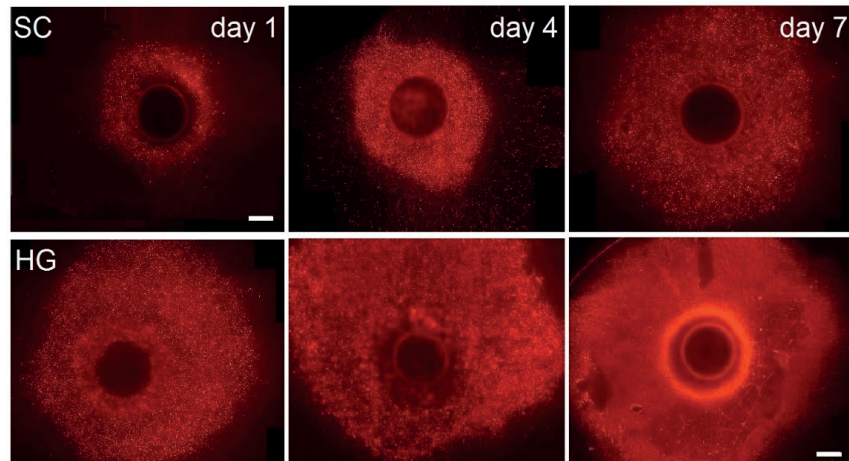
#### 2.11. Cell Count Analysis

Quantification was performed to compare the number of live and dead cells on the test samples. From EthD-1 stained-red fluorescent dead cell nuclei and Calcein AM-green fluorescent-stained live cells (100× magnification), cells from 10 fields of vision were counted and the results were re-counted per cell number per 1 mm<sup>2</sup>. The algorithm enabling image analysis created in Matlab software (MathWorks, Natick, MA, USA) was used to quantify cell nuclei.

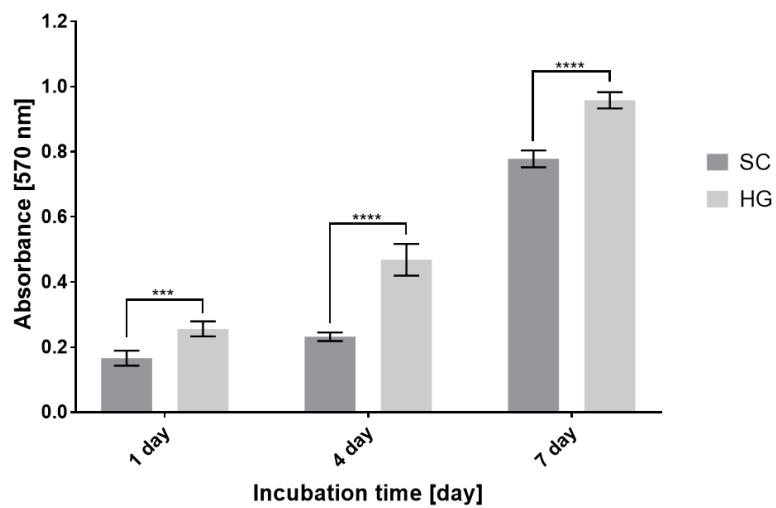
### 3. Results and Discussion

The results of in vitro testing show the functionality of the combination of bioprinting with 3D fiber scaffolds and, furthermore, the significant benefits it brings. The combination is fully biocompatible. Fluorescence microscopy (Figure 5) and MTT Assay (Figure 6) representing the basic print-surface test show that scaffolds with seeded cells exhibit a higher degree of cell viability and confluent growth of the scaffold. In addition, in the bioink printed scaffolds, there is a high degree of migration of cells from the point of their printing into the structure of the material. It can be said that hydrogel aids in the initial consolidation and distribution of cells evenly over the structure of the scaffold and prevents the cells from migrating largely in the gravitational-gradient direction. Fluorescence microscopy and MTT Assay values on post-cultivation day one confirm the higher rate of live cells after their seeding, and hence higher efficiency of targeted cell seeding by bioprinting.

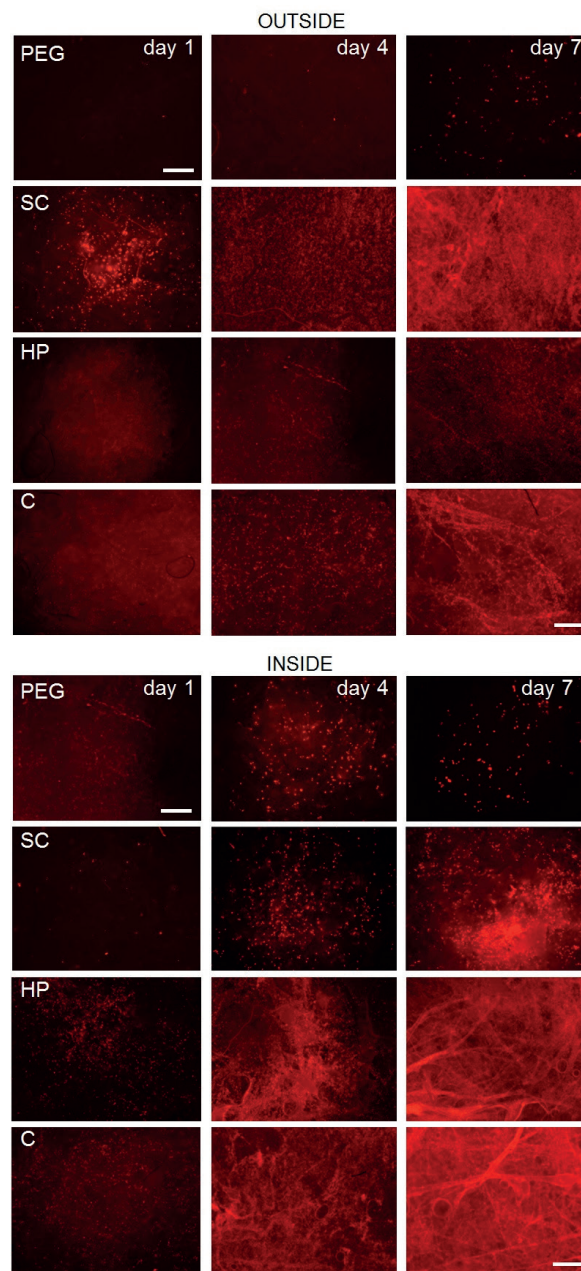
The results of fluorescence microscopy (Figure 7) and the MTT Assay (Figure 8), which compare the effect of internal bioprinting of various bioinks on the viability of human osteoblasts, show and confirm our assumption that cell viability is best supported by the bioink containing hyaluronan hydrogel with incorporated collagen. This combination, as in the first experiment, demonstrates a higher rate of cell metabolic activity in scaffolds combined with hydrogel. On the other hand, the polyethylene glycol hydrogel has shown a lack of crosslinking by UV radiation, which did not penetrate into the scaffold structure and therefore appeared to be inconvenient. Therefore, it is clear that hydrogels using additional radiation for crosslinking are not suitable for a combination with 3D fiber scaffolds. The results clearly show that unlike conventional cellular seeding, printing cells with hydrogel into the structure will provide a higher degree of internal cell proliferation. The chosen amount (200 µL) of the printed bioink applied to a single sample (15 × 6 mm) has proven to be satisfactory. The sample totally absorbed this volume without creating larger defects or structural changes.



**Figure 5.** Images from fluorescence microscopy of bone osteoblasts on scaffolds on the 1st, 4th and 7th test days—propidium iodide staining. The images consist of shots taken by microscope auto-focus in z-axis, 1  $\mu\text{m}$  step; the scale is 1 mm. SC—scaffold with conventionally seeded cells, HG—scaffolds with printed hydrogel.

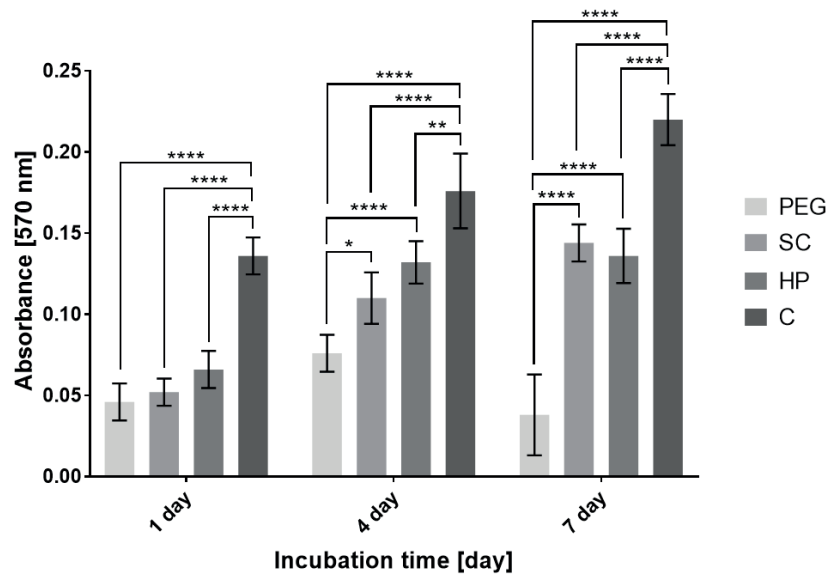


**Figure 6.** Cell metabolic activity described by the MTT Assay—comparison of surface bioprinting and conventional cell seeding (mean value  $\pm$  standard deviation,  $n = 4$ ). Statistically significant difference in the significance level: \*\*\*  $p < 0.0006$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ . SC—scaffolds with conventionally seeded cells, HG—scaffolds with a printed hydrogel bioink.



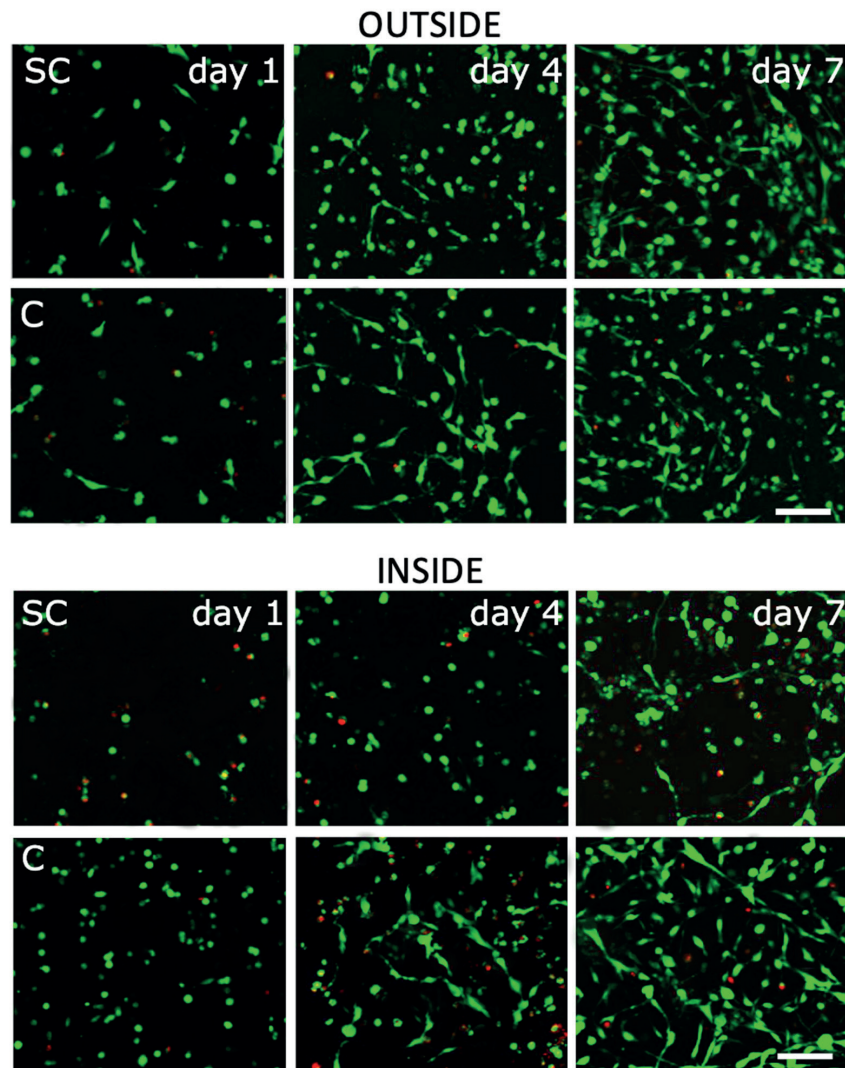
**Figure 7.** Images of fluorescence microscopy of bone osteoblasts on scaffolds on the 1st, 4th and 7th test days comparing the effect of the internal printing of various bioinks on the viability of human osteoblasts—propidium iodide staining. The images consist of shots taken by microscope auto-focus in z-axis, 1  $\mu\text{m}$  step; the scale is 500  $\mu\text{m}$ . The top section shows surface cell proliferation—OUTSIDE. The bottom part shows internal cell proliferation (3 mm under the surface)—INSIDE. C—Hydrogel with incorporated collagen, HP—Hydrogel with incorporated heparin, PEG—polyethylene glycol photosensitive hydrogel, SC—scaffold with conventionally seeded cells.





**Figure 8.** Cell metabolic activity described by the MTT Assay—comparison of the effect of internal bioprinting of different print media on the viability of human osteoblasts (mean value  $\pm$  standard deviation,  $n = 4$ ). Statistically significant difference in the significance level: \*  $p < 0.04$ ; \*\*  $p < 0.002$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$  (ANOVA, post-hoc Tukey). C—Hydrogel with incorporated collagen, HP—Hydrogel with incorporated heparin, PEG—polyethylene glycol photosensitive hydrogel. SC—scaffold with conventionally seeded cells.

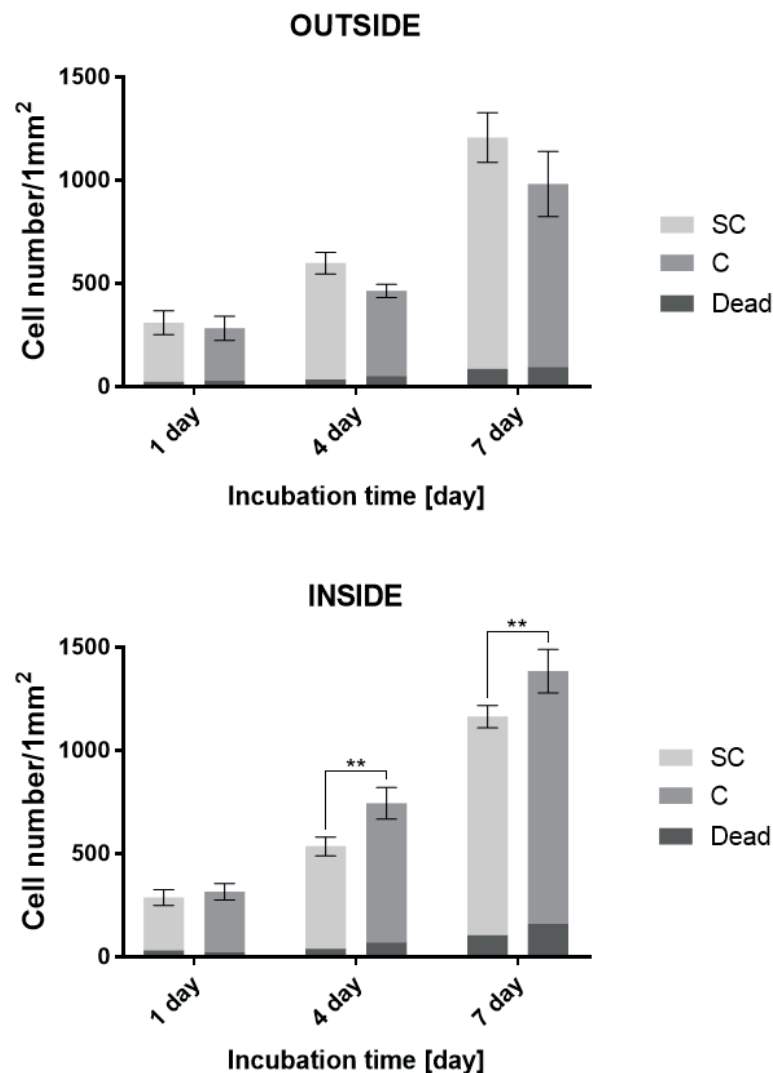
The final “Live or Dead” test evaluated cell viability, migration, and morphology in more detail with regard to their seeding and the used medium. Analyses using fluorescence microscopy (Figure 9) and the quantification of cellular count (Figure 10) confirmed previous results. The test was primarily aimed at visualizing the cell morphology and distinguishing between the number of red-stained dead and green-stained living cells. The results show that during the seeding of the cells, the printed hydrogel ensures their higher percentage of capture in the scaffold. It can be stated that the hydrogel provides better migration of the cells in the scaffold structure and overall provides a higher viability contrary to a scaffold fitted in a conventional manner without hydrogel; however, this assertion cannot be related to the migration of cells on the surface of the scaffold if we compare the scaffold with the internal printing of selected bioink with the scaffold without bioink, where it is mainly the surface of the scaffold that is seeded. From the overall morphology of cells, it is clear that the hydrogel promotes the distribution and viability of cells, which, however, are less adhered to the surface of the fibers, especially within the structure. It seems that the restriction in cell nutrition in combination with hydrogel inside the scaffold is not great. In the case of a hydrogel-free scaffold, again, a lower level of internal proliferation is evident, but it is also given by the way the cells are seeded. Overall, as shown in Figure 9, in the case of a combination of scaffold and hydrogel, the cells show better morphology, better adherence, better expansion, and a more pronounced shape. This can be observed especially on the fourth and seventh day of incubation. The results of cell proliferation and viability, apparent from fluorescence microscopy, correlate with the analysis of the number of cells per unit area (Figure 10).



**Figure 9.** Fluorescence images of live and dead bone osteoblasts on scaffolds of the 1st, 4th and 7th test days comparing the effect of the internal printing of selected bioink and scaffold without bioink on the viability of human osteoblasts—live cells (green: Calcein AM) and dead cells (red: EthD-1) staining. The scale is 100  $\mu\text{m}$ . The top section shows surface cell proliferation—OUTSIDE. The bottom part shows internal cell proliferation (3 mm under the surface)—INSIDE. C—Hydrogel with incorporated collagen, SC—scaffold with conventionally seeded cells.

The ratio of dead to living cells corresponds to the expected values for this type of application. It can be said that the proportion of dead cells is generally higher inside the scaffold and on the seventh day it reaches 13% in the case of combination with a hydrogel. In the case of both internal and external seeding, the overall proportion of dead cells in combination with the hydrogel is higher than in the fibrous scaffold alone. Nevertheless, the number of viable cells in the case of the combination with the hydrogel is significantly higher in the case of internal seeding on the fourth and seventh day compared to the fiber scaffold alone. The combination of scaffold by hydrogel, therefore, has a significant effect

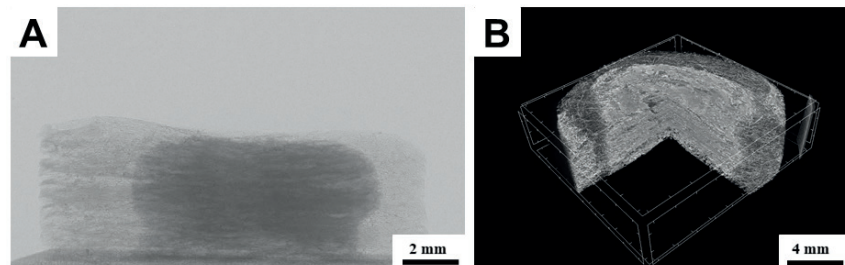
on internal proliferation and cell viability, as confirmed by the analysis of the number of dead and living cells.



**Figure 10.** Cell proliferation rate described by cell number on 1 mm<sup>2</sup>—comparison of the effect of internal bioprinting of selected bioink and scaffold without bioink on the viability of human osteoblasts (mean value  $\pm$  standard deviation,  $n = 10$ ). Statistically significant difference in the significance level: \*\*  $p < 0.0046$  (ANOVA, post-hoc Tuckey). The top section shows the number of cells per mm<sup>2</sup> on the surface. The bottom part shows the number of cells per mm<sup>2</sup> into the structure. C—Hydrogel with incorporated collagen, SC—scaffold with conventionally seeded cells, Dead—Number of dead cells.

A numerical tomography method was used to visualize the distribution of hydrogel by the scaffold structure. From the results, it is evident that in the scanning characteristics mentioned in the methodology, the hydrogel component is contrasting and well-distinguishable (Figure 11). It can be seen that the hydrogel printed inside the structure penetrated the scaffold evenly and without any major inhomogeneities. The distribution copies the shape of the scaffold and it can be assumed that gravitation has no noticeable effect on the distribu-

tion. In the CT image in part B, there are light segments resembling hydrogel, but they are only imaginary phantoms. All employed hydrogels were tested, and no greater difference in morphology of their distribution was observed. It can be said that the low-viscosity hydrogels are suitable for printing into the inside structure composed of micro/nanofibres before crosslinking.



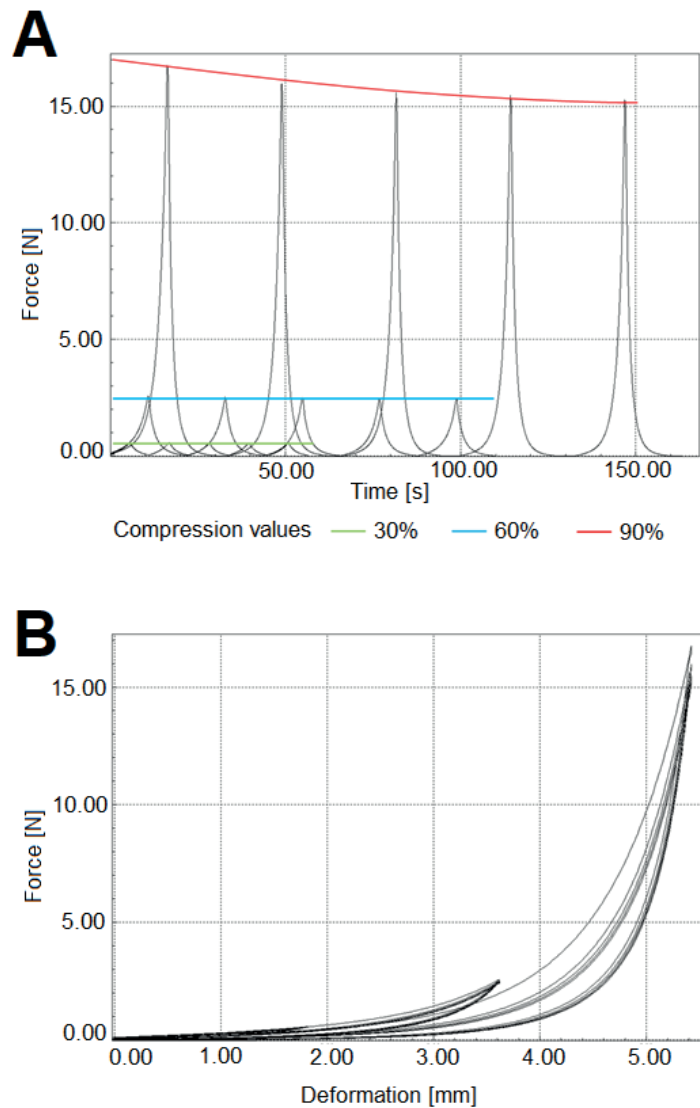
**Figure 11.** Computed tomography images visualizing the distribution of hydrogel within a scaffold structure. (A)—side view of the sample; X-ray scan. (B)—3D sample screening.

After critical evaluation of the functionality of the combination of bioprinting hydrogels with 3D micro/nanofibrous scaffolds, it can be concluded that it brings some advantages as well as disadvantages.

The advantages certainly include very good sample handling, where the 3D micro/nanofibrous scaffold is a compact carrier of the hydrogel contained within the structure. A 3D scaffold can be produced as needed in different shapes and sizes. It is also possible to control the density of the fibrous structure and thus significantly adapt the resulting properties of the composite. In the case of PCL, the fibrous structure lends the system a long term degradation component compared to the hydrogel itself. The 3D fibrous scaffold provides the hydrogel system with very good mechanical properties—the sample module is 0.8 MPa and the deflection limit at 60% cyclic compression. The values of the compression modulus and the limited reversible-cyclic deformation was carried out on a two-column universal dynamometer-M2.050 (LaborTech, Czech Republic) with a nominal load capacity of 5 kN. A compression element platform with a diameter of 30 mm and strain gauge with a nominal load of 50 N was used. The compression velocity was 20 mm/min. Five cycles at sample compression values (Discs of 15 mm diameter and 6 mm width) of 30, 60, and 90% were performed. Figure 12 shows graphs of individual measurements.

However, there are some disadvantages too. They include a limited choice of crosslinking principles of hydrogel with respect to the structure of the 3D scaffold, where the use of additional crosslinking principles, such as the supply of energy (e.g., UV) or additional crosslinking with solutions etc., is inappropriate. Furthermore, there is a lower homogeneity of the composite compared to the hydrogel systems themselves and a smaller degree of homogeneity of cell agglomeration compared to hydrogels alone. This results in greater scattering of the results of biological testing. Another undisputed disadvantage is the limitation of biological testing options, especially the limited quality visualization in comparison with transparent hydrogels. It is also problematic to perform “Live or Dead” tests.

The findings of this research will make it possible for further research to carry out more efficient seeding of more extensive fiber scaffolds, as well as scaffolds, which are more complicated in shape. It might be possible to print structured patterns into a 3D fiber structure or patterns of two or more different cell lines or bioinks.



**Figure 12.** Measurement of cyclic deformation. (A) The testing of reversible cyclic deformations of PCL scaffolds at sample compression values 30, 60, and 90%. (B) The deformation curves of cyclic deformations testing at sample compression values of 30, 60, and 90%.

#### 4. Conclusions

The experiments served to prove the functionality of a combination of bioprinting technology and 3D fiber scaffolds fabricated from a biodegradable polymer. The scaffolds demonstrated a high level of affinity for the selected bioinks. This combination provided a high level of biocompatibility and evinced an enhanced rate of live cells immediately following seeding, i.e., a beneficial impact on the rate of cell proliferation and confluent growth compared to conventionally-seeded scaffolds. The results thus indicate that a hyaluronan hydrogel with incorporated collagen is suitable for the bioprinting of human osteoblasts within the structure of the scaffold considered in this study. The combination of the selected 3D fiber scaffold and the tested technology appears to be promising in terms of its use in the field of bone regenerative medicine.

**Author Contributions:** Conceptualization, J.E. and R.J.; methodology, J.E. and R.J.; validation, J.E. and T.K.; investigation, J.E., R.J., M.K. and T.K.; writing—review and editing, J.E., R.J., T.K., M.K. and J.C.; supervision, J.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, the European Union via European Structural and Investment Funds as part of the Research, Development and Education Operational Programme-Hybrid Materials for Hierarchical Structures project (Hyhi), grant number reg. no. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000843 and a Specific University Research Grant project (reg. no. 21203) awarded by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic in the year 2017.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Caddeo, S.; Boffito, M.; Sartori, S. Tissue Engineering Approaches in the Design of Healthy and Pathological In Vitro Tissue Models. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2017**, *5*, 40. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Jirkovec, R.; Holec, P.; Hauzerova, S.; Samkova, A.; Kalous, T.; Chvojka, J. Preparation of a Composite Scaffold from Polycaprolactone and Hydroxyapatite Particles by Means of Alternating Current Electrospinning. *ACS Omega* **2021**, *6*, 9234–9242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Khorshidi, S.; Karkhaneh, A. Hydrogel/fiber conductive scaffold for bone tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2017**, *106*, 718–724. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Catros, S.; Guillotin, B.; Bačáková, M.; Fricain, J.-C.; Guillemot, F. Effect of laser energy, substrate film thickness and bioink viscosity on viability of endothelial cells printed by Laser-Assisted Bioprinting. *Appl. Surf. Sci.* **2011**, *257*, 5142–5147. [[CrossRef](#)]
- Rider, P.; Kačarević, P.Z.; Alkildani, S.; Retnasingh, S.; Barbeck, M. Bioprinting of tissue engineering scaffolds. *J. Tissue Eng.* **2018**, *9*. [[CrossRef](#)]
- Mironov, V.; Visconti, R.P.; Kasyanov, V.; Forgacs, G.; Drake, C.J.; Markwald, R.R. Organ printing: Tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials* **2009**, *30*, 2164–2174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Corona, B.T.; Ward, C.L.; Harrison, B.S.; Christ, G.J. Regenerative medicine: Basic concepts, current status, and future applications. *J. Investig. Med.* **2010**, *58*, 849–858. [[CrossRef](#)]
- Murphy, S.V.; Atala, A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 773–785. [[CrossRef](#)]
- Jakab, K.; Norotte, C.; Marga, F.; Murphy, K.; Vunjak-Novakovic, G.; Forgacs, G. Tissue engineering by self-assembly and bio-printing of living cells. *Biofabrication* **2010**, *2*, 022001. [[CrossRef](#)]
- Murphy, S.V.; Skardal, A.; Atala, A. Evaluation of hydrogels for bio-printing applications. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2013**, *101*, 272–284. [[CrossRef](#)]
- Peppas, N.A.; Hilt, J.Z.; Khademhosseini, A.; Langer, R. Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology. *Adv. Mater.* **2006**, *18*, 1345–1360. [[CrossRef](#)]
- Jun, I.; Han, H.-S.; Edwards, J.R.; Jeon, H. Electrospun Fibrous Scaffolds for Tissue Engineering: Viewpoints on Architecture and Fabrication. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Lukáš, D.; Sarkar, A.; Martinová, L.; Vodsed'álková, K.; Lubasová, D.; Chaloupek, J.; Pokorný, P.; Mikeš, P.; Chvojka, J.; Komárek, M. Physical principles of electrospinning (Electrospinning as a nano-scale technology of the twenty-first century). *Text. Prog.* **2009**, *41*, 59–140. [[CrossRef](#)]
- Huang, Z.-M.; Zhang, Y.-Z.; Kotaki, M.; Ramakrishna, S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos. Sci. Technol.* **2003**, *63*, 2223–2253. [[CrossRef](#)]
- Guceri, S.; Gogotsi, Y.G.; Kuznetsov, V. *Nanoengineered Nanofibrous Materials*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, The Netherlands, 2003; pp. 97–106. ISBN 1-4020-2549-1.
- Cato, T.L.; Khan, Y. Polymer/Calcium Phosphate Scaffolds for Bone Tissue Engineering. In *Scaffold in Tissue Engineering*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2006; pp. 253–282. ISBN 1-57444-521-9.
- Erben, J.; Pilarova, K.; Sanetnik, F.; Chvojka, J.; Jencova, V.; Blazkova, L.; Havlicek, J.; Novak, O.; Mikes, P.; Prosecka, E.; et al. The combination of meltblown and electrospinning for bone tissue engineering. *Mater. Lett.* **2015**, *143*, 172–176. [[CrossRef](#)]
- Erben, J.; Jencova, V.; Chvojka, J.; Blazkova, L.; Strnadova, K.; Modrak, M.; Kostakova, E.K. The combination of meltblown technology and electrospinning—The influence of the ratio of micro and nanofibers on cell viability. *Mater. Lett.* **2016**, *173*, 153–157. [[CrossRef](#)]
- Russell, S.J. *Handbook of Nonwovens*; Woodhead Publishing Limited: Boca Raton, FL, USA; CRC Press LLC: Boca Raton, FL, USA, 2007; pp. 172–185. ISBN 978-1-185573-603-0.

20. Gutarowska, B.; Michalski, A. Antimicrobial activity of filtrating meltblown nonwovens with addition of silver ions. *Fibres Text. East. Eur.* **2009**, *17*, 23–28.
21. Bidault, X.; Pneau, N. Impact of the granularity of a high-explosive material on its shock properties. *Res. Rev. J. Mater. Sci.* **2017**, *5*. [[CrossRef](#)]
22. Miranda, D.G.; Malmonge, S.M.; Campos, D.M.; Attik, N.G.; Grosogoeat, B.; Gritsch, K. A chitosan-hyaluronic acid hydrogel scaffold for periodontal tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* **2016**, *104*, 1691–1702. [[CrossRef](#)]
23. Martins, J. Development of a Polymeric Matrix based on Hyaluronic Acid and Dextrin Hydrogels for the Expansion of Undifferentiated Mesenchymal Stem Cells. Master Thesis, Faculty of Engineering of University of Porto, Porto, Portugal, 2014.
24. Hollister, S.J. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 518–524. [[CrossRef](#)]
25. Wei, G.; Ma, P.X. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2004**, *25*, 4749–4757. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Fransiska, S.; Ho, M.H.; Li, C.H.; Shih, J.L.; Hsiao, S.W.; Thien, D.V.H. To enhance protein production from osteoblasts by using micro-patterned surfaces. *Biochem. Eng. J.* **2013**, *78*, 120–127. [[CrossRef](#)]
27. Harrington, S.; Williams, J.; Rawal, S.; Ramachandran, K.; Stehno-Bittel, L. Hyaluronic Acid/Collagen Hydrogel as an Alternative to Alginate for Long-Term Immunoprotected Islet Transplantation. *Tissue Eng. Part A* **2017**, *23*, 1088–1099. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

## **Příloha 6**





## A comparison study of nanofiber, microfiber, and new composite nano/microfiber polymers used as sorbents for on-line solid phase extraction in chromatography system



Martina Háková<sup>a</sup>, Lucie Chocholoušová Havlíková<sup>a</sup>, Jirí Chvojka<sup>b</sup>, Jakub Erben<sup>c</sup>, Petr Solich<sup>a</sup>, František Švec<sup>a</sup>, Dalibor Šatínský<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Charles University, Faculty of Pharmacy, The Department of Analytical Chemistry, Al. Heyrovského 1203, 500 05, Hradec Králové, Czech Republic

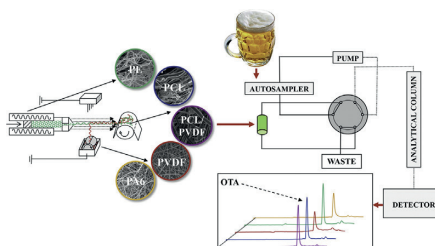
<sup>b</sup> The Technical University of Liberec, The Institute for Nanomaterials, Advanced Technology, and Innovation, Studentská 1402/2, 46001, Liberec, Czech Republic

<sup>c</sup> Technical University of Liberec, Faculty of Textile Engineering, Department of Nonwovens and Nanofibrous Materials, Studentská 2, 461 17, Liberec, Czech Republic

### HIGHLIGHTS

- Five different nanofibrous and composite nano/microfibrous polymers were tested.
- Promising composite sorbent for on-line extraction was created by melt-blown and electrospun technology.
- Composite polymer consisted of polycaprolactone microfibers/polyvinylidene difluoride nanofibers.
- It showed extremely good stability in organic solvents and under the high-backpressure.
- The new nanofibrous extraction was tested for ochratoxin A in beer for the first time.

### GRAPHICAL ABSTRACT



### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 8 February 2018

Received in revised form

12 April 2018

Accepted 14 April 2018

Available online 21 April 2018

#### Keywords:

Polyamide 6

Polyvinylidene difluoride

Polycaprolactone

Polyethylene nanofibers

On-line extraction

Ochratoxin A

### ABSTRACT

Three different approaches has been used to obtain nano/micro fibers and their diversity and extraction properties were examined. The effect of their structure on stability in an ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) system during on-line SPE procedure was monitored. Five types of various nano/micro fiber polymers were used as sorbents: polyamide 6 nanofibers, polyvinylidene difluoride nanofibers, polyethylene microfibers, and two new polycaprolactone microfiber/nanofiber and polycaprolactone microfibers/polyvinylidene difluoride nanofibers composite polymers. The fiber polymers were filled in a cartridge directly connected to the UHPLC system and tested. For each polymer, the optimal conditions of the on-line extraction were found and potential applicability on real samples was tested. The determination of ochratoxin A (OTA) in beer matrix was chosen as a case study. Relevant factors such as the mechanical and chemical stability of the nano/microfibers, filling the cartridges, fiber reusability and the possibility and the repeatability of all processes were involved in the proposed study. A new nano/micro composite sorbent consisting of polycaprolactone microfibers/polyvinylidene difluoride nanofibers was chosen as the most suitable sorbent for the on-line extraction of OTA from a beer matrix. The tested validation parameters had the value of intra-day precision lower than 1.48%,

\* Corresponding author.

E-mail address: [satinsky@faf.cuni.cz](mailto:satinsky@faf.cuni.cz) (D. Šatínský).

linearity in the range from 0.5 to 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  with  $r^2 \geq 0.9999$  for standard and matrix calibration curve, and recovery in the range 99.1–103.9% at five concentration levels. Long-term precision evaluated for 31 analyses over the period of three months did not exceed 2.9% RSD. It confirmed the column reusability and perfect stability of nano/micro composite sorbent in the presence of organic solvents and after repeated injection of a complex beer matrix.

© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

The fabrication, application, and possible utilization of nanofibers in different areas of advanced technologies and everyday use have been hot topics in recent years. Nanofibers possess large surface area resulting from their small size. The surface area of nanofiber polymers can be controlled and their properties can be changed in a wide range of ways. Nanofiber polymers can have different physicochemical properties and can contribute to different interactions [1]. All these facts make nanofibers attractive for researchers in different areas. For example, in analytical chemistry, nanofibers are tested as perspective sorbents for solid phase extraction (SPE) [2]. Nowadays, nanofibrous SPE is a promising, new, and innovative approach using polymer fibers as sorbents with suitable physicochemical properties and large sorption capacity that requires small volumes of samples and solvents. The large surface area enhances the sorption capacity and reaction kinetics with the target analytes. Therefore, polymer nanofibers exhibit a good potential in this field due to their versatility, stability, and reusability.

Various approaches have been tested by different research groups over the past decade and the most suitable ways and arrangements of using nanofibers as sorbents for SPE have been developed [3–6]. However, the use of nanofibers as sorbents in different SPE manifolds also presents certain problems. Several factors affect the extraction properties of the nanofibers and all of them have to be considered when developing an extraction procedure.

The type and chemistry of the polymer are the first aspects which have to be contemplated. A wide range of polymers covering a large variety of chemistries are available. The most frequently used polymers are polyamide, polystyrene, and polyetherimide [7–13]. The relative ease with which these polymers can be modified enables the preparation of a large range of copolymers and composite materials differing in chemistry. This variability then provides many yet-unexplored options [3,5,14–18], e.g. creation of new coated nanofibers with unique chemical characteristics.

The fabrication of nanofibers is the next important parameter. Several approaches towards fiber production have been designed. Typically, electrospinning and the melt-blown technologies are the most commonly used. Electrospinning uses a strong electrostatic field for forming the nanofibers. Due to the small diameter of these nanofibers, they are not stable, and their three-dimensional structure can collapse. That is why electrospun nanofibers are mostly used in the format of a 2D cloth (sheet). Nanofibers in this format can be conveniently used as membranes for filtration or extraction. These extraction techniques should be used only in off-line mode to avoid some problems. An on-line connection with a suitable flow analytical method such as liquid chromatography is problematic or impossible because the flat layout is not compatible with the LC system. Also, packing the sheets in the SPE cartridges for on-line coupling is less reproducible and often adds large void volume in the system.

The meltblown technology enables the production of a three-dimensional porous structure of the fibers in both nano and micro dimensions. Polymers used for the preparation of fibers using the meltblown technology typically have a lower melting temperature than the polymers used for electrospinning. The three-dimensional structure of microfibers is stable and can withstand even the high pressure applied in UHPLC. Furthermore, the porous structure provides for other advantages such as the low contribution of the cartridge filled with fibers to the overall back pressure in the on-line SPE UHPLC system.

Microfibers can be used alone as sorbents for on-line SPE-UHPLC, or they can provide a scaffold for nanofibers that are not able to create a stable three-dimensional porous structure. The combination of micro and nanofibers can create a unique composite material with sorption properties depending on the chemistry of the polymer used and on the method of fabrication. Bonding nanofibers to a microfiber scaffold created from the same type of polymer can enlarge the active surface. This increase then enhances the extraction capacity and the speed of extraction. Using a different type of polymer for preparation of the nanofibers leads to a dual chemistry composite polymer with modified extraction properties. Combining the meltblown and electrospun fibers is a way to innovate nanofibrous sorbents for solid phase extraction and successfully apply them in high-pressure systems. Only a few reports describing the preparation and use of composite polymer fibers prepared via this approach have been published [19–21].

The next important aspect that cannot be neglected is the arrangement of the nanofibers. For solid phase extraction procedures, the nanofibers can be used in the format of discs and membranes [5,8–10,16,22,23], layers covering steel wires [14,24], and filled in cartridges and pipette tips [3,17,25].

As it was mentioned, using nanofibers as sorbents for on-line solid phase extraction coupled with liquid chromatography (on-line SPE-HPLC) remains a quite challenging task. On-line connections simplifying the analysis of real samples with a minimal demand for the operator's skills, and improving the repeatability of the whole process are desirable. A handful of reports dealing with the application of the polymer nanofibers, mostly using polyamide 6, in on-line method, have been published [13,14,25,26].

Our current study concerns use of new nanofiber sorbents for on-line SPE-UHPLC. We also compare various types of polymers including microfibers, nanofibers, and composite structures, prepared using three different approaches. The effect of the structure of our fibers on extraction of real samples and their suitability for the determination of ochratoxin A (OTA) in beer was elucidated. This work also deals with some practical problems related to the development of the on-line SPE-UHPLC method such as the reproducibility of nano/microfiber packing, flow and back pressure inconsistency, the reuse of extraction column, and the long-term stability of the tested polymers. Complete method validation for on-line SPE determination of OTA in beer samples was carried out for the most suitable nanofiber sorbent.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and materials

All used sorbents and standards are summarized in the [Supplementary materials \(S1\)](#).

### 2.2. Instrumentation and software

A meltblown equipment (Laboratory equipment J&M Laboratories, USA) was used to create meltblown fibers and composite fibers. The scheme of the meltblown device is shown in [Fig. 1](#). The NS1WS500U nanospider (Elmarco, Czech Republic) was used to form the polyamide 6 and polyvinylidene difluoride nanofibers. On-line SPE UHPLC was carried out using the Nexera X2 UHPLC system (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) equipped with a CBM-20 A communication module, a LC-30AD solvent delivery systems, a DGU-20 A5R degassing unit, a SIL-30 A S autosampler, a CTO-20 A C column oven with an FCV-12 A H high pressure six-port switching valve, as well as SPD-M30A DAD and an RF-10AXL detectors. A VEGA3 scanning electron microscope (Tescan) was used for the structural analysis of the fibers.

### 2.3. Preparation of standard solutions and samples

A standard stock solution of ochratoxin A with a concentration of  $5 \text{ mg L}^{-1}$  was prepared by dissolving OTA in methanol. The solution was stored at  $4^\circ\text{C}$  in dark. A working standard solution with a concentration of  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  for method development was prepared by diluting the standard stock solution 1000 times with water on the day of measurement. The beer sample was filtered through a  $0.22 \mu\text{m}$  PTFE filter and injected directly into the SPE-UHPLC system. The injection volume was  $50 \mu\text{L}$  (the maximum possible volume of the injection loop). Each injection was done in triplicate. The extraction efficiency and suitability of the sorbents for the extraction of OTA in beer was verified using two spiked reference samples ( $5 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) of OTA in beer diluted with water in ratio 1:1. All beer samples were stored in a freezer to ensure the stability. The undiluted filtered beer samples (pilsner type available on the local market) were used for the method validation.

### 2.4. Preparation of nanofibers and microfibers

#### 2.4.1. Polyamide 6 nanofibers

Polyamide 6 (PA6) was prepared as a nanofibrous mat (sheet) using the electrospinning technique. PA6 was dissolved in a solution composed of a mixture of formic acid and acetic acid at a 1:2 ratio (v/v). The final concentration of polyamide 6 in the solution was 12 wt%. Nanospider device was used for the needleless electrospinning procedure. The voltages  $+55.5 \text{ kV}$  and  $-24.5 \text{ kV}$  were

applied on the active electrode (emitter) and the collecting electrode (collector), respectively. The distance between the electrodes was 198 mm. The electrospinning process was carried out at a humidity of 32% and a temperature of  $22.1^\circ\text{C}$ . An antistatic spunbond nonwoven (Pegas Nonwovens, Czech Republic), which moved along the collecting electrode at a constant speed of  $90 \text{ mm min}^{-1}$ , was used to collect the formed nanofibers. These nanofibers had a surface weight of  $0.75 \text{ g m}^{-2}$ .

#### 2.4.2. Polyvinylidene fluoride nanofibers

Polyvinylidene fluoride (PVDF) was dissolved in an 8:2 v/v mixture of dimethylformamide and acetone. The final concentration of PVDF was 16 wt%. A needleless electrospinning procedure was performed using a Nanospider. The applied voltages were  $+35 \text{ kV}$  and  $-15 \text{ kV}$  on the emitter and collector, respectively, and the distance between the electrodes 200 mm. The electrospinning process was carried out at a humidity of 32% and a temperature of  $22.1^\circ\text{C}$ . An antistatic spunbond nonwoven was used to collect the nanofibers. It moved along the collecting electrode at a constant speed of  $20 \text{ mm min}^{-1}$ . The obtained nanofibers had a surface weight of  $4.5 \text{ g m}^{-2}$ .

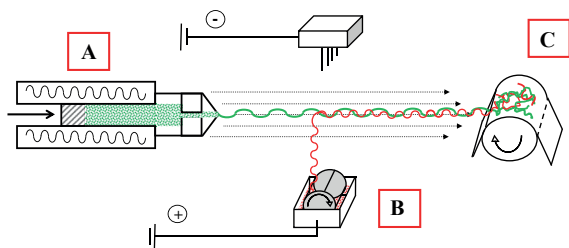
#### 2.4.3. Polyethylene microfibers

The meltblown technology was used to prepare polyethylene (PE) microfibers. This process includes extrusion of forced melted polymer through a spinning head with fine spinning orifices (gaps) that form the fibers in the hot airstream. The polymer was heated in the extruder at the following stepwise temperature gradients: 95, 130, 175, 210,  $290^\circ\text{C}$ . The volumetric flow rate of the melted polymer was set at  $200 \text{ g h}^{-1}$  and it was extruded at a screw speed of 10 rpm. The spinning head used to extrude the melt had 65 gaps each 0.4 mm in diameter, and the width of the jet was 75 mm. The laminar airstream with an air velocity of  $20 \text{ m s}^{-1}$  was used to stretch the fibers. The distance between the jet and the stretching was 300 mm. The fibers were collected by a collector at a distance of 1100 mm from the jet. The air temperature during the process was  $23^\circ\text{C}$  and the humidity 45%.

#### 2.4.4. Polycaprolactone microfiber and nanofiber composite

The set-up for the creation of polycaprolactone (PCL) nanofibers bonded to the PCL microfiber scaffold comprised a meltblown equipment, an electrospinning device including a roller spinner and a countervailing pressure cylinder, and computer-controlled pumps. The meltblown extruder screw rotated at 3–15 rpm for 30–120 min depending on the ratio of micro- and nanofibers in the sample. 100 g polymer per sample was extruded each time. The fibers were stretched in an air stream at a distance of 200 mm from the meltblown. The air velocity was  $20 \text{ m s}^{-1}$ . The meltblown die length was 100 mm ([Fig. 1A](#)).

A PCL solution in a 9:1 v/v mixture of chloroform and ethanol used for the electrospinning process had a concentration of 16 wt%. The diameter of the roller was 30 mm and its length 150 mm. The diameter of the strings was 0.2 mm. The spin rate of the roller was 12 spins per min. The applied voltages were  $+35 \text{ kV}$  on the stringed roller and  $-14 \text{ kV}$  on the opposite electrode. The opposite electrode was composed of four apexes 50 mm in length and 4 mm in diameter at a distance of 30 mm ([Fig. 1B](#)). Nanofibers in contact with the melted microfibers in the air stream formed a stable composite material, which was then transferred to a collector covered with an antistatic spunbond nonwoven ([Fig. 1C](#)). The spinning was carried out at a temperature of  $23^\circ\text{C}$  and a humidity of 45%.



**Fig. 1.** The scheme of the device combining the meltblown and electrospinning procedures.

#### 2.4.5. Polycaprolactone microfiber and polyvinylidene difluoride nanofiber composite

A combination of two different technologies (meltblown and electrospinning) was used to create the PCL and PVDF mixture (Fig. 1). The PCL polymer was heated in an extruder at stepwise temperature gradients: 80, 121, 149, 171 °C at an extruder screw speed of 7.5 rpm. The volumetric flow rate of the melt was 100 g h<sup>-1</sup>. PCL microfibers were stretched by a hot laminar airstream at an air velocity of 20 m s<sup>-1</sup> and a distance of 300 mm from the spinning head that was 75 mm wide and contained 65 gaps with a diameter of 0.4 mm.

The final concentration of PVDF in the 8:2 w/w dimethylacetamide/acetone solution used for electrospinning was 20% w/w. A special stringed roller was designed for the combination of the meltblown and electrospinning technologies. The diameter of the roller was 30 mm and its length 150 mm. The diameter of the strings was 0.2 mm. The spin rate of the roller was set at 12 spins per min. The applied voltages were +35 kV on the stringed roller and -15 kV on the opposite electrode. The opposite electrode was composed of four apexes each 50 mm long and 4 mm in diameter at a distance of 30 mm. The distance between the collector and the apexes was 80 mm. The electrospinning was carried out at a temperature of 23 °C and humidity of 45%.

#### 2.5. Preparation of the extraction pre-columns

We have observed in our preliminary testing that the cylindrical arrangement was the most suitable format for using nanofibers in the on-line SPE-UHPLC system. The extraction pre-columns were prepared manually by packing the weighted amount of each polymer in the empty 5 × 4.6 mm i. d. column cartridge. The cartridge was placed in a guard pre-column holder and connected to the system using UHPLC fittings. Each pre-column was washed with 100% acetonitrile for 15 min at a flow rate increasing from 0.1 to 1 mL min<sup>-1</sup> to avoid exceeding the 20 MPa pressure limit for the cartridge holder and to achieve the optimal arrangement of the nanofibers in the column. Finally, each column was washed with pure water for 5 min at a flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup>.

Five types of polymers featuring various formats of nanofibers and microfibers were tested. Polyamide 6 and polyvinylidene fluoride were used as a nanofiber sheet, polyethylene was tested as cotton-like microfibers and two composite materials based on polycaprolactone microfibers were tested as well. The first composite was PCL microfibers combined with nanofibers while the second composite was PLC with PVDF nanofibers.

#### 2.6. UHPLC column-switching analysis

An on-line SPE-UHPLC system was used for the simultaneous pre-concentration and determination of ochratoxin A in beer. SPE was carried out using nanofibrous pre-columns. A different washing mobile phase was used for each sorbent at a flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup>. Chromatographic separations were carried out using a 100 × 4.6 mm i. d., 2.7 μm particle size Ascentis Express Phenyl-Hexyl fused-core analytical column from Supelco (Sigma-Aldrich, Germany) using a gradient of the mobile phase consisting of 0.5% aqueous acetic acid with a pH of 2.8 (solvent A) and acetonitrile (solvent B) at a flow rate of 1.0 mL min<sup>-1</sup> and at two different temperatures of 20 °C (for PLC and PCL/PVDF) and 35 °C (for the other sorbents) (Table 1).

50 μL of sample was injected in the extracting pre-column. While Ochratoxin A was pre-concentrated on the pre-column, the analytical column was equilibrated to the initial conditions of the gradient (20% B in A). The valve switching time was set at 1.0 min since the extraction step lasted for 1 min. The gradient program

started after the valve switched. Isocratic elution with the mobile phase containing 20% B in A was used for 2 min. After that the percentage of B in A increased to 45% within 1 min and then to 100% B in 2 min. The mobile phase consisting of 100% B was held for 1 min. The 1 min long equilibration of the analytical column back to the initial conditions followed. The detection of OTA was achieved using a fluorometric detector at an excitation wavelength of 333 nm and an emission wavelength of 460 nm. The total run time was 8 min.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Stability of the polymers in solvents

The stability was tested for 24 h at a laboratory temperature of 25 °C and after that for 15 min in an ultrasonic bath at a temperature of 35 °C. All tested nanofibers were weighted and placed in various solvents including water, 0.5% acetic acid, methanol and acetonitrile. After the tested time period, the fibers were removed from the solvent, dried, and weighted again. All changes and/or dissolution were monitored. All our polymers were stable in all solvents at the temperature 25 and 35 °C except for polycaprolactone, which was not stable in acetonitrile at the higher temperature. As a result, the temperature 20 °C was used while working with both composite materials PCL and PVDF/PCL.

#### 3.2. Optimization of the on-line SPE-UHPLC extraction procedure

Each polymer was tested in the same way, only PCL and the mixture of PVDF/PCL required lower column oven temperature due to their instability in acetonitrile at the higher temperature.

The first tested parameter was the composition of the washing mobile phase used during the washing step. The mixtures of organic solvents, i.e. methanol and acetonitrile, with 0.5% aqueous acetic acid were tested as the washing mobile phase. The peak area of OTA at 0% organic solvent was considered 100%. The percentage change in the peak area of OTA was then evaluated. Bar charts shown in Fig. 2 are used for the graphical representation of the results. Changes in the extraction efficiency of the nanofiber polymers are presented in Fig. 2a, while results for polyethylene microfibers and composite materials are shown in Fig. 2b and c. The influence of the content of organic modifier on extraction efficiency is expressed as the percentage changes in the peak areas of OTA. The composition of the washing mobile phase was then selected based on the results of the optimization experiments. Two important factors were taken into account: (i) the minimal loss of analyte represented with a decrease in the peak area of less than 5%, and (ii) the composition of the washing mobile phase containing the maximum percentage of organic solvent for the elution of possible impurities in the sample already during the washing/pre-concentration step.

The second tested parameter was the optimal duration of the washing step. That parameter depended on the time needed for the valve switch and it was tested in the range from 1 to 7 min. Longer times were undesirable because of the extended time of the analysis. The final conditions of the on-line SPE-UHPLC procedure for the determination of OTA in beer are summarized in Table 1.

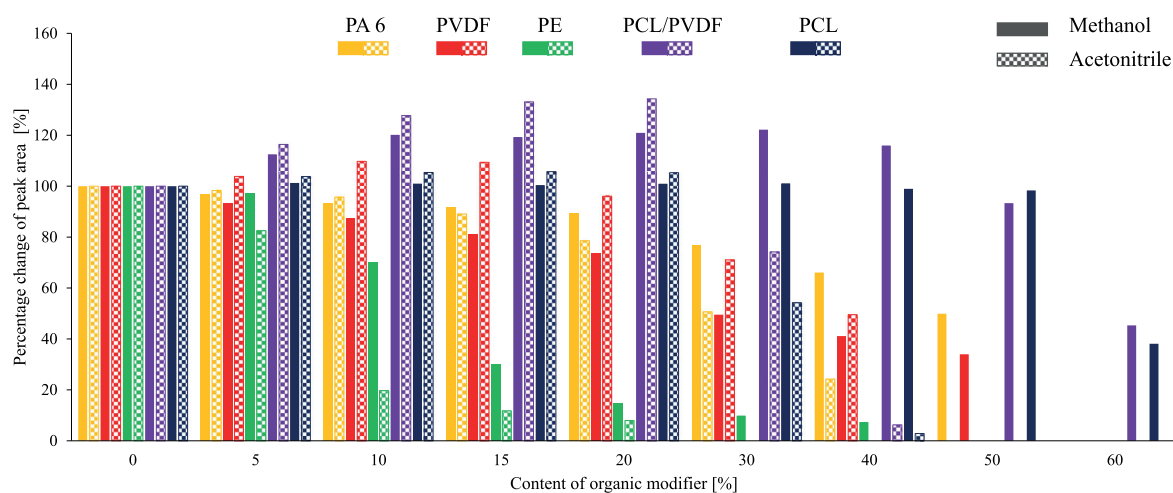
##### 3.2.1. Polyamide 6 nanofibers

These nanofibers were tested as a sheet obtained from the electrospinning device. About 24 mg of nanofibers were packed in an empty column cartridge. The effect of packing on extraction efficiency was verified during our previous work [26]. The preparation and packing of the extraction pre-column was the crucial step of the entire procedure. It was important to obtain a fully filled

**Table 1**

Conditions of on-line SPE-UHPLC for the determination of ochratoxin A in beer samples.

Sorbent	Temperature of analysis	Washing mobile phase composition	Duration of the washing step
PA6 nanofibers	35 °C	0.5% acetic acid: acetonitrile 95:05 (v/v)	1 min
PVDF nanofibers	35 °C	0.5% acetic acid: acetonitrile 75:15 (v/v)	1 min
PE microfibers	35 °C	0.5% acetic acid: methanol 95:05 (v/v)	1 min
PCL/PCL composite fibers	20 °C	0.5% acetic acid: acetonitrile 80:20 (v/v)	1 min
PCL/PVDF composite fibers	20 °C	0.5% acetic acid: acetonitrile 80:20 (v/v)	1 min

**Fig. 2.** Bar charts of the effect of organic modifier in the washing mobile phase on the extraction efficiency of OTA; tested on: (A) nanofibers, (B) microfibers, and (C) composite fibers.

cartridge with minimal void volumes to ensure good contact of the sample in the mobile phase with nanofibers. However, the cartridge filling was limited by the increasing back pressure and system leaking when excessive quantity of nanofiber mats was packed. In addition, we observed that PA 6 nanofibers negatively affected the peak symmetry of OTA increasing the value up to 1.8. It was caused by non-homogenous filling of sheet nanofibers material in extraction column and by worse wettability of PA 6 surface.

The retention of ochratoxin A decreased with the increasing percentage of organic solvent, which is typical for extraction procedures using reversed phase sorbents. Fig. 2a shows that the optimal washing mobile phase contained 5% methanol and 5% acetonitrile with which a 3 and 2% loss of OTA was observed, respectively. The duration of the washing step was tested for both these washing mobile phases. Extending the washing time from one to 2 min led to a higher analyte loss. The decrease in the peak area of OTA was 7% and 8% while using washing mobile phase containing 5% methanol and 5% acetonitrile, respectively. Therefore the duration of washing step was set to 1 min.

### 3.2.2. Polyvinylidene fluoride nanofibers

PVDF nanofibers were tested in the same format as polyamide 6 and similar problems with packing, system pressure and peak symmetry were observed. This phenomenon was obvious in all used washing mobile phases and it could be explained by the inappropriate form and non-homogenous packing of the nanofibers in the column bed. Furthermore, we also discovered problems with reproducibility of injection. Thus, 66 mg nanofibers were packed into the cartridge and tested. This weight provided repeatable values of peak areas of OTA during repeated injections. A peak

tailing of OTA with the tailing factor of about 1.6 was determined.

Use of methanol as the organic solvent in the washing mobile phase led to a decrease in the peak areas which extent depended on the content of methanol. The analyte loss was about 7% measured from the peak area when only 5% methanol was used. Acetonitrile exhibited a more interesting elution profile. With increasing content of acetonitrile in the mobile phase, the peak area of OTA increased. This trend was observed up to 15% acetonitrile represented by a 9% increase in peak area compared to that observed for 0.5% aqueous acetic acid with no organic modifier. This phenomenon can be explained by the strong retention of ochratoxin A and insufficient elution from the PVDF nanofibers when the inappropriately weak composition of the mobile phase was used. Thus, 15% acetonitrile was used as the optimal content of organic modifier in the washing mobile phase for the following experiments. The time of the valve switch was next tested parameter. Extending the washing step from one to 2 min caused a 10% decrease in the peak area of OTA. In addition, extending the washing time resulted in more losses of the analyte.

### 3.2.3. Polyethylene microfibers

Polyethylene microfibers were tested in the form of a cotton-like material obtained by the meltblown technology. About 43 mg of the sorbent was fully filled in the cartridge. These microfibers enabled to achieve repeatable packing and no significant effect of the sorbent on peak symmetry characterized with a tailing factor of 1.2 was observed.

The retention of OTA was affected by an increased percentage of organic phase in the washing mobile phase. A larger decrease in the peak area was observed when more organic modifier was used.

Acetonitrile exhibited a more significant effect. More than 5% acetonitrile in the washing mobile phase caused a decrease in the peak area of nearly 18%. On the other hand, 5% methanol led to a decrease in OTA peak area of only 3% (Fig. 2b). Therefore, the washing mobile phase used contained 5% methanol.

### 3.2.4. Polycaprolactone microfiber and nanofiber composite

The combination of meltblown and electrospinning technologies produced a novel cotton-like fibrous material, which had excellent pressure resistance and minimal void volume. This composite enabled simple and non-problematic packing in the cartridge and the peak shape of OTA characterized by a tailing factor of 1.2 was not again affected by the sorbent. The cartridge accommodated 53 mg sorbent.

Surprisingly, the retention of OTA on the sorbent did not change up to 30% methanol in the washing mobile phase. The peak area started to decrease only at a higher content of methanol. When acetonitrile was used as the organic modifier, the analyte loss was detected once the percentage of acetonitrile exceeded 20%. A small 5% increase in the peak area was observed in the acetonitrile percentage range from 5 to 20% in the washing mobile phase (Fig. 2c). Two washing mobile phases comprising a 20:80 v/v mixture acetonitrile and 0.5% aqueous acetic acid, and a 30:70 v/v mixture of methanol and 0.5% acetic acid were used for testing the duration of the washing step. In contrast to methanol, a significant of the time of the valve switch and the percentage change in the peak area was observed with acetonitrile. For example, 20% acetonitrile in the washing mobile phase caused a peak area decrease of about 10% after a short 3 min washing as opposed to effect of 20% methanol in the washing mobile phase that produced only a 10% decrease after long 7 min washing.

### 3.2.5. Polycaprolactone microfiber - polyvinylidene fluoride nanofiber composite

The last tested sorbent was a composite polymer comprising PCL microfibers and PVDF nanofibers. About 44–45 mg were packed in the cartridge. A stronger retention of OTA by the PCL/PVDF sorbent compared to that by the PCL composite was observed. Increase in the proportion of the organic modifier increased the peak area of OTA. This was explained by the enhanced binding of OTA to the sorbent due to the lipophilic characteristics of PVDF. An increase in the peak area was observed while using the acetic acid mobile phase with acetonitrile and methanol in a concentration range of 5–20% and 5–40%, respectively. After exceeding these percentages, loss of the analyte was again observed (Fig. 2c). Cross contamination between the sample injections was detected when methanol was used as the organic modifier. For this reason, 20% acetonitrile in 0.5% aqueous acetic acid was selected as the most suitable washing mobile phase. The complete elution of OTA was obtained using this mobile phase and no cross-contamination of the blank sample in the subsequent analysis was observed.

The optimal conditions of on-line SPE-UHPLC determination of ochratoxin A in beer matrix are summarized in Table 1 for each

sorbent. The comparison of relative extraction efficiency, peak symmetry and repeatability of extraction step for each tested nanofibrous sorbent are evaluated in Table 2. The highest peak area, perfect peak symmetry and repeatability was obtained when the composite micro/nano PCL/PVDF material for extraction was used.

### 3.3. Re-using and re-packing of nanofibrous sorbent

The possibility to re-use and re-pack polymers was also tested. More than 100 analyses including optimization of the on-line extraction procedure and application of real samples were carried out with each polymer. After that, the fibers were removed from the cartridge and dried. The dried fibers were reinserted in the cartridge and the extraction properties were tested and evaluated again as a percentage change in the peak area of the standard solution of OTA. The peak areas of OTA found during the first testing of each polymer were considered to be 100% and the peak area after the drying and re-packing process was related to this value. PVDF nanofibers could not be re-used because of problems with leaking and exceeding the pressure limits. A decrease in the extraction to 88% was observed for PA6 nanofibers. However, the extraction properties of PCL, PE, and PCL/PVDF fibers remained unchanged as shown in Table 2. These results demonstrate that all the fibers instead of PVDF can be reused in the on-line extraction system while keeping their original properties.

### 3.4. Scanning electron microscopy analysis

Fig. 4 presents SEM images of polymer fibers PVDF, PCL, and PCL/PVDF before and after all analyses. The nanostructure of the polyamide 6 and PE nanofibers did not change even after more than 300 and 100 analyses, respectively, and only minor mechanical deformations were observed in the former. In contrast, the PVDF nanofibers were deformed completely at high pressure. We also observed significant swelling of PVDF nanofibers after multiple extraction procedure with organic solvents (Fig. 4b). The composite materials were also stable after testing. The PCL nano/micro composite remained stable after more than 130 analyses (Fig. 3d).

The resistance of PCL/PVDF was tested in two steps. First after 150 analyses and second after repacking and further use. The structure remained unchanged when checked in the first step (Fig. 4f) while changes were observed after almost 230 analyses and after the repacking.

However, the extraction properties during three months of testing did not change as demonstrated with the RSD value for peak area that was less than 3% ( $n = 31$ ). These results confirmed the excellent properties of the new PCL/PVDF composite material in comparison with the often-used polyamide 6 nanofibers. Due to a new 3D structure of the PCL/PVDF scaffold, the nanofibers were protected against the high pressure in chromatography systems. Therefore, the PCL/PVDF composite material was used for validation of the method and the on-line extraction of OTA from beer.

**Table 2**  
Comparison of nano/microfibrous polymers for on-line SPE/UHPLC application.

Type of polymer	Technology	Weight of sorbent (mg)	Relative efficiency (%)	Peak symmetry	RSD (%) n = 6	Extraction efficiency after re-packing (%)
PA 6 nanofibers	electrospinning	23.66	70.54	1.8	0.81	87.65
PVDF nanofibers	electrospinning	65.62	50.35	1.6	1.00	–
PE microfibers	meltblown	43.05	94.98	1.2	0.91	99.82
PCL composite	combination	53.33	96.95	1.2	0.30	99.18
PCL/PVDF composite	combination	44.80	100.00	1.1	0.35	101.36

– not determined.

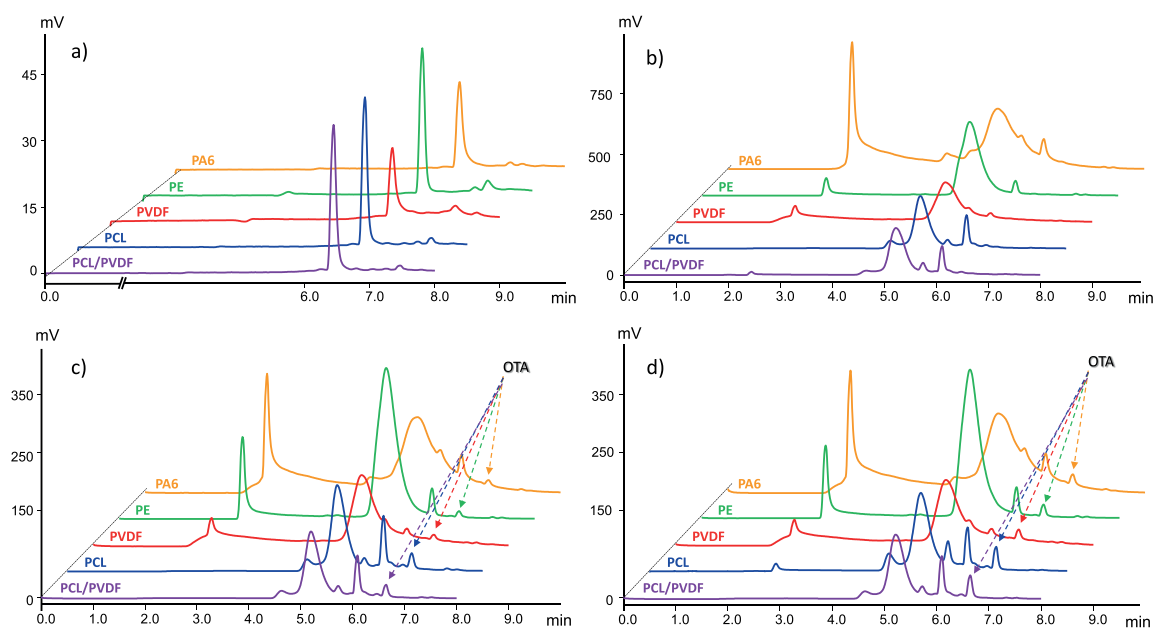


Fig. 3. Comparison of the on-line SPE-UHPLC chromatograms of 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  OTA standard solution (a), blank beer (b), spiked beer at a concentration of 2.5 (c) and 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  (d).

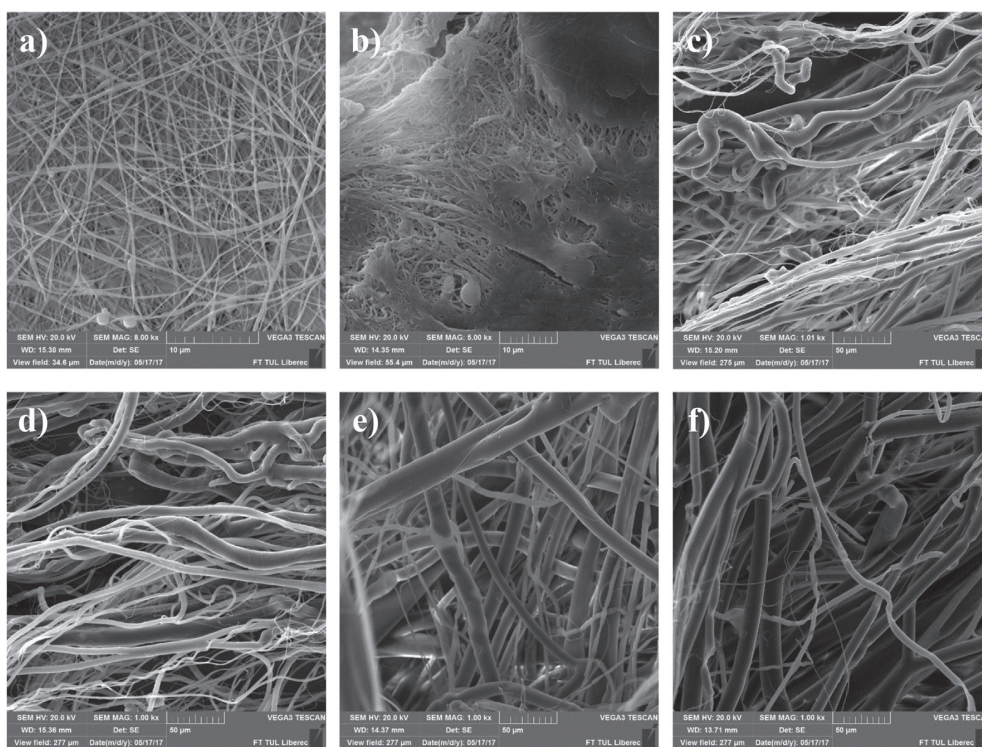


Fig. 4. SEM images of original PVDF (a), PCL (c), and PCL/PVDF (e) and PVDF (b), PCL (d), and PCL/PVDF (f) after their application.

### 3.5. Validation of the on-line SPE-UHPLC method

Validation of the on-line extraction method using the composite PCL/PVDF sorbent was carried out to demonstrate suitability of the method for determining OTA in beer. The validation parameters are summarized in Tables 3 and 4.

The repeatability of the packing with the fibers was also tested. This step was deemed crucial for the preparation of pre-columns and to verify the effect of the packing procedure on the extraction efficiency. Four different pre-columns prepared simultaneously containing similar weight of the fibers ( $45 \pm 0.5$  mg) were tested. A standard solution of OTA at a concentration of  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  was used for the evaluation of their extraction efficiency. The relative standard deviation (RSD %) of the extraction efficiencies for all tested columns was less than 0.8%. This confirms that the extraction efficiency of the PCL/PVDF composite sorbent was not affected by the packing.

The system suitability test (SST) and validation parameters including method linearity, intra- and inter-day precision, and trueness were evaluated. The standard solution of OTA at a concentration of  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  was injected six times to calculate the SST parameters. The tailing factor of OTA was 1.1 and the peak capacity was 20.44. The repeatability of injection that covered the extraction step and following separation was evaluated in terms of the relative standard deviation and was found 0.2%.

Method linearity was tested in the range from 0.5 to  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  using seven calibration points. Two types of calibration curves, i.e. standard calibration and matrix calibration, were plotted to test the effect of the matrix. Beer filtered through a PTFE filter ( $0.22 \mu\text{m}$ ) was used to dilute the standard stock solution of OTA to the required concentrations of the matrix calibration. No significant effect of the matrix was observed. The parameters of both calibration curves including slope and intercept are presented in Table 3.

The intra-day precision of the method was tested using again spiked beer samples at a concentration of  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ . A set of samples was created by diluting the standard stock solution of OTA with the filtered beer. It was prepared six times and injected twice. The value of intra-day precision was 1.48%. The inter-day reproducibility was tested for three days using the standard solution at a concentration level of  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  and the RSD value was 0.5%.

The long-term precision of the method was tested using a standard solution of ochratoxin A at a concentration of  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ . Using this standard solution, 31 analyses over the period of three months were carried out and the peak areas of OTA were evaluated. An RSD value not exceeding 2.9% confirmed the outstanding column reusability and the stability of the sorbent in the presence of organic solvents and a complex beer matrix for a long time. Also, these results corroborated re-usability of the PCL/PVDF composite polymer even in the high pressure chromatography systems.

**Table 3**  
Chromatography system suitability test (SST) and validation parameters of on-line SPE extraction using the PCL/PVDF composite.

	PCL/PVDF
Peak capacity	20.44
Repeatability of injection (RSD %)	0.2
Peak symmetry	1.1
Calibration range ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	0.5–100
Standard calibration	$y = 44400x - 8036.3$
Regression coefficient ( $r^2$ )	0.9999
Matrix calibration	$y = 43955x + 7902.3$
Regression coefficient ( $r^2$ )	0.9999
Intra-day precision (n = 6)	1.5
Inter-day precision (n = 3)	0.5
Long-term repeatability (n = 31)	2.9

**Table 4**  
Values of recovery on five concentration levels for OTA nanofibrous extraction.

Spiked ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Found ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Recovery (%)
0	<LOQ	–
2.5	2.60	103.91
5	5.09	101.73
25	25.57	102.28
50	50.10	100.20
100	99.10	99.10

The trueness of the method was tested at concentration levels of 2.5, 5, 25, 50, and  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ , and evaluated by determining the recovery of the known standard addition of OTA in the beer sample. First, a blank beer sample was analyzed to ensure that it did not contain OTA at a concentration exceeding the limit of detection of the method. Recovery was found to be  $100 \pm 4\%$  at all concentration levels.

The comparison of our method with previously published on-line SPE HPLC methods in term of selected validation parameters is presented in Table S2 in Supplementary materials.

### 3.6. Analysis of real samples

The application of all tested nano/micro and composite fibers in the analysis of real beer samples was the ultimate parameter that was involved in our comparison study. The maximum permitted level of ochratoxin A in beer samples marketed in Europe was set in Commission Regulation (EC) No 1881/2006 at  $3.0 \mu\text{g kg}^{-1}$  [27]. Therefore, three sets of samples including blank filtered beer and two dilute beer spiked with OTA at concentrations of 5.0 and  $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$  were prepared and measured. A comparison of the on-line SPE-UHPLC chromatograms of the standard solution of OTA (a concentration of  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) is shown in Fig. 3a) for all tested nano/micro fibers. Comparison of the chromatographic separation of blank filtered beer and spiked diluted beer at concentrations of  $2.5 \mu\text{g L}^{-1}$  and  $5 \mu\text{g L}^{-1}$  are presented in parts 3 b), 3 c), and 3 d), respectively.

## 4. Conclusion

Both well-established PA6 nanofibers and our new previously undescribed nanofiber and nano/microfiber composite polymers were tested and compared for the extraction of OTA from beer. We have proven that new composite polymers prepared by a technology which combines meltblown and electrospinning procedure are suitable for high pressure on-line SPE UHPLC system and add several benefits over the other fibers. A combination of two different procedures that forms special materials appears to be an excellent approach to obtain new sorbent. Cotton-like materials from meltblown alone or from a combination with electrospinning can be used in the on-line systems and provide for more benefits compared to the 2D-cloth made by electrospinning. We tested stability of all polymer fibers and concluded that PVDF nanofibers were not mechanically and chemically sufficiently stable when used alone. However, when used in a combination with another polymer, its stability was significantly increased. Differences in the behavior of all tested polymers in the on-line SPE-UHPLC system, extraction efficiency, and the peak symmetry of ochratoxin A were observed and described. The PCL/PVDF composite polymer was chosen as the most suitable sorbent for the on-line extraction of OTA from beer and complete method validation was carried out. Only 45 mg of nano/microfiber composite sorbent was needed for an effective extraction and whole analysis including extraction and separation step required only 8 min.



It can be concluded that process of fiber fabrication and type of the used nanofibrous polymers is crucial for successful on-line solid phase extraction procedure coupled to high pressure chromatography system.

### Acknowledgements

Financial support of this project no. 17–08738 S by GAČR project is gratefully acknowledged. M. H. acknowledges the financial support of specific research no. SVV 260 412. The research presented in this article was also supported by the Ministry of Education, Youth, and Sports within the framework of the targeted support of the “National Programme for Sustainability I” LO 1201 and the OPR&DI project “Centre for Nanomaterials, Advanced Technologies and Innovation”, CZ.1.05/2.1.00/01.0005. This work was also supported by the STARSS project (Reg. No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/15\_003/0000465) co-funded by ERDF.

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.04.023>.

### References

- [1] E.M. Reyes-Gallardo, R. Lucena, S. Cardenas, Electrospun nanofibers as sorptive phases in microextraction, *Trac. Trends Anal. Chem.* 84 (2016) 3–11.
- [2] S. Chigome, N. Torto, A review of opportunities for electrospun nanofibers in analytical chemistry, *Anal. Chim. Acta* 706 (2011) 25–36.
- [3] L.L. Chu, S.L. Zheng, B. Qu, S.W. Geng, X.J. Kang, Detection of beta-agonists in pork tissue with novel electrospun nanofibers-based solid-phase extraction followed ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Food Chem.* 227 (2017) 315–321.
- [4] L.L. Wei, Y. Yan, X.J. Kang, Application of packed-nanofibers solid-phase extraction for determination of rhodamine B in dry chilli, fruit drink and red wine, *Chem. J. Chin. Univ.-Chin* 38 (6) (2017) 935–941.
- [5] M. Asiabi, A. Mehdinia, A. Jabbari, Electrospun biocompatible Chitosan/MIL-101 (Fe) composite nanofibers for solid-phase extraction of Delta9-tetrahydrocannabinol in whole blood samples using Box-Behnken experimental design, *J. Chromatogr. A* 1479 (2017) 71–80.
- [6] N.T. Tavengwa, P. Nyamukamba, E. Cukrowska, L. Chimuka, Miniaturized pipette-tip-based electrospun polyacrylonitrile nanofibers for the micro-solid-phase extraction of nitro-based explosive compounds, *J. Separ. Sci.* 39 (24) (2016) 4819–4827.
- [7] B. Maddah, S.S. Javadi, A. Mirzaei, M. Rahimi-Nasrabadi application of electrospun polystyrene nanofibers as solid phase extraction sorbent for the preconcentration of diazinon and fenitrothion in environmental waters, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 38 (2015) 208–214.
- [8] Q. Xu, S.Y. Wu, M. Wang, X.Y. Yin, Z.Y. Wen, W.N. Ge, Z.Z. Gu, Electrospun Nylon6 nanofibrous membrane as SPE adsorbent for the enrichment and determination of three estrogens in environmental water samples, *Chromatographia* 71 (5–6) (2010) 487–492.
- [9] Q. Xu, X.Y. Yin, S.Y. Wu, M. Wang, Z.Y. Wen, Z.Z. Gu, Determination of phthalate esters in water samples using Nylon6 nanofibers mat-based solid-phase extraction coupled to liquid chromatography, *Microchim. Acta* 168 (3–4) (2010) 267–275.
- [10] S.Y. Wu, Q. Xu, T.S. Chen, M. Wang, X.Y. Yin, N.P. Zhang, Y.Y. Shen, Z.Y. Wen, Z.Z. Gu, Determination of bisphenol a in plastic bottled drinking water by high performance liquid chromatography with solid-membrane extraction based on electrospun nylon 6 nanofibrous membrane, *Chin. J. Anal. Chem.* 38 (4) (2010) 503–507.
- [11] Q. Xu, N. Zhang, X. Yin, M. Wang, Y. Shen, S. Xu, L. Zhang, Z. Gu, Development and validation of a nylon6 nanofibers mat-based SPE coupled with HPLC method for the determination of docetaxel in rabbit plasma and its application to the relative bioavailability study, *J. Chromatogr. B* 878 (26) (2010) 2403–2408.
- [12] V. Antos, P. Hrabak, M. Komarek, M. Stuchlik, Polyetherimide nanofibers as sorbents for organochlorinated pesticides determination, *J. Nanomater.* (2016), 1390345 pages 1–7, <https://doi.org/10.1155/2016/1390345>.
- [13] H. Bagheri, H. Piri-Moghadam, S. Rastegar, Magnetic and electric field assisted electrospun polyamide nanofibers for on-line mu-solid phase extraction and HPLC, *RSC Adv.* 4 (2014) 52590–52597.
- [14] M.M. Moen, M. Javanbakht, M. Karimi, B. Akbari-adergani, B. Molecularly imprinted sol-gel nanofibers based solid phase microextraction coupled on-line with high performance liquid chromatography for selective determination of acesulfame, *Talanta* 134 (2015) 340–347.
- [15] G.T. Zhu, X. Chen, X.M. He, H. Wang, Z. Zhang, Y.Q. Feng, Electrospun highly ordered mesoporous silica-carbon composite nanofibers for rapid extraction and prefractionation of endogenous peptides, *Chem. Eur. J.* 21 (11) (2015) 4450–4456.
- [16] M. Asiabi, A. Mehdinia, A. Jabbari, Preparation of water stable methyl-modified metal-organic framework-5/polyacrylonitrile composite nanofibers via electrospinning and their application for solid-phase extraction of two estrogenic drugs in urine samples, *J. Chromatogr. A* 1426 (2015) 24–32.
- [17] L.-Q. Chen, Y. Wang, I.-S. Qu, J.-J. Deng, X.-J. Kang, Selective extraction of catecholamines by packed fiber solid-phase using composite nanofibers composing of polymeric crown ether with polystyrene, *Biomed. Chromatogr.* 29 (1) (2015) 103–109.
- [18] H. Bagheri, H. Piri-Moghadam, S. Rastegar, N. Taheri, Electrospun titania sol-gel-based ceramic composite nanofibers for online micro-solid-phase extraction with high-performance liquid chromatography, *J. Separ. Sci.* 37 (15) (2014) 1982–1988.
- [19] J. Erben, V. Jencova, J. Chvojka, L. Blazkova, K. Strnadova, M. Modrak, E.K. Kostakova, The combination of meltblown technology and electrospinning - the influence of the ratio of micro and nanofibers on cell viability, *Mater. Lett.* 173 (2016) 153–157.
- [20] J. Erben, K. Pilarova, F. Sanetrik, J. Chvojka, V. Jencova, L. Blazkova, J. Havlicek, O. Novak, P. Mikes, E. Prosecka, D. Lukas, E. Kostakova, 3D micro-nano fibrous scaffold prepared by meltblown in combination with electrospinning for the bone tissue engineering, *Nanocon*, in: 6th International Conference vol. 2014, 2015, pp. 541–545.
- [21] D. Kimmer, I. Vincent, J. Fenyk, D. Petras, M. Zatloukal, W. Sambaer, V. Zdimal, Morphology of nano and micro fiber structures in ultrafine particles filtration, in: *Novel Trends in Rheology Iv*, 1375, 2011.
- [22] R. Chen, Y.Y. Yang, B. Qu, Y. Li, Y. Lu, L.L. Tian, W.Y. Shen, Rapid determination of sulfonamide residues in pork by surface-modified hydrophilic electrospun nanofibrous membrane solid-phase extraction combined with ultra-performance liquid chromatography, *Anal. Bioanal. Chem.* 408 (20) (2016) 5499–5511.
- [23] F. Qi, X. Li, B. Yang, F. Rong, Q. Xu, Disks solid phase extraction based polypyrrole functionalized core-shell nanofibers mat, *Talanta* 144 (2015) 129–135.
- [24] H. Bagheri, Aghakhani, M. Baghernejad, A. Akbarinejad, Novel polyamide-based nanofibers prepared by electrospinning technique for headspace solid-phase microextraction of phenol and chlorophenols from environmental samples, *Anal. Chim. Acta* 176 (2012) 34–39.
- [25] H. Bagheri, S. Asgari, H. Piri-Moghadam, On-line micro solid-phase extraction of clodinafop propargyl from water, soil and wheat samples using electrospun polyamide nanofibers, *Chromatographia* 77 (2014) 723–728.
- [26] M. Háková, L. Chocholeusová Havlíková, J. Chvojka, P. Solich, D. Šatinský, An on-line coupling of nanofibrous extraction with column-switching high performance liquid chromatography - a case study on the determination of bisphenol A in environmental water samples, *Talanta* 178 (2018) 141–146.
- [27] Commission Regulation (EC) No 1881/2006 of 19 December 2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A32006R1881> (accessed January 25, 2018).

## **Příloha 7**



# Polycaprolactone nanofibers functionalized with a dopamine coating for on-line solid phase extraction of bisphenols, betablockers, nonsteroidal drugs, and phenolic acids

Martina Háková<sup>1</sup> · Lucie Chocholoušová Havlíková<sup>1</sup> · Jiří Chvojka<sup>2</sup> · Jakub Erben<sup>2</sup> · Petr Solich<sup>1</sup> · František Švec<sup>1</sup> · Dalibor Šatinský<sup>1</sup>

Received: 29 March 2019 / Accepted: 17 September 2019  
© Springer-Verlag GmbH Austria, part of Springer Nature 2019

## Abstract

Polycaprolactone composite nanofibers coated with a polydopamine layer are introduced as a new type of absorption material for on-line solid phase extraction (SPE) in chromatographic system. A hybrid technology combining the electrospinning and melt blowing was used for the preparation of 3D-structured microfiber/nanofibrous polycaprolactone composite. The dopamine coating was then applied to functionalize the micro/nanofibers. Polydopamine-coated polycaprolactone fibers were tested as an extraction phase in on-line SPE prior to HPLC separation and UV detection. Four groups of biologically active substances including bisphenols (Bisphenol S, Bisphenol AF, Bisphenol A, Bisphenol C, Bisphenol AP, Bisphenol Z, Bisphenol BP, and Bisphenol M), betablockers (Timolol, Metoprolol, Labetalol, and Propranolol), nonsteroidal antiphlogistic drugs (Salicylic acid, Ketoprofen, Naproxen, Indomethacin, Diclofenac, Ibuprofen, and Meclofenamic acid), and phenolic acids (Chlorogenic acid, Caffeic acid, Sinapic acid, m-Coumaric acid, Benzoic acid, and Cinnamic acid) were used as the model analytes. Neat and coated fibers were compared and applied as sorbents for the on-line extraction set-up. Both materials produced good extraction potential for the determination of bisphenols and nonsteroidal drugs in model biological and environmental samples including river water, human urine, and blood serum. However, the polydopamine layer significantly increased the extraction efficiency of polar drugs. Typical repeatability of on-line extraction procedure on polydopamine coated fibers was in the range 0.12–4.11% for bisphenols, 0.55–1.41% for antiphlogistic drugs, 0.59–2.52% for phenolic acids, and 1.01–1.65% for betablockers.

**Keywords** Solid phase extraction · Nanofiber · Microfiber · Surface modification · Dopamine coating · Degradation · Polymerization · Column switching · Micro-column · Chromatography

## Abbreviations

PCL Polycaprolactone  
PCL-D Polycaprolactone coated by dopamine

BP Bisphenols  
PA Phenolic acids  
NSAID Nonsteroidal drugs  
BB Beta blockers

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00604-019-3846-2>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Dalibor Šatinský  
satinsky@faf.cuni.cz

<sup>1</sup> The Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Charles University, Ak. Heyrovského 1203, 500 05 Hradec Králové, Czech Republic

<sup>2</sup> Department of Nonwovens and Nanofibrous Materials, Faculty of Textile Engineering, The Technical University of Liberec, Studentská 1402/2, 46001 Liberec 1, Czech Republic

## Introduction

Advanced trends in solid phase extraction (SPE) methods are focused on finding both new sorbents and automated microextractions. Using nanofibrous extraction coupled on-line to liquid chromatography is a very promising avenue fitting advanced trends in the sample analysis. Reproducibility of the preparation and application of the new sorbents in home-made cartridges can be problematic, especially in case of manual handling with vacuum based

SPE manifold. Therefore, column switching chromatography (on-line SPE-HPLC) can be very helpful for ensuring the repeatable and reproducible conditions of analytes extraction. On-line SPE procedure provides stable flow rate, precise pressure control, defines time of sample contact with the sorbent during loading and elution steps, and enables quantitative transfer of the analytes in analytical column [1]. In addition, on-line extraction procedure avoids loss of analytes, which is typical for manual handling.

Polymers in nanofiber format are promising sorptive phases and represent a suitable alternative to commercial particulate sorbents because of their wide chemical variability, ease of modification, and enhanced surface area. Electrospinning is one of the most often used methods to produce nanofibers. It can be used alone or in combination with other fiber producing technique for the preparation of composite materials. Combination of two fiber producing techniques enables the preparation of novel sorbents with unique properties. Here is reported a hybrid technology combining the electrospinning and melt blown techniques to obtain porous composite material suitable for on-line SPE HPLC.

Polydopamine shows a good potential for universal surface modification [2]. It can change the surface properties of polymers and alter and/or improve the extraction properties due to its functional groups. Thus, polydopamine layer changes the lipophilic polycaprolactone (PCL) to water-wettable fibers [3]. Use of the dopamine coated materials for extraction in off-line systems have already been published. For example, dopamine-coated polystyrene/graphene electrospun nanofibers were used for thin-film microextraction and determination of the aldehyde metabolites in human urine [4]. Preparation of the core-shell nanoparticles or nanotubes via dopamine coating was described for determination of the phthalic acid esters in water [5], for compounds with estrogenic activity in milk [6], and for removal of uranium from contaminated water [7]. Furthermore, wide range of substrates, such as metals, synthetic polymers, ceramics, silver nanoparticles, and other materials were coated with poly(dopamine) forming the surface layer [8–10].

We tested in our study polycaprolactone nano/microfiber composite coated with polydopamine as sorbent for on-line SPE of various types of compounds and evaluated the effect of the polydopamine layer on extraction efficiency of model compounds with different physicochemical properties. We expected increased extraction efficiency for the analytes with phenolic groups because polydopamine contains phenol-like functions in its structure, therefore bisphenols (BP) and phenolic acids (PA) as lipophilic and hydrophilic members of the model compounds were chosen. Furthermore, extraction of pharmaceutical substances including nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) and betablockers (BB) possessing acidic and basic properties were also tested. The

effect of the surface degradation of PCL on the coating process, the reproducibility of the polymerization, and the repeatability of packing of SPE cartridges are also described.

## Materials and methods

### Reagents and materials

All reagents used for the preparation of composite PCL and coating, as well as standards and chemicals are presented in Supplementary material section (S1).

### Instrumentation and software

A melt blown device (Laboratory equipment J&M Laboratories, USA, <http://www.jmlaboratorysupplies.com>) in a combination with the electrospinning system was used for production of composite nano/microfiber polymer. The scheme of this tool is shown in scheme S1 (Supplementary material section). Scanning electron microscope (SEM) VEGA3 (Tescan, UK, <https://www.tescan.com/en-us/technology/sem/vega3>) was used for the structural analysis of sorbents sputtered with gold. UHPLC system Nexera X2 (Shimadzu Corporation, Japan, <https://www.shimadzu.com/>) comprised a CBM-20A communication module, a DGU-20 A5R degassing unit, a LC-30 AD solvent delivery systems, a SIL-30AS autosampler, a CTO-20 AC column oven with an FCV-12AH high pressure six-port switching valve, and an SPD-M30A DAD detector. Three chromatographic columns - Kinetex® Biphenyl (150 × 4.6 mm, S-5 μm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA, <https://www.phenomenex.com/>), Ascentis® Express F5 (100 × 4.6 mm, S-2.7 μm) (Merck, Darmstadt, Germany, <https://www.merckgroup.com/>), and YMC -Triart C18 ExRS (100 × 4.6 mm, S-3 μm) (YMC, Kyoto, Japan, <http://www.ymc.co.jp>) were used for the analytical separations.

### Preparation of standard solutions and samples

Extraction properties of nanofibrous sorbent were tested using solutions of selected compounds. Standard stock solutions were prepared by dissolving each substance individually in acetonitrile (BP) or methanol (NSAID, PA, BB) at a concentration of 1 g L<sup>-1</sup> and stored in the dark at 4 °C (BP, NSAID) or in a freezer (PA, BB). Working standard solutions were prepared by diluting the standard stock solutions with water on the day of measurement to the final concentration shown in Table S1 (Supplementary material section). Each group of compounds possessing different physicochemical properties was tested separately. The final concentrations and injection volumes were optimized for each group of compounds according to the detector response and signal to noise ratio.

The applicability of the on-line SPE-HPLC method was tested using real-life samples including river water, urine, and blood serum. Water collected from the river Orlice and urine were filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  polytetrafluoroethylene filter before the analysis. Human serum reference material Lyonorm Hum N was purchased from Erba Lachema, s.r.o. (Brno, Czech Republic, <https://www.erbalachema.com>). Serum sample was diluted five-times with water and injected directly in the system.

### Preparation of polycaprolactone fibers

The preparation of PCL nanofibers bonded to PCL microfibers was described in our previous study [11]. The device for spinning of polycaprolactone (PCL) nanofibers bonded to the PCL microfiber scaffold comprised a melt blown equipment, an electrospinning device including a roller spinner and a countervailing pressure cylinder, and computer-controlled pumps. The melt blown extruder screw rotated at 7 rpm. Fibers were stretched in air stream at a distance of 200 mm from the melt blown. PCL was dissolved in 9:1 v/v chloroform-ethanol mixture to achieve a concentration of 16 wt.% and used for electrospinning. Applied voltages were + 35 kV at the stringed roller and - 14 kV at the opposite electrode. Nanofibers contacting melted microfibers in air stream formed a stable composite material. Small discs with a diameter of 5 mm were cut from the PCL fiber layer removed from the collector and used for the coating.

### Dopamine coating procedure

Discs cut from PCL micro/nanofibers mat were placed in the aqueous solution containing tris(hydroxymethyl)aminomethane ( $1.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and dopamine ( $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) and left in this solution under a constant stirring at 250 RPM and a temperature of 22 °C for 4 h. These conditions were adopted from optimization experiments published elsewhere [12, 13]. Then, coated PCL discs were removed from the solution, washed 5 times with water and placed in water into sonication bath for 30 s. SEM images

of the native uncoated (PCL) and coated (PCL-D) materials are shown in Fig. 1. Units covered by polydopamine layer were dark. Polydopamine layer is also visible as the wrinkled surface on thicker microfibers.

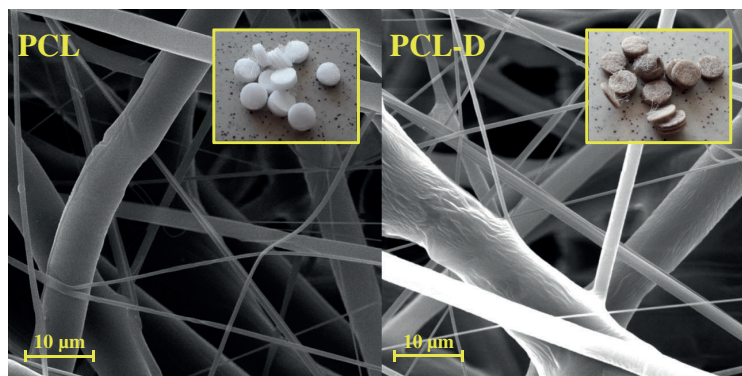
### Preparation of SPE micro-columns

The SPE micro-column were prepared manually by layering small circular discs (PCL, or PCL-D) in the  $5 \times 4.6 \text{ mm}$  I.D. column cartridge. A guard pre-column holder with the SPE micro-column was connected in the column switching system via UHPLC fittings. The SPE micro-column was before use conditioned with 100% methanol for 10 min at a flow rate of  $2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  followed with water for 5 min. All impurities from the fiber-preparation and coating process were removed from sorbent applying this procedure and micro-column was ready for on-line extraction in UHPLC system.

### UHPLC column switching analysis

On-line SPE-UHPLC method was used for the simultaneous extraction and separation of the analytes. Extraction was carried out with the SPE micro-column filled with PCL or PCL-D. All UHPLC separations were carried out at a flow rate of  $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$  using three different stationary phases at a temperature of 20 °C with UV detection at 210, 230, 240, and 280 nm for NSAID, BP, PA, and BB, respectively. The composition of mobile phase, the used columns, and the gradient programs used for the separations are presented in Table S2 (Supplementary material section). In the first step, compounds were injected in extraction micro-column and the washing was carried out using the washing mobile phase containing a low percentage of the organic modifier. In the second step after the valve switch, the retained analytes were washed out from the extraction column directly in analytical column using gradient elution. Gradient separation of the analytes started at the time of the valve switch.

**Fig. 1** SEM analysis of the native uncoated PCL (left) and polydopamine coated PCL-D (right) extraction sorbents



## Results and discussion

PCL composite nanofibers with microfibrinous scaffold presented in our previous works [11, 14] demonstrated both excellent mechanical stability and extracting properties in the on-line high-pressure extraction system used for extraction of lipophilic analytes. Therefore, we have chosen PCL as the base polymer for further functionalization via dopamine coating. Determination of the differences between polydopamine layers prepared under different conditions using typical analytical method such as IR and Raman spectroscopy was not possible due to the very small quantity of polydopamine deposited at the fibers. Therefore, the comparison of the extracting efficiency is the simplest and only way to evaluate the reproducibility of the coating process. Energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDX) analysis was used for the proof of the dopamine coating via significant presence of the nitrogen (12.3–13.4 wt.%). SEM images and results are depicted in [Supplementary material](#) section.

### Comparison of the extraction properties of coated and uncoated PCL

Evaluation of tailing factors of compounds, extraction efficiency expressed as peak areas of individual analytes, and repeatability of extraction were characteristics used for the description of differences between both coated and uncoated extracting materials. Final chromatograms presenting the separation of each group of tested analytes using both extracting materials are shown in Fig. 2. Table 1 then summarizes both tailing factors and repeatability for these analytes and both sorbents. Repeatability of extraction process was evaluated

as a relative standard deviation of eight injection of working standard solutions. Repeatability of extraction, changes in tailing factors, and differences between extraction efficiency of the sorbents were evaluated after using the washing mobile phase in absence of organic modifier to ensure the minimum analyte loss.

Furthermore, composition of the washing mobile phase and the time of the valve switch were tested to obtain the information about analyte retention characteristics for each extracting material. The change in the peak area expressed as recovery of analyte was evaluated for each analyte under changing conditions. Peak area of analytes in the absence of the organic solvent in the washing mobile phase on uncoated PCL was considered as 100% recovery. Radar charts shown in Figs. S1, 2, 3, and 5 represent graphical evaluation of the results. The middle axis represents percentage of the analyte recoveries. Spokes represent content of organic modifier (methanol and acetonitrile in part A and B, respectively) or duration of the washing step (in min) in part C. The composition of the washing mobile phase with the highest content of the modifier but at the same time producing the minimal loss in the recovery was considered the optimum content of organic modifier. Effect of the washing step duration using optimum content of organic modifier was tested as an additional parameter together with pH value during extraction of NSAID, PA, and BB.

### Extraction of bisphenols

Bisphenols was the first group of model analytes tested to demonstrate differences in the extraction properties of PCL and PCL-D. Both sorbents provided similar retention with

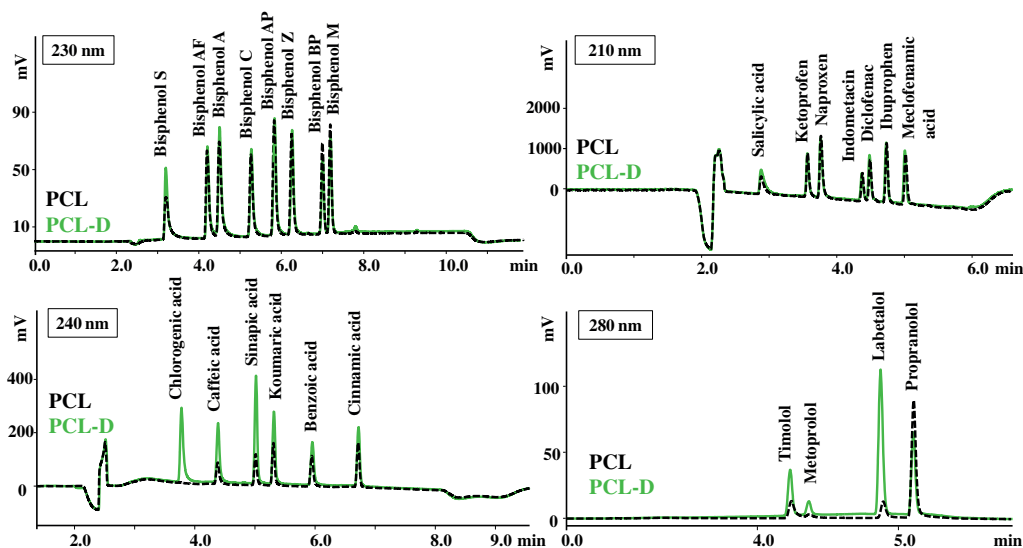


Fig. 2 Optimized chromatograms of each group of tested analytes using both PCL and PCL-D extracting materials. Details of chromatographic conditions are presented in Table S2.

**Table 1** Repeatability of on-line extraction procedure on both PCL and PCL-D materials, evaluation of tailing factors and peak resolution after extraction

Analyte	PCL			PCL-D		
	RSD (%) <i>n</i> = 8	Tailing factor	Resolution	RSD (%) <i>n</i> = 8	Tailing factor	Resolution
Bisphenol S	0.24	3.3	–	0.39	3.2	–
Bisphenol AF	0.12	2.0	5.9	0.72	1.6	8.0
Bisphenol A	0.15	1.9	2.0	1.19	1.8	2.4
Bisphenol C	0.14	1.6	5.2	0.12	1.7	6.0
Bisphenol AP	0.56	1.4	4.0	0.71	1.5	4.6
Bisphenol Z	0.27	1.3	3.1	0.32	1.4	3.6
Bisphenol BP	8.42	1.1	5.8	4.11	1.1	6.5
Bisphenol M	1.98	1.2	1.6	0.99	1.2	1.7
Salicylic acid	1.78	2.7	–	1.22	2.5	–
Ketoprofen	1.42	1.6	7.2	0.71	1.5	6.4
Naproxen	1.27	1.6	2.6	0.55	1.5	2.5
Indometacin	1.02	1.1	8.1	1.08	1.1	7.7
Diclofenac	0.77	1.3	1.6	1.41	1.3	1.5
Ibuprophen	1.72	1.2	3.4	0.94	1.2	3.3
Meclofenamic acid	5.13	1.2	3.8	0.92	1.2	3.7
Chlorogenic acid	–	–	–	1.02	1.7	–
Caffeic acid	2.20	1.7	–	1.87	1.4	6.5
Sinapic acid	1.69	1.3	2.9	1.33	1.1	2.6
Koumaric acid	1.94	1.3	3.6	1.83	1.2	3.7
Benzoic acid	2.21	1.4	1.3	2.52	1.3	1.9
Cinnamic acid	1.14	1.1	8.6	0.59	1.1	3.0
Timolol	0.87	–	–	1.01	1.1	–
Metoprolol	3.02	–	–	1.04	1.4	2.3
Labetalol	1.51	2.5	–	1.27	1.2	9.1
Propranolol	0.50	1.4	3.4	1.65	1.1	4.1

only minor differences observed. More polar bisphenols were more retained on PCL-D. For example, retention of bisphenol S was about 15% smaller on PCL than on PCL-D. On the contrary, retention of bisphenol M, which is the most lipophilic compound in this group, was about 14% higher using the more lipophilic PCL. Problems with repeatable extraction of bisphenol BP occurred using both sorbents. This can result from the poor solubility of this compound in solvents.

Effect of the organic modifier on analyte recoveries were similar for both sorbents with no significant effect of the coating on the analyte retention. All BP, except bisphenol S, were well retained on both sorbents. Less than 10% analyte loss was observed when using 20% aqueous methanol (Fig. S1 A) or 10% aqueous acetonitrile (Fig. S1 B) (Supplementary material section). Effect of washing step duration was tested with the washing mobile phase being 15% aqueous methanol (Fig. S1 C) or 5% aqueous acetonitrile. Again, the effects were similar no matter what sorbent was used. All BP, except bisphenol S, were well retained even after 3 min of washing when the relative percentage change was less than 10%.

### Extraction of nonsteroidal drugs

Nonsteroidal antiphlogistic representing more polar compounds than bisphenols were also chosen for the testing of the new sorbent. First, optimization of the pH value of the washing mobile phase was carried out to reach the best analyte retention. Water and water acidified with 0.5 and 2% acetic acid were tested as the washing mobile phases. The extraction efficiency of salicylic acid was strongly affected by the pH of the washing mobile phase and the best recovery was achieved using the 0.5% acetic acid.

PCL-D afforded better repeatability than PCL in extraction of this group of analytes. This feature was most noticeable for meclofenamic acid. Enhanced extraction efficiency was observed with PCL-D sorbent for almost all tested antiphlogistic. Recoveries of salicylic acid, meclofenamic acid, diclofenac, and ibuprofen using that sorbent were respectively 36, 11, 13, and 10% higher. Washing with the mobile phases containing different percentages of organic modifier affected recoveries similarly while testing both extracting materials. Meclofenamic acid, ibuprofen, and diclofenac were

best retained with an analyte loss of less than 6%. Due to their higher lipophilicity, they were retained even at a high percentage of organic modifier in the washing mobile phase reaching up to 40% aqueous methanol and 20% aqueous acetonitrile (Fig. S2) (Supplementary material section). Considering the poor retention of salicylic acid, the mobile phase with 15% methanol was chosen for testing the effect of duration of the washing. The decrease of recovery for salicylic acid, ketoprofen, and naproxen with the time of washing was slower on the PCL-D since these compounds were stronger retained (Fig. S2 C) (Supplementary material section). Both sorbents exhibited good extraction efficiency for NSAID with the largest differences evident for the salicylic acid. Additionally, more polar analytes such as salicylic acid, ketoprofen, and naproxen exhibited smaller tailing factors using the PCL-D sorbent (Table 1).

### Extraction of phenolic acids

Phenolic acids represent polar compounds with carboxylic and aromatic groups in their structure. The acidic mobile phase was used both to suppress the ionization and improve retention. Effect of pH of the washing mobile phase was tested with water, 0.5% aqueous acetic acid, and 4% aqueous formic acid. The highest recoveries on both sorbents were achieved with 0.5% aqueous acetic acid.

PCL coated by the polydopamine provided significantly increased extraction efficiency for this group of compounds. For example, chlorogenic acid was not retained on PCL. Recovery of caffeic acid, sinapic acid, and coumaric acid were about 61, 70 and 40% larger on PCL-D compared with PCL. Peak areas of benzoic acid and cinnamic acid were about 25% larger on PCL-D. Comparison of the on-line SPE UHPLC chromatograms including both sorbents is shown in Fig. 2.

Decrease in the retention during optimization of the washing system concerning content of the organic modifier and duration of the washing step was similar for both sorbents. Retention of compounds was strongly affected by the organic modifier. Even 5% methanol led to a decrease in the peak area by more than 10% (Figs. S3 A and B) (Supplementary material section). For testing of the washing step duration only 5% of methanol was chosen to keep organic phase content at minimum enabling elution of potential interferences. Fig. S3 C shows relative changes in the peak areas on both sorbents.

### Extraction of beta blockers

Polydopamine layer affected peak shapes of the beta blockers after the on-line extraction procedure. Better peak symmetry was achieved when PCL-D was used as a sorbent with tailing factors in the range from 1.14 to 1.39. In contrast, timolol and metoprolol were not baseline separated because of high tailing

of both compounds when PCL was used. All values of tailing factors are summarized in Table 1. Retention of BB on the sorbent was strongly affected by the pH value of the washing mobile phase. Water and aqueous washing mobile phases with different pH values adjusted between 4.5 and 9 by 0.5% trimethylamine and glacial acetic acid were tested. Changes in peak areas for each sorbent are shown in Fig. S4. Retention of BB increased with increasing pH value as result of the decrease in the molecule ionization. Increase in the retention of propranolol was most significant on PCL sorbent with the difference in peak area between pH 8 and 9 exceeding 65%. However, the increase in peak area was mere 10% with PCL-D sorbent. Peak area of propranolol was larger at pH 9 compared to that washed when with water. This difference the most significant exceeding 90% while using PCL sorbent. A decrease in retention occurred for labetalol at pH 9. Peak areas of labetalol on both sorbents were two times larger at pH 7 than at pH 9. Decrease of labetalol retention at high pH can be caused by a weak ionization of the amide group. It is obvious that for BB, except labetalol, the best extraction efficiency on the PCL sorbent was reached using the washing mobile phase at pH 9.

In case of PCL-D, the dependence between pH value and the retention of analytes was similar to PCL. Yet, applying the ultra-pure water alone in the washing mobile phase significantly increased the retention of the analytes (Fig. S4). On the contrary, the same extraction efficiency was not reached using the buffer of the same pH value. This phenomenon is likely to be caused by differences in the ionic strength of the solution. Finally, the pH 9 buffer and ultra-pure water were used as washing mobile phases in the next optimization of extraction for PCL and PCL-D, respectively.

Relative changes in the peak areas with methanol as organic modifier were similar on both sorbents (Fig. S5 A). Decrease in peak area of propranolol was steeper on PCL at higher contents of methanol. Differences were more significant when using acetonitrile in the washing mobile phases (Fig. S5 B) (Supplementary material section). Retention of labetalol increased on the PCL-D in comparison with PCL without coating. In comparison with washing mobile phase in absence of organic modifier the analyte loss was 40% on PCL and only 18% on PCL-D using 5% acetonitrile. For testing the washing step duration, 5% aqueous methanol was found as optimal content of organic component. Timolol and labetalol retained better on the PCL-D than on PCL when 5% methanol was in the washing mobile phase. Almost 60% labetalol was retained on the PCL-D but only 11% remained on PCL after 7 min of washing. Other BB exhibited a better retention on the PCL-D during washing, but the difference was less than 20% of difference thus not as noticeable as for labetalol.



### Effect of PCL ageing on dopamine-coating and inter-micro-column reproducibility

Our experiments described in section 3.1. confirmed the significant effect of dopamine coating on extraction efficiency for BB and PA. Therefore, these two groups of compounds were selected to evaluate reproducibility of the dopamine coating. PCL is a semi crystalline polymer which properties change during storage [15, 16]. For this reason, four independent experiments leading to the coating were carried out and evaluated. Differently aged PCL was used in each polymerization experiment. The first PCL nanofibers were 2 years old (experiment # 1), the second batch was 1.5 year (experiment # 2), the third 1 year old (experiment # 3), and the fourth tested (experiment # 4) used freshly prepared nanofibers. Three micro-columns filled each with 44 mg PCL-D from each polymerization experiment were prepared for the evaluation of the inter-microcolumn reproducibility. Table 2 present the results. Very poor repeatability was achieved with PCL experiments 1 and 2. The highest values of RSD were observed for chlorogenic acid, sinapic acid, and labetalol, i.e. analytes highly affected by dopamine coating. This phenomenon points to a potential problem with dopamine layer. The best coating is achieved while using new fibers that are not affected by degradation of the PCL fibers. The older the PCL fibers, the rougher their surface. This is because the amorphous phase degrades and the crystalline remains during aging of the fibers. In our study, this claim was derived from the final shade of the coating. When coating was much lighter for the partially degraded materials and the polymer solution was darker, compared to the non-degraded materials. Such surface erosion of PCL was described elsewhere [2, 15, 16].

Three polymerizations using freshly made PCL fibers were then carried out to estimate reproducibility of the process. RSD values of the peak areas for timolol, chlorogenic, and sinapic acid were less than 10%, all other analytes exhibited

RSD values about 6% or lower. These results confirmed both excellent reproducibility of polydopamine coating process and preparation of the SPE micro-column.

### Intra- and inter-day precision

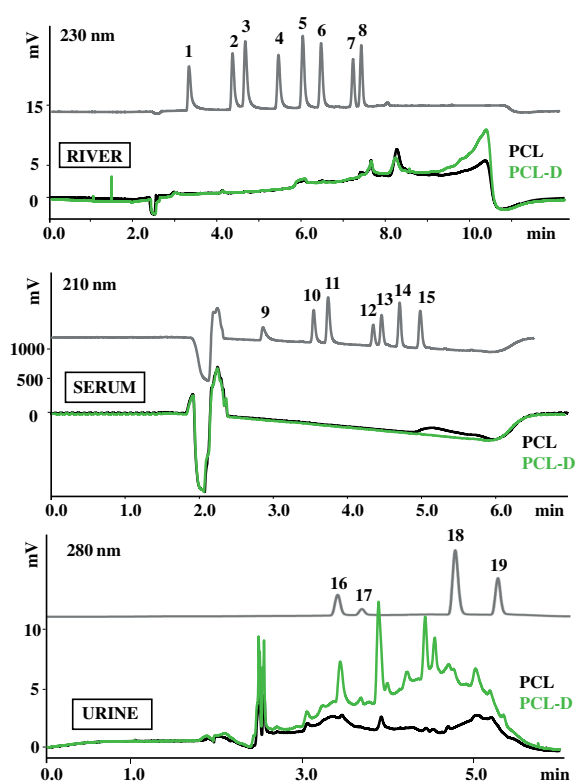
Standard solutions of BB or PA were injected six times to evaluate intra-day precision for method including the extraction step. RSD values were less than 2.71 and 3.40% for PA and BB, respectively. Inter-day reproducibility was tested for 4 days using standard solutions. All RSD values are collected in Table S3 (Supplementary material section). Retention of BB on the dopamine coated PCL was strongly affected by the pH value of the washing mobile phase as discussed in the chapter 3.1.

### Analysis of blank real samples

An applicability of PCL and PCL-D nanofibers for clean-up ballast matrix interferences in real samples was tested using river water, human blood serum, and urine since they exemplified matrixes typical for the analysis of bisphenols, nonsteroidal drugs and betablockers, respectively. Blank matrix (10  $\mu$ L) was injected directly in the on-line SPE-HPLC system. The washing mobile phase was 15% aqueous methanol for the analysis of river water and blood serum, and 5% aqueous methanol for the analysis of urine. Duration of the washing step was 1 min. Chromatograms of blank real samples and clean-up efficiency after extraction on both nanofiber sorbents are presented with chromatograms of separated standards in Fig. 3. Both sorbents enabled a good clean-up effect for both human serum and river water. In contrast, clean-up efficiency was better for PCL in case of urine extraction. As mentioned above, dopamine coating improved the extraction efficiency for polar compounds that are known problem in analysis of urine matrix. Therefore, PCL-D clean-up did not work well in this case.

**Table 2** Inter-cartridge repeatability in different polymerization experiments - effect of PCL ageing on dopamine-coating and inter-micro-column reproducibility

Analyte	RSD (%) $n = 3$			
	Experiment #1	Experiment #2	Experiment #3	Experiment #4
Chlorogenic acid	9.56	17.41	8.71	2.52
Caffeic acid	43.66	4.44	3.37	3.23
Sinapic acid	7.61	13.14	5.44	4.59
m-Coumaric acid	5.69	4.51	3.07	3.21
Benzoic acid	47.65	4.83	2.19	2.03
Cinnamic acid	5.66	3.67	4.51	0.91
Timolol	14.42	6.34	3.03	2.69
Metoprolol	6.58	3.71	2.38	0.79
Labetalol	12.33	12.56	1.16	1.08
Propranolol	16.66	6.46	1.13	0.89



**Fig. 3** Chromatograms of standards and blank real samples and clean-up efficiency after extraction on both nanofiber sorbents. Details of chromatographic conditions for each group of analytes are presented in Table S2. Analytes in chromatograms: 1 – Bisphenol S, 2 – Bisphenol AF, 3 – Bisphenol A, 4 – Bisphenol C, 5 – Bisphenol AP, 6 – Bisphenol Z, 7 – Bisphenol BP, 8 – Bisphenol M, 9 – Salicylic acid, 10 – Ketoprofen, 11 – Naproxen, 12 – Indomethacin, 13 – Diclofenac, 14 – Ibuprofen, 15 – Meclofenamic acid, 16 – Timolol, 17 – Metoprolol, 18 – Labetalol, 19 – Propranolol

Generally, the main limitations of the developed on-line nanofibrous extraction method are relatively lower selectivity of extraction step due to versatility of PCL material, column leaking at higher flow rates, back-pressure fluctuations after the valve switch, ageing of PCL nanofibers, and poor stability of both PCL and PCL-D nanofibers at higher temperatures in organic solutions (especially in acetonitrile).

## Conclusion

The preparation of polydopamine coated fibrous extraction materials via polymerization at the fiber surface and the effect of this coating on the extraction efficiency of PCL was demonstrated. The reusability of the material was proofed by the inter and intra-day precision data. SEM analysis before and after 300 extraction runs on PCL-D material is presented in Supplementary material (Figure S7). Reproducibility of the

polymerization process was verified by the comparison of the peak areas of analytes that were most affected by the polydopamine layer. The significant advantage of the coating is the ability of the functionalized fibers to extract polar compounds such as phenolic acids and beta blockers. This result confirms the assumption that dopamine-coated material has a higher hydrophilicity. Strong effect of pH and ionic strength of the mobile phase on the retention of beta blockers has also been observed. This trend was the most significant while using the coated PCL-D. However, polydopamine coating did not significantly change the extracting characteristics at different pH values of the washing mobile phase. Elution profiles of beta blockers displayed similar trends on both sorbents.

Bisphenols were well retained on both PCL and PCL-D. Except bisphenol S, all other bisphenols were strongly retained on both extracting materials, even at higher percentage of the organic solvent in the washing mobile phase. Both sorbents also well extracted the group of nonsteroidal anti-inflammatory drugs including ibuprofen, diclofenac, and meclofenamic acid even at a high percentage of organic modifier of 40% methanol or 20% acetonitrile, and did not decrease even after a long term of washing for 7 min with 15% aqueous methanol. Both extracting materials also demonstrated an excellent purification potential for the extraction of bisphenols and nonsteroidal drugs from the real-life samples including river water, serum, and urine.

We envision that our polydopamine coated PCL-D fibers can be used in a variety application such as the determination of phenolic acids in beverages and other liquid samples in the presence strongly retained lipophilic interferences. The hydrophilic components are then eluted with the mobile phase containing a small percentage of organic solvent content in which the lipophilic contaminants remain retained on the sorbent.

**Acknowledgements** Financial support of the GAČR project no. 17-08738S and EFSA-CDN project (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000841) co-funded by ERDF is gratefully acknowledged. M. H. acknowledges the financial support of specific research of Charles University no. SVV 260 412 and GAUK no. 766 218.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interests** The authors declare that they have no competing interests.

## References

1. Fernandez-Ramos C, Šatínský D, Šmídová B, Solich P (2014) Analysis of trace organic compounds in environmental, food and biological matrices using large-volume sample injection in column-switching liquid chromatography. *TRAC-Trends Anal Chem* 62: 69–85. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.07.008>

2. Dreyer DR, Miller DJ, Freeman BD, Paul DR, Bielawski CW (2012) Elucidating the structure of poly(dopamine). *Langmuir* 28: 6428–6435. <https://doi.org/10.1021/la204831b>
3. Kim M, Kim JS, Lee H, Jang JH (2016) Polydopamine-decorated sticky, water-friendly, biodegradable polycaprolactone cell carriers. *Macromol Biosci* 16:738–747. <https://doi.org/10.1002/mabi.201500432>
4. Zhang H, Hu S, Song D, Xu H (2016) Polydopamine-sheathed electrospun nanofiber as adsorbent for determination of aldehydes metabolites in human urine. *Anal Chim Acta* 943:74–81. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.09.028>
5. Gonzalez-Salamo J, Socas-Rodriguez B, Hernandez-Borges J, Rodriguez-Delgado MA (2017) Determination of phthalic acid esters in water samples using core-shell poly(dopamine) magnetic nanoparticles and gas chromatography tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1530:35–44. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.11.013>
6. Socas-Rodriguez B, Hernandez-Borges J, Herrera-Herrera AV, Rodriguez-Delgado MA (2018) Multiresidue analysis of oestrogenic compounds in cow, goat, sheep and human milk using core-shell polydopamine coated magnetic nanoparticles as extraction sorbent in micro-dispersive solid-phase extraction followed by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 410:2031–2042. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0882-4>
7. Bai LF, Duan SX, Jiang WQ, Liu M, Wang S, Sang M, Gong X, Li JX, Xuan SH (2017) High performance polydopamine-functionalized mesoporous silica nanospheres for U(VI) removal. *Appl Surf Sci* 426:1121–1132. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.07.274>
8. Lee H, Dellatore SM, Miller WM, Messersmith PB (2007) Mussel-inspired surface chemistry for multifunctional coatings. *Science* 318(5849):426–430. <https://doi.org/10.1126/science.1147241>
9. Lee H, Rho J, Messersmith PB (2009) Facile conjugation of biomolecules onto surfaces via mussel adhesive protein inspired coatings. *Adv Mater* 21:431–434. <https://doi.org/10.1002/adma.200801222>
10. Zhang HF, Xu H (2017) Electrospun nanofibers-based online micro-solid phase extraction for the determination of monohydroxy polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine. *J Chromatogr A* 1521:27–35. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.09.035>
11. Háková M, Havlíková LC, Chvojka J, Erben J, Solich P, Švec F, Šatínský D (2018) A comparison study of nanofiber, microfiber, and new composite nano/microfiber polymers used as sorbents for on-line solid phase extraction in chromatography system. *Anal Chim Acta* 1023:44–52. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.04.023>
12. Kim S, Jeong Y, Kang SM (2016) Marine antifouling surface coatings using tannic acid and poly(N-vinylpyrrolidone). *Bull Kor Chem Soc* 37:404–407. <https://doi.org/10.1002/bkcs.10687>
13. Hong S, Yeom J, Song IT, Kang SM, Lee H (2014) Pyrogallol 2-aminoethane: a plant flavonoid-inspired molecule for material-independent surface chemistry. *Adv Mater Interfaces* 1:1400113. <https://doi.org/10.1002/admi.201400113>
14. Háková M, Havlíková LC, Chvojka J, Švec F, Solich P, Šatínský D (2018) Nanofiber polymers as novel sorbents for on-line solid phase extraction in chromatographic system: a comparison with monolithic reversed phase C18 sorbent. *Anal Chim Acta* 1018:26–34. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.02.065>
15. Dong Y, Liao S, Ngiam M, Chan CK, Ramakrishna S (2009) Degradation behaviors of electrospun resorbable polyester nanofibers. *Tissue Engin, Part B, Reviews* 15:333–351. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2008.0619>
16. Woodruff MA, Hutmacher DW (2010) The return of a forgotten polymer - polycaprolactone in the 21st century. *Progress Polym Sci* 35:1217–1256. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.04.002>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

## **Příloha 8**

## 3D-Printed Magnetic Stirring Cages for Semidispersive Extraction of Bisphenols from Water Using Polymer Micro- and Nanofibers

Ivana H. Šrámková, Burkhard Horstkotte,\* Jakub Erben, Jiří Chvojka, František Švec, Petr Solich, and Dalibor Šatínský

Cite This: *Anal. Chem.* 2020, 92, 3964–3971

Read Online

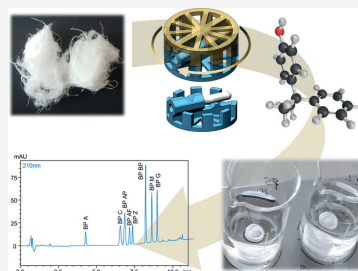
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

**ABSTRACT:** A magnetic stirring device allowing semidispersive solid phase extraction of eight bisphenols (A, AF, AP, C, BP, G, M, and Z) from river waters using polymer nano- and microfibers followed by HPLC with spectrophotometric detection has been developed and applied. About 50 mg of fibers was placed in a round, cage-like housing consisting of two identical 3D printed pieces that were locked together by a magnetic stirring bar. Magnetic stirring action of the cage devices enabled highly efficient interaction of the fibers housed inside with the aqueous samples and analyte transfer without risking fiber compaction and/or damaging. Polypropylene was found to be the best-suited filament material for the cage 3D printing, and polycaprolactone fibers appeared the most efficient sorbent out of eight tested polymers. Experimental design revealed that analytes extraction from 100 mL aqueous samples was completed within 50 min and stripping in methanol required less than 35 min. Cage housing enabled simple and robust handling of the fibrous sorbent that could be used repeatedly up to at least 5 times. Procedural repeatability was less than 5% RSD, and limits of detection and quantitation were 0.1–2.1 and 0.4–7.0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectively. Analyte recoveries at 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  level ranged from 87.1% to 106.5% in the analysis of two spiked river and two lake waters.



Solid phase extraction (SPE) using nonselective sorbents is the most common technique for sample pretreatment in the determination of a wide range of pollutants including bisphenols.<sup>1</sup> Alternative sorbents are increasingly explored for analyte isolation and preconcentration from environmental, food, and biological matrices such as hollow porous carbon spheres,<sup>2</sup> molecularly imprinted polymers,<sup>3</sup> and magnetic covalent organic framework nanocomposites.<sup>4</sup> Novel sorbents promise certain improvements in SPE performance: decrease in sample and sorbent amount, simplification of sorbent handling, reduction in preparative steps, decrease in extraction time, facilitation of automation, and increase in method selectivity and sensitivity.

In the research of alternatives to nonselective sorbents, nanofibers have emerged and are gaining popularity.<sup>5,6</sup> They are defined by diameters below 1  $\mu\text{m}$  and can be produced from natural polymers such as chitosan, cellulose, and silk or be manufactured from synthetic polymers.<sup>5</sup> Polymeric fibers are already used in a plethora of everyday products including medical bandages, scaffolding in drug delivery systems, industrial textiles, and sensors while their use in analytical chemistry is far from being thoroughly explored.<sup>5</sup> Although they possess smaller active specific surface area than classical sorbents, they are highly attractive due to straightforward production by electrospinning<sup>7</sup> or melt blowing<sup>8</sup> and the

possibility of functionalization or decoration with secondary materials.<sup>9–11</sup>

Nanofiber sorbents can be packed in cartridges, i.e., implemented in column format. In this sense, polydopamine-coated polystyrene nanofibers with deposited Ag nanoparticles were reported for the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from human urine.<sup>9</sup> Porous cellulose acetate fibers were incorporated in an online extraction system of nonsteroidal anti-inflammatory drugs from urine and plasma.<sup>12</sup> Similarly, an online column switching system was used for nanofibrous extraction of bisphenol A.<sup>13</sup> Furthermore, extraction of inorganic analytes using a composite of chitosan nanofibers and aluminum-based metal organic frameworks was reported.<sup>14</sup>

Compaction of nanofibers results in high flow resistance that obliged Bagheri et al. to use an HPLC pump for flow injection preconcentration on polyaniline nanocomposite fibers.<sup>15</sup> Besides, online cartridge packing demands a tricky compromise between uniform and reproducible fiber packing to

Received: December 2, 2019

Accepted: January 31, 2020

Published: January 31, 2020

prevent channeling effects and avoiding pores obstruction and fiber inaccessibility.

Alternatively, fibrous materials can be used in a disc format that allows reducing back pressure and enhances accessibility of the fiber surface by the sample solution.<sup>16,17</sup> However, the small quantity of nanofibers that can be accommodated in the disk format reduces the extraction capacity and limits the applicability especially when treating larger sample volumes.

Stir bar sorptive extraction (SBSE) is a widely used technique for preconcentration and sample cleanup based on magnetic stir bars coated with a sorptive layer, most often PDMS. SBSE features simple manipulation and the possibility of both thermal and solvent desorption. The effort in eliminating some drawbacks, such as low extraction efficiency for polar analytes ( $\log P < 2$ )<sup>18</sup> or tedious preparation of thicker layers<sup>19</sup> led to the investigation of novel coating materials.<sup>20</sup> Some of these new materials resulted in improved selectivity or broader application range but tricky fabrication, long lasting extraction times, or low physical stability of the coating layer remained the main weaknesses.<sup>20</sup> Here we report a novel approach akin to stir bar sorptive extraction to handling nanofibers as sorbents in a reproducible and robust manner for offline analyte preconcentration prior to liquid chromatography taking advantage of 3D printing. The main benefit of the 3D printing is the fast prototyping and the fabrication of virtually any object that would be difficult to produce by other means. Recent excellent reviews discussed numerous applications of 3D printed elements or entire systems proving the usefulness of this 21st century technology in analytical chemistry.<sup>21,22</sup> Our proposed mode of nanofiber implementation is based on a simple-to-use 3D printed cage-like device acting as a magnetic stirrer that is loaded with fibrous sorbent, then immersed, and spun in the sample for analyte extraction. The cage housing enables inclusion and usage of an amount of fibers that is sufficient for the analyte extraction from large sample volumes but also protects the nanofibers that are placed loosely inside the cage and increases the extraction kinetics and accessibility of the fiber surface and wad packing by the tumbling action.

To explore the potential of using polymeric nanofibers in such stir-bar emulating approach, bisphenols were used as the model analytes of high concern. These compounds are used mostly as plasticizers and precursors for polymers and resins. With the massive utilization of plastics, bisphenols, in particular the most commonly used bisphenol A, became ubiquitous. Despite a relatively short half-life,<sup>23</sup> bisphenol A is considered quasi-persistent in the environment<sup>24</sup> and gives rise to a number of severe toxic effects after chronic exposure.<sup>2</sup> Bisphenol analogues have toxicity profiles comparable to that of the primary substance.<sup>25,26</sup> Bisphenols can be found in river waters,<sup>5</sup> human urine,<sup>25</sup> indoor dust,<sup>26</sup> baby food,<sup>27</sup> canned food,<sup>28</sup> and dairy products.<sup>29</sup> The high impact of even low concentrations justifies the exploration of new sample preparation methodologies as the one proposed here.

## EXPERIMENTAL SECTION

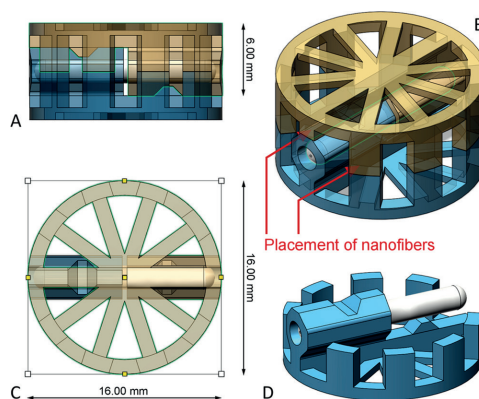
**Chemicals.** All reagents were of analytical grade. Water produced by a Milli-Q purification system with resistivity 18 M $\Omega$  × cm was used. Standards of bisphenols A, AF, AP, BP, C, G, M, and Z, all with a purity exceeding 98%, acetonitrile, methanol, isopropanol (all gradient grade), denatured ethanol, and phosphoric acid (p.a.) were purchased from Sigma-Aldrich (Prague, Czech Republic). The structures and properties of all

bisphenols are presented in the Supporting Information, section 1.

The following polymeric 3D printing filaments were used: Polypropylene (PP) 1.75 ± 0.03 mm, natural (Smartfil, Spain), polyethylene terephthalate (PET), natural, 1.75 ± 0.03 mm (Smartfil), polylactic acid (PLA), natural, copolyester with a bio monomer (CPE-HG 100 Extrafill), black, 1.75 ± 0.05 mm, and polyamide (PA) Jet, natural, 1.75 ± 0.05 mm (Fillamentum, Czech Republic).

**Extraction Devices.** An FDM 3D printer from TriLab company (Hradec Králové, Czech Republic), model DeltiQ L, was used for the production of the stirring cages. The applied printing parameters are shown in the Supporting Information, section 2.

The stirring cages for holding the nanofibers were assembled from two identical 3D printed elements. Schematic drawings and image of the single element and assembled cages with fiber sorbent placement is shown in Figure 1 and the Supporting



**Figure 1.** Stirring device with magnetic stirring bar (15 mm, 1.7 mm diameter) shown from side (A), angle (B), and top view (C), made of two identical 3D printed pieces (D). Location of nanofibers is indicated.

Information, section 3, respectively. The two elements were joined together and held in position by locking them with a magnetic stirring bar (15 mm in length, 1.7 mm in diameter) purchased from Sigma-Aldrich (Brand, PTFE, CYC, Z328708-10EA) as shown in Figure 1.

Nanofibers produced from polycaprolactone (nPCL), polyamide (nPA6), polyimide (nPID), polystyrene (nPS), polyvinylidene fluoride (nPVPDF), and polyacrylonitrile (nPAN); microfibers prepared from polyethylene ( $\mu$ PE), and composites consisting of microPCL fiber with nanoPVDF fibers (nPCL/ $\mu$ PVPDF) and of polycaprolactone nano- and microfibers (nPCL/ $\mu$ PCL) produced by electrospinning (nanofibers) or melt-blown (microfibers) using conditions described elsewhere<sup>30</sup> were obtained from the Technical University of Liberec, Czech Republic, Faculty of Textile Engineering. The nPCL/ $\mu$ PCL fibers eventually used in this work are characterized in the Supporting Information, section 4.

**Sample Collection and Storage.** Samples were collected in the Hradec Králové area, Czech Republic. Waters from two

rivers (Orlice - O, Labe - L) and two lakes (Biřička - B, Roudnička - R) were collected. They were kept in a cool dark place before handling. After sedimentation of suspended particulate matter, 100 mL of each water were collected and used without filtration or centrifugation.

**Instrumentation.** A multiposition stirrer (Variomag Poly, Labicom, Czech Republic) was used throughout allowing the simultaneous extraction of up to 15 samples.

A Shimadzu LC-10 system comprising a dual pump LC-10 AD VP, a degasser DGU-14A, an autosampler SIL-HT A, a column oven CTO-10AC VP, and a DAD detector SPD-M10A VP was used with the Ascentis Express RP-NH<sub>2</sub> separation column (100 × 4.6 mm, particle diameter 5 μm). The detection wavelength was 210 nm. The injection volume was 100 μL unless stated otherwise. Gradient elution with acetonitrile (A) and 0.1% aqueous H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (B) was carried out as follows: 0–3.5 min: 70–58% B in A; 3.5–5.5 min: 58% B; 5.5–10 min: 58–5% B; 10–11 min: 5% B; 11–12 min: 5–70% B; 12–13 min: 70% B in A. Under these conditions, baseline separation of all analytes was achieved in 10 min.

The statistical software Umetrics Modde Pro (Sartorius, Umea, Sweden) enabled experimental design of loading and stripping times.

**Extraction Procedure.** The optimized procedure comprised cutting the microfiber pads to equal weights of  $52 \pm 1$  mg and placing them in the two voids of the stirring cage. After closing and locking the cage with the magnetic stirring bar, the device was rinsed with ethanol and water for cleaning and conditioning the fiber sorbent. Then, each fiber-loaded cage was placed in screw-capped glass bottles filled with 100 mL of the sample or mixed bisphenol standard and left to stir for 50 min to achieve the fiber loading. The cages were tapped with a paper tissue to absorb the excess of aqueous sample from the cage and fiber wad, then placed in snap cover flask containing 5 mL methanol, and stirred for 35 min for analyte stripping. This volume ensured that the entire stirring cage was fully immersed. The obtained extracts were diluted 1:1 with water to ensure efficient analyte retention on the HPLC separation column. To evaluate the exact concentration in the used aqueous samples/standards, an aliquot was diluted 1:1 with methanol to achieve equal solvent content in extracts and standards. Before reuse, the fiber-filled cages were immersed in ethanol, stirred for at least 15 min, and then rinsed with water.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Design and Fabrication of Stirring Cages.** An important issue was to find a simple mechanism of closing the cages and to achieve mechanical stability of the final device in spite of consisting of two pieces and having small dimensions. The use of a magnetic stirring bar as locking bolt and use of two identical pieces increased simplicity and reduced the required print-outs, enabled easy cage assembly, and avoided the up–down orientation problem of the device inside the sample due to its symmetry. To obtain a high surface-to-volume ratio and small dimensions of the final device and to have the stirring bar close to bottom of the sample flask, a very thin but long stirring bar appeared ideal. The cage dimensions were adjusted to the size of the slimmest and longest magnetic stirring bar available on the market. The fibers were located in two separate chambers inside the stirring cage, which also assured higher turbulence and better accessibility of the inner surfaces of the fiber wad.

Printing quality using a nozzle of 0.4 mm extrusion diameter was unacceptable. In particular, the vertical cage elements were distorted. A nozzle of 0.2 mm led to stringing and insufficient layer adhesion for polyamide and polypropylene printing materials that were the most promising materials in terms of chemical stability. Finally, a nozzle of 0.3 mm enabled production of high-quality printouts (see the [Supporting Information](#), section 3) with all filament polymers at an acceptable speed (8.5 min per unit).

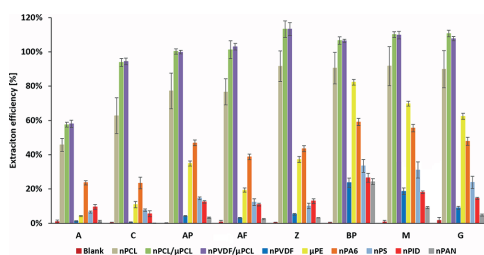
Smaller stirring cages were not studied as a possible way to decrease the volume of the extraction solvent and thus increase the preconcentration factor. This was because (i) the 3D print of a significant smaller device with required stiffness and surface quality was not practical and (ii) the loadable amount of fibers would reduce considerably. This in turn would decrease the volume of treatable sample. Also, the ratio of fiber material to the cage itself would be unfavorable. (iii) Only shorter but thicker stirring bars of smaller size were found, so that cages would show a lower diameter-to-height ratio which would hinder even and steady rotation.

Vice versa, as the volume increases with the cube of the radius, the surface does only with the square. Thus, larger cages would require far more fiber sorbent, where the inner surfaces of the fiber wads would be less accessible by the sample and an even larger volume of eluent, extraction time, and 3D printer filament would be required.

**Stirring Rate.** The stirring plate used in the study allowed stirring rates up to 990 rpm. While a faster stirring rate could potentially increase the mass transport of the analytes to the nanofibers housed in the stirring cages, rates higher than 400 rpm lead to unstable stirring behavior represented by tumbling of the stirring cages and even flotation of them due to liquid convection inside the sample. Both effects were due to a small weight of ca. 0.6 g of the assembled stirring cages and small size of the incorporated stirring bars. Therefore, a speed of 300 rpm was used throughout the optimization studies and for sample treatment to ensure reliable and reproducible operation.

**Selection of Nanofibers. Extraction Properties.** The first step of the method development was the choice of a suitable sorbent, i.e., finding the best-suited polymer fibers out of nine available materials. 3D-printed cages of PLA were used with a mixed bisphenols standard of high concentration and a long extraction time as the starting condition. Extractions as well as extract analysis by HPLC were carried out in duplicate, respectively. Conditions and results are given in [Figure 2](#). The highest signals were observed for nPCL/μPCL and nPVDF/μPCL fibers followed by pure nPCL fibers, while the extraction capacity for nPVDF alone was poor. We speculate that the hydrophobic nanofibers collapsed, in particular in the aqueous media, whereas the composite fibers maintained their flocculent texture thus providing a higher effective surface area. It becomes also clear that the surface chemistry of PCL was far better than PVDF for our model analytes. Given these results, nPCL/μPCL fibers were chosen for all further work.

**Mechanical Stability.** Fibers that can be released during the extraction and stripping step and pass in the sample present a substantial risk regarding column damage if injected in the HPLC system. Therefore, mechanical stability of the fibers was an important factor to evaluate. After the extraction procedure carried out with all available fibers, presence of broken or loose fibers both in the aqueous sample and the extract was examined using a particle analyzer (see the [Supporting](#)

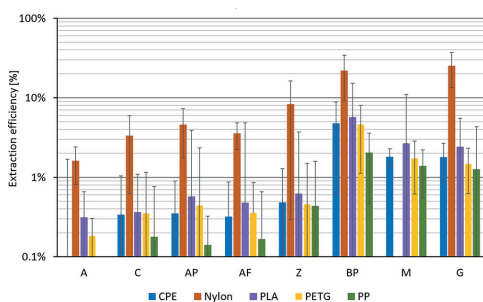


**Figure 2.** Selection of sorbent material. Comparison of various polymer nano-, micro-, and composite materials. Analytes are presented in order of elution from the HPLC column. Conditions: Cages printed from PLA holding  $43.3 \pm 0.3$  mg of fibrous sorbent, 120 min loading in 50 mL of mixed standard  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , 30 min stripping in 5 mL of ethanol, injection vol. of  $10 \mu\text{L}$  of 1:1 diluted extract with water.

Information, section 4.5). Values were below the detection limit of the instrument throughout. Hence, the risk of column clogging was insignificant at the chosen stirring rate. These results were identical for fibers used for a second time. Therefore, mechanical stability was not a decisive parameter in the selection of fibers for this study. Furthermore, we concluded that the stirring cages allow robust handling of the fibers.

**Selection of the Material for 3D Printing.** In the following, we studied the extraction capacity for bisphenols of the 3D printed empty cages using five filament materials. In addition, we evaluated the presence of bisphenols in these filaments considering their possible use as additives.

**Extraction Capacity of 3D Printing Materials.** First, the empty cages devoid of sorbent were immersed in a mixed bisphenol standard, with a concentration of  $1 \text{ mg L}^{-1}$  each, stirred for 2 h, then placed in 5 mL of ethanol, and stirred for another 30 min before analyzing the extract. The results are shown in Figure 3. A significant retention of bisphenol BP was observed in all tested materials. The lowest content of bisphenols in the extract, i.e., the lowest extraction capacity, featured cages from PP with max. 2%. Taking into account the high concentration level of the used standard, PP can be



**Figure 3.** Selection of the printing material—extraction capacity of 3D printing material. Bisphenols extracted with different printing material with intermediate rinsing with water. Conditions: 50 mL of mixed standard  $1 \text{ mg L}^{-1}$ , loading time: 2 h, stripping in 5 mL of ethanol for 30 min, and injection vol. of  $10 \mu\text{L}$ .

considered as inert so that it was chosen for cage printing. Also, considering the chemical stability and solubility, PP was the best material out of the tested polymers. In contrast, PLA has a limited solvent stability and dissolves instantaneously in ACN.

#### Intrinsic Content of Bisphenols in 3D Printing Material.

To test the intrinsic content of bisphenols and possible leachables in the filament polymers, 23.3 cm long pieces of each filament, i.e., the length required for the printing of a single cage, were cut in segments about 1 cm long and immersed in 5 mL of ethanol for 48 h. The same experiment was done using 5 mL of methanol. No detectable amounts of bisphenols were found in the extracts for any of the five materials. However, eight not identified substances, most likely additives used in production, were found in the chromatogram of the methanolic extract of PA with retention times partly overlapping with those of the analytes. Therefore, this material was rated inappropriate for our application. The cleanest chromatograms were obtained for extracts from PP filament that confirmed our choice of PP as the best suited material for our study.

**Optimization of the Extraction Variables.** After the selection of the printing and sorbent materials, parameters related to analyte extraction, i.e., the stripping solvent, the loading and stripping times, the amount of sorbent, and the effect of sample pH and ionic strength, as well as sorbent washing were studied. The corresponding experiments are described in the Supporting Information, section 5.

For all experiments, the mixed standards concentration was decreased to 50 ppb for each analyte to approach concentrations as close to those to be found in contaminated surface waters. To compensate for the lower sensitivity, the injection volume was increased from 10 to  $100 \mu\text{L}$ . Continuing with 1:1 dilution of the alcoholic extract with water, peak resolution was not affected.

Shortly, methanol was chosen over ethanol, isopropyl alcohol, and acetonitrile. Ethanol yielded similar results when diluted 1:1 with water but was not considered for its higher hydrophobicity. Using isopropyl alcohol affected the separation performance considerably even if diluted. Acetonitrile was not compatible with the chosen nPCL/ $\mu\text{PCL}$  fibers. Experimental design for stripping and loading time revealed that 50 and 35 min were optimal, respectively.

Improvement in the extraction efficiency for the most polar analyte was studied by decreasing the pH value as well as by increase in the ionic strength. For neither action a significant improvement was found so that original conditions were kept. Finally, washing between loading and elution revealed no significant effect for neither standards nor surface waters so that this step was omitted resulting in a simpler and shorter procedure.

**Analytical Method Evaluation.** To quantitatively evaluate our method, we constructed two calibration curves: One for experiments without extraction in the range of  $20\text{--}1000 \mu\text{g L}^{-1}$ , and one including the extraction step with standard concentrations between 2 and  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . The preconcentration factors were calculated as the ratio of both calibration curves slopes. The sensitivity gain ranged from 8.5 for BP A to 20.2 for BP M. The analytical figures of merit are summarized in Table 1. Linearity for all analytes covered the entire calibration ranges with excellent coefficients of determination ( $r^2$ ). The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated on the base of signal-to-noise ratio:  $3 \cdot \sigma$  and  $10 \cdot \sigma$  for LOD and LOQ, respectively, where  $\sigma$  is the standard



Table 1. Analytical Figures of Merit

BP	LOD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	linear range ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	calibration equation	$r^2$	intraday repeatability (% RSD, $n = 6$ )		interday repeatability (% RSD, $n = 3$ )	preconc. factor <sup>a</sup>
					5 $\mu\text{g L}^{-1}$	50 $\mu\text{g L}^{-1}$		
A	0.7	2.5–200	$y = 1300 \mu\text{g L}^{-1} + 1061$	0.9998	3.8	4.9	1.6	8.5
C	0.4	1.5–200	$y = 2780 \mu\text{g L}^{-1} + 2503$	0.9998	4.4	3.8	6.1	13.7
AP	2.1	7.0–200	$y = 4100 \mu\text{g L}^{-1} - 988$	1.0000	7.5	4.1	4.1	16.5
AF	0.3	1.0–200	$y = 1650 \mu\text{g L}^{-1} + 1222$	0.9999	5.7	3.7	8.0	14.6
Z	0.8	3.0–200	$y = 1430 \mu\text{g L}^{-1} + 254$	0.9999	5.8	4.1	8.9	15.5
BP	0.1	0.5–200	$y = 5830 \mu\text{g L}^{-1} - 694$	0.9999	7.9	4.8	4.3	19.7
M	1.4	5–200	$y = 3500 \mu\text{g L}^{-1} + 950$	0.9999	4.7	4.9	6.5	20.2
G	1.9	6.5–200	$y = 3450 \mu\text{g L}^{-1} - 1060$	0.9999	6.9	4.7	3.4	18.6

<sup>a</sup>Preconcentration factor calculated from the slopes of calibration curves with and without extraction.

Table 2. Analysis of Surface Water Samples<sup>a</sup>

bisphenol	$c_{\text{add}}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	sample 1 (L)		sample 2 (O)		sample 3 (B)		sample 4 (R)	
		$c_{\text{found}}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	R (%)	$c_{\text{found}}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	R (%)	$c_{\text{found}}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	R (%)	$c_{\text{found}}$ ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	R (%)
A	0	<LOD		<LOD		<LOD		<LOD	
	5	4.44 ± 0.40	88.8 ± 8.0	4.99 ± 0.17	99.8 ± 3.5	4.33 ± 0.01	86.6 ± 0.2	5.42 ± 0.20	108.4 ± 4.1
	50	52.2 ± 1.37	104.5 ± 2.7	52.8 ± 1.64	105.7 ± 3.3	53.0 ± 3.54	105.9 ± 7.1	51.5 ± 0.15	103.0 ± 0.3
C	0	<LOD		<LOD		<LOD		<LOD	
	5	4.35 ± 0.05	87.0 ± 1.1	4.49 ± 0.28	89.0 ± 5.6	3.73 ± 0.15	74.7 ± 3.0	4.54 ± 0.07	90.8 ± 1.5
	50	51.4 ± 1.70	102.9 ± 3.4	51.6 ± 1.23	103.2 ± 2.5	49.7 ± 0.90	99.4 ± 1.8	47.4 ± 0.74	94.8 ± 1.5
AP	0	<LOD		<LOD		<LOD		<LOD	
	5	4.99 ± 0.03	90.2 ± 1.0	5.17 ± 0.21	93.4 ± 4.5	4.42 ± 0.13	88.5 ± 7.3	5.20 ± 0.12	94.1 ± 2.7
	50	50.8 ± 1.10	101.7 ± 2.4	50.7 ± 1.03	101.5 ± 2.2	50.1 ± 0.48	100.3 ± 1.0	47.3 ± 0.29	94.6 ± 0.6
AF	0	<LOD		<LOD		<LOD		<LOD	
	5	6.05 ± 0.50	88.4 ± 10.1	6.29 ± 0.08	97.1 ± 8.7	5.78 ± 0.16	78.1 ± 4.0	6.60 ± 0.14	93.5 ± 3.02
	50	53.0 ± 3.7	105.9 ± 3.8	55.0 ± 5.6	109.9 ± 2.7	51.6 ± 1.23	103.3 ± 2.5	50.4 ± 0.95	100.8 ± 1.9
Z	0	<LOD		<LOD		<LOD		<LOD	
	5	5.35 ± 0.02	107.1 ± 0.4	5.68 ± 0.22	113.6 ± 22.9	5.13 ± 0.18	99.4 ± 22.4	7.15 ± 1.49	143.0 ± 29.8
	50	53.2 ± 4.4	106.5 ± 3.9	54.0 ± 5.3	108.0 ± 2.7	52.3 ± 0.98	104.6 ± 2.2	48.7 ± 0.69	97.3 ± 1.6
BP	0	1.4 ± 0.01		1.2 ± 0.36		1.6 ± 0.11		1.6 ± 0.04	
	5	5.42 ± 0.07	80.0 ± 1.4	6.12 ± 0.20	98.4 ± 8.2	5.51 ± 0.10	77.6 ± 3.0	6.16 ± 0.30	91.4 ± 6.1
	50	43.6 ± 4.17	87.1 ± 8.1	43.9 ± 5.41	87.8 ± 10.8	43.9 ± 5.63	87.9 ± 11.3	42.4 ± 0.20	84.8 ± 0.5
M	0	<LOD		<LOD		<LOD		<LOD	
	5	4.25 ± 0.07	75.7 ± 2.2	4.74 ± 0.05	87.1 ± 5.6	4.26 ± 0.14	85.2 ± 3.2	5.18 ± 0.22	103.6 ± 4.6
	50	47.7 ± 2.01	95.3 ± 4.0	48.3 ± 2.01	96.7 ± 4.0	47.3 ± 1.44	94.5 ± 2.9	42.6 ± 0.17	85.2 ± 0.5
G	0	<LOD		<LOD		<LOD		<LOD	
	5	6.13 ± 0.07	108.8 ± 7.5	6.60 ± 0.14	132.0 ± 2.1	6.04 ± 0.17	80.3 ± 10.6	6.87 ± 0.15	102.0 ± 8.1
	50	51.2 ± 1.84	102.4 ± 3.7	51.6 ± 2.31	103.3 ± 4.6	50.6 ± 1.29	101.1 ± 2.6	45.4 ± 0.21	90.8 ± 0.5

<sup>a</sup> $n = 4$ .

deviation of blank measurement. LOD values of 0.1–2.1  $\mu\text{g L}^{-1}$  were found. The repeatability of the extraction was assessed via submitting six replicates of bisphenols standards with concentrations of 5 and 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  to the entire analytical process. Repeatability values were below 8% RSD for 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  and 5% for 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  concentration.

It is noteworthy that it was possible to use the PCL fibers more than 5 times with no significant change in the slope of the calibration function or the extraction efficiency provided the devices were washed with ethanol between extractions to prevent the risk of analyte and matrix carry-over.

**Application to Natural Waters.** A peak corresponding to its retention time to bisphenol BP was found for all samples in concentrations ranging from 1.2 to 1.6  $\mu\text{g L}^{-1}$ . However, mass spectrometric detection would be required for unequivocal identification of the found compound. All other compounds were below the limit of detection. Therefore, these waters were

spiked at two concentration levels, 5 and 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Recovery values were calculated from the increase in the peak area. The recovery values for all analytes were generally between 74.7 and 113.6% for spiking level 5  $\mu\text{g L}^{-1}$  and between 87.1 and 106.5% for 50  $\mu\text{g L}^{-1}$ . These results confirm the suitability of standard calibration even for natural waters without the need for matrix calibration. Results of analysis are summarized in Table 2. Chromatograms of standard, river water, and spiked samples are shown in the Supporting Information, section 6.

**Final Discussion and Comparison with Other Methods.** A prime purpose behind this study was to develop an alternative to the delicate direct use of polymer nano- and microfiber sorbents and a mode for easy and robust handling of the fibers in a reproducible manner. For the first time, our stirring cages allowed using a mass of fibers similar to that reported for column packing<sup>13</sup> without being confronted with a high back pressure, low surface accessibility due to

Table 3. Analytical Methods for the Determination of Bisphenols and Their Derivatives<sup>a</sup>

analytes	matrix	sample amount	sample preparation, extraction time	analytical technique	LOD, $\mu\text{g L}^{-1}$	ref
A, AF, AP, C, F, S, TBBPA, TCBPA, TDP	sea water, river water and grape juice	200 mL	dsPE- hollow carbon spheres 30 s	HPLC-DAD	0.050–0.53	2
A, AF, B, F, S, TPA	human serum	10 mL	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @COF nanocomposites 10 min	HPLC-MS	1–78.1 $\times 10^{-3}$	4
A, B, F, E, BFDGE, bisphenols digicydil ethers and their derivatives	canned food	200 mg	SUPRAS 30 min	HPLC-FL	0.3–1.1	28
A, F, Z, 4TBP	drinks and food	2 mL diluted to 10 mL	SBSE 4 h	GC-MS	4.7–12.5 $\times 10^{-3}$	33
A, F, Z	personal care products	120 mg in 10 mL	SBSE 3 h	GC-MS	8 $\times 10^{-3}$	34
21 bisphenols, bisphenols digicydil ethers and their derivatives	dairy products	5 g	QuEChERS	UHPLC-MS/MS	0.8–200 $\times 10^{-3}$	29
A	river water	50 $\mu\text{L}$	PA nanofibers	online UHPLC-FL	0.6	13
A, AF, B, E, F, P, S	plastic packaged baby food	2 g	QuEChERS	GC-MS/MS	0.1–1	27
A	milk	30 mL	DMIP coated stir bar 1 h + 20 min	HPLC-FL	6.84 $\times 10^{-3}$	35
A, 4TBP, DHBP, TBBPA	tap water	25 mL	DMIPs coated stir bar 5 h	HPLC-FL	5.70 $\times 10^{-3}$	36
A	aqueous sample	10 mL	CN–polyamide coated stir-bar 4 h	HPLC-UV	0.3	37
A, AF, BP, AP, C, G, M, Z	natural waters	100 mL	Semidispersive $\mu\text{PCL/nPCL}$ SPE 50 min +35 min	HPLC-DAD	0.1–2.1	this work

<sup>a</sup>A - bisphenol A, AF - bisphenol AF, AP - bisphenol AP, B - bisphenol B, BP - bisphenol BP, C - bisphenol C, CN - carbon nanotubes, DHBP - 4,4'-dihydroxybiphenyl, DMIP - dummy molecularly imprinted polymer, E - bisphenol E, F - bisphenol F, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@COF - magnetite modified covalent organic framework, M - bisphenol M, P - bisphenol P, PA - polyamide SBSE - stir bar sorptive extraction, QuEChERS - Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe sample preparation technique, S - bisphenol S, SUPRAS - supramolecular solvents, 4TBP - 4-*tert*-butylphenol, TBBPA - tetrabromobisphenol A, TCBPA - tetrachlorobisphenol A, TDP - 4,4'-Thiodiphenol, Z - bisphenol Z.

overcompression of fibers, or channeling due to lose and improper compaction.

The proposed cages allow the use of a fibrous flocculent sorbent in direct contact with the sample and allow sample permeation through the sorbent wad. In contrast, other stirring device, e.g., the earlier reported rotating disks format, are based on commercial sorbents either integrated into a polymer membrane matrix<sup>31</sup> or covered by a membrane filter<sup>32</sup> causing the effective contact surface of the sorbent with the sample to be significantly decreased.

The seeming disadvantage of 1:1 extract dilution with water before injection enabled the efficient retention of the analytes on the HPLC column and the injection of a large volume without affecting the separation. On the contrary, retention times, peak resolution, and peak areas were affected using pure methanolic and, even more so, pure ethanolic extracts. Evaporation of the extract and analyte redissolution into a suitable volume for injection was not considered due to the risk of analyte loss and contamination and, in particular, additional time and procedural effort.

Increase in the sample volume beyond the applied 100 mL was not tested as a possibility to further enhance the method sensitivity as this would have required prolonging the extraction time instead of just demonstrating proof-of-concept using a new and efficient extraction device.

Many approaches have been proposed addressing bisphenol determination in different matrices. Table 3 lists recently developed methods for bisphenols preconcentration and determination in natural waters, canned food, baby food, personal care products, and other sources. The most noteworthy general benefit of the presented method is procedural simplicity. Zhang applied dispersive SPE with hollow porous carbon spheres within only 30 s.<sup>2</sup> However, samples had to be filtered and evaporated, thus prolonging the

analysis time while risking loss of the analyte. Chen synthesized magnetic sorbent nanoparticles with short extraction and stripping times and LOD values similar or higher than with our method.<sup>4</sup> The method reported by Alabi required careful preparation and handling of a SUPRAS extractant, vortexing, and centrifugation.<sup>28</sup> LOD values were only comparable to our outcomes although more sensitive fluorescence detection was involved. Besides, a few methods based on stir bar sorptive extraction for the preconcentration of multiple bisphenols were reported.<sup>33,34</sup> The extraction and stripping times ranging from 1 to 5 h were in general significantly longer than those typical of our method.<sup>33–36</sup> In some cases, harsh organic solvents such as chloroform had to be used for stripping,<sup>37</sup> whereas methanol, used in this work, can be easily regarded as a green alternative.

Compared to stir bars with elaborated coatings,<sup>20</sup> our device showed the advantages of simple preparation, i.e., loading of the fiber sorbent that can be changed as suitable for the analytical problem, and mechanical stability of the fibrous sorbent, while thermal desorption would be not feasible.

## CONCLUSIONS

3D printed polypropylene cages with integrated magnetic stirring bar were developed for housing polymer nanofibers that are an emerging sorbent material for solid phase extraction. This device simplified handling of nano- and microfibers and enabled merging the benefits of both dispersive solid phase extraction and stir bar sorptive extraction. Our devices were filled with composite PCL nano- and microfibers and successfully applied to the enrichment of eight bisphenols from surface waters with posterior separation using HPLC.

The extraction times of the presented method were significantly shorter than those required in typical stir bar extractions. The fibrous sorbent present in the cage and the manual procedure were sufficiently robust to allow repeated application for up to five times without impairing the extraction efficiency or analyte recoveries. Also, no sorbent washing was required which allowed the reduction of the procedural steps.

Collected samples were processed simply after sedimentation of particulate matter without further treatment. Problems with pressure or low capacity typical for online HPLC and low-pressure systems were omitted. Excellent linearity and recovery values proved the suitability of our devices and method developed for pollutants determination in natural water. Continuing developments will focus on further improvements in preconcentration, e.g., via including an additional step of solvent evaporation and gain in sensitivity by fluorescence detection as well as procedural automation.

Thus, our stirring cage currently represents a simple-to-use device that facilitates the workflow while handling environmental waters. It also opens new avenues for a diversity of applications including determination of other analytes and potentially also for handling of other liquid matrices.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.9b05455>.

1. Information on the used model analytes; 2. printing parameters for magnetic stirring cages for nanofiber extractions; 3. photographic documentation of cage fabrication, assembly, and use; 4. characteristics of the nPCL/ $\mu$ PCL fibers; 5. optimization of the extraction variables; 6. chromatograms of standard, sample, and spiked sample (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

**Burkhard Horstkotte** – Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, Hradec Králové 50 005, Czech Republic; [orcid.org/0000-0003-2337-9634](https://orcid.org/0000-0003-2337-9634); Phone: +420 495 067 183; Email: [horstkob@faf.cuni.cz](mailto:horstkob@faf.cuni.cz)

### Authors

**Ivana H. Šrámková** – Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, Hradec Králové 50 005, Czech Republic

**Jakub Erben** – Faculty of Textile Engineering, Department of Nonwovens and Nanofibrous Materials, Technical University of Liberec, 461 17 Liberec, Czech Republic

**Jiří Chvojka** – Faculty of Textile Engineering, Department of Nonwovens and Nanofibrous Materials, Technical University of Liberec, 461 17 Liberec, Czech Republic

**František Švec** – Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, Hradec Králové 50 005, Czech Republic

**Petr Solich** – Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, Hradec Králové 50 005, Czech Republic 50 005 Hradec Králové, Czech Republic

**Dalibor Šatinský** – Department of Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Charles University, Hradec Králové 50 005, Czech Republic

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acs.analchem.9b05455>

## Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

This project was supported by the project EFSA-CDN (No. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000841) cofunded by ERDF. The authors also acknowledge the support of the Czech Science Foundation through project No. 20-19297S. The authors are thankful to Mgr. Juraj Martiška for carrying out the mechanical stability tests and to Mgr. Pavel Jakubec for discussion concerning the fiber mechanical stability.

## ■ REFERENCES

- (1) Caballero-Casero, N.; Lunar, L.; Rubio, S. *Anal. Chim. Acta* **2016**, *908*, 22–53.
- (2) Zhang, Z.; Zhang, J.; Wang, Y.; Tong, Y.; Zhang, L. *Talanta* **2017**, *167*, 428–435.
- (3) Yang, J. J.; Li, Y.; Wang, J. C.; Sun, X. L.; Chen, J. P. *Sepu* **2015**, *33* (5), 468–474.
- (4) Chen, L.; He, Y. T.; Lei, Z. X.; Gao, C. L.; Xie, Q.; Tong, P.; Lin, Z. *Talanta* **2018**, *181*, 296–304.
- (5) Háková, M.; Chocholoušová, H.; Havlíková, L.; Solich, P.; Švec, F.; Šatinský, D. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2019**, *110*, 81–96.
- (6) Reyes-Gallardo, E. M.; Lucena, R.; Cárdenas, S. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2016**, *84*, 3–11.
- (7) Reneker, D. H.; Chun, I. *Nanotechnology* **1996**, *7* (3), 216–223.
- (8) McCulloch, J. G. *Int. Nonwovens J.* **1999**, *8*, 139–149.
- (9) Zhang, H.; Xu, H. J. *Chromatogr. A* **2017**, *1521*, 27–35.
- (10) Yan, Z.; Wu, M.; Hu, B.; Yao, M.; Zhang, L.; Lu, Q.; Pang, J. J. *Chromatogr. A* **2018**, *1542*, 19–27.
- (11) Arabsorkhi, B.; Sereshti, H. *Microchem. J.* **2018**, *140*, 241–247.
- (12) Golzari Aqda, T.; Behkami, S.; Bagheri, H. *J. Chromatogr. A* **2018**, *1574*, 18–26.
- (13) Háková, M.; Chocholoušová, H.; Havlíková, L.; Chvojka, J.; Solich, P.; Šatinský, D. *Talanta* **2018**, *178*, 141–146.
- (14) Asiabi, M.; Mehdinia, A.; Jabbari, A. *Microchim. Acta* **2017**, *184* (11), 4495–4501.
- (15) Bagheri, H.; Khanipour, P.; Roostaie, A. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1433*, 34–40.
- (16) Qi, F. F.; Li, X. Q.; Yang, B. Y.; Rong, F.; Xu, Q. *Talanta* **2015**, *144*, 129–135.
- (17) Šrámková, I. H.; Carbonell-Rozas, L.; Horstkotte, B.; Háková, M.; Erben, J.; Chvojka, J.; Švec, F.; Solich, P.; García-Campaña, A. M.; Šatinský, D. *Talanta* **2019**, *197*, 517–521.
- (18) David, F.; Ochiai, N.; Sandra, P. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2019**, *112*, 102–111.
- (19) Rykowska, I.; Wasiak, W. *Acta Chromatogr.* **2013**, *25*, 27–46.
- (20) Gilart, N.; Marcé, R. M.; Borrull, F.; Fontanals, N. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2014**, *54*, 11–23.
- (21) Gross, B.; Lockwood, S. Y.; Spence, D. M. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (1), 57–70.
- (22) Cocovi-Solberg, D. J.; Worsfold, P. J.; Miró, M. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2018**, *108*, 13–22.
- (23) Cousins, I. T.; Staples, C. A.; Klečka, G. M.; Mackay, D. *Hum. Ecol. Risk Assess.* **2002**, *8* (5), 1107–1135.
- (24) Pivnenko, K.; Pedersen, G. A.; Eriksson, E.; Astrup, T. F. *Waste Manage.* **2015**, *44*, 39–47.
- (25) Liao, C.; Liu, F.; Alomirah, H.; Loi, V. D.; Mohd, M. A.; Moon, H.-B.; Nakata, H.; Kannan, K. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46* (12), 6860–6866.

- (26) Liao, C.; Liu, F.; Guo, Y.; Moon, H. B.; Nakata, H.; Wu, Q.; Kannan, K. *Environ. Sci. Technol.* **2012**, *46* (16), 9138–45.
- (27) García-Córcoles, M. T.; Cipa, M.; Rodríguez-Gómez, R.; Rivas, A.; Olea-Serrano, F.; Vilchez, J. L.; Zafra-Gómez, A. *Talanta* **2018**, *178*, 441–448.
- (28) Alabi, A.; Caballero-Casero, N.; Rubio, S. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1336*, 23–33.
- (29) Cheng, Y.; Nie, X.-M.; Wu, H.-Q.; Hong, Y.-H.; Yang, B.-C.; Liu, T.; Zhao, D.; Wang, J.-F.; Yao, G.-H.; Zhang, F. *Anal. Chim. Acta* **2017**, *950*, 98–107.
- (30) Háková, M.; Havlíková, L. C.; Chvojka, J.; Erben, J.; Solich, P.; Švec, F.; Šatinský, D. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1023*, 44–52.
- (31) Calderilla, C.; Maya, F.; Cerda, V.; Leal, L. O. *Talanta* **2019**, *202*, 67–73.
- (32) Arismendi, D.; Becerra-Herrera, M.; Cerrato, I.; Richter, P. *Talanta* **2019**, *201*, 480–489.
- (33) Cacho, J. I.; Campillo, N.; Vinas, P.; Hernandez-Cordoba, M. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1247*, 146–153.
- (34) Cacho, J. I.; Campillo, N.; Vinas, P.; Hernandez-Cordoba, M. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2013**, *78–79*, 255–260.
- (35) Zhan, W.; Wei, F.; Xu, G.; Cai, Z.; Du, S.; Zhou, X.; Li, F.; Hu, Q. *J. Sep. Sci.* **2012**, *35* (8), 1036–1043.
- (36) Sheng, N.; Wei, F.; Zhan, W.; Cai, Z.; Du, S.; Zhou, X.; Li, F.; Hu, Q. *J. Sep. Sci.* **2012**, *35* (5–6), 707–712.
- (37) Ayazi, Z.; Matin, A. A. *J. Chromatogr. Sci.* **2016**, *54* (10), 1841–1850.

## **Příloha 9**

# Poly- $\epsilon$ -caprolactone Nanofibrous Polymers: A Simple Alternative to Restricted Access Media for Extraction of Small Molecules from Biological Matrixes

Hedvika Raabová, Martina Háková, Lucie Chocholoušová Havlíková, Jakub Erben, Jiří Chvojka, Petr Solich, František Švec, and Dalibor Šatínský\*

Cite This: <https://dx.doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00544>

Read Online

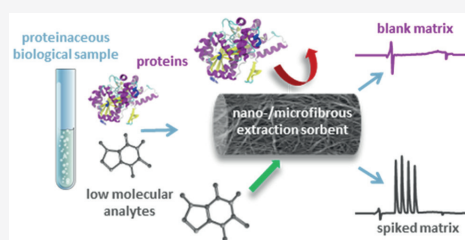
ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

**ABSTRACT:** Poly- $\epsilon$ -caprolactone nanofibrous polymer has been used as an alternative to restricted access media for extraction of protein-containing biological samples and direct transfer in the chromatographic system. Three commercial cartridges differing in length and internal diameter have been manually packed with the composite material prepared from poly- $\epsilon$ -caprolactone nanofibers coated on poly- $\epsilon$ -caprolactone microfibrillar scaffold and connected to the column-switching chromatographic system. Bovine milk and human serum (25  $\mu$ L) spiked with a mixture of methyl-, ethyl-, propyl-, and butylparaben in a concentration range of 1–100  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> were online extracted using the cartridge-containing fibers. Then, 5 and 20% (v/v) aqueous methanol was applied as the washing mobile phase. While the ballast protein macromolecules were quantitatively eluted from the nano/microfibrillar composite sorbent, the parabens were retained. After the mobile phase was switched to a stronger one, these compounds were then eluted from the extraction sorbent, directed in the analytical column, and finally separated. An extraction efficiency of 86–101% for all parabens achieved using the optimum-sized cartridge and a repeatability of the extraction procedure of 0.06–1.95% RSD were obtained.



Nanomaterials became widely used in recent years in a variety of research areas, including analytical chemistry. For example, nanofibers and nanotubes found applications in sample pretreatment procedures.<sup>1</sup> By definition, the sample pretreatment aims at selective and quantitative isolation of an analyte from the matrix, resulting in minimization or even elimination of matrix interferences. Therefore, this step plays an important role in the entire analytical procedure. The requirements for fast automated sample preparation methods are rapidly increasing with the development of new analytical methods and instruments. The ideal sample preparation method should be selective, sensitive, cost-effective, fully automated, and environmentally friendly.<sup>2,3</sup> Despite notable advances in this field, the sample preparation approaches concerning biological samples remain the “Achilles’ heel” of the analytical process because of complexity of the typical biological matrixes. For example, proteins present in the matrix can irreversibly damage sampling and extraction devices, decrease chromatographic column efficiency, and negatively affect the entire process through their adsorption and/or precipitation.<sup>4–6</sup> On top of the desired purification, pre-concentration is also often required because the low molecular weight analytes are present in biological fluids at trace levels. Therefore, the development of novel techniques allowing the

direct or online sample cleanup in analytical instrumentation is a paramount task.<sup>2,7</sup>

In the case of the protein-containing matrix, restricted access media (RAM) coupled with column-switching chromatography provides an effective path to automation of sample pretreatment, and their use decreases the total analysis time. RAM was developed for removal of proteins from biological matrixes and enabled separation of the low molecular weight compounds present in the sample in a single step.<sup>8</sup> The exclusion mechanism of conventional RAM is based on the concept of a chemical or physical barrier or a combination of both.<sup>9</sup> RAM particles typically feature two surfaces, inner and outer, both of them covered with functionalities determining their physicochemical properties.<sup>10</sup> For example, in systems suitable for reverse-phase separation of small molecules, the outer surface covered with hydrophilic moieties creates a chemical barrier that avoids interaction with biomacromole-

Received: February 7, 2020

Accepted: April 21, 2020

Published: April 21, 2020

cules. The small pore size of the solid support contributes to the selectivity via size exclusion mechanism, preventing penetration of large molecules to the inner surface, thus representing a physical barrier. The hydrophobic functionalities on the inner pore surface care for the retention of low molecular weight analytes. New trends in RAM combine the above-mentioned concepts with others, including molecular imprinting, magnetic nanoparticles, ion exchange sorbents, and advanced nanotubes to achieve better selectivity, specificity, and extraction efficiency.<sup>9,11</sup>

The most common approach includes connection of a RAM column to a two-position switching valve to create an online extraction chromatographic system. The extraction of small molecules and removal of the large counterparts is carried out using the RAM column at the initial valve position. After switching the valve, the analytes are eluted from the RAM column, transferred in the analytical column, and separated. Using this approach, the direct injection of complex samples containing proteins in this chromatographic system is possible without damaging the column.<sup>12,13</sup>

RAM-like systems prepared from nanotubes and nanoparticles reported in recent years were successfully used for extraction of both organic and inorganic molecules.<sup>9</sup> However, we did not find any reports describing use of nanofibers as an affordable alternative to RAM.

We observed in our previous studies the excellent extraction ability of composite material based on a combination of poly- $\epsilon$ -caprolactone (PCL) nanofibers with PCL microfibers.<sup>14,15</sup> This material was prepared using a technology coupling electrospinning with meltblown, producing nano/microfibrous material.<sup>16</sup> Surprisingly, we found now that the PCL composite can be used as a novel and efficient alternative to RAM sorbents. In this letter, we describe application of this composite in the online solid phase extraction (SPE)/chromatography system for the direct analysis of parabens in complex protein-containing matrixes human serum and bovine milk.

## EXPERIMENTAL SECTION

A complete description of materials, instrumentation, and preparation of extraction cartridges is available in the Supporting Information.

## RESULTS AND DISCUSSION

**Protein Elution.** Before the online extraction experiments, the efficiency of protein exclusion was evaluated in the offline mode. Both milk and serum pretreated as described in Supporting Information 1 were directly injected in the 10 × 4.6 mm internal diameter extraction cartridge PCL-2 packed with the composite fibers connected directly to the UV detector. Then, the extraction unit was washed with 5% (v/v) for serum and 20% (v/v) aqueous methanol for milk. The higher percentage of methanol used in milk analysis was needed to remove the higher content of residual interferences. The flow rate of the washing mobile phase was 1.0 and 2.5 mL min<sup>-1</sup> for serum and milk, respectively. Proteins eluted from the extraction unit were monitored at their absorption maximum of 280 nm. A very fast elution of proteins from nanofibrous sorbent was observed already during the first minute of washing. The detector signal reached the baseline again after 30 s with injected human serum and in less than 1 min with milk, as shown in Supporting Information 3. These

measurements confirmed that nanofibrous sorbents did not adsorb the proteins.

To demonstrate the inability of the PCL composite fibers to adsorb proteins, we carried out adsorption experiments with the hydrophobic protein bovine serum albumin (BSA) dissolved in water. Even under these conditions in a complete absence of any organic solvent, we did not observe adsorption of this protein, as confirmed by the early elution of BSA in the stream of water, and there was no presence of any additional substantial peak on the baseline after applying acetonitrile (Figure 1). In fact, this behavior is surprising with respect to

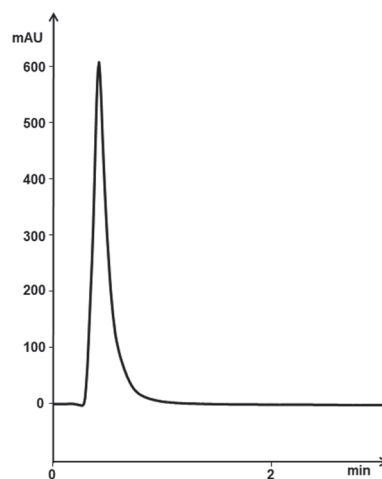


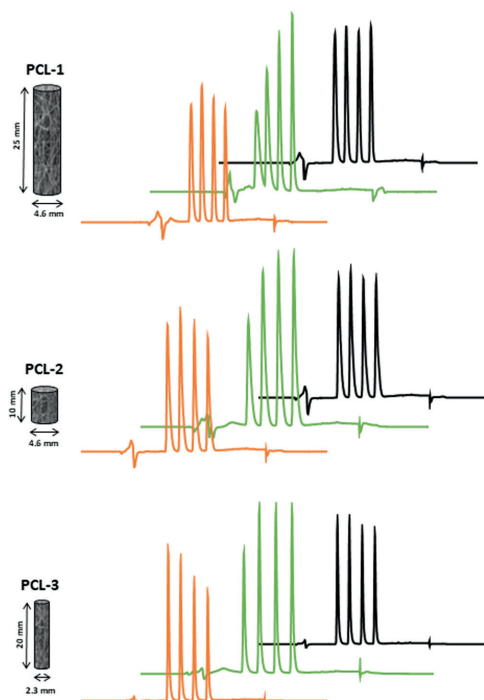
Figure 1. Elution profile of a 10  $\mu$ L BSA solution injected in the stream of water using PCL-2 cartridge directly attached to the UV detector.

previous studies of protein adsorption on PCL-based structures in formats different from nanofibers. For example, a typical PCL film adsorbed BSA at a rate of up to 35 ng/cm<sup>2</sup>, and the extent of adsorption depended on the surface morphology of the films.<sup>17</sup> Recent molecular dynamics studies revealed that PCL/poly(vinyl alcohol) coelectrospun scaffolds strongly adsorbed proteins such as fibronectin and collagen.<sup>18,19</sup> Therefore, we speculate that the reason for absence of adsorption of proteins is the morphology of our PCL nano/microcomposite fibers resulting from the method of their preparation. The observed effect is likely related to the curvature of the nanofibers so that the large protein molecules do not have enough flexibility to be multipoint attached to the highly curved nanofiber to get retained, while this is not an issue for the small molecule counterparts. Moreover, the extent of hydrophobicity of PCL itself may play a certain role as well.

The chromatograms of blank serum after using each PCL cartridge (Supporting Information 4 Figure S-3a) confirm no protein interferences in retention window of parabens. The situation is slightly different for milk extraction because a small interfering peak at the time typical of retention time of methylparaben was observed (Figure S-3b).

To further confirm the absence of residual proteins in the cartridge after the washing step, we used the spiked matrixes. The contents of the cartridge after extraction and washing were

transferred in the analytical column and eluted in the gradient of the mobile phase. The efficiency of the cleanup procedure using all three PCL cartridges under optimized conditions is demonstrated with chromatograms in Figure 2. No effect on the separation and peak shape was observed.



**Figure 2.** Chromatograms of parabens spiked in serum (orange trace) and milk (green trace), and their comparison with standard (black trace) solution after using cartridges PCL-1, PCL-2, and PCL-3.

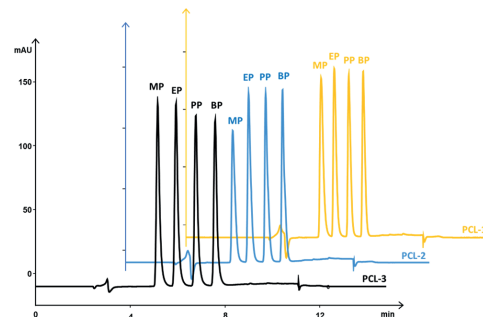
**Optimization of Online Extraction.** Protein elution from all three cartridges varying in dimensions containing the fibrous sorbent was tested with both serum and milk spiked with parabens. The extraction conditions including time of valve switch, flow rate, and concentration of methanol in the washing mobile phase were optimized.

The time of the extraction step depended on the amount of the composite sorbent in the extraction cartridge. The larger quantity of nanofibers in the cartridge, the slower the elution of the ballast macromolecules. Therefore, PCL-1 had to be rinsed with the washing mobile phase for a longer time than PCL-3 to ensure removal of all undesired components originating from the matrix. The extraction time could be decreased after an increase in the flow rate. This observation indicates that no adsorption/desorption kinetics was involved in the process, and the washing was simply a function of the washing mobile phase volume.

The washing mobile phase with 5, 10, 15, and 20% (v/v) aqueous methanol was used for both milk and serum matrixes. The recovery of retained parabens decreased with the

increasing concentration of the organic component in the washing mobile phase. Also, smaller quantities of parabens were retained on fibers when the time of the washing step was extended. These findings suggested that parabens were adsorbed weakly and desorbed as the percentage of methanol increased. Therefore, optimization of the washing step was important to achieve a compromise between complete removal of proteins while retaining all the parabens. We found that 20% aqueous methanol was needed to elute proteins contained in the milk matrix, whereas 5% aqueous methanol was sufficient for elution while using serum as the matrix. Further experiments were carried out at flow rates of 0.5–2.5 mL min<sup>-1</sup>, and time of valve switch after 1–3 min. The optimum extraction conditions that differed for each cartridge are shown in Supporting Information 5.

**Linearity and Repeatability of Extraction.** The different dimensions of the extraction cartridges affected primarily the time of analysis and retention of interferences (vide supra). However, the different lengths of the cartridges did not lead to any dispersion in paraben peaks and worsening in their symmetry as demonstrated with chromatogram of standard solutions in Figure 3. The matrix calibration curves for all three



**Figure 3.** Demonstration of peak symmetry for standard solution of parabens after extraction using PCL-1, PCL-2, and PCL-3 cartridges.

extraction PCL devices prepared for parabens at concentrations ranging from 1 to 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and measured in triplicates had the correlation coefficient over 0.98. Repeatability of injection was evaluated from six injections at each concentration level and the values did not exceed 5% RSD. The results of the method linearity and repeatability are summarized in the Supporting Information 6.

**Recovery of Extraction.** The extraction efficiency of each PCL cartridge was tested at three concentration levels at bottom, middle, and upper level of the calibration curve, i.e. at 1, 20, and 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The recoveries for both serum and milk are shown in Supporting Information 7. Our results confirmed that efficiency of protein exclusion and simultaneous retention of parabens from serum was similar no matter which one of the three PCL cartridges was used. The recovery of parabens also determined in triplicates was found at levels ranging from 78 to 99% for PCL-1, 78–118% for PCL-2, and 91–112% for PCL-3 cartridge. A less effective removal of interferences was observed in experiments with milk. The recoveries of methylparaben and ethylparaben were negatively affected because the residual interferences increased the signal and thus the recovery values. For example, the recovery of



methylparaben at the lowest concentration level was 222% using cartridge PCL-1. The effect on recovery determination was significant primarily on PCL-1 and PCL-3, while recoveries on PCL-2 were found in a reasonable range of 86–103%. This result confirms another effect of size of the cartridge. The PCL-1 is the cartridge with the highest quantity of the nano/microfibrous sorbent. Therefore, it is possible that the more resistant interferences like fats were not washed out properly. However, changing the extraction step conditions would lead to loss of the analytes as mentioned above. Similarly, the PCL-3 was filled with the smallest amount of sorbent that could not handle the entire sample.

**Comparison with Commercial RAM Sorbent.** The performance of PCL cartridges was compared with commercially available ADS C18 sorbent commonly used for the online extraction of biological samples. The pretreated milk and serum were spiked with  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  parabens. The extraction efficiency presented in Supporting Information 8 is expressed as a percent recovery. It shows that the recoveries after extraction were compared to those obtained for samples analyzed without extraction step.

The bar diagram in Supporting Information 8 also confirms that the extraction efficiency of our fibrous sorbents was comparable or even better than the commercial ADS C18 sorbent. The recovery using ADS C18 was 29–35% lower for propyl- and butylparaben in serum, most likely due to their adsorption on lipoproteins present in the matrix. In contrast, recoveries of parabens from milk using ADS C18 were reduced only by about 15%.

**Reusability.** Overall, the composite micro/nanofibrous material in the tested extraction PCL cartridges was used more than 300 times during optimization of variables including flow rate, washing mobile phase composition, and the time of washing, and no change in the extraction efficiency was observed. The back pressure in the chromatographic column increased slightly when the spiked milk matrix was analyzed. No pressure increase was monitored while analyzing the serum. The analytes have always been eluted in narrow peaks with a retention time less than 8 min, as shown in Figure 3. Peak asymmetry, which can serve as a probe evaluating changes in the chromatographic performance, did not vary during the entire study. Moreover, we did not notice any macroscopic or even SEM microscopic changes in the sorbents' appearance after removing them for the cartridge (Supporting Information 9). Because the extractions were carried out under different conditions, their direct comparison would be pointless.

Therefore, we used  $25 \mu\text{L}$  of milk and serum matrix each spiked with 5 and  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  and injected them 30 times in the system to confirm reusability of the sorbent in each extraction unit. The RSD values are collected in Supporting Information 9, Table S-5. The repeatability of the extraction procedure was in the range 0.42–8.48%. The repeatability values of over 5% and reduced recovery were observed for propyl- and butylparaben in serum. Their higher lipophilicity most likely caused their adsorption on serum lipoproteins, and their free fraction in the sample decreased over time. An even more pronounced effect was observed with commercial ADS C-18 sorbent for propyl- and butylparaben, as demonstrated with Figure S-4, Supporting Information 8.

## CONCLUSIONS

Our study demonstrated a new approach useful for the online extraction of small molecules from biological protein-containing matrixes before their chromatographic separation. The composite made from polycaprolactone micro- and nanofibers was successfully used as an extraction sorbent that did not adsorb proteins while retaining the small molecule analytes. Our approach features simplicity of the extraction unit, enables rapid extraction, and the material is easy to prepare. For example, the now commercial Pinkerton's packed RAM columns were prepared using a multistep procedure. It obviously begins with the production of porous silica beads. The next step includes a complete hydrophobization of the entire surface of small-pore silica beads, and then an enzyme that is totally excluded from the inner pores cleaves the hydrophobic moieties only at the outer surface of beads while rendering the surface hydrophilic. The hydrophobic groups within the pores remain unchanged. In contrast, material we propose is prepared in a single step via a common technology coupling electrospinning with meltblown producing nano/microfibrous sorbent. Our nanofibers can also be easily modified to obtain tailor-made sorbents for a broad spectrum of analytes. The simple access to fibrous sorbents with different chemistries facilitates selective extraction that is one of the main goals of the modern sample pretreatment techniques. The implementation presented in this paper clearly demonstrated simplicity of the approach. On top of that, our preparation is a technology that can be easily scaled up. Thus, units for selective extraction can be fabricated in any size as opposed to the typical RAM sorbents for which multistep preparation is tedious and not suitable for large scale operations. Our extraction cartridges could be used for at least 300 analyses without losing efficiency and affecting the chromatographic separation performance. We demonstrated that the PCL nanofiber sorbents are a promising alternative to conventional RAM sorbents and can achieve a faster and easier pretreatment of protein-containing samples in food and bioanalysis. Our future experiments will focus on the evaluation of different types of polymers in fiber formats to control their chemistry and to open new vistas for their use in numerous innovative applications.

## ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.0c00544>.

Experimental section, chromatographic system, protein removal, biological matrixes, extraction conditions, linearity and repeatability of extraction, recovery, comparison with commercial RAM sorbent, and reusability (PDF)

## AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

Dalibor Šatinský – Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry, Charles University, 50005 Hradec Králové, Czech Republic; [orcid.org/0000-0002-4057-9542](https://orcid.org/0000-0002-4057-9542); Email: [satinsky@faf.cuni.cz](mailto:satinsky@faf.cuni.cz)

**Authors**

**Hedvika Raabová** – Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry, Charles University, 50005 Hradec Králové, Czech Republic

**Martina Háková** – Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry, Charles University, 50005 Hradec Králové, Czech Republic

**Lucie Chocholeušová Havlíková** – Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry, Charles University, 50005 Hradec Králové, Czech Republic

**Jakub Erben** – Faculty of Textile Engineering, Department of Nonwovens and Nanofibrous Materials, Technical University of Liberec, 46001 Liberec 1, Czech Republic

**Jiří Chvojka** – Faculty of Textile Engineering, Department of Nonwovens and Nanofibrous Materials, Technical University of Liberec, 46001 Liberec 1, Czech Republic

**Petr Solich** – Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry, Charles University, 50005 Hradec Králové, Czech Republic

**František Švec** – Faculty of Pharmacy, Department of Analytical Chemistry, Charles University, 50005 Hradec Králové, Czech Republic

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/10.1021/acs.analchem.0c00544>

**Notes**

The authors declare no competing financial interest.

**ACKNOWLEDGMENTS**

Financial support of the GAČR project no. 20-19297S is gratefully acknowledged. H.R. and M.H. acknowledge the financial support of specific research SVV 260 412 and GAUK project no. 766 218. EFSA-CDN project (no. CZ.02.1.01/0.0/0.0/16\_019/0000841) cofunded by ERDF is also gratefully acknowledged.

**REFERENCES**

- (1) Plotka-Wasyłka, J.; Szczepańska, N.; de la Guardia, M.; Namieśnik, J. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2016**, *77*, 23–43.
- (2) Medvedovici, A.; Bacalum, E.; David, V. *Biomed. Chromatogr.* **2018**, *32*, 1–23.
- (3) Kole, P. L.; Venkatesh, G.; Kotecha, J.; Sheshala, R. *Biomed. Chromatogr.* **2011**, *25*, 199–217.
- (4) Sadílek, P.; Šatinský, D.; Solich, P. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2007**, *26*, 375–384.
- (5) de Paula, F. C. C. R.; de Pietro, A. C.; Cass, Q. B. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1189*, 221–226.
- (6) Clark, K. D.; Zhang, C.; Anderson, J. L. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 11262–11270.
- (7) Du, B.; Qu, T.; Chen, Z.; Cao, X.; Han, S.; Shen, G.; Wang, L. *Talanta* **2014**, *129*, 465–472.
- (8) Pinkerton, T. C. *J. Chromatogr. A* **1991**, *544*, 13–23.
- (9) de Faria, H. D.; de Carvalho Abrao, L. C.; Santos, M. G.; Barbosa, A. F.; Figueiredo, C. E. *Anal. Chim. Acta* **2017**, *959*, 43–65.
- (10) Yang, S. H.; Fan, H.; Classon, R. J.; Schug, K. A. *J. Sep. Sci.* **2013**, *36*, 2922–2938.
- (11) Xiao, D.; Liu, S.; Liang, L.; Bi, Y. *Microchim. Acta* **2016**, *183*, 1417–1423.
- (12) Baghdady, Y. Z.; Schug, K. A. *J. Sep. Sci.* **2016**, *39*, 4183–4191.
- (13) Papouskova, B.; Fan, H.; Lemr, K.; Schug, K. A. *J. Sep. Sci.* **2014**, *37*, 2192–2199.
- (14) Hakova, M.; Havlikova, L. C.; Chvojka, J.; Svec, F.; Solich, P.; Satinsky, D. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1018*, 26–34.
- (15) Hakova, M.; Havlikova, L. C.; Chvojka, J.; Erben, J.; Solich, P.; Svec, F.; Satinsky, D. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1023*, 44–52.

(16) Erben, J.; Pilarova, K.; Sanetnik, F.; Chvojka, J.; Jencova, V.; Blazkova, L.; Havlicek, J.; Novak, O.; Mikes, P.; Prosecka, E.; Lukas, D.; Kuzelova Kostakova, E. *Mater. Lett.* **2015**, *143*, 172–176.

(17) Khampieng, T.; Yamassatien, V.; Ekabutr, P.; Pavasant, P.; Supaphol, P. *Adv. Polym. Technol.* **2018**, *37*, 2030–2042.

(18) Shamloo, A.; Sarmadi, M. *Integr. Biol.* **2016**, *8*, 1276–1295.

(19) Sarmadi, M.; Shamloo, A.; Mohseni, M. *PLoS One* **2017**, *12*, No. e0169451.

## **Příloha 10**

## Studium morfologie

Snímky vlákněné struktury byly generovány pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM) s použitím mikroskopu VEGA3 SBU – EasyProbe (Tescan, Brno, Česká republika) vybaveného wolframovou katodou. Skenování probíhalo při napětí 12 kV, apertuře 20  $\mu\text{m}$  a pracovní vzdáleností 10–14 mm. Suché vzorky byly před analýzou potaženy vrstvou zlata o tloušťce 10 nm.

Studium morfologie jednotlivých vzorků bylo provedeno pomocí softwaru pro analýzu obrazu NIS Elements (Nikon, Rakousko). Pro měření průměrů vláken bylo pořízeno 5 SEM snímků (zvětšení 1000x) z různých míst příslušného vzorku. U každého vzorku bylo naměřeno 300 průměrů vláken. Naměřené hodnoty byly dále podrobeny statistické analýze.

Distribuce velikosti průměrů pórů byla měřena použitím kapilárního průtokového porometru 3G zH (Anton Paar, Rakousko). Tři disky o průměru 47 mm a měřené ploše 500 mm<sup>2</sup> byly testovány minerálním olejem v tlakovém rozsahu 0–1 MPa, pro každý vzorek.

Ke stanovení celkové porozity byla použita gravimetrická metoda pro vzorky o rozměru 50 x 50 mm. Tloušťka byla měřena pomocí stolního mikrometru 49-63 (TMI, USA) s tlakem 400 Pa podle standardní zkušební metody EDANA – NWSP 120.1.R0 (15). Pro konečný výpočet byla použita hmotnost a objem měřeného vzorku ve vztahu k hustotě polykaprolaktonu (1,145 g/cm<sup>3</sup>).

Analýza specifického měrného povrchu (BET) byla provedena na přístroji Autosorb iQ (Quantachrome, Rakousko) ve standardním režimu. Vlákenný vzorek (1000 mg) byl vložen do skleněné cely o průměru 12 mm a před měřením odplyňován po dobu 4 8 hodin při 20 °C. Pro analýzu byl použit Krypton a data byla zpracována pomocí softwaru ASiQwin.

## Stabilitní testy

Tepelná stabilita PCL byla testována pomocí termogravimetrické analýzy (TGA) za použití termogravimetrického analyzátoru – Q500 (TA Instruments, USA). Experiment byl proveden v atmosféře syntetického kyslíku při průtoku 60 ml min<sup>-1</sup> v teplotním rozsahu 25 °C až 750 °C, při rychlosti ohřevu 10 °C min<sup>-1</sup>. Limit tepelné stability byl stanoven jako teplota, při které se hmotnost vzorku snížila o 0,3 % hm.

Krystalinita a přechodové teploty materiálu byly hodnoceny pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC). Byl použit kalorimetr – DSC 1/700 (Mettler Toledo, Urdorf, Švýcarsko). Kalibrace proběhla podle standardů india a zinku. Vzorky o hmotnosti 10 ± 0,5 mg byly analyzovány atmosféře N<sub>2</sub> s rychlostí ohřevu 10 °C min<sup>-1</sup> v rozmezí -50 °C – 150 °C. Stupeň krystalinity v % ( $X_c$ ) byl vzat z běhu zahřívání a vypočten jako:

$$X_c = [(\Delta H_m - \Delta H_c) / \Delta H_m^\circ] \times 100$$

kde  $\Delta H_m$  je entalpie tání a  $\Delta H_c$  je exotermická krystalizace stanovená z DSC a  $\Delta H_m^\circ$  je entalpie tání pro 100% krystalický polymer 135,21 J g<sup>-1</sup> PCL. Uvedené křivky představují ve všech případech průměry dvou samostatných měření.

Index toku taveniny (MFR), který popisuje tokové vlastnosti plastových materiálů, byla měřen pomocí plastometru (Ceast, Pianezza, Itálie) v rozsahu od 80 °C do 240 °C podle křivky TGA. Zatížení taveniny bylo 2,16 kg, tryska o průměru 0,8 mm. Pro každou teplotu bylo provedeno celkem 10 měření, po kterých následoval výpočet průměrných hodnot.

Potenciální posuny molární hmotnosti při procesu meltblown byly hodnoceny pomocí gelové permeační chromatografie (GPC) při využití vysokotlakého kapalinového chromatografu – Ultimate 3000 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Byla použita gelová kolona – PFG Micro 300A (Polymer Standards Service, Mainz, Německo) a detektor – Varian LC-385 ELSD (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). PCL byl rozpuštěn v 1,1,1,3,3,3-hexafluorisopropanolu (HFIP) do konečné koncentrace 2 mg/ml. Objem nástřiku jednotlivých vzorků byl nastaven na 15 ul. Početní a hmotnostní průměr molárních hmotností byly vypočteny pomocí polymethylmethakrylátových kalibračních standardů.

## **Biologické testy**

Potenciální cytotoxicita vláken byla testována podle normy ISO 10993-5. Z testovaných PCL vláken byl připraven extrakt o zvolené koncentraci 20 mg/ml. Tento materiálový extrakt byl poté testován buněčnou linií lidských nádorových osteoblastů (MG 63) po dobu 24 hodin v 96jamkové mikrotitrační destičce. Po nanesení materiálového extraktu na testované buňky byla sledována životaschopnost buněk. Životaschopnost byla stanovena pomocí kolorimetrického testu – CCK 8 (Dojindo Laboratories, Japonsko), který je založen na aktivitě enzymů (dehydrogenáz) v testovaných buňkách po dobu 72 hodin

Potenciální změny v degradačním profilu PCL vláken byly stanoveny na základě enzymaticky katalyzovaného procesu za využití enzymu pankreatické Lipázy (Sigma Aldrich, Česká republika). Tři vzorky příslušného materiálu hmotnosti 50 mg, byly inkubovány v 50 ml roztoku fosfátového pufru s 5 U.I lipázy při teplotě 30 °C, který byl u všech vzorků každých 24 hodin měněn. Vzorky pro příslušný testovací den, byly vyjmuty z lázně, vysušeny a zvaženy. Na základě hmotnostních úbytků byla sestavena degradační křivka.