

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Název práce

Analýza sulfonovaných polycyklických aromatických uhlovodíků a jejich
průmyslové použití

2023

Bc. Adéla Šemberová

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Analysis of sulfonated aromatic polycyclic hydrocarbons and their industrial
applications

Master thesis

2023

Bc. Adéla Šemberová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Adéla Šemberová**
Osobní číslo: **C21421**
Studijní program: **N0531A130028 Analytická chemie**
Téma práce: **Analýza sulfonovaných polycyklických aromatických uhlovodíků a jejich průmyslové použití**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

Zásady pro vypracování

1. V dostupné literatuře proveďte rešerši týkající se analýzy sulfonovaných polycyklických aromatických uhlovodíků a jejich průmyslového použití.
2. Navrhněte metodu pro analýzu vybraných sulfonovaných polycyklických aromatických uhlovodíků a aplikujte ji na předložené vzorky.
3. Dozažené výsledky kriticky zhodnoťte a diskutujte.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Jan Fischer, CSc.**
Katedra analytické chemie

Konzultant diplomové práce: **Ing. Kateřina Vyňuchalová, Ph.D.**
Synthesia a.s.

Datum zadání diplomové práce: **7. února 2023**

Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

L.S.

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D.
děkan

doc. Ing. Petr Česla, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Analýza sulfonovaných polycyklických aromatických uhlovodíků a jejich průmyslové použití jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že 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, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 27. 4. 2023

Bc. Adéla Šemberová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych touto cestou vyjádřila poděkování vedoucímu své diplomové práce panu doc. Ing. Janu Fisherovi, CSc. a konzultantům paní Ing. Kateřině Vyňuchalové, Ph.D. a panu Ing. Janu Vyňuchalovi, Ph.D. ze společnosti Synthesia a.s za jejich cenné rady, trpělivost, vstřícnost a ochotu při odborném vedení v laboratoři a nadále při zpracování mé diplomové práce.

Rovněž bych chtěla poděkovat rodině a přátelům za jejich podporu během celého mého studia.

ANOTACE

Zaměření této diplomové práce, ve spolupráci se společností Synthesia a.s., spočívá v analýze sulfonovaných aromatických polycyklických uhlovodíků používaných v různých aplikacích. Byly navrženy vhodné metody pro jejich kvalitativní analýzu a stanovení s následným porovnáním získaných výsledků. Diplomová práce je převážně zaměřená na analýzu sulfonovaných derivátů pyrenu izolovaného z dehtu, respektive benzolu a sulfonovaného naftalenu ve vzorcích plastifikátorů do betonů.

KLÍČOVÁ SLOVA

Elektrofilní aromatická sulfonace, separace sulfonovaných aromátů, pyren, naftalen, HPLC, CZE

TITLE

Analysis of sulfonated aromatic polycyclic hydrocarbons and their industrial applications

ANNOTATION

On my master thesis I am focusing on the analysis of sulfonated aromatic polycyclic hydrocarbons used in different applications. It is concerned with designing suitable methods for their qualitative analysis and determination with the final comparison of the results. The thesis is mainly focused on the analysis of sulfonated pyrene, the derivatives isolated from tar, respectively benzene and sulfonated naphthalene in concrete plasticizer samples. My thesis was realized in collaboration with the company Synthesia a.s.

KEYWORDS

Electrophilic aromatic sulfonation, separation of sulfonated aromatics, pyrene, naphthalene, HPLC, CZE

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ	11
SEZNAM TABULEK	13
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	15
ÚVOD.....	17
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	18
1.1 Synthesia a.s.	18
1.2 DEZA a.s.....	19
1.3 Sulfonované aromatické uhlovodíky	20
1.3.1 Sulfonace	20
1.3.2 Vybrané sulfonované aromatické uhlovodíky	20
1.3.2.1 Pyren	21
1.3.2.1.1 Sulfonovaný pyren a jeho aplikace	22
1.3.2.2 Naftalen.....	27
1.3.2.2.1 Sulfonovaný naftalen a jeho aplikace	28
1.4 Vysvětlení fluorescence.....	32
1.5 Vybrané techniky analýzy sulfonovaných aromatických látek	33
1.5.1 Kapalinová chromatografie.....	33
1.5.1.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, HPLC	33
1.5.1.1.1 Základní popis kapalinové chromatografie.....	34
1.5.1.1.2 Instrumentace v kapalinové chromatografii	36
1.5.2 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)	36
1.5.3 Metody analýzy sulfonovaných pyrenů	38
1.5.3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	38
1.5.3.2 Kapilární zónová elektroforéza.....	39
1.5.4 Metody analýzy sulfonovaných naftalenů	40
1.5.4.1 Analýza chromatografickými technikami.....	40
1.5.4.2 Analýza elektroforetickými technikami.....	42
2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	44
2.1 Chemikálie	44
2.1.1 Použitá rozpouštědla	44

2.1.2	Chemikálie pro přípravu pufru	44
2.1.3	Sulfonované pyreny	44
2.1.4	Sulfonované naftaleny	45
2.2	Přístrojové vybavení	46
2.2.1	Přístroje	46
2.3	Mobilní fáze	48
2.3.1	Mobilní fáze pro HPLC	48
2.3.2	Příprava elektrolytu pro CE	49
2.4	Postup přípravy sulfonovaného pyrenu.....	49
2.5	Optimalizované podmínky HPLC analýzy sulfonovaných pyrenů	49
2.5.1	Příprava kalibrační řady pro sulfonované pyreny	50
2.5.2	Příprava analyzovaných vzorků pro HPLC	51
2.6	Stanovení dalších látek ve vzorcích sulfonovaných pyrenů	51
2.7	Příprava vzorků a standardů pro UV/Vis spektrometrii.....	51
2.8	Příprava vzorků a standardů pro fluorescenční spektrometrii.....	52
2.9	Optimalizované podmínky CZE analýzy sulfonovaných pyrenů.....	52
2.9.1	Příprava kalibrační řady pro sulfonované pyreny	52
2.9.2	Příprava analyzovaných vzorků pro CZE	53
2.10	Optimalizované podmínky měření pro sulfonované naftaleny.....	53
2.10.1	Příprava kalibrační řady pro sulfonované naftaleny	54
2.10.2	Příprava analyzovaných vzorků pro HPLC	54
3	DISKUZE A VÝSLEDKY	55
3.1	Optimalizace separace sulfonovaných pyrenů pomocí HPLC	55
3.1.1	Spektrometrické analýzy vzorků a standardů sulfonovaného pyrenu	58
3.1.2	Kalibrační měření pro sulfonované pyreny pomocí HPLC	60
3.1.3	Shrnutí výsledků analýz sulfonovaných pyrenů pomocí HPLC	63
3.2	Optimalizace separace sulfonovaných pyrenů pomocí CZE	63
3.2.1	Kalibrační měření pro sulfonované pyreny pomocí CZE.....	67
3.2.2	Shrnutí výsledků analýz sulfonovaných pyrenů pomocí CZE.....	69
3.3	Porovnání výsledků stanovení tetrasulfonovaného pyrenů pomocí HPLC a CZE ..	70

3.4 Optimalizace separace sulfonovaných naftalenů pomocí HPLC	70
3.4.1 Kalibrační měření pro sulfonované naftaleny pomocí HPLC	77
3.4.2 Shrnutí výsledků analýz sulfonovaných naftalenů pomocí HPLC	82
ZÁVĚR	83
POUŽITÁ LITERATURA	84
PŘÍLOHA A: Sulfonované pyreny	88
PŘÍLOHA B: Sulfonované naftaleny	94

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: Struktura pyrenu (podle [8])	21
Obrázek 2: Substituce pyrenu (podle [8])	22
Obrázek 3: Fluoreskující pyren (vlevo)/sulfonovaný pyren (vpravo), (vlastní ilustrace)	24
Obrázek 4: Iont Zr^{IV} pokrytý sulfonovaným pyrenem [10]	25
Obrázek 5: Struktura naftalenu	27
Obrázek 6: Sikament® (podle [19])	30
Obrázek 7: Struktura Spolostanu, poly-napftalensulfonátu sodného (podle[20])	30
Obrázek 8: Jablonski diagram fluorescence a fosforescence (podle [17])	32
Obrázek 9: Obecné schéma kapalinového chromatografu (podle [24])	36
Obrázek 10: Schéma elektroforetického zařízení (podle [27])	38
Obrázek 11: Vzorky a standardy pyrenu/sulfonovaného pyrenu (vlastní ilustrace)	44
Obrázek 12: Standardy sulfonovaných naftalenů (vlastní ilustrace)	46
Obrázek 13: Kapalinový chromatograf Agilent 1260 Infinity II (vlastní ilustrace)	47
Obrázek 14: Kapilární elektroforéza Agilent $3^{D}CE$ 1700 (vlastní ilustrace)	48
Obrázek 15: Separace směsi standardu pyrenu a sulfonovaných pyrenů. Kolona: Kinetex® Polar C18, 15 cm x 3 mm, 100Å, 2,6 µm, gradientová eluce podle metody 3 (tabulka č. 8) průtok MF: 0,5 ml/min, detekce: UV 238 nm. STD 1: pyren-1-sulfonová kyselina, STD 2: pyren-1,3,6,8-tetrasulfonová kyselina, STD 3: pyren	56
Obrázek 16: HPLC separace vzorku 051/297A rozpuštěného v acetonitrilu, experimentální podmínky viz obrázek č.15	57
Obrázek 17: HPLC separace vzorku 051/297B rozpuštěného v acetonitrilu, experimentální podmínky viz obrázek č.15	57
Obrázek 18: UV/Vis spektrum vzorku 051/297A rozpuštěného ve vodě/rozpuštěného v ACN, změřeno na UV spektrometru SPECORD 50	58
Obrázek 19: Porovnání UV/Vis spektra nasulfonovaného vzorku pyrenu (051/266C v ACN) s pyrenem, změřeno na UV spektrometru SPECORD 50	59
Obrázek 20: Spektrum vzorku 051/297A, změřeno na FLD spektrofluorometru FluoroMax 4, záznam excitačního(absorpčního)/emisního(fluorescenčního) spektra vzorku	59
Obrázek 21: Kalibrační závislost STD 2 (1,3,6,8-tetrasulfonovaný pyren)	61
Obrázek 22: Optimalizovaná CZE separace standardů, nepokrytá křemenná kapilára o vnitřním průměru 75 µm, celková délka 75 cm (efektivní délka 62 cm), 0,05 mol/l tetraboritan sodný ve vodě (pH= 9,3) s přidavkem 0,01 mol/l β- cyklodextrinu; teplota: 25 °C, zvolené napětí: +25 kV, dávkování: 10 s x 50 mbar, přetlak: 35 mbar na straně dávkování, UV detekce: 230 nm; STD 1: pyren-1-sulfonová kyselina, STD 2: pyren-1,3,6,8-tetrasulfonová kyselina, STD 3: pyren	65
Obrázek 23: CZE separace vzorku 051/297A o koncentraci 0,2 mg/ml ve vodě, experimentální podmínky viz obrázek č.22	65
Obrázek 24: CZE separace vzorku 051/297B o koncentraci 0,2 mg/ml ve vodě, experimentální podmínky viz obrázek č.22	66
Obrázek 25: CZE separace vzorku 051/266C o koncentraci 0,2 mg/ml ve vodě, detekce, experimentální podmínky viz obrázek č.22, detekce: 230 nm	66
Obrázek 26: Kalibrační závislost pro STD 2 (1,3,6,8-tetrasulfonovan pyren)	68

Obrázek 27: Optimalizovaná HPLC podmínky separace standardů sulfonovaných derivátů naftalenů, Kolona: Kinetex® Polar C18, 15 cm x 2,6 mm, 100Å, 2,6 μm, gradientová eluce podle metody 3 (tabulka č. 26, průtok: 0,5 ml/min, detekce: UV 228 nm	72
Obrázek 28: Optimalizovaná HPLC separace standardů sulfonovaných derivátů naftalenů, metoda 3, experimentální podmínky viz obrázek č. 27	73
Obrázek 29: Optimalizovaná HPLC vzorku Spolostanu 7G rozpuštěného ve vodě o koncentraci 1 g/l, metoda 3, experimentální podmínky viz obrázek č. 27.	73
Obrázek 30: Výřez přední části záznamu optimalizované HPLC separace vzorku Spolostanu 7G rozpuštěného ve vodě o koncentraci 1 g/l, metoda 3, experimentální podmínky viz obrázek č. 27.....	74
Obrázek 31: Optimalizovaná HPLC separace vzorku Spolostanu 4P rozpuštěného ve vodě o koncentraci 1 g/l, metoda 3, experimentální podmínky viz obrázek č. 27.	74
Obrázek 32: Výřez přední části záznamu optimalizované HPLC separace vzorku Spolostanu 4P rozpuštěného ve vodě o koncentraci 1 g/l, metoda 3, experimentální podmínky viz obrázek č. 27.....	75
Obrázek 33: Optimalizovaná HPLC separace vzorku A naftalensulfonové kys. rozpuštěného ve vodě o koncentraci 1 g/l, metoda 3, experimentální podmínky viz obrázek č. 27.....	75
Obrázek 34: Výřez přední části záznamu optimalizované HPLC separace vzorku A naftalensulfonové kyseliny rozpuštěného ve vodě o koncentraci 1 g/l, metoda 3, experimentální podmínky viz obrázek č. 27.	76
Obrázek 35: Optimalizovaná HPLC separace vzorku B naftalensulfonové kys. rozpuštěného ve vodě o koncentraci 1 g/l, metoda 3, experimentální podmínky viz obrázek č. 27.....	76
Obrázek 36: Optimalizovaná HPLC vzorku C naftalensulfonové kys. rozpuštěného ve vodě o koncentraci 1 g/l, metoda 3, experimentální podmínky viz obrázek č. 27.	77
Obrázek 37: Kalibrační křivka pro standardy 1,6-NDSK; 2,6-NDSK a 2,7-NDSK – série 1	78
Obrázek 38: Kalibrační křivka pro standardy 1,5-NDSK; 2,7-NDSK a naftalen – série 2	79

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Optimalizovaný průběh gradientu.....	50
Tabulka 2: Podmínky separace při měření na HPLC/DAD-FLD	50
Tabulka 3: Kalibrační řada pro STD 2	51
Tabulka 4: Kalibrační řada STD 2	53
Tabulka 5: Optimalizované podmínky gradientu	53
Tabulka 6: Podmínky při měření HPLC/DAD-FLD	54
Tabulka 7: Kalibrační řada pro zvolené standardy.....	54
Tabulka 8: Optimalizace podmínek metody	55
Tabulka 9: Identifikace jednotlivých sledovaných standardů	56
Tabulka 10: Kalibrační závislost STD 2	60
Tabulka 11: Kalibrační parametry pro vzorky 051/297A, 051/297B, 051/266C.....	60
Tabulka 12: Parametry kalibrační křivky	61
Tabulka 13: Výsledky kalibrační závislosti pro vzorek 051/266C (n=3)	61
Tabulka 14: Výsledky kalibrační závislosti pro vzorek 051/297A (n=3)	62
Tabulka 15: Výsledky kalibrační závislosti pro vzorek 051/297B (n=3)	62
Tabulka 16: Přehled výsledků analýz vybraných složek vzorků sulfonovaného pyrenu.....	62
Tabulka 17: Identifikace sledovaných standardů	64
Tabulka 18: Kalibrační závislost STD 2	67
Tabulka 19: Vyhodnocení chromatogramů vzorků 051/297A, 051/297B, 051/266C (rozpuštěných ve vodě).....	67
Tabulka 20: Parametry kalibrační křivky	68
Tabulka 21: Výsledky kalibrační závislosti pro vzorek 051/266C (n=3)	68
Tabulka 22: Výsledky kalibrační závislosti pro vzorek 051/297A (n=3)	68
Tabulka 23: Výsledky kalibrační závislosti pro vzorek 051/297B (n=3)	69
Tabulka 24: Přehled výsledků analýz vybraných složek vzorků sulfonovaného pyrenu v procentech (%)	69
Tabulka 25: Porovnání výsledků získaných z HPLC/CZE	70
Tabulka 26: Optimalizace podmínek metody	71
Tabulka 27: Identifikované standardy ve vzorcích Spolostanu 7G, 4P, vzorcích A, B a C naftalensulfonových kyselin	72
Tabulka 28: Kalibrační závislost vybraných standardů (1,6-NDSK; 2,6-NDSK a 2,7-NDSK) pro vzorky spolostanů 7G, 4P a vzorek A naftalensulfonové kyseliny (směsi) – série 1.....	78
Tabulka 29: Parametry kalibrační křivky pro 1,6-NDSK; 2,6-NDSK a 2,7-NDSK– série 1	78
Tabulka 30: Kalibrační závislost vybraných standardů (1,5-NDSK; 2,7-NDSK; naftalen) pro vzorky B a C naftalensulfonových kyselin (směsi) – série 2.....	79
Tabulka 31: Parametry kalibrační křivky pro 1,5-NDSK; 2,7-NDSK a naftalen – série 2.....	79
Tabulka 32: Vyhodnocení chromatogramů vzorků Spolostanů 7G, 4P a vzorků A, B a C naftalensulfonových kyselin	80
Tabulka 33: Nalezená množství 1,6-naftalensulfonové kyseliny ve vzorcích Spolostanu 7G, 4P a vzorku A naftalensulfonové kyselin, uvedeny pouze vzorky, kde daná kyselina byla nalezena	80

Tabulka 34: Nalezená množství 2,6-naftalensulfonové kyseliny ve vzorcích Spolostanu 7G, 4P a vzorku A naftalensulfonové kyselin, uvedeny pouze vzorky, kde daná kyselina byla nalezena	80
Tabulka 35: Nalezená množství 2,7-naftalensulfonové kyseliny ve vzorcích Spolostanu 7G, 4P a vzorku A naftalensulfonové kyselin, uvedeny pouze vzorky, kde daná kyselina byla nalezena	81
Tabulka 36: Nalezené množství 1,5-naftalensulfonové kyseliny ve vzorku B naftalensulfonové kyseliny	81
Tabulka 37: Nalezené množství 2,7-naftalensulfonové kyseliny ve vzorku C naftalensulfonové kyseliny	81
Tabulka 38: Nalezené množství naftalenu ve vzorku C naftalensulfonové kyseliny	81
Tabulka 39: Souhrn výsledků analýz jednotlivých standardů ve vzorcích spolostanů 7G, 4P a vzorcích A, B a C naftalensulfonových kyselin v hmotnostních procentech (%)	82

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

Brij 35	polyoxyethylen-23-laurylether
CEC	kapilární elektrochromatografie (CEC)
CGE	kapilární gelová elektroforéza
CIEF	kapilární izoelektrická fokusace (CIEF)
CITP	kapilární izotachoforéza (CITP)
CZE	kapilární elektroforéza
D&C Green No. 8	trisodná sůl kyseliny 8-hydroxy-1,3,6-pyren-trisulfonové
DAD	detektor s diodovým polem
EAS	elektrofilní aromatické substituce
HEC	hydroxyethylcelulóza
HIC	hydrofobní interakční chromatografie
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IEC	iontově výměnná chromatografie
ICP	iontově párová chromatografie
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MF	mobilní fáze
MIP	molekulárně imprintované polymery
MLC	Micelární kapalinová chromatografie
NMR	nukleární magnetická rezonance
NP-HPLC	systemy s normálními fázemi
NS	naftalensulfonáty
NDS	naftalendisulfonáty
NDSK	naftalendisulfonová kyselina
OCP	portlandský cement
OFET	organický tranzistory s efektem pole
OPV	organické fotovoltaické články
OLED	organické světlo emitující diody
PAH	polycyklický aromatický uhlovodík
PMS	sodná sůl pyren-1-sulfonové kyseliny
PPOP	porézní polymery
PTS	trisodná sůl kyseliny pyren-1,3,6-trisulfonové

PTTS	sodná sůl pyren-1,3,6,8-tetrasulfonové kyseliny
RP-HPLC	systemy s reverzními fázemi
SBU	Strategic Business Units
SDS	dodecylsulfát sodný
SEC	molekulová vylučovací chromatografie
SF	stacionární fáze
SPPOP	sulfonované porézní polymery
Triton X-405	polyethylenglykol terc-oktylfenyl ether
TLC	tenkovrstvé chromatografie

ÚVOD

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) jsou uhlovodíky se dvěma nebo více kondenzovanými benzenovými jádry uspořádanými v různých strukturních konfiguracích. Mezi polycyklické aromatické uhlovodíky patří např. antracen, acenaften, naftalen, pyren, benzo[a]pyren, chrysen, fenantren atd. Některé z nich jsou cíleně vyráběny (izolovány) průmyslovými postupy a dále využívány v různých průmyslových odvětvích, jiné představují vysoce toxické polutanty, které se do životního prostředí dostávají jednak z průmyslových výroby, ale i z dalších zdrojů jako je např. spalování fosilních paliv, výfukové plyny, cigaretový dým a mohou mít nepříznivé účinky na naše zdraví. [1] Některé z polyaromatických látek představují výborný substrát pro jejich další průmyslové zpracování například pomocí sulfonačních reakcí.

Tato diplomová práce se zabývá analýzou produktů sulfonace pyrenu, který představuje velice výhodný meziprodukt pro různé průmyslové aplikace (např. polygrafický průmysl, moderní elektrooptické prvky, biologické vědy apod), je tedy vhodné mít vypracovanou analytickou metodu pro analýzu a kontrolu průběhu jeho sulfonace. Ve spolupráci se společností Synthesia a.s a Deza a.s byly připraveny vzorky sulfonovaných pyrenů, které byly následně analyzovány vyvinutou metodou.

Dalším cílem diplomové práce bylo navržení vhodné metody pro identifikaci a stanovení obsahu volných naftalensulfonovaných kyselin ve vzorcích plastifikátorů do betonů a v různých směsích naftaledisulfonových kyselin.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Synthesia a.s.

Synthesia a.s. je společností, která je spojena s Pardubicemi a jejich okolím. Vznikla roku 1920 jako Československá akciová továrna na výbušné látky. Od té doby se postupem let začala rozvíjet další odvětví, kterým se společnost postupně věnovala např. výrobě vojenské nitrocelulózy, kyseliny dusičné a sírové, výrobě farmaceutických substancí, pesticidů, antrachinonových barviv a pigmentů. V průběhu růstu této společnosti byly založeny i její sesterské závody. Roku 1928 vznikl závod v Semtíně, kde byla věnována pozornost anorganickým produktům pro výrobu výbušnin. Roku 1939 vznikl závod v Rybitví se zaměřením na výrobu barviv a léčiv. Nyní je společnost Synthesia, patřící do koncernu Agrofert, rozdělena do čtyř SBU – SBU Pigmenty a barviva, SBU Nitrocelulóza, SBU Organická chemie a SBU Energetika

Od počátků založení má společnost Synthesia za sebou mnoho úspěchů. Za zmínění stojí především, že společnost Synthesia a.s. je jedním z největších českých výrobců organických sloučenin se silnou pozicí v oblasti pokročilých intermediátů, jediným výrobcem vitamínu D v Evropě, předním světovým výrobcem vysoce jakostních organických pigmentů, evropským producentem barviv pro přírodní a syntetické materiály, předním hráčem na světovém trhu s výrobou nitrocelulózy a mnoho dalších.

K důležitým aspektům této společnosti patří pozornost a podpora věnovaná studiu chemie na základních školách, spolupráce se středními a vysokými školami jako je například Střední průmyslová škola chemická nebo Fakulta chemicko-technologická Univerzity Pardubice. [2]

1.2 DEZA a.s.

Deza a.s je výrobcem základních organických látek určených pro další chemické využití, je druhým největším zpracovatelem černouhelného dehtu a surového benzolu v Evropě a jeho jediným zpracovatelem v České republice.

Historie společnosti DEZA, a.s. se začala psát od roku 1892, kdy vznikl první závod v Moravské Ostravě. Postupem let se začala tato společnost rozvíjet za vzniku nových a specializovaných závodů, čímž se rozrostla až do Valašského Meziříčí, kde sídlí od roku 1967 dodnes. Roku 1953 začala probíhat výroba antrachinonu v nedalekých Otrokovicích. Mezi velké úspěchy jejich výzkumu se řadí reaktor a katalyzátor využívaný k výrobě antrachinonu, který si DEZA a.s. dokázala vyvinout sama. Důležitým rokem se stal i rok 2017, kdy tato společnost odkoupila závod Petrochemia Blachownia v Polsku věnující se zpracování surového benzolu a výrobě extra čistého toluenu. Díky svému výrobnímu programu patří společnost DEZA a.s. mezi velmi významné podniky v koncernu Agrofert.

Ze základních surovin je vyráběno 36 různých produktů například smola a dehtové oleje, aromatická rozpouštědla (toluen, solventní nafta, ...), aromatické speciality (antrachinon, antracen, acenaften, karbazol, pyren...), ftalanhydridy a estery, benzen, naftalen, fenoly, kresoly, kresolové kyseliny atd.

Zpracovávání těchto typů látek má možný vliv na životní prostředí, kterého si je DEZA a.s. plně vědoma. Proto klade velký důraz na jeho ochranu a snaží se minimalizovat co největší množství emisí škodlivin vznikající při skladování surovin nebo při výrobě produktů, pomocí nemalých investic do ekologizace výroby. [3]

1.3 Sulfonované aromatické uhlovodíky

1.3.1 Sulfonace

Sulfonační reakce aromátů se řídí mechanismem elektrofilní aromatické substituce (EAS), podobně jako nitrace, halogenová substituce, Friedel-Craftsova alkylace a acylace. Základ pro pochopení elektrofilní aromatické substituce (schéma 1) spočívá v klasickém dvoustupňovém mechanismu zahrnující tvorbu meziproductů π -komplexu (1) a σ -komplexu (2), kde tvorba σ -komplexu, areniového iontu (pomocí iontového mechanismu) je považována za klíčový krok celé sulfonační reakce. [4]

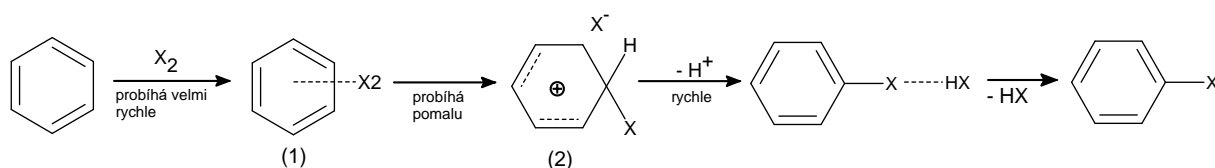


Schéma 1: Znárodnění vznikajícího iontu arenia pro reakci EAS (podle [4])

Sulfonace je nejčastěji realizována zahříváním vybrané aromatické sloučeniny s kyselinou sírovou, oleem nebo oxidem sírovým, který je považován za velmi účinné sulfonační činidlo s minimálním dopadem na životní prostředí oproti kyselině sírové. Oxid sírový působí jako elektrofil, který atakuje substrát. Sulfonace je reakcí vratnou. Ve zředěném roztoku kyseliny sírové probíhá desulfonace (schéma 2). [5]

Z reakcí založené na EAS vznikají významné chemické látky, produkty i meziprodukty nezbytné pro syntézu průmyslově cenných látek, tak i látek farmaceutických či agrochemikálií. [5]

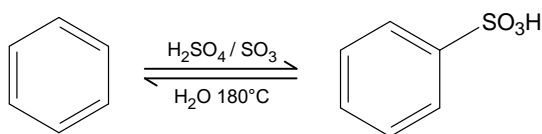


Schéma 2: Zjednodušené schéma sulfonační reakce (podle [6])

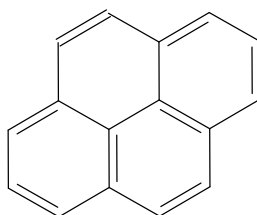
1.3.2 Vybrané sulfonované aromatické uhlovodíky

Hlavním zdrojem poskytujícím aromatické uhlovodíky je ropa nebo černouhelný dehet. Původně byly takto vzniklé aromatické uhlovodíky považovány za odpadní produkty, ale v současné době se ropné frakce s vysokým podílem těchto aromátů dále zpracovávají. Mezi hlavní nejpoužívanější aromáty patří benzen a naftalen, které jsou pomocí alkylačního činidla

alkylovány na alkylbenzeny a alkylnaftaleny. Tyto látky jsou následnou sulfonací převedeny na sulfonáty, což jsou soli sulfonových kyselin, kde skupina $-SO_3H$ je navázána na hydrofobním atomu uhlíku arylové, alkylové nebo alkylarylové skupiny. Vlivem této skupiny se jedná o látky s výbornou rozpustností ve vodě, chemickou a tepelnou stabilitou. Tyto ropné sulfonáty jsou využívány hlavně jako povrchově aktivní látky. [7]

1.3.2.1 Pyren

Pyren je polycyklický aromatický uhlovodík (obrázek č.1) objevený roku 1837 ve zbytku po destilaci černouhelného nebo hnědouhelného dehtu. Nadále vzniká při pyrolytických procesech, jako je pyrolýza acetyleny a vodíku, dalšími petrochemickými postupy (hydroformování, krakování nebo katalytické reformování) či destilací thebenolu nebo thebeninu se zinkovým prachem v proudu vodíku. Modernizace procesu destruktivní dehydrogenace černého uhlí, tak i procesu destilace černouhelného dehtu zapříčinila získávání značného množství pyrenu a dalších polycyklických uhlovodíků čímž se tyto látky a převážně pyren staly široce komerčně využitelnými. [8]



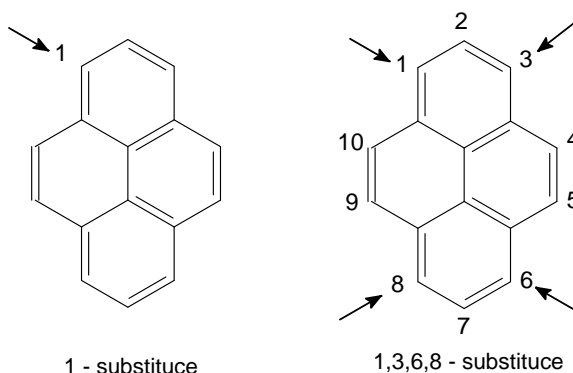
Obrázek 1: Struktura pyrenu (podle [8])

Velkou předností pyrenu jsou jeho fotofyzikální vlastnosti, které učinily tento aromát jednou z nejvíce studovaných organických molekul. Z počátku byl pyren používán při přípravě několika derivátů pro průmysl syntetických barviv např. pyrantronu. V současnosti je jedním z nejčastěji používaných substrátů pro barviva používaná ve fluorescenční značených polymerech. Postupným studiem jeho vlastností se pyren stal základním chromoforem volby v základním i aplikovaném fotochemickém výzkumu. Pyren v roztoku vytváří intramolekulární excimery, které v kombinaci s dlouhotrvajícími excitovanými stavy této molekuly, vysokými kvantovými výtěžky fluorescence a citlivostí excitačních spekter na změny v různých mikroprostředí přivedly pyren na status dokonalého standardu jako molekulární sondy různých mikroprostředí. Tendence pyrenu a jeho derivátů tvořit excimery může být používána pro zkoumání strukturních vlastností makromolekulárních systémů: v rozpoznávání DNA, zkoumání lipidových membrán nebo ve strukturních studiích peptidů a proteinů. Se změnou intenzity fluorescence excimeru se odráží i změny prostředí tzn. že zmíněná fluorescence

excimerů pyrenu či jeho derivátů může být nadále využitelná ke snímání parametrů prostředí (tlak, teplota, pH). [8]

O pyren je v poslední době zájem i ve formě organického polovodiče v aplikacích organické elektroniky a v materiálových vědách. Díky svým atraktivním fotofyzikálním a elektronickým vlastnostem pyren splňuje kritéria uplatňovaných v nové generaci elektronických a optoelektronických zařízeních například organické fotovoltaické články (OPV), lasery, organické světlo emitující diody (OLED) a organické tranzistory s efektem pole (OFET). Tyto zařízení nacházejí využití v osvětlení, plochých displejích, solárních modulech atd. [8]

Modifikace pyrenu za účelem úspěšné přípravy jeho různých derivátů pro další využití je prováděna substitucí pyrenového kruhu. Je substituován přímou elektrofilní aromatickou substitucí (obrázek č.2) přednostně do poloh 1-, 3-, 6- a 8- čímž se snadno připraví mono – a 1,3,6,8-tetrasubstituované pyreny. [8]



Obrázek 2: Substituce pyrenu (podle [8])

1.3.2.1.1 Sulfonovaný pyren a jeho aplikace

Pyren ve své struktuře obsahuje rozšířenou π -vazbu a tuhou rovinnou strukturu, a proto má jedinečné fluorescenční vlastnosti mezi které patří luminiscenční stabilita, rychlé podléhání reakcí v mikroprostředí a dlouhá fluorescenční životnost. Pro tyto vlastnosti jsou pyren a jeho deriváty hojně využívány v různých oblastech. Vlastnosti, jako už zmíněná luminiscence či rozpustnost ve vodě, se dají vylepšit zavedením skupiny – SO_3H do pyrenového kruhu. Sulfonace pyrenu (schéma 3) může probíhat dvoustupňově, kdy prvním krokem je reakce pyrenu s kyselinou sírovou v prostředí síranu sodného, za vzniku sodné soli pyren-1-sulfonové kyseliny (PMS). Ve druhém kroku je takto připravená sůl kyseliny nasulfonována pomocí olea za vzniku tetra sodné soli pyren-1,3,6,8-tetrasulfonované kyseliny (PTTS), schéma 3a. Tato

syntéza může probíhat i jedнокrokovou sulfonací za pomoci 50 % olea, což je ekologičtější, snadnější i nákladově efektivnější, schéma 3b.[9]

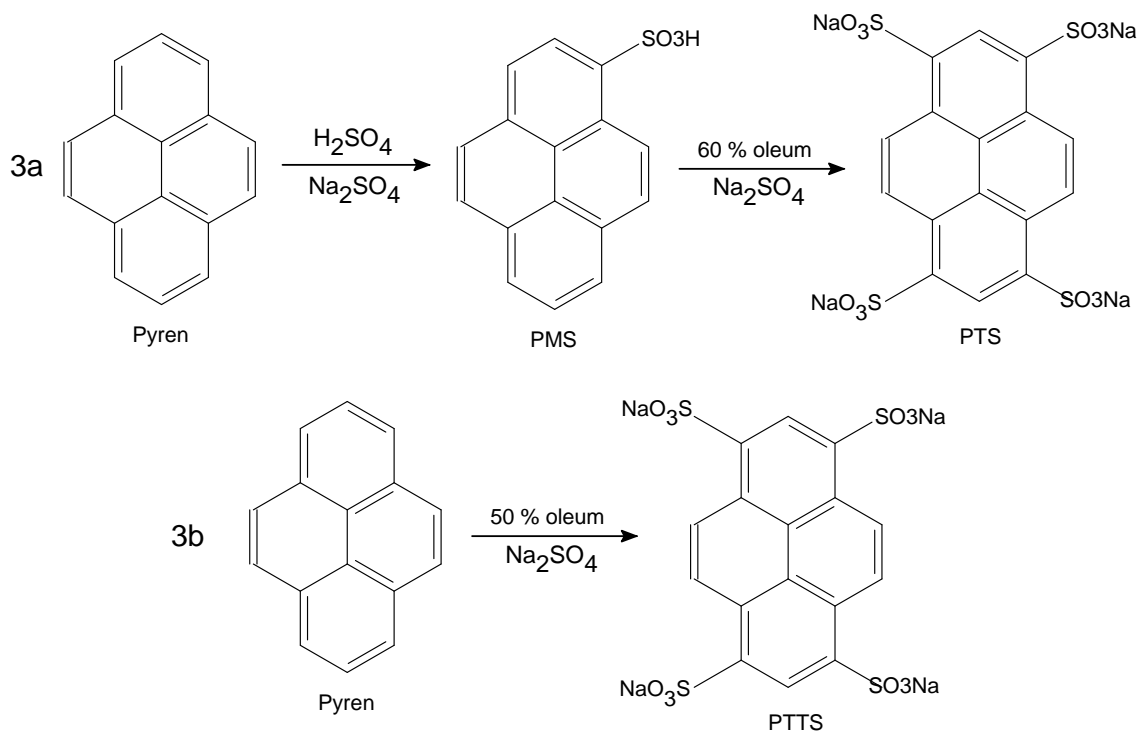


Schéma 3: Dvoustupňová a jednostupňová sulfonační reakce pyrenu (podle [9])

Do struktury pyrenu mohou být zavedeny i jiné funkční skupiny, jako jsou skupiny formylové (-CHO), estery (-COOR), hydroxylové (-OH), a další. Pro zlepšení rozpustnosti pyrenu se však nejvíce osvědčilo zavedení skupiny -SO₃H respektive její sodné soli, za vzniku již zmíněné PTTS. Takto připravená PTTS vykazuje čistě modrou fluorescenci v UV světle, vyznačující se viditelnou emisí o delší vlnové délce při absorpci ultrafialového záření o kratší vlnové délce (obrázek č.3) Tyto organické deriváty pyrenu jsou uplatňovány jako luminiscenční inkousty nebo jako materiály k přípravě ve vodě rozpustných neviditelných inkoustů na bázi vodného roztoku hydroxyethylcelulózy (HEC), které slouží jako pojivo a zvyšuje jeho viskozitu. Tyto ve vodě rozpustné fluorescenční materiály jsou slibným kandidátem na uplatnění v aplikacích proti padělaní např. na bankovkách, luxusních předmětech/zboží či průkazech totožnosti oproti tradičním technologiím ochrany proti padělaní, jež jsou velice složité, drahé a ekologicky náročné. [9]

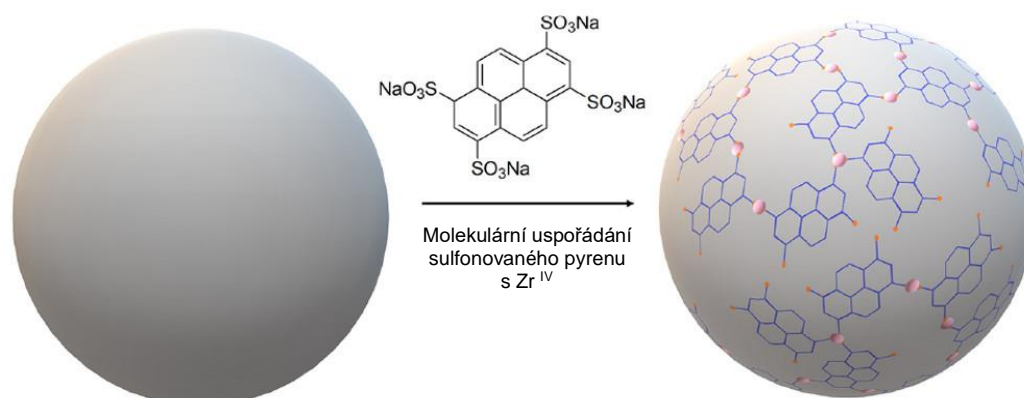


Obrázek 3: Fluoreskující pyren (vlevo)/sulfonovaný pyren (vpravo), (vlastní ilustrace)

Další aplikací sulfonovaných pyrenů je jejich využití jako povrchové nátěrové látky. Jedná se konkrétně o sulfonované pyreny s ionty Zr^{IV} (obrázek č. 4). Díky vysokému koordinačnímu číslu Zr^{IV} a schopnosti tvořit vícenásobné vazby s organickými ligandy obsahujícími kyslík (oxofilita), lze tento iont využít pro pospojování jednotlivých molekul sulfonovaného pyrenu za vzniku tzv. zesíťovaného komplexu. Výsledný povlak může pokrývat pevné substráty nebo sloužit jako platforma na roubování funkčních polysacharidů. Sulfonované pyreny s ionty Zr^{IV} jsou univerzálními povlaky s nefenolickými molekulami. Tyto molekuly či molekulární páry, i když neobsahují fenolové molekuly, mohou existovat v různých podobách. Jedná se tedy o materiálově nezávislé povlaky. [10]

Sulfonovaný pyren se skládá z hydrofobního aromatického jádra s hydrofilními postranními skupinami a za specifických podmínek mají takto vytvořené komplexy schopnost prakticky pokrýt jakýkoliv pevný substrát prostřednictvím různých interakcí. Převážně se jedná se o interakce kovalentní, van der Waalsovy či interakce pomocí vodíkové vazby. [10]

V této studii byly připraveny mimo jiné i povrchové povlaky na bázi komplexu Zirkonu se sulfonovaným pyrenem modifikovaným λ -karagenem, které vykazovaly silnou antiadhezní aktivitu proti zachycování rozsivek na tyto povrchy, což může být využito např. při ochraně námořních plavidel. [10]



Obrázek 4: Iont Zr^{IV} pokrytý sulfonovaným pyrenem [10]

Pro vysokou citlivost na změny polaritý makromolekul v mikroprostředí například u nukleových kyselin, proteinů či membrán jsou sulfonované deriváty pyrenu aplikovány v biologických vědách, a to především ke studiu konformace, dynamiky, složení a architektury těchto jednotlivých makromolekul. Na základě jejich vysoké rozpustnosti ve vodě nacházejí využití jako fotoregulátory k řízení smyčkování jedno-řetězcové DNA, což umožnilo zkoumat dynamiku smyčkování, řízení konformace a funkce biomolekul za fyziologických podmínek. Sulfonovaný derivát pyrenu, konkrétně pyranin (8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonová kyselina) obsahující tři sulfonové skupiny a nachází uplatnění jako sonda pro reaktivní formy kyslíku, respektive fluorescenční sonda. [11] [12]

Dalšími využívanými deriváty jsou 1-sulfonované pyreny (PMS) a tetrasulfonované pyreny (PTTS) převážně uplatňované v materiálové vědě nebo jako barevné přísady ve srovnání s 1,3,6-trisulfonovaným pyrenem (PTS). Tyto deriváty, (ale hlavně PMS) také ochotně interagují s grafenem za získávání stabilní disperze grafenu. Grafen je v podstatě jednovrstvý grafit, který je zajímavý díky svým mechanickým, tepelným a optickým vlastnostem a je hojně používán pro transparentní vodivé elektrody. Exfoliace grafenu neboli jeho výroba, vyžaduje použití drahých, toxických a obtížně odstranitelných organických rozpouštědel, které mají dopad na životní prostředí. Vyvinutí této jednoduché metody pro výrobu grafenových suspenzí založené právě na nekovalentní interakci PMS za použití vody jako rozpouštědla, výrazně ulehčilo a odlehčilo klasickou sice jednoduchou, ale ekologicky náročnou výrobu grafenu. Navíc, lze tuto suspenzi použít jako inkoust pro elektrochemické tisknutelné senzory na bázi tetování, protože na pyren, jak již bylo na začátku zmíněno, lze snadno navázat bílkoviny či jiné biologické substráty. [13]

Dále můžou být pyreny využity pro přípravu porézních polymerů (uvedeny ve formě PPOP - 1, PPOP-2, PPOP-3), které jsou nejprve syntetizovány Friedl-Craftsovou alkylační reakcí pyrenu a bis(1,4-dibrommethyl)benzenu za podmínek refluxu, v přítomnosti katalyzátoru FeCl₃ (Lewisovi kyseliny) a v různých molárních poměrech. Poté je provedena funkcionalizace povrchu pórů těchto materiálů pomocí skupin – SO₃H a následně provedena úprava kyselinou chlorsulfonovou za vzniku sulfonovaných (uvedeny ve formě SPPOP -1, SPPOP-2, SPPOP-3), mikroporézních organokatalyzátorů (schéma 4) použitelných pro syntézy biopaliv za ekologických reakčních podmínek. Celý proces se děje při pokojové teplotě okolo 20 °C. [14]

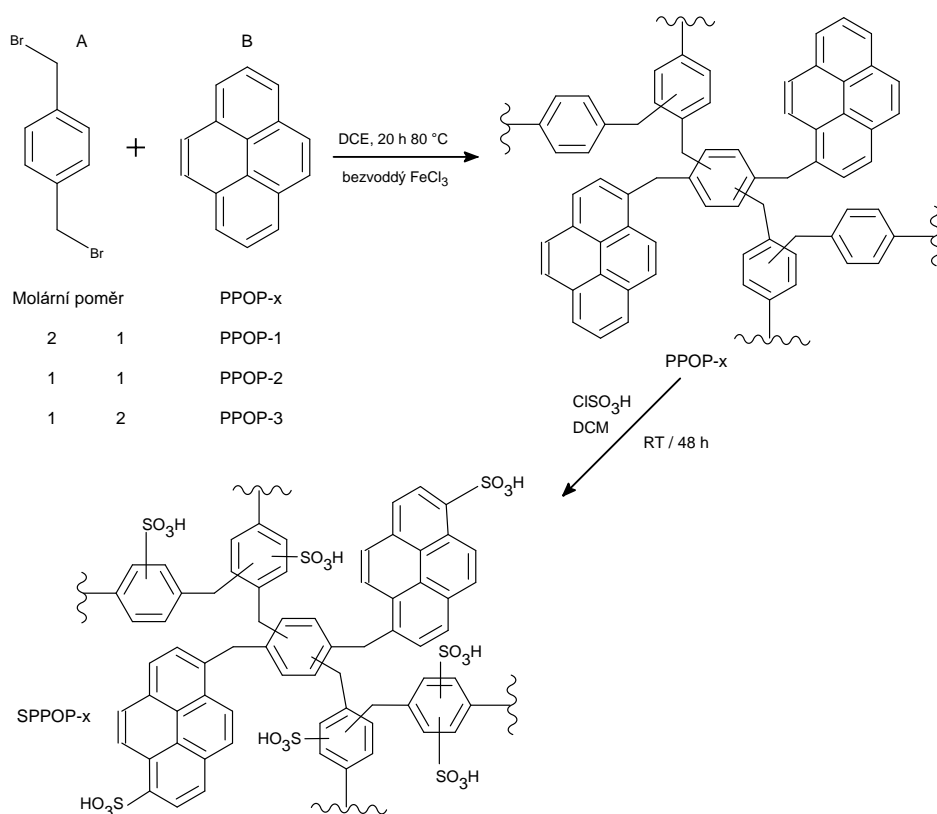


Schéma 4: Příprava porézního organického polymeru a jeho funkcionalizace kyselinou sulfonovou (podle [14])

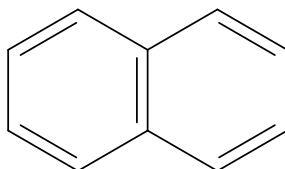
Takto připravené materiály mají velmi vysokou povrchovou kyselost s perfektní katalytickou aktivitou pro syntézu bionafty prostřednictvím esterifikace či transesterifikace mastných kyselin/esterů s dlouhým řetězcem. [14]

Katalytická aktivita se zvyšuje se stupněm sulfonace, proto má materiál SPPOP-3 nejvyšší katalytickou aktivitu vzhledem k ostatním SPPOP-1, SPPOP-2. Další plusem těchto polymerů je, že neobsahují toxické kovy a mohou být uplatněny při separačních, adsorpčních a katalytických procesech nebo jako superkondenzátory. [14]

V této ve formě porézního organického materiálu mohou sulfonované pyreny fungovat jako katalyzátor při syntéze bionafty. Bionafta je považována za nízkoemisní náhražku nafty. Lze ji vyrobit esterifikací volných mastných kyselin s alkoholy s krátkým řetězcem (např. methanol) za přítomnosti kyselých/zásaditých katalyzátorů nebo transesterifikací triacylglycerolů. Jednou z alternativ při výrobě bionafty je využití mikroporézního organického materiálu na bázi pyrenu jako katalyzátoru při její výrobě. Jedná se o materiál, který je udržitelnější, biologicky odbouratelnější a neobsahuje toxické kovy. Je převážně využíván díky svému specifickému velkému povrchu, který je zapříčiněn reaktivními organickými funkčními skupinami navázanými do pórů povrchu. [14]

1.3.2.2 Naftalen

Naftalen je bílou krystalickou látkou s bodem tání 80 °C a bodem varu 218 °C (obrázek č. 5). Jedná se o těžký polycyklický aromatický uhlovodík, který znečišťuje životní prostředí a je veden jako potenciální karcinogen. Do životního prostředí kolem nás se naftalen dostává v důsledku nedokonalých spalovacích procesů jak z přírodních, domácích či průmyslových zdrojů. Z větší části se jedná o zdroje jako automobilová a letecká doprava, spalování benzínu, z fosilních paliv, cigaretového kouře nebo i z lesních požárů. Tento uhlovodík je i minoritní složkou motorové nafty a leteckých paliv. [15]



Obrázek 5: Struktura naftalenu

Průmyslově se naftalen vyrábí z černouhelného dehtu, z ropných frakcí, anebo získáváním z methylnaftalenů vznikajícího při krakovacích procesech (tepelném rozkladu uhlovodíků). Naftalen je velmi důležitou surovinou využitelnou při výrobě anhydridu ftalové kyseliny, která je poté využívána pro syntézy ftalátových změkčovadel či pryskyřic. Dále je jako výchozí surovina pro naftalensulfonové kyseliny, které jsou poté přidávány do betonů, kde poslouží jako ztěkovač tzv. superplastifikátory. Naftalen může být dále využit pro syntézu azobarviv, jako dispergátor a činidlo v gumárenském průmyslu, pro syntézu různých léčiv a chemikálií, výroba pyrotechniky atd. Ve spotřebních výrobcích se naftalen nachází například v repelentech proti molům, ve sprejích do toalet, a dokonce i v pánských štětkách na holení. [15]

1.3.2.2.1 Sulfonovaný naftalen a jeho aplikace

Reakčním mechanismem elektrofilní aromatické substituce (schéma 5) lze zavést do organické molekuly naftalenu sulfonovou skupinu za vzniku naftalensulfonové kyseliny. Sulfonace naftalenu je reakcí vratnou a poloha sulfonové skupiny je ovlivněna vnějšími podmínkami. Významnou roli hraje teplota, která řídí polohu zavedené sulfoskupiny – SO₃H. Kineticky řízená reakce je při nízkých teplotách příznivější pro orientaci skupiny – SO₃H do polohy 1- a pro termodynamicky řízenou reakci za vysokých teplotách příznivější do polohy 2-. Izomer 1-naftalensulfonové kyseliny vzniká při nižších teplotách (35–95 °C) a 2-naftalensulfonová kyselina vzniká při sulfonaci za teploty kolem 160–165 °C. [16]

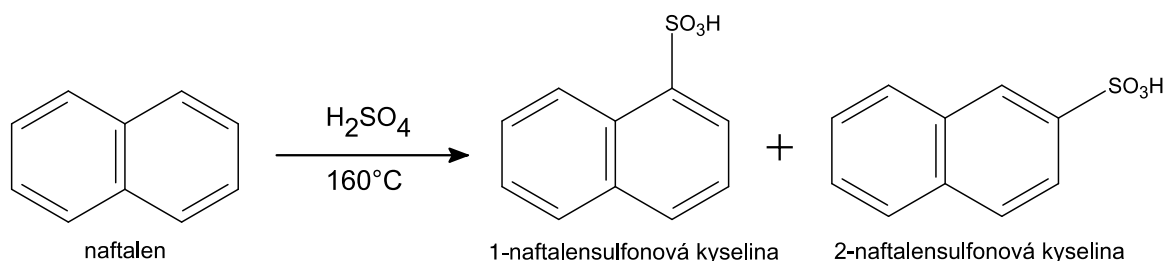


Schéma 5: Sulfonační reakce naftalenu (podle [16])

Pokud je potřeba připravit pouze 2-naftalensulfonovou kyselinu, je nutné odstranit část 1-naftalensulfonové kyseliny, která i přes zvolené podmínky sulfonace v mírném množství vzniká. K odstranění lze využít hydrolytickou reakci při cca 140 °C (schéma 6). [16]

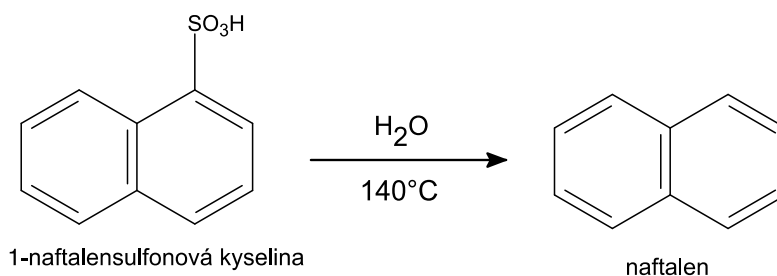


Schéma 6: Hydrolýza α-naftalen sulfonové kyseliny (podle [16])

Jedno z využití 2-naftalensulfonové kyseliny je příprava kondenzátu s formaldehydem. Polykondenzace 2-naftalensulfonové kyseliny s formaldehydem probíhá v přebytku kyseliny sírové, která je následně zneutralizována hydroxidem sodným (Schéma 7). [16]

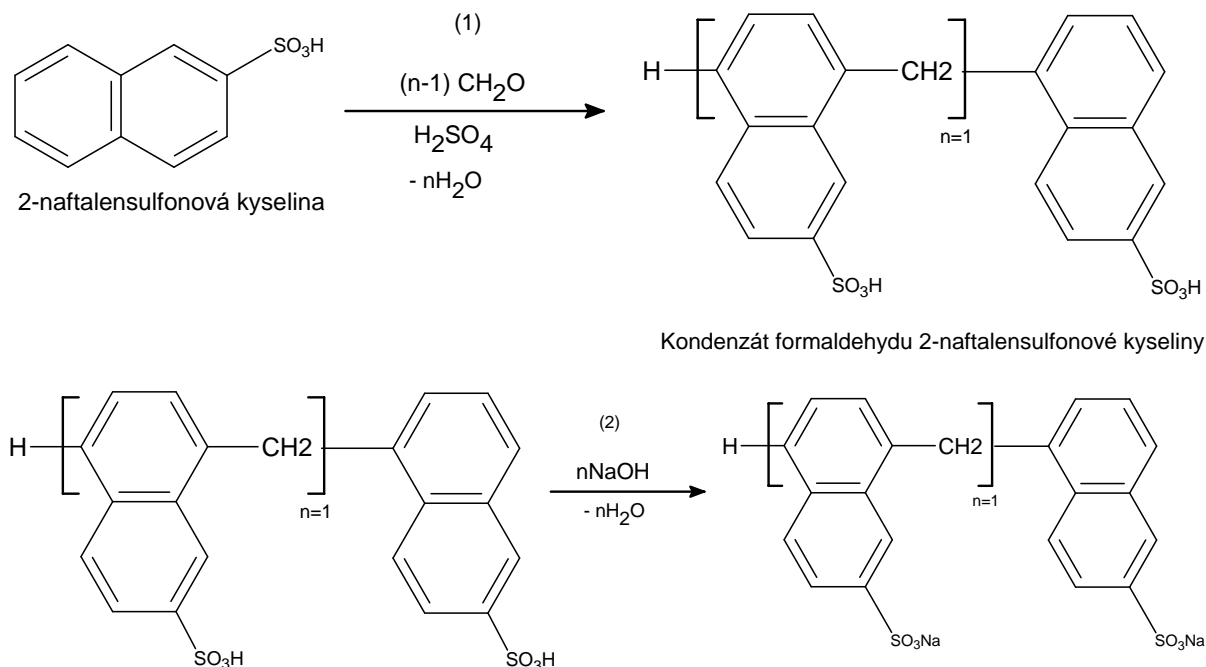


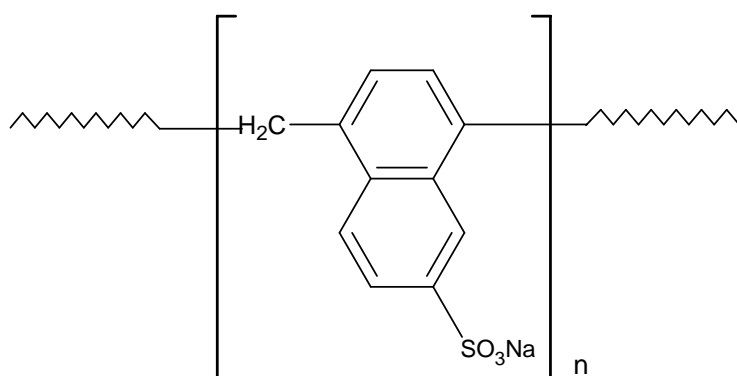
Schéma 7: Polykondenzace kyseliny β -naftalen sulfonové (podle [17])

Tento kondenzát je vysokomolekulární sloučenina s dobrými emulgačními, dispergačními či smáčecími vlastnostmi a je používán jako aniontová povrchově aktivní látka. [16] Jeho vlastnosti úzce souvisí se stupněm polymerace. Výrobky s nízkým polymeračním stupněm ($n = 1-3$) jsou uplatňovány v barvířském průmyslu pro syntetická vlákna, v textilním a tiskařském průmyslu. Produkty se středním stupněm polymerace nacházejí využití jako plastifikátory betonů, zlepšující hydrologické vlastnosti betonu (čerpatelnost) a snižují potřebu záměsové vody, což se projeví ve vyšší pevnosti finálního betonového výrobku. Výrobky s vysokým polymeračním stupněm ($n \geq 15$) našly uplatnění jako přísady do kalů znečištěných vod nebo jako přísady do velmi pevného betonu. [18].

Beton lze z hlediska mechanických vlastností vylepšovat přidáním chemických příměsí či přísad. Sulfonované polymery na bázi naftalenů (např. Sikamenty® vyráběný společností Sika) jsou jednou z velmi takto využívaných příměsí. Sikament® (obrázek č. 6) je hnědá kapalina využívající se pro výrobu volně tekoucího betonu, tvorbu sypkého betonu, betonu s vysokou počáteční rychlostí tuhnutí a je i činidlem redukujícím obsah vody pro výrobu

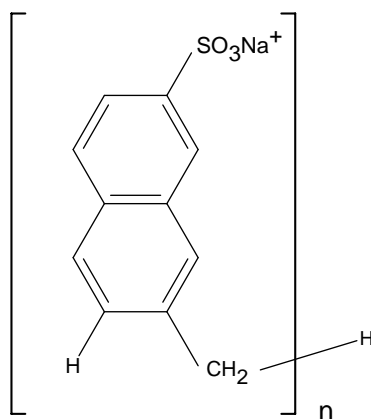
vysokopevnostního betonu. Jedná se o tzv. superplastifikátor, který při výrobě betonu působí pouze fyzikálně, neúčastní se zde žádných chemických reakcí s cementem. [19]

Sikament® je účinný plastifikátor kapalného charakteru zvyšující pevnost betonu v tlaku a snižují oxidaci ocelové výztuže. Se zvyšující se dávkou plastifikátoru dochází ke zvyšování záporného náboje na částicích cementu čímž se zvyšuje hodnota pevnosti betonu v tlaku. Toto se děje na základě adsorpce plastifikátoru na částice cementu, která vede k většímu odpuzování mezi nimi, což vede k lepší dispergaci cementu v betonové směsi. [19]



Obrázek 6: Sikament® (podle [19])

Jiné komerčně dostupné přípravky na podobné bázi jako Sikamenty® je například série Spolostanů (obrázek č. 7) vyráběných společností Enaspol, Velvěty. Jedná se o různé typy jako např. Spolostan 7G, 7L, 7L Ca atd, které jsou přidávány do betonových a maltových směsí, které pak mohou být např. využity k tvorbě masivních betonových konstrukcí. Jiné typy jako Spolostan 4P, 4L, 4G, 3G atd. jsou využívány i v jiných odvětvích např. v zemědělském, papírenském, textilním nebo gumárenském průmyslu, kde působí jako účinné dispergátory. [20]

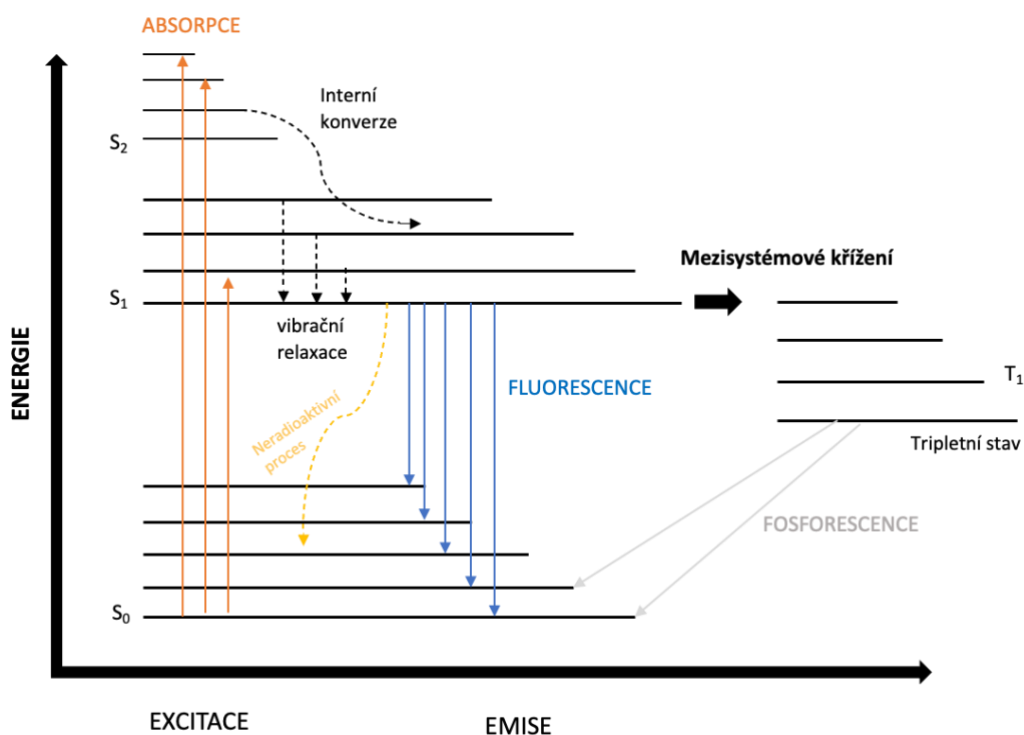


Obrázek 7: Struktura Spolostanu, poly-naphtalensulfonátu sodného (podle[20])

Další specialitou naftalensulfonátů (NS) a naftalendisulfonátů (NDS) je jejich uplatnění v geotermálních systémech jako stopovače v geotermálních rezervoárech, převážně ke zkoumání jejich hydrodynamiky a propustnosti. Nejčastěji jsou do aktivních rezervoárů injektovány roztoky sulfonátů např. v roztocích chloridu sodného. Díky produkovanému teplu v rezervoárech dochází k migraci aplikovaných sloučenin, které vlivem této migrace podléhají změnám, disproportionaci či tvorbě nových izomerů, rozkladu na směsi produktů, anebo zůstanou v nezměněné formě. Takto jsou zavedené NS/NDS následně detekovány v blízkých vrtech nebo pramenech, kde slouží jako indikátory konektivity (propojení) jednotlivých vrtů. Uvedené polyaromatické sulfonáty splňují široké spektrum kritérií pro to, aby mohly být v této oblasti využívány. NS a NDS jsou šetrné k životnímu prostředí, cenově dostupné, velmi dobře detekovatelné pomocí fluorescenční spektroskopie s nízkými detekčními limity přibližně 200 ppt, vykazují nízkou až nedetekovatelnou koncentraci pozadí a jsou vysoce tepelně stabilní. Kandidáti pro tyto geotermální systémy mohou být naftalen-1-sulfonát, naftalen-1,5-disulfonát, naftalen-1,6-disulfonát, naftalen-2-sulfonát, naftalen-2,6 nebo 2,7 -disulfonát, naftalen-1,3,6,-trisulfonát a jako poslední zmíněný potenciální stopovač je i pyren-1,3,6,8-tetrasulfonát, probíraný v předchozích kapitolách. Zásadní vliv na stabilitu a zároveň i používání uvedených sloučenin pro stopování v rezervoárech má teplota, pH a salinita (koncentrace minerálních látek rozpuštěných ve vodě). Například u 1,5-NDS bylo zjištěno, že se zvyšující teplotou se rychlost rozkladu zvyšuje, a naopak s rostoucím pH rychlost rozkladu této sloučeniny klesá. Tato skutečnost byla zkoumána v sérii experimentů, kdy první série byla zaměřená na rychlost rozkladu různých roztoků 1,5-NDS při tlaku nasycených par za daných teplot 250 °C, 270 °C a 300 °C. Druhá série byla měřena po dobu 2-3 týdnů při teplotách 200 °C a poté 300 °C. Výsledky vykazovaly značnou závislost rozkladu na teplotě. Při teplotě 200 °C se 1,5-NDS rozkládá na 1-NSA, a při vyšších teplotách okolo 250 °C vzniká z 1-NSA až konečný produkt, respektive naftalen. Dále byla zkoumána tepelná stabilita i dalších naftalensulfonových kyselin postupným zahříváním z cca 270 °C až na 390 °C. Stabilita rostla v pořadí od nejméně stabilního po nejstabilnější: 1,5-NDS < 1,6-NDS < 1-NSA < 2,6-NDS \approx 2,7-NDS < 2-NSA. Tento výsledek slouží jako orientační představa o tepelné stabilitě jednotlivých izomerů. Tyto experimenty byly provedeny jak za laboratorních podmínek tak i ve vybraných geotermálních oblastech jako Island, Nový Zéland, Francie atd. [21]

1.4 Vysvětlení fluorescence

Fluorescence (obrázek č. 8) je kvantový jev řazený společně s fosforescencí do tzv. luminiscenčních jevů. V základním stavu je molekula na nejnižší energetické vibrační hladině a elektron při absorpci záření přechází na různé vibrační hladiny excitovaných stavů. Dalšími jevy (vnitřní konverze a vibrační relaxace) přechází molekula na nejnižší vibrační hladinu prvního excitovaného stavu. Z tohoto stavu se může molekula vrátit do základního stavu buď nezářivou konverzí, kdy se přebytek energie uvolní vývojem tepla, dále zářivým přechodem na různé vibrační hladiny základního stavu tzv. fluorescence a ve speciálních případech může molekula přejít z prvního singletového stavu mezisystémovým přechodem do prvního tripletového stavu. Z tohoto stavu se molekula navrátí do stavu základního také zářivým přechodem tzv. fosforescencí, která je však oproti fluorescenci relativně pomalá. [22]



Obrázek 8: Jablonski diagram fluorescence a fosforescence (podle [17])

K fluorescenci dochází ze stejné energetické hladiny, bez ohledu na to, na jakou hladinu byla molekula při absorpci záření vypuzena z čehož vyplývá, že tvar ani maximální vlnová délka fluorescenčního pásu nezávisí na vlnové délce budícího záření. Avšak vlnová délka absorbovaného záření ovlivňuje intenzita fluorescence (I_F). [22]

Aby látka měla předpoklad fluoreskovat v blízké ultrafialové nebo viditelné oblasti je zapotřebí přítomnosti konjugovaného systému π elektronů v její molekule. Látky neabsorbující

záření v této oblasti nefluoreskují. Typickým příkladem fluoreskujících látek jsou polykondenzované aromatické uhlovodíky (pyren, naftalen, antracen...). Čím větší je počet kondenzovaných aromatických jader v molekule, dochází tak k rozšíření konjugovaného π -elektronového systému a s tím i ke zvýšení intenzity fluorescence společně s posunem fluorescenčního pásu k vyšším vlnovým délkám. Fluorescenci ovlivňuje viskozita, hustota nebo polarita zvoleného rozpouštědla. Látky, které přirozenou fluorescenci nemají, je možné vhodnou reakcí převést na fluoreskující deriváty. K měření fluorescenčních/fosforescenčních spekter se používají fluorimetry, respektive fosforimetry. Lze ji změřit i za pomoci běžných absorpčních fotometrů nebo spektrometry pro UV/Vis oblast. [22]

Měření fluorescence nachází široké uplatnění v mnoha oblastech jako je např. klinická analýza pro stanovení katecholaminů, aminů, aminokyselin. V anorganické analýze je využívána při důkazech a stanovení prvků jako Ga, Be, Zr, Lu, Al nebo různých fluoreskujících komplexů. Pro kontrolu životního prostředí je využívána k proměřování přirozeně fluoreskujících látek, převážně karcinogenních PAH jako je benzo[a]pyren, pyren ke zjišťování úrovně znečištění ovzduší, půdy atd. Nadále mohou být stanovovány některé pesticidy nacházející se ve vodách či toxické aflatoxiny přítomné v oříškách, zrní a dalších potravinách. [22]

1.5 Vybrané techniky analýzy sulfonovaných aromatických látek

1.5.1 Kapalinová chromatografie

Objev metody kapalinové chromatografie je připisován rusko-italskému botaniku Michailu Semjonoviči Cvětovi a je datován na začátek 19. století. Během následujících století se chromatografie dále rozvíjela a obohacovala o nové zásadní teoretické práce, které definovaly různé principy a rozdělení chromatografie, studovaly vlivy podmínek analýz na účinnost separace a mnoho dalších poznatků, které ji úspěšně dovedly tam, kde je využívána v současnosti. Kapalinová chromatografie reprezentuje jednu z nejvýznamnějších metod pro analytické laboratoře. [23]

1.5.1.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) byla poprvé demonstrována v polovině 70. letech 20. století Horváttem a spol. Dnes je HPLC nejčastějším uspořádáním kapalinové chromatografie, které je hojně využíváno v analytických laboratořích výzkumného i praktického zaměření. Využití nachází ve všech možných oblastech výzkumu, v rutinních a

klinických analýzách, forenzních analýzách, diagnostických aplikací, analýz potravin, rostlinných materiálů nebo životního prostředí. [23]

1.5.1.1.1 Základní popis kapalinové chromatografie

Chromatografie se řadí mezi separační analytické metody, které jsou založeny na rozdílné distribuci látek mezi dvě nemísitelné fáze. Jedná se o nepohyblivou stacionární fázi (SF) a pohyblivou mobilní fázi (MF), která je vždy kapalná. Stacionární fáze je uložena v chromatografické koloně a tvoří tak její náplň. Stacionární fázi může být tuhá látka či film kapaliny chemicky vázaný nebo zakotvený na nosiči (tuhé matrici). Stacionární fáze mohou být rozčleněny dle nosiče stacionární fáze, chromatografického módu nebo chemického složení. Chromatografický systém/mód je charakterizován typem interakce mezi stacionární fází a studovaným analytem. Mezi hlavní typy interakcí jsou:

- Adsorpce
- Polarita
- Vodíkové vazby
- Velikosti molekuly
- Dipólové interakce
- Afinitní interakce
- Interakce vlivem náboje

Na základě takovýchto interakcí se pak chromatografie dělí na širokou škálu separačních módů:

- Systémy s normálními fázemi (NP-HPLC/NPLC)
- Systémy s obrácenými fázemi (RP-HPLC/RPLC)
- Iontově výměnná chromatografie (IEC)
- Iontově párová chromatografie (IPC)
- Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)
- Hydrofobní interakční chromatografie (HIC)
- Micelární kapalinová chromatografie (MLC)
- Molekulová vylučovací chromatografie (SEC)
- Afinitní a chirální chromatografie

Systémy pro separace látek s normálním fázovým uspořádáním jsou charakterizovány polární stacionární fází a nepolární mobilní fází. Princip retence v tomto systému je popisován adsorpcí. Jedná se o tzv. soutěž o adsorpční lokalizovaná centra na povrchu SF mezi dělenou látkou a MF. Retence je poté určena pomocí nespecifických interakcí analytu s MF a

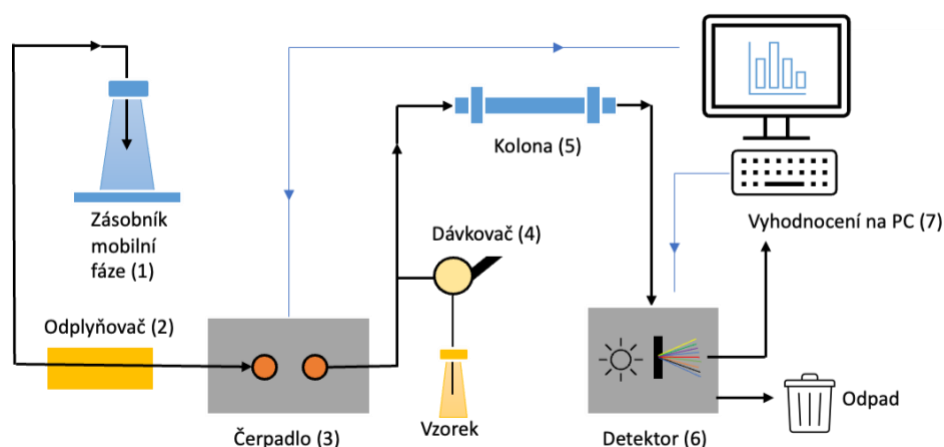
specifickými mezimolekulárními interakcemi analytu s povrchem sorbentu. V současné době tento separační mód ustupuje do pozadí, protože vyžaduje práci s těkavými bezvodými organickými rozpouštědly. Nachází však uplatnění u analytů s limitovanou rozpustností ve vodném prostředí jako jsou lipofilní látky, izomery nebo látky, které se rozkládají v jiných separačních systémech vlivem vody. [23]

Při chromatografii v systémech s obrácenými fázemi je použita polární mobilní fáze oproti stacionární, která je středně polárního až nepolárního charakteru. Mobilní fáze je vodně-organické povahy. Organickou složkou je polární organické rozpouštědlo mísitelné s vodou (alkoholy, acetonitril). Další složkou mobilní fáze může být přídavek bází, kyselin nebo pufrů. Princip retence v systému s obrácenými fázemi je řízen poklesem interakce analytu s mobilní fází, protože na obrácených SF se nevyskytují aktivní adsorpční centra schopná interakcí. Povrch SF je schopen pouze slabých interakcí elektrostatických, interakcí dipól-dipólových, pomocí vodíkových vazeb atd. Chromatografie na obrácených fázích je využitelná pro látky v širokém rozmezí různých acidobazických vlastností, polarit, analýzu jednoduchých i složitých směsí vzorků i velkých molekul (proteomika). Je velice univerzální a uplatňovaná v mnoha oblastech od farmacie, analýzy potravin, dopingové analýzy, toxikologie, environmentální analýzy až po moderní “omické“ přístupy jako metabolomika nebo lipidomika. [23]

Důležitou roli pro provedení kvalitních separací hrají i jednotlivé parametry charakterizující stacionární fázi jako je její tvar, průměrná velikost a distribuce částic, měrný povrch SF, obsah uhlíku navázaného na základním materiálu SF, měrný objem a velikosti pórů...Nadále musí splňovat požadavky na mechanickou a chemickou stabilitu, odolávat vysokým tlakům, a nerozpouštět se v použitých mobilních fázích atd. V současnosti se jako náplně kolon používají tzv. chemicky vázané stacionární fáze, kde vlastní SF je kovalentně navázána na vhodný nosič (matrici). Ideálním nosičem a zároveň nejrozšířenějším anorganickým sorbentem je silikagel ($\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ – nejčastější amorfni forma). Je vysoce mechanicky odolný, umožňuje separace za vysokých tlaků v aplikacích HPLC, UHPLC a může být využíván i nemodifikovaný samotný pro separaci v systémech s normálními fázemi nebo v HILIC (hydrofilní interakční chromatografii). V systémech s obrácenými fázemi je nejčastěji jako SF používán oktadecylsilikagel. Jedná se o nepolární stacionární fázi s chemicky vázaným alkylovým řetězcem (C18) pro na silikagelovou matrici. Silikagelová matrice SF může být modifikována i dalšími funkčními skupinami jako např. oktylovými, fenylovými, pentafluorofenylovými, kyanopropylovými, bifenylovými atd. Nadále mohou být SF připraveny na bázi organických polymerních materiálů, kovových oxidů nebo grafitového uhlíku. [23]

1.5.1.1.2 Instrumentace v kapalinové chromatografii

Kapalinový chromatograf se skládá z několika základních funkčních jednotek se specifickými funkcemi (obrázek č. 9). Z jednoho nebo více zásobníků MF (1) je mobilní fáze vedena přes odplyňovač (2) do vysokotlakého čerpadla (3). Čerpadlem je MF vytlačována přes dávkovací zařízení (ruční šesticestý ventil nebo programovatelný autosampler) sloužící k nadávkování vzorku (4) do chromatografické kolony (5). Pro lepší reprodukovatelnost výsledků, může být kolona umístěna v termostatu. Kolona je přímo spojena s detektorem (6), jehož odezva je vyhodnocena a zpracována počítačem (7). Počítač slouží též ke kontrole a řízení celého chromatografického systému. Jeli potřeba pro separaci látek MF s proměnlivým složením (gradientová eluce) je možné k tomuto využít tzv. nízkotlaký gradient s jedním vysokotlakým čerpadlem nebo tzv. vysokotlaký gradient, kdy každá složka MF je čerpána samostatným vysokotlakým čerpadlem. [23]



Obrázek 9: Obecné schéma kapalinového chromatografu (podle [24])

1.5.2 Kapilární zónová elektroforéza (CZE)

Kapilární zónová elektroforéza (obrázek č. 10) je moderní elektromigrační separační technika k analýze velkých i malých molekul realizovaná v křemenné kapiláře o průměru do 100 μm . Vlastní separace látek je nejčastěji výsledkem kombinace dvou jevů elektroforetické migrace látek a elektroosmotického toku uvnitř kapiláry. Elektroforetická migrace látek (nabitých částic) je způsobena pohybem těchto částic v homogenním elektrickém poli uvnitř kapiláry. Konečná rychlost migrace je výsledkem působení elektrické síly na částici a zároveň odporu viskózního prostředí uvnitř kapiláry, který rychlost brzdí. Po dosažení ustáleného stavu, se obě síly vyrovnají a částice se nadále pohybuje konstantní rychlostí (1). [25], [26]

$$F_1 = F_2 \rightarrow QE = kv \quad (1)$$

Kde Q je náboj částice, E je intenzita elektrického pole, k je koeficient zohledňující tvar částice a viskozitu prostředí v kapiláře a v je rychlost migrující částice.

Pro každou částici je charakteristická tzv. elektroforetická mobilita (μ), která je definována jako rychlost částice vztažená na jednotku intenzity elektrického pole (2).

$$u_e = \frac{v}{E} \quad (2)$$

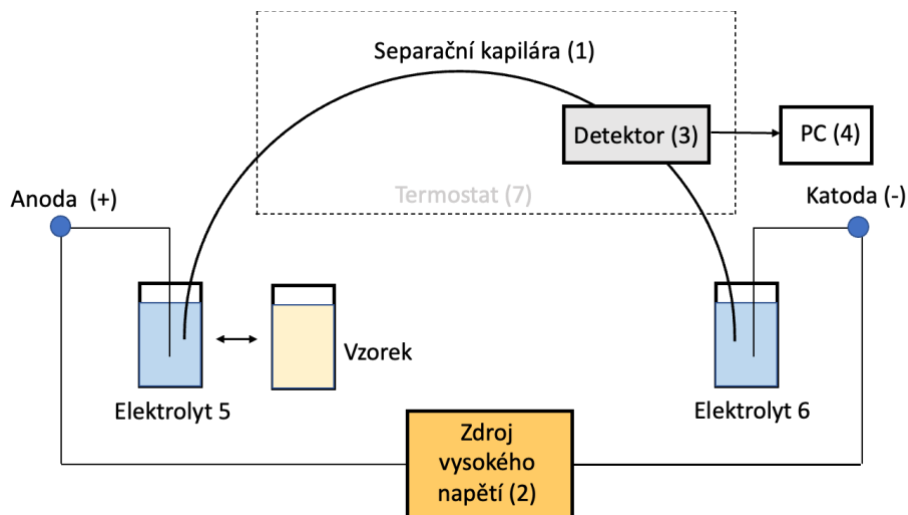
Vlivem disociace silanových skupin z vnitřního povrchu křemenné kapiláry dochází při elektroforetické separaci k dalšímu jevu tzv. elektroosmóze. Vnější projev elektroosmózy je elektroosmotický tok uvnitř kapiláry. Tento elektroosmotický tok vzniká ihned po připojení zdroje elektrického napětí na separační kapiláru a čerpá celý obsah kapiláry k jedné z elektrod (za běžných podmínek směrem ke katodě). Velikost el. toku závisí na materiálu kapiláry, pH elektrolytu a jeho viskozitě. Za vhodných podmínek el. tok umožňuje simultánní analýzy kationtů, aniontů i neutrálních částic během jedné analýzy. Rychlostní profil el. toku je píستový a nepřispívá významně k rozšiřování zón migrujících látek. [25], [26]

Vedle kapilární zónové elektroforézy mohou být v kapiláře realizovány další varianty zónové elektroforézy:

- Kapilární gelová elektroforéza (CGE)
- Kapilární elektrochromatografie (CEC)
- Kapilární izotachoforéza (CITP)
- Kapilární izoelektrická fokusace (CIEF)
- Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)

Běžně se CZE separace (obrázek č.) realizují v křemenných kapilárách (1) s vnitřním průměrem 10 - 75 μm s délkou 30 - 100 cm. Separace je realizována při napětí (2) 10 - 30 kV (záleží na délce a průměru kapiláry a vodivosti elektrolytu (5, 6), tak aby ztrátový výkon na kapiláře nepřekročil cca 5 - 6 W/m). Kapilára je umístěna v termostatu (9) se vzduchovým nebo

vodním temperováním. Detekce (3) je realizována nejčastěji on-column, UV, respektive fluorescenční a vyhodnocení probíhá na počítači (4). [25], [26]



Obrázek 10: Schéma elektroforetického zařízení (podle [27])

1.5.3 Metody analýzy sulfonovaných pyrenů

1.5.3.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC je běžnou a úspěšně používanou metodou ke stanovení pomocných barev a meziproduktů v barevných přísadách. Jako příklad může být uvedeno barvivo D&C Green No. 8 (G8) používané v kosmetice a farmacii v USA. Vedlejším produktem jeho výroby je PTS (trisodná sůl kyseliny 1,3,6-pyrentrisulfonové) a PTTS (tetrasodná sůl kyseliny 1,3,6-pyrentrisulfonové). Obsah vedlejší produktů v G8 barvivu je omezen (< 1 % P3S a P4S), a proto je důležité jejich stanovení, ke kterému může být použita semipreparativní tenkovrstvé chromatografie (TLC) nebo HPLC. TLC je prováděna na směsné vrstvě silikagelu a celulózy. Po analýze je deska vysušena, seškrábnuty barevné pásy, provedena extrakce barviv z adsorbentu a konečná kvantifikací za pomoci UV spektrofotometrie. [28]

HPLC analýza pro sulfonované deriváty bylo provedena na koloně Kinetex PFP (2,6 μ , 100Å, 100 mm x 4,6 mm). Jako mobilní fáze sloužil 0,1M vodný roztok octanu amonného v methanolu s gradientovou elucí. Vlnová délka detekce byla 280 nm, což je vhodná vlnová délka pro analýzu P3S a P4S. Celkový potřebný čas k analýze činil okolo 12–15 minut. Ve srovnání s TLC metodou, je metoda HPLC méně pracnou, s menší časovou náročností a s použitím minimálního množství rozpouštědel. Díky použití kolony povrchově porézními

částicemi mohlo být dosaženo rychlosti srovnatelné s UHPLC analýzami. Tento způsob separace lze využít i pro jiné velmi polární aromatické látky. [28]

Další studie využívá pro separaci sulfonovaných aromatických pyrenů je za pomoci protiproudé chromatografie s rafinací pH zóny. Jedná se o chromatografii kapalina-kapalina, která umožňuje separaci organických kyselin a bází podle jejich hydrofobicity a hodnot pKa bez použití pevného nosiče. Separace je vhodná pro látky obsahující jednu nebo více skupin karboxylových kyselin, peptidů, aminokyselin, pro fluoresceinová barviva nebo sulfonované kyseliny. Přidáním iontově párového činidla do roztoku vzorku i do organické stacionární fáze umožňuje kvalitní separaci barviv na bázi sulfonovaných kyselin a usnadňuje jejich přechod do organické SF. K separaci např. PTS (nečistota v barvivu D&C Green No. 8) může být využit jako ligand dodecylamin, který zůstává ve SF a působí tak, jako protiiont pro složky barviva substituovanými sulfonovanou kyselinou. Pro separaci je využit komerční vysokorychlostní CCC systém s UV detekcí při 254 nm. Eluenty z kolony jsou sbírány pomocí sběrače frakcí na základě hodnot pH a poté analyzovány pomocí HPLC. Identifikace a charakterizace separovaného PTS může být provedena hmotnostní spektrometrií s vysokým rozlišením, HPLC s UV spektry nebo protonovou magnetickou rezonancí (NMR). [29]

1.5.3.2 Kapilární zónová elektroforéza

Na základě studií a databází, které byly k dispozici, a ve kterých byly vyhledávány informace ohledně separací sulfonovaných derivátů pyrenů pomocí elektroforetických metod, se nepodařilo najít žádný relevantní odkaz zaznamenávající tuto skutečnost, a proto je v následujícím textu uveden pouze krátký výčet některých aplikací sulfonovaných derivátů pyrenu s využitím pro separace či stanovení jiných látek.

Sulfonované pyreny, konkrétně pyrentetrasulfonáty, jsou používány např. jako migrační referenční markery, které jsou využívány pro separace enantiomerních chirálních sloučenin pomocí kapilární elektroforézy, většinou v přítomnosti vysoce sulfatovaných cyklodextrinů [30]. Tento typ využití tetrasulfonovaného pyrenu je popisován i v práci zabývající se separací herbicidů obsahující fenoxykyseliny a jejich enantiomery pomocí kapilární zónové elektroforézy. [31]

V další studii byl 1,3,6,8 - terasulfonovaný pyren využit pro simultánní stanovení xanthinu, hypoxantinu a kyseliny močové pomocí diferenčně pulzní voltametrie. Tetrapyrensulfonát byl využit ve formě senzoru tzv. kompozitu PPTS-NG, který vznikl po funkcionalizaci dusíkem

dopovaným molekulou grafenu (NG). Takto připravený kompozit slouží pro konstrukci citlivých elektrochemických senzorů v bioelektrochemii a enviromentální analýze. [32]

Jak již bylo zmíněno, nebyla nalezena žádná relevantní práce popisující provedení elektroforetické separace sulfonovaného pyrenu, a proto bylo rozhodnuto, že se pokusíme optimalizovat podmínky nejen pomocí HPLC, ale i separace pomocí CZE se vzájemným porovnáním získaných výsledků z jednotlivých metod.

1.5.4 Metody analýzy sulfonovaných naftalenů

Naftalensulfonáty jsou aromatické sloučeniny s velice dobrou tepelnou stabilitou, vysokou rozpustností a mobilitou ve vodném prostředí, ale zároveň nízkou biologickou odbouratelností. Snadno se dostávají do enviromentálních vod, jako jsou vody podzemní a povrchové. Koncentrace v evropských povrchových a říčních vodách se běžně pohybuje v rozmezí ng/l – µg/l. Maximální hladina těchto kontaminantů v pitné vodě je 2 µg/l. Všechny jejich zmiňované vlastnosti je činí nebezpečnými pro vodní prostředí. Z tohoto důvodu je velmi důležitým a nezbytným krokem jejich analýza a kontrola jejich přítomnosti ve vodě.

Před samotnou analýzou vzorků vod s potenciálním obsahem sulfonovaných naftalenů, je nejprve nutná jejich předúprava extrakčním obohacovacím krokem. Jedná se o extrakce pomocí iontových párů v pevné fázi (iontový pár SPE) nebo aniontové výměny či molekulárně imprintované polymery (MIP). Přímé stanovení NS je značně náročné, protože jejich koncentrace ve vzorcích získaných z životního prostředí je velmi nízká a může být nadále komplikována i vlivem matricových interferencí, které se vyskytují v komplexních reálných vzorcích. Ke stanovení NS v různých matricích vzorku jsou rozděleny na metody chromatografické, elektroforetické a spektrofotometrické. [33]

1.5.4.1 Analýza chromatografickými technikami

Dělení složitých směsí látek pomocí chromatografických technik jsou jedny z velmi využívaných a osvědčených. [33] Mohou být použity různé typy chromatografických metod, jako například plynová chromatografie (GC), která však zahrnuje spojení s procesem derivatizace. [34] Derivatizace je cílenou přeměnou chemické struktury analytu chemickou reakcí funkční skupiny s vhodným derivatizačním činidlem. Takový produkt/derivát má požadované chromatografické (fyzikálně-chemické) vlastnosti. Derivatizace je vhodná pro separační techniky a vůbec pro celkové umožnění separace u některých druhů látek. U NS je prováděna za účelem zvýšení jejich těkavosti, [35] kdy jsou aromatické sulfonové kyseliny před

samotnou separací převedeny na odpovídající esterové deriváty. Takový derivát je možno získat např. metylací tetramethylamoniovým kationtem, metylací diazomethanem nebo reakcemi s thionylchloridem-trifluorethanolem. Tohoto derivatizačního postupu lze využít při stanovení sulfonovaných derivátů naftalenu ve vzorcích balené nebo říční vody pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. [33], [36]

Vzhledem k polárnímu charakteru aromatických sulfonovaných látek je vhodné jejich analýzu provádět kapalinovou chromatografií nebo speciálně kapalinovou chromatografií s využitím iontových párů.

V roce 2000, R. A. Gimeno a spol. publikovali rychlou analytickou metodu pro kvantifikaci NS pomocí online iontově párové kapalinové chromatografie. Chromatografický systém byl online spojen s předklonkou, na které byl proveden obohacovací extrakční krok. Jako předkoncentrační technika byla zde zvolena SPE s použitím polymerních či C18 sorbentů. Metoda byla dále vybavena fluorescenčním spektrometrem jako detekčním systémem. Fluorescenční detektor je pro aromatické sulfonáty preferován z důvodu jednoduššího přístrojového vybavení v porovnání s hmotnostním spektrometrem, a také má vyšší citlivost, než je při UV detekci. Cíl této práce tkvěl ve zrychlení samotné doby analýzy NS. Na zkrácení/zrychlení doby analýzy byl k měření použit rychlý fluorescenční spektrometr, který zaznamenává spektra při pevné excitační vlnové délce a rychlém skenování emisní vlnové délky. Koeluované analyty lze poté kvantifikovat pomocí různých emisních vlnových délek nebo vícerozměrné kalibrace. Z tohoto důvodu není nutná úplná separace chromatografických píků, a dochází tak k výraznému zkrácení doby analýzy z 1 h na cca 25 minut. Protože není nutná úplná separace NS sloučenin, byla zvolena analýza za izokratických podmínek s průtokem mobilní fáze 1 ml/min a při pokojové teplotě okolo 20 °C. Mobilní fáze byla směs methanolu/vody v poměru 35 % : 65 % s přidavkem fosforečnanového pufru a bromidu terc-butylamonium bromidu jako ion-párového činidla. K separaci byla použita kolona byla Kromasil 100 C18 o rozměrech 150 × 4 mm a velikosti částic 5 μm. Za takto zvolených podmínek je možné kvantifikovat ve vodě koncentraci NS okolo 0,01–3 μg/l. [34]

U HPLC systémů s obrácenými fázemi s čistě vodně-organickou mobilní fází se sulfonové kyseliny eluují blízko mrtvého objemu kolony a s malou retencí, protože sulfonované látky jsou silné kyseliny, které zcela disociují ve vodných i vodně-organických roztocích v širokém rozsahu pH. Pro potlačení jejich ionizace a zlepšení jejich separačních vlastností nelze pokaždé

použit zředěné kyselý pufr, ale je nutné do mobilní fáze přidávat iontové sloučeniny (soli) pro úspěšné dosažení separačního procesu. Retenci vzorku lze řídit úpravou koncentrace organického rozpouštědla a anorganické soli v mobilní fázi. Selektivita a retence separace závisí na počtu sulfonových skupin, na povaze a charakteru aromatického kruhu, počtu a poloze substituentů a na povaze iontového činidla.[37]

Pro separaci izomerních naftalen mono – až tetrasulfonových kyselin, které jsou používány jako barvářské meziprodukty, je vhodná separace pomocí HPLC s vodně-metanolovými mobilními fázemi obsahujícími síran sodný (Na_2SO_4). Separace je citlivá na typ nepolární stacionární fáze. Nejlepší separace bylo dosaženo na koloně s vysokým pokrytím uhlíkovou stacionární fází (Separon SGX RPS). Tímto způsobem bylo rozseparováno 12 mono-tetranafталensulfonových kyselin s využitím lineárního gradientu klesajícího obsahu síranu sodného a zároveň lineárního gradientu růstu koncentrace methanolu v mobilní fázi. [37], [38]

1.5.4.2 Analýza elektroforetickými technikami

Vedle použití kapalinové chromatografie (CE) pro separaci aromatických sulfonovaných látek hraje významnou roli použití kapilární elektroforézy v této oblasti. Kapilární elektroforéza je ideální technikou pro separaci iontových látek rozpustných ve vodě. K těmto analýzám lze použít kapilární zónovou elektroforézu (CZE) nebo micelární elektrokinetickou chromatografii (MEKC). [39]

Zatímco v pracovních elektrolytech bez přídavku vhodných selektorů izomerů se naftalensulfonové kyseliny dělí pouze podle stupně sulfonace, je po přídavku vhodného činidla (např. cyklodextriny) umožněna i separace jednotlivých polohových izomerů naftalenů se stejným stupněm sulfonace. Jako nejvhodnější se ukázal přídavek β -cyklodextrin a/nebo γ -cyklodextrinu do pracovního elektrolytu s borátovým pufr. Tímto způsobem se podařilo rozseparovat podobnou směs jako v případě dříve uvedené HPLC s mobilní fází s vysokou koncentrací anorganické soli. [37]–[39]

Roku 1998 R. Niessner a R. Loos provedli separaci 14 různých aromatických sulfonátů CZE metodou s použitím směsného boritanu octanového pufru nastaveného na $\text{pH} = 10$. K detekci byl využit UV detektor (210/230 nm) a duální monochromátorový fluorescenční detektor. (excitační vlnová délka 230 nm; emisní vlnová délkou 335/410 nm). Pro zlepšení separace jednotlivých izomerů byl k pracovnímu elektrolytu přidáván acetonitril až do 40 %. Tato metoda byla kombinována i s obohacováním vzorku na sytřen-divinylbenzenovém sorbentu (LiChrolut EN). [39]

Zvýšení selektivity separací pro elektroforetické metody lze vyřešit přidáním povrchově aktivní látky do elektrolytu v módu tzv. micelární elektrokinetické chromatografie (MEKC). Mechanismus zahrnuje kombinaci hydrofobně-hydrofilních a dipolárních interakcí mezi micelou a analytem. Použité povrchově aktivní látky mohou být neiontové, kationtové, aniontové a amfoterní povahy. Pro zlepšení separací NS jsou často využívány neiontové povrchově aktivní látky např. Brij 35, aniontové povrchově aktivní látky jako SDS nebo jiné např. polyethylenglykol, Triton X-405 nebo cholát sodný. Přídavek organických modifikátorů do pufru může ovlivnit jak jednotlivé mobility jednotlivých analytů, tak i jejich elektroosmotický tok. [40] Vliv přídavku SDS na separaci směsi 21 naftalensulfonátů založené na MEKC sledoval S. J. Kok a spol. Těchto 21 ND bylo rozděleno do tří skupin charakterizovaných počtem substituentů -NH₂, -OH nebo -SO₃⁻. Požadovaná separace proběhla za použití boritanového pufru obsahující buď 100 mM SDS nebo 15 % ACN. Doba analýzy se oproti klasické CE prodloužila z 19 minut na 28 minut a bylo dosaženo základní separace a skoro úplné separace pro 1-NS, 2-NS a další naftalensulfonáty s -NH₂ skupinami. U dalších proměřovaných sulfonátů např. 1,5-NS, 2,6-NS a 2,7-NS nebyla separace ovlivněna ani přídavkem SDS. Přídavek methanolu do elektrolytu vedl pouze k rozšíření píku analyzovaných látek, ale zatímco přídavek ACN v koncentraci 5 – 20 obj. % zaručil úplnou separaci problematických izomerů 1,5-NS, 2,6-NS a 2,7-NS.[40] [41]

Vědecké práce porovnávající selektivitu a užitečnost povrchově aktivních látek pro separaci naftelnových sulfonátů se shodují na tom, že neiontové povrchově aktivní látky jsou selektivnější a pro daný účel výhodnější. Pan Angelino a spol. ukázali, že Brij 35 je ideálním surfaktantem pro úspěšnou separaci izomerních BZS (benzensulfonátů) a NS. Zároveň studovali vliv přídavku alkylaminu (oktylamin) do micelárního systému. Přestože oktylamin nemůže tvořit iontové páry tzv. oktylamonium-sulfonáty při zvoleném pH pufru (pH > 8), je výhodný pro změny micelárního prostředí a tím zlepšení MEKC separace (např. zkrácením doby analýzy oproti výsledkům uvedeným v [41], lepší tvary píku, lepší účinnost). Sulfonované deriváty nebo jejich hydroxylové/aminové skupiny jsou velice rozšířenými látkami znečišťující životní prostředí. Jsou převážně přítomny jako komplexní směsi obsahující mnoho izomerů a jejich separace je stále celkem komplikovaným krokem. Existují určitá doporučení na separaci zahrnující uplatnění dvou nezávislých metod pro potvrzení a porovnávání výsledků, protože chybí určitá standartní referenční metoda jejich analýzy. [42]

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Chemikálie

2.1.1 Použitá rozpouštědla

- Acetonitril (HPLC) ($\geq 99,7\%$, Sigma Aldrich)
- Methanol (HPLC) ($\geq 99,7\%$, Sigma Aldrich)
- Deionizovaná voda – připravena přístrojem na úpravu vody Demiwa 10 ROSA a IWA 20 iol, (Watek, Ledec nad Sázavou, ČR)

2.1.2 Chemikálie pro přípravu pufru

- Octan amonný, (p.a, pro analýzu LachNer, Neratovice, ČR)
- Kyselina boritá ($\geq 99,5\%$, Sigma Aldrich)
- Tetraboritan sodný dodekahydrát (99,5 %, Sigma Aldrich)
- β -Cyklodextrin ($\geq 98,0\%$, Sigma Aldrich)

2.1.3 Sulfonované pyreny

Vzorky:

- Vzorek 051/297A: Pyren-1,3,6,8-tetrasulfonová kyselina, (Synthesia, Rybitví, Česká republika)
- Vzorek 051/297B: Pyren-1,3,6,8-tetrasulfonová kyselina, (Synthesia, Rybitví, Česká republika)
- Vzorek 051/266C: Pyren-1,3,6,8-tetrasulfonová kyselina, (Synthesia, Rybitví, Česká republika)



Obrázek 11: Vzorky a standardy pyrenu/sulfonovaného pyrenu (vlastní ilustrace)

Standardy:

- STD 1: sodná sůl 1-pyrensulfony kyseliny ($\geq 99,7\%$), CAS: 59323-54-5, Sigma Aldrich, USA)
- STD 2: sodná sůl pyren-1,3,6,8-tetrasulfony kyseliny ($\geq 95\%$), CAS: 59572-10-0 (Thermo Scientific, USA)
- STD 3: Pyren, (DEZA, Valašské Meziříčí, ČR)

Sulfonace:

- Oleum (20 %, Synthesia, Rybitví, ČR)
- Síran sodný p.a., Penta, Chrudim
- Chlorid sodný p.a., Penta, Chrudim

2.1.4 Sulfonované naftaleny

Vzorky:

- Vzorek 1: Spolostan 7G, vysokomolekulární kondenzát naftalensulfony kyseliny a formaldehydu, Poly-naphthalensulfonát sodný, (Enaspol, ČR)
- Vzorek 2: Spolostan 4P, nízkomolekulární kondenzát naftalensulfony kyseliny a formaldehydu, Poly-naphthalensulfonát sodný (Enaspol, ČR)
- Vzorek 3: Naftalensulfony kyselina směs, (Synthesia, Semtín, ČR)
- Vzorek 4: Naftalensulfony kyselina směs, (Synthesia, Semtín, ČR)
- Vzorek 5: Naftalensulfony kyselina směs, (Synthesia, Semtín, ČR)

Standardy:

- STD 1: 1,3 – NDSK – Na; sodná sůl 1,3-naftalendisulfony kyseliny, Spolek pro chemickou a hutní výrobu, Ústí nad Labem)
- STD 2: 1,6 – NDSK-Na; sodná sůl 1,6-naftalendisulfony kyseliny, (Spolek pro chemickou a hutní výrobu, Ústí nad Labem)
- STD 3: 1,5-NDSK-Na; sodná sůl 1,5-naftalendisulfony kyseliny, (Spolek pro chemickou a hutní výrobu, Ústí nad Labem)
- STD 4: 1,7-NDSK-Mg; hořčnatá sůl 1,7-naftalendisulfony kyseliny, (Spolek pro chemickou a hutní výrobu, Ústí nad Labem)
- STD 5: 2,6 – NDSK-Na; sodná sůl 2,6-naftalendisulfony kyseliny, (výzkumný ústav organických syntéz, Pardubice-Rybitví)
- STD 6: 2,7 – NDSK-Na; sodná sůl 2,7-naftalendisulfony kyseliny, (výzkumný ústav organických syntéz, Pardubice-Rybitví)

- STD 7: 1,3,5-NTSK-Na; sodná sůl 1,3,5-naftalentrifosfonové kyseliny, (Spolek pro chemickou a hutní výrobu, Ústí nad Labem)
- STD 8: 1,3,6-NTSK-Na; sodná sůl 1,3,6-naftalentrifosfonové kyseliny, (Spolek pro chemickou a hutní výrobu, Ústí nad Labem)
- STD 9: 1,3,7-NTSK-Na; sodná sůl 1,3,7-naftalentrifosfonové kyseliny, (Spolek pro chemickou a hutní výrobu, Ústí nad Labem)
- STD 10: 1,3,5,7-NTTSK-Ca; vápenatá sůl 1,3,5,7-naftalentetrasulfonové kyseliny, (Spolek pro chemickou a hutní výrobu, Ústí nad Labem)
- STD 11: naftalen ($\geq 99\%$, Sigma Aldrich)



Obrázek 12: Standardy sulfonovaných naftalenů (vlastní ilustrace)

2.2 Přístrojové vybavení

2.2.1 Přístroje

- a) HPLC chromatograf Agilent 1260 Infinity II, Agilent Technologies (Santa Clara, USA), obsahující:
 - kvartérní čerpadlo (nejvyšší dosažitelný tlak činí 800 bar, nastavení průtoku v rozsahu 0,1 – 5 ml/min)
 - kolonový termostat (vyhřívání od 10–80 °C)
 - detektor s diodovým polem (DAD), rozsah vlnových délek 190 – 950 nm, umožnění současného měření až při 8 vlnových délkách
 - fluorescenční detektor (FLD)
 - autosampler (schopnost dávkovat objem 0,1 – 100 μ l)



Obrázek 13: Kapalinový chromatograf Agilent 1260 Infinity II (vlastní ilustrace)

→ Testované kolony:

- 1) Kinetex® Polar C18, 150 x 3.0 mm, 2.6 μm , 100Å (Phenomenex)
- 2) Ascentis® Express ES-CN, 10 cm x 4.6 mm, 2.7 μm (Supelco)
- 3) Discovery® HS F5, 15 cm x 4.6 mm, 5 μm (Supelco)
- 4) Supelcosil® LC – NH₂ 15 cm x 3.0 mm, 3 μm (Supelco)
- 5) Poroshell 120 EC-C18, 15 cm x 3.0 mm, 2.7 μm (Agilent Technologies)

b) Kapilární elektroforetický systém Agilent 1700, Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA), obsahující:

- Kapilára, 365 x 75 μm I.D, délka 75 cm (efektivní délka k detektoru 62 cm), (Polymicro)
- zdroj napětí (do 30 kV)
- detektor s diodovým polem (DAD)
- autosampler



Obrázek 14: Kapilární elektroforéza Agilent ^{3D}CE 1700 (vlastní ilustrace)

- c) UV spektrometr SPECORD 50 plus, Analytik Jena (Jena, Německo)
- d) FLD spektrofluorometr FluoroMax-4, Horiba Jobin Yvon, (LABIMEX s.r.o, Praha)
- e) Ultrazvuková lázeň, Sonorex (Bandelin)
- f) pH metr (Metrohm) 827, (Metrohm)
- g) Sušící kalibrační váhy Sartorius, (Sartorius)
- h) Analytické váhy AE 200, Mettler (Mettler-Toledo)
- i) Sušárna Memmert UN, (Memmert)
- j) Automatické pipety o různých objemech, (Fisherbrand)
- k) Odměrné baňky, kádinky, kapátka, kopist, lodičky, nálevky
- l) Křemenné kyvety pro UV/Vis s optickou dráhou 1 cm Hellma (Hellma)

2.3 Mobilní fáze

2.3.1 Mobilní fáze pro HPLC

- a) MF A – octan amonný (1 g/l)
- b) MF B – Acetonitril (100 %)
- c) MF C – Demineralizovaná voda

Jako mobilní fáze A byl používán pufr, roztok octanu amonného (demineralizovaná voda a octan amonný). Na analytických vahách byl naváženo 1 g octanu amonného a rozpuštěn v jednolitrové odměrné baňce. Roztok octanu amonného byl promíchán a přefiltrován přes filtr s velikostí částic 0,2 μm . Roztok byl uchováván v zásobní lahvi z tmavého skla, která brání rozkladu pufru. Mobilní fázi B tvořil 100 % Acetonitril HPLC kvality.

2.3.2 Příprava elektrolytu pro CE

Pro separace provedené na kapilární elektroforéze byl připraven 0,05 mol/l borátový elektrolyt s přidavkem 0,01 mol/l β -cyklodextrinu. Ve 100 ml odměrné baňky byla rozpuštěna navážka 1,905 g tetrahydroboritanu sodného (dodekahydrátu) a objem baňky doplněn po rysku destilovanou vodou. Do 25 ml odměrné baňky bylo rozpuštěno 0,028 g β -cyklodextrinu a doplněno po rysku připraveným roztokem tetraboritanu. Takto připravený elektrolyt byl před použitím přefiltrován přes stříkačkový mikrofiltr (0,2 μm) přímo do elektrolytových nádobek přístroje pro kapilární elektroforézu.

2.4 Postup přípravy sulfonovaného pyrenu

Příprava sulfonovaného pyrenu proběhla laboratorně. Do sulfonační baňky bylo naváženo cca 160 g síranu sodného a 1300 g 20 % olea, poté byla směs zahřáta na 60 °C. Do vzniklého roztoku bylo přidáno cca 101 g pyrenu (při 55 °C) a směs byla ponechána reagovat přes noc (16 h). Druhý den byla směs převedena do 4000 g vody a celá směs byla následně ochlazená. Bylo získáno okolo 5444 g směsi. Po vysolení bylo odebráno cca 100 g směsi ke které byl přidán chlorid sodný (cca 13 – 20 g), směs byla míchána (2 – 4 h), poté přefiltrována a vysušena, čímž byly získány vzorky sulfonovaného pyrenu.

2.5 Optimalizované podmínky HPLC analýzy sulfonovaných pyrenů

Finální analýzy HPLC/DAD-FLD pyrenu, standardů a sulfonovaných vzorků pyrenu proběhla na kapalinového chromatografu Agilent 1260 Infinity II s využitím optimalizované metody založené na gradientové eluci, která docílila separace jak jednotlivých standardů sulfonovaného pyrenu monosulfonovaného, tetrasulfonovaného pyrenu tak i nesulfonovaného pyrenu v jedné metodě. Optimalizovaný gradient je uvedený v tabulce č. 1. a podmínky měření v tabulce č. 2.

Tabulka 1: Optimalizovaný průběh gradientu

Gradient		
Čas (min)	% MF A	% MF B
0	98	2
3	98	2
10	10	90
12	10	90
12,5	98	2
22	98	2

Tabulka 2: Podmínky separace při měření na HPLC/DAD-FLD

Přístroj:	kapalinový chromatograf Agilent 1260 Infinity II
Kolona:	Polar C18, Kinetex, 15 cm x 3 mm, 100Å, 3 µm
Teplota:	30 °C
MF A:	Voda + octan amonný (1 g/l)
MF B:	Acetonitril
Průtok:	0,5 ml/min
Objem nástřiku:	1 µl
Detekce UV:	240, 254, 270, 330, 238 nm (kvantifikace při: 238 nm)
Detekce FLD:	Excitace při 230 nm ; Emise při 460 nm

2.5.1 Příprava kalibrační řady pro sulfonované pyreny

Kalibrační řada byla připravena pro standard STD 2, kde zásobní roztok byl připraven rozpuštěným navážky 100 mg do 100 ml odměrné baňky, která byla doplněna po rysku demineralizovanou vodou. Ze zásobního roztoku byl následně odpipetován daný objem (viz tabulka č. 3) do 10 ml odměrné baňky, která byla opět doplněna demineralizovanou vodou po rysku. Dávkován byl vždy 1 µl roztoku.

Tabulka 3: Kalibrační řada pro STD 2

c (mg/ml)	V _{STD 2} (ml)
0,1	1
0,2	2
0,3	3
0,4	4
0,5	5
0,6	6
0,7	7

2.5.2 Příprava analyzovaných vzorků pro HPLC

Zásobní roztoky vzorků (051/266C, 051/297A, 051/297B) byly připraveny rozpuštěným navážky 100 mg do 100 ml odměrné baňky. Jednotlivé vzorky byly zhomogenizovány, protřepány, vloženy na 5 minut do ultrazvuku a následně přefiltrovány přes nylonový filtr s velikostí pórů 0,2 μm pro odstranění nečistot, aby popřípadě nedošlo k zanesení kolony. Každý vzorek byl připraven 2x, kdy jednou byl vždy rozpuštěn a doplněn po rysku demineralizovanou vodou, a podruhé rozpuštěn a doplněn po rysku 70 % acetonitrilem. Opět dávkováno 1 μl roztoku.

2.6 Stanovení dalších látek ve vzorcích sulfonovaných pyrenů

Stanovení dalších látek (chloridy a sírany) proběhlo ve spolupráci ve společnosti VUOS a.s., jež disponuje přístroji a metodami pro jejich přesné stanovení. Tyto experimenty nebyly přímou náplní diplomové práce. Chloridy a sírany byly stanoveny titračně, metodou ve vzorcích sulfonovaných pyrenů 051/297A a 051/297B.

Vlhkost vzorku byla zjišťována na sušicích vahách navážením cca 1 g vzorku a vysušením do konstantní hmotnosti. Odečtením hmotnosti před a po skončení sušení byla vypočítána reálná vlhkost vzorku.

2.7 Příprava vzorků a standardů pro UV/Vis spektrometrii

Vzorky a standardy pro měření pomocí UV-VIS spektrofotometrií byly připraveny stejným postupem jako je postup popsáný v kapitole 2.5.2. Dále byla provedena úprava naředěním všech vzorků minimálně pětsetkrát. Naředěnými vzorky byla poté plněna kyveta s délkou optické dráhy 1 cm a ta poté vložena do spektrofotometru. Rozsah snímaných spekter byl od 210 – 400 nm.

2.8 Příprava vzorků a standardů pro fluorescenční spektrometrii

Vzorky a standardy pro měření pomocí fluorescenční spektrofotometrie byly připraveny stejným postupem jako je popsáný postup v kapitole 2.5.2. Dále byla provedena úprava naředěním všech vzorků minimálně pětsetkrát. Naředěnými vzorky byla poté plněna kyveta s délkou optické dráhy 1 cm a ta poté vložena do spektrofotometru. Sledované vlnové délky pro excitační spektrum byly v rozmezí od 210 nm do 400 nm, sledované vlnové délky pro emisní spektrum byly v rozmezí od 300 nm do 600 nm.

2.9 Optimalizované podmínky CZE analýzy sulfonovaných pyrenů

Pro analýzu byla zvolena nepokrytá křemenná kapilára s celkovou délkou 75 cm (efektivní délka k detektoru 62 cm) x 75 μm vnitřní průměr. Teplota kapiláry byla 25 °C a zvolené napětí pro separaci 25 kV. Dávkování do kapiláry bylo pomocí tlaku (10 s při tlaku 50 mbar). Detekce byla provedena detektorem diodového pole snímající vlnovou délku 230 nm. Protože iontová mobilita tetrasulfonovaného pyrenu je v absolutní hodnotě vyšší než mobilita elektroosmotického toku, bylo nutné během analýzy aplikovat na kapiláru přetlak 35 mbar na straně dávkování. Doba analýzy činila 11 minut.

Před každým měřením byla kapilára promyta 0,1 M NaOH po dobu 1 minuty, deionizovanou vodou po dobu 1 minuty a na závěr naplněna a propláchnuta elektrolytem po dobu 1 minuty. Celkový čas analýzy včetně přípravy kapiláry byl 14 minut.

2.9.1 Příprava kalibrační řady pro sulfonované pyreny

Kalibrační řada byla připravena pro standard STD 2, kde zásobní roztok byl připraven rozpuštěným navážky 100 mg do 100 ml odměrné baňky, která byla doplněna po rysku demineralizovanou vodou. Ze zásobního roztoku byl následně odpipetován daný objem (viz tabulka č. 4) do 10 ml odměrné baňky, která byla opět doplněna demineralizovanou vodou po rysku. Dávkování bylo nastaveno po dobu 10 s tlakem 50 mbar.

Tabulka 4: Kalibrační řada STD 2

c (mg/ml)	V _{STD 2} (ml)
0,1	1
0,2	2
0,3	3
0,4	4
0,5	5
0,6	6
0,7	7

2.9.2 Příprava analyzovaných vzorků pro CZE

Zásobní roztoky vzorků (051/266C, 051/297A, 051/297B) byly připraveny rozpuštěním navážky 100 mg do 100 ml odměrné baňky. Jednotlivé vzorky byly zhomogenizovány, protřepány, vloženy na 5 minut do ultrazvuku a poté doplněny demineralizovanou vodou po rysku. Roztoky byly následně ještě 5x zředěny. Dávkování bylo nastaveno po dobu 10 s tlakem 50 mbar.

2.10 Optimalizované podmínky měření pro sulfonované naftaleny

Veškerá chromatografická měření pro HPLC/DAD-FLD naftalenu, jeho sulfonovaných vzorků a standardů proběhla prostřednictvím kapalinového chromatografu Agilent 1260 Infinity II s využitím optimalizované metody založené na gradientové eluci, která docílila požadované separace jak jednotlivých standardů sulfonovaného naftalenu, tak i nesulfonovaného naftalenu v jedné analýze. Optimalizovaný gradient je uveden v tabulce č. 5 a podmínky měření v tabulce č. 6.

Tabulka 5: Optimalizované podmínky gradientu

Gradient		
Čas (min)	% MF A	% MF B
0	100	0
1	100	0
3	98	2
10	85	15
15	85	15
25	10	90
27	10	90
27,5	100	0
37	100	0

Tabulka 6: Podmínky při měření HPLC/DAD-FLD

Přístroj:	kapalinový chromatograf Agilent 1260 Infinity II
Kolona:	Polar C18, Kinetex, 15 cm x 3 mm, 100Å, 3 µm
Teplota:	30 °C
MF A:	Voda + octan amonný (1 g/l)
MF B:	Acetonitril
Průtok:	0,5 ml/min
Objem nástřiku:	1 µl
Detekce UV:	240, 254, 270, 330, 228 nm (kvantifikace při: 228 nm)
Detekce FLD:	Excitace při 230 nm; Emise při 460 nm

2.10.1 Příprava kalibrační řady pro sulfonované naftaleny

Kalibrační řada byla připravena pro standard 1,5-NDSK, 1,6-NDSK, 2,6-NDSK, 2,7-NDSK a naftalen, kde zásobní roztoky byly připraveny rozpuštěným navážky 100 mg do 100 ml odměrné baňky, která byla doplněna po rysku demineralizovanou vodou. Ze zásobního roztoku byl následně odpipetován daný objem (viz tabulka č. 7) do 10 ml odměrných baněk, které byly opět doplněny demineralizovanou vodou po rysku. Dávkován byl vždy 1 µl roztoku.

Tabulka 7: Kalibrační řada pro zvolené standardy

c (mg/ml)	V _{STD 2} (ml)
0,01	0,1
0,05	0,5
0,1	1
0,15	1,5
0,2	2
0,25	2,5
0,3	3

2.10.2 Příprava analyzovaných vzorků pro HPLC

Zásobní roztoky vzorků (Spolostan 7G, Spolostan 4P, směsi naftelendisulfonových kyselin (vzorek A, vzorek B, vzorek C)) byly připraveny rozpuštěným navážky 100 mg do 100 ml odměrné baňky. Jednotlivé vzorky byly zhomogenizovány, protřepány, vloženy na 5 minut do ultrazvuku a následně přefiltrovány přes nylonový filtr s velikostí pórů 0,2 µm pro odstranění nečistot, aby popřípadě nedošlo k zanesení kolony. Byly dávkovány 3 µl roztoku pro vzorky spolostanů a 0,5 µl pro vzorky směsi naftalensulfonových kyselin.

3 DISKUZE A VÝSLEDKY

3.1 Optimalizace separace sulfonovaných pyrenů pomocí HPLC

Pro analýzu sulfonovaných pyrenů byla optimalizována metoda gradientové HPLC separace. Analýzy modelových standardů a vzorků proběhly různými postupy, kde byly vyzkoušeny odlišné průběhy gradientů (tabulka č. 8). Cílem byla úplná separace všech látek obsažených ve vzorcích za co možná nejkratší čas, ale i separace jak polárních sulfonovaných pyrenů, tak i nepolárního pyrenu v jedné metodě. Pro optimalizaci podmínek byly vyzkoušeny i různé typy kolon vhodných pro tento typ látek. (uvedeno v kapitole 2.2.1). Jako organická složka mobilní fáze byl zkoušen acetonitril a methanol požadované HPLC kvality.

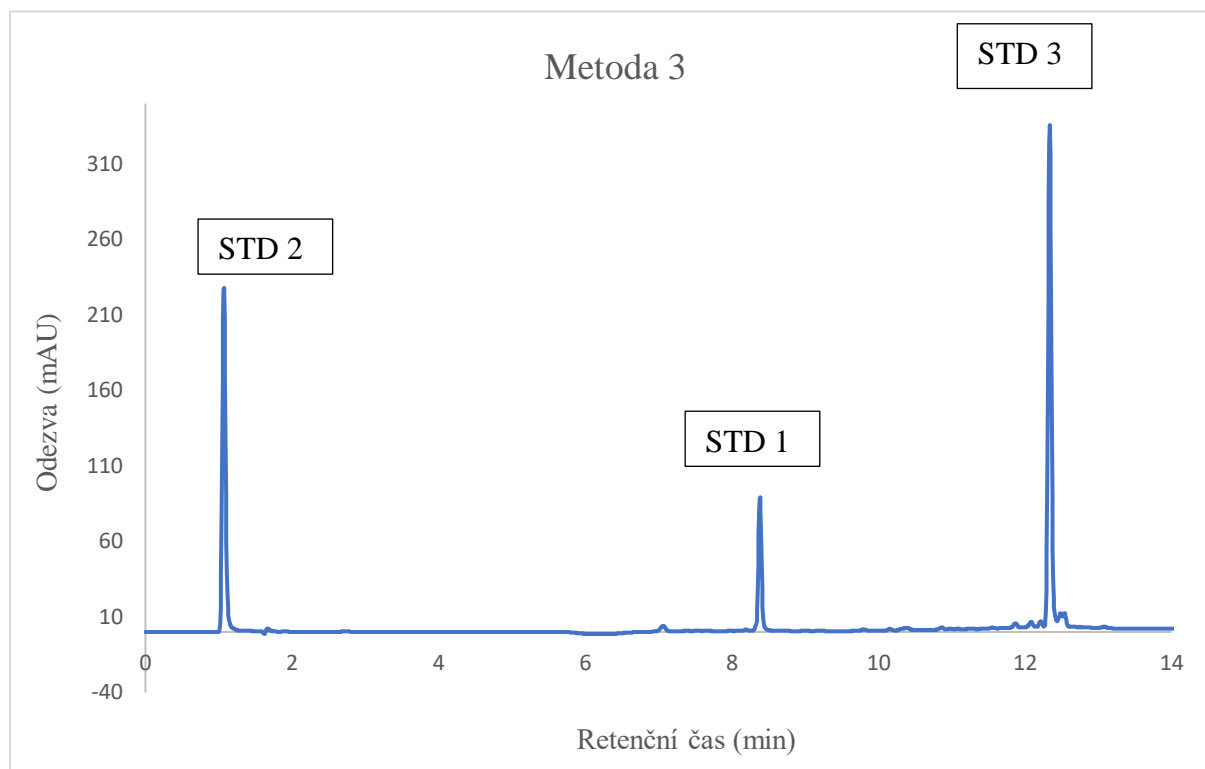
Jako nejvhodnější kolona byla vybrána kolona Kinetex® Polar C18, která je ve vodném prostředí vysoce stabilní a díky jejímu modifikovanému povrchu se pro separaci vysoce polárních sulfonovaných látek hodí nejvíce. Z testovaných gradientů byla Metoda 3 vyhodnocena jako optimální a lepší výsledky byly dosaženy s acetonitrem, jako organickou složkou mobilní fáze oproti methanolu. Zvolená metoda dosahuje předem stanovených cílů s optimálními časovými podmínkami, kdy během 22 minut proběhla jak analýza, tak i reekvilibrace kolony na počáteční podmínky.

Tabulka 8: Optimalizace podmínek metody

Metoda 1			Metoda 2			Metoda 3		
Čas (min)	% MF A	% MF B	Čas (min)	% MF A	% MF B	Čas (min)	% MF A	% MF B
0	95	5	0	98	2	0	98	2
3	95	5	18	90	80	3	98	2
20	10	90	20	10	90	10	10	90
22	10	90	22	10	90	12	10	90
22,5	95	5	22,5	98	2	12,5	98	2
30	95	5	27	98	2	22	98	2

MF A: octan amonný (1 g/l) ve vodě; MF B: acetonitril HPLC kvality

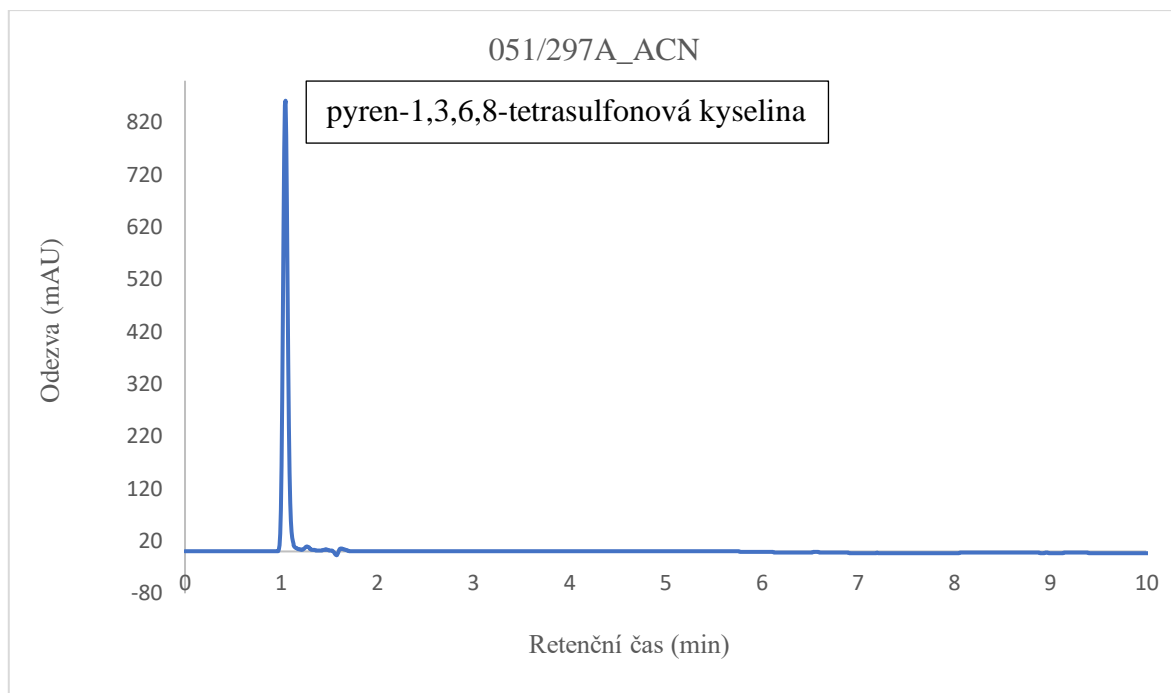
Pro identifikaci v chromatogramu byly analyzovány jak samotné standardy sodných solí STD 1 (pyren-1-sulfonová kyselina) a STD 2 (pyren-1,3,6,8-tetrasulfonová kyselina), tak i STD 3 (pyren) a zároveň jejich směs. Separace směsi standardů za optimalizovaných podmínek (metoda 3) je uvedena na obrázku č. 15 a separace reálných vzorků na obrázcích č.16 a 17. Retenční časy standardů jsou uvedeny v tabulce č. 9.



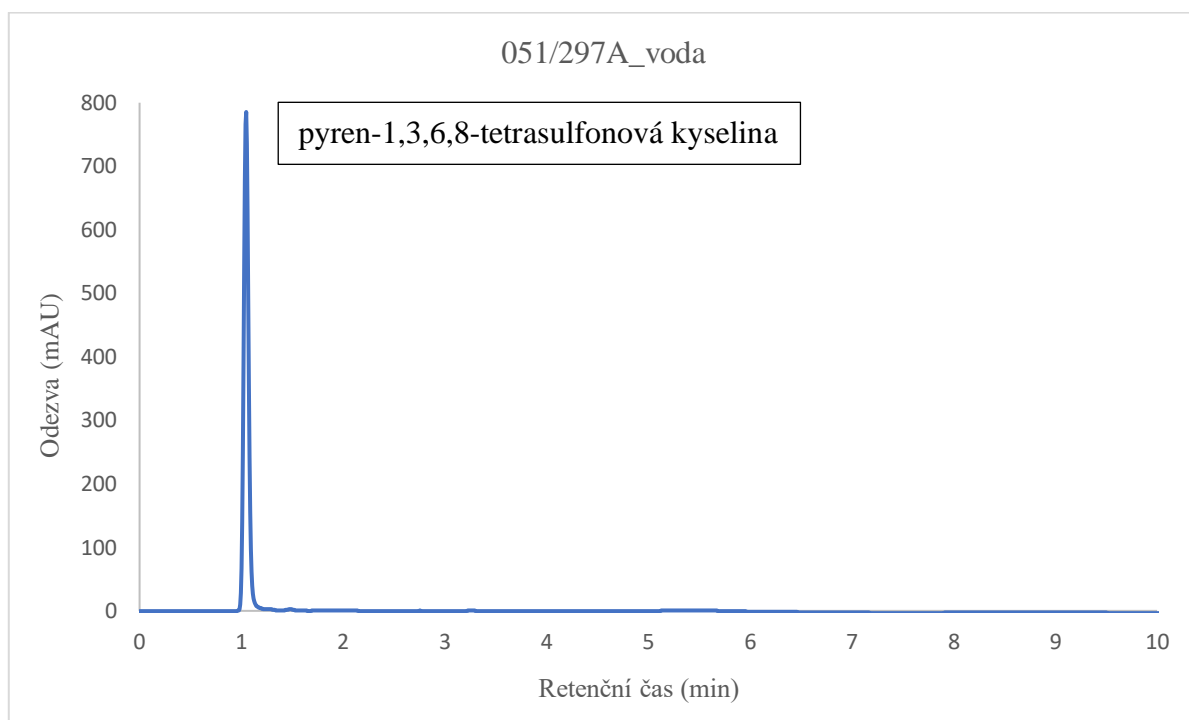
Obrázek 15: Separace směsi standardů pyrenu a sulfonovaných pyrenů. Kolona: Kinetex® Polar C18, 15 cm x 3 mm, 100Å, 2,6 µm, gradientová eluce podle metody 3 (tabulka č. 8) průtok MF: 0,5 ml/min, detekce: UV 238 nm. STD 1: pyren-1-sulfonová kyselina, STD 2: pyren-1,3,6,8-tetrasulfonová kyselina, STD 3: pyren

Tabulka 9: Identifikace jednotlivých sledovaných standardů

Složka	Retenční čas (min)
STD 2 (pyren-1,3,6,8-tetrasulfonová kyselina)	1,075
STD 1 (pyren-1-sulfonová kyselina)	8,395
STD 3 (pyren)	12,351



Obrázek 16: HPLC separace vzorku 051/297A rozpuštěného v acetonitrilu, experimentální podmínky viz obrázek č.15



Obrázek 17: HPLC separace vzorku 051/297B rozpuštěného v acetonitrilu, experimentální podmínky viz obrázek č.15.

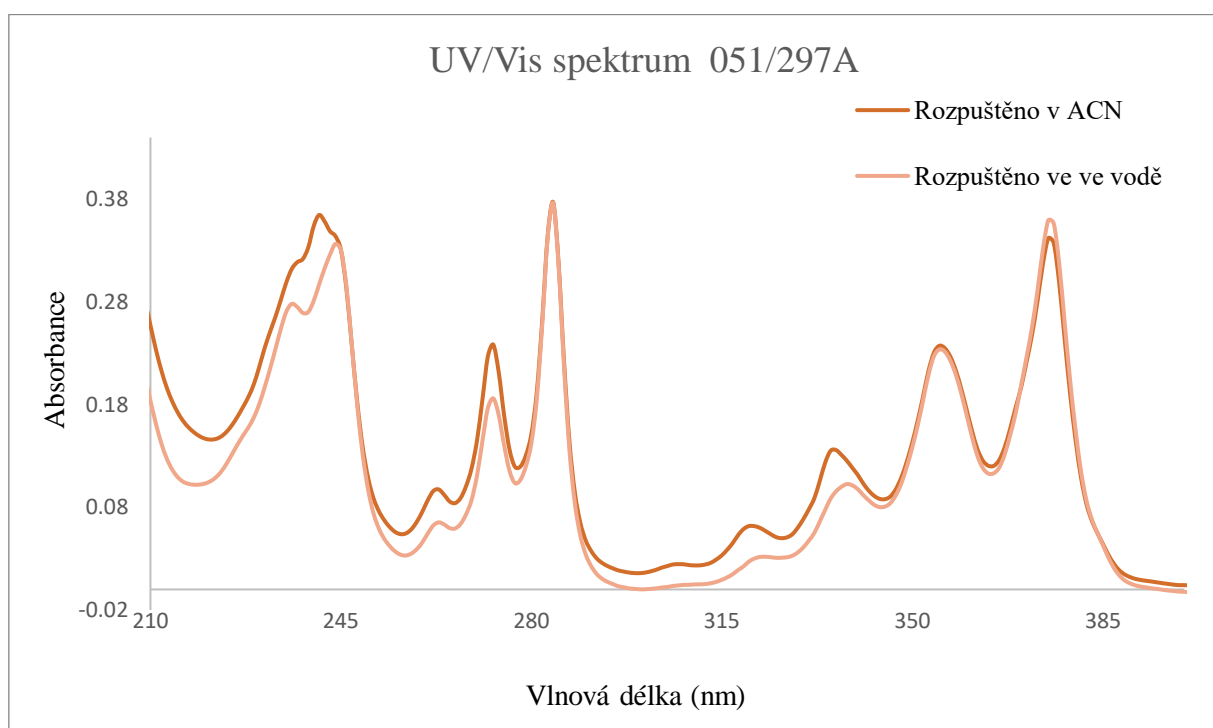
Další záznamy analýz vzorků (051/297A a 051/297B) změřených metodou 3 jsou uvedeny v příloze A pod čísly 1-4. Chromatogramy s různými podmínkami analýz během optimalizace separace jsou uvedeny v příloze A pod čísly 5-9.

3.1.1 Spektrometrické analýzy vzorků a standardů sulfonovaného pyrenu

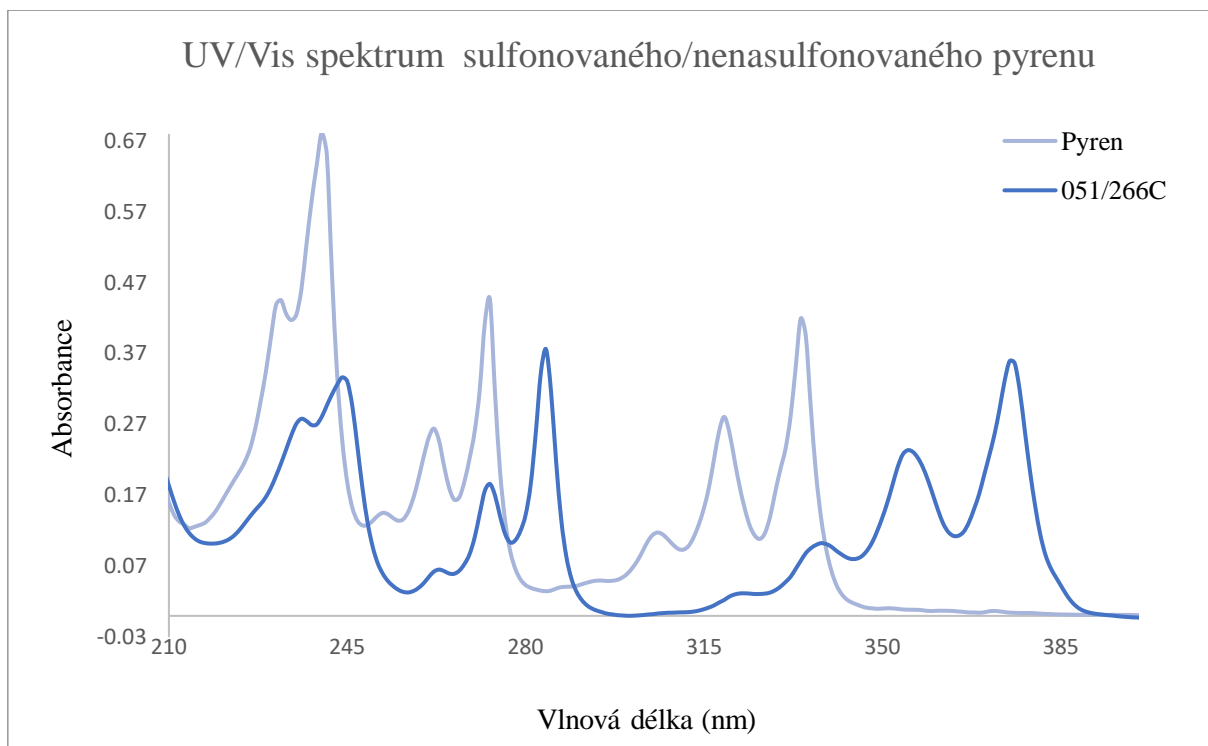
Při HPLC měření všech látek byla snímána detektorem UV-Vis i fluorescenční spektra, která tak mohla být porovnána se spektry změřenými na stolním UV/Vis respektive fluorescenčním spektrofotometru. Vzorky a standardy byly k měření připraveny tak, jak je popsáno v kapitole 2.5.2 v experimentální části diplomové práce. Měření proběhlo vždy třikrát.

Vybrané záznamy porovnávající jednotlivá spektra změřená na stolním spektrometru a spektra změřená na HPLC detektoru obsahuje příloha A pod čísly 10-11. Získaná spektra změřená na spektrometru (UV/Vis) se shodují se spektry změřenými na HPLC. Záznamy ze stolních spektrometrů jsou uvedeny v této kapitole na obrázcích č. 18–20.

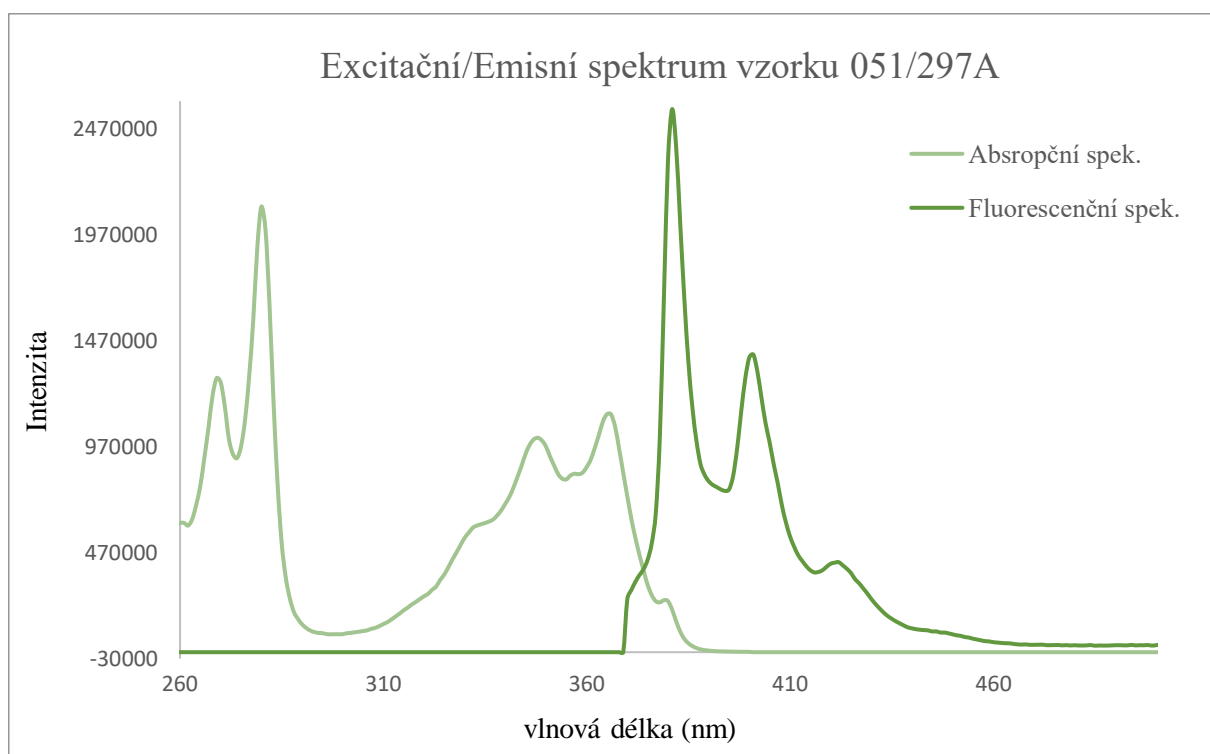
Ze záznamu na obrázku č. 19 je vidět posun všech absorpčních pásů vzorku tetrasulfonovaného pyrenu k vyšším vlnovým délkám (bathochromní posun) oproti pyrenu. Fluorescenční spektrum vzorku 051/297A je typickou ukázkou spektra kdy emisní spektrum je zrcadlovým obrazem excitačního spektra tetrasulfonovaného pyrenu. Spektra získaná z fluorescenčního HPLC detektoru nelze porovnat s fluorescenčními spektry na stolním spektrofluorimetru, protože u HPLC fluorescenčního detektoru je na emisní straně použita štěrbinová s větší šířkou, 20 nm.



Obrázek 18: UV/Vis spektrum vzorku 051/297A rozpuštěného ve vodě/rozpuštěného v ACN, změřeno na UV spektrometru SPECORD 50



Obrázek 19: Porovnání UV/Vis spektra nasulfonovaného vzorku pyrenu (051/266C v ACN) s pyrenem, změřeno na UV spektrometru SPECORD 50



Obrázek 20: Spektrum vzorku 051/297A, změřeno na FLD spektrofluorometru FluoroMax 4, záznam excitačního(absorpčního)/emisního(fluorescenčního) spektra vzorku

3.1.2 Kalibrační měření pro sulfonované pyreny pomocí HPLC

Porovnáním výsledků analýz vzorků se standardy, jak z hlediska retenčních časů i spekter bylo zjištěno, že vzorek obsahuje pouze jednu majoritní složku, a to konkrétně tetrasulfoovaný pyren (STD 2). Pro kvantitativní účely HPLC analýzy byla tedy uvažována pouze jedna kalibrační řada. Příprava kalibračního měření proběhla dle postupu uvedeného v kapitole 2.5.1. Kalibrační měření roztoků proběhlo vždy třikrát a poté byla sestrojena kalibrační závislost plochy píku na jejich koncentraci, která posloužila ke kvantitativnímu vyhodnocení obsahu tetrasulfoovaného pyrenu ve vzorcích. Data kalibrační závislosti a kalibrační křivky jsou uvedeny v tabulkách č. 10-12 a znázorněny na obrázku č. 21. Hodnota korelačního koeficientu R byla 0,9990, což je vyhovující pro lineární závislost. Mez stanovitelnosti (LOQ) a mez detekce (LOD) byly vypočítány v programu Excel nástrojem ANOVA při tvorbě kalibračních závislostí z hodnot uvedených v tabulce č. 10. Kvantifikace proběhla při 238 nm.

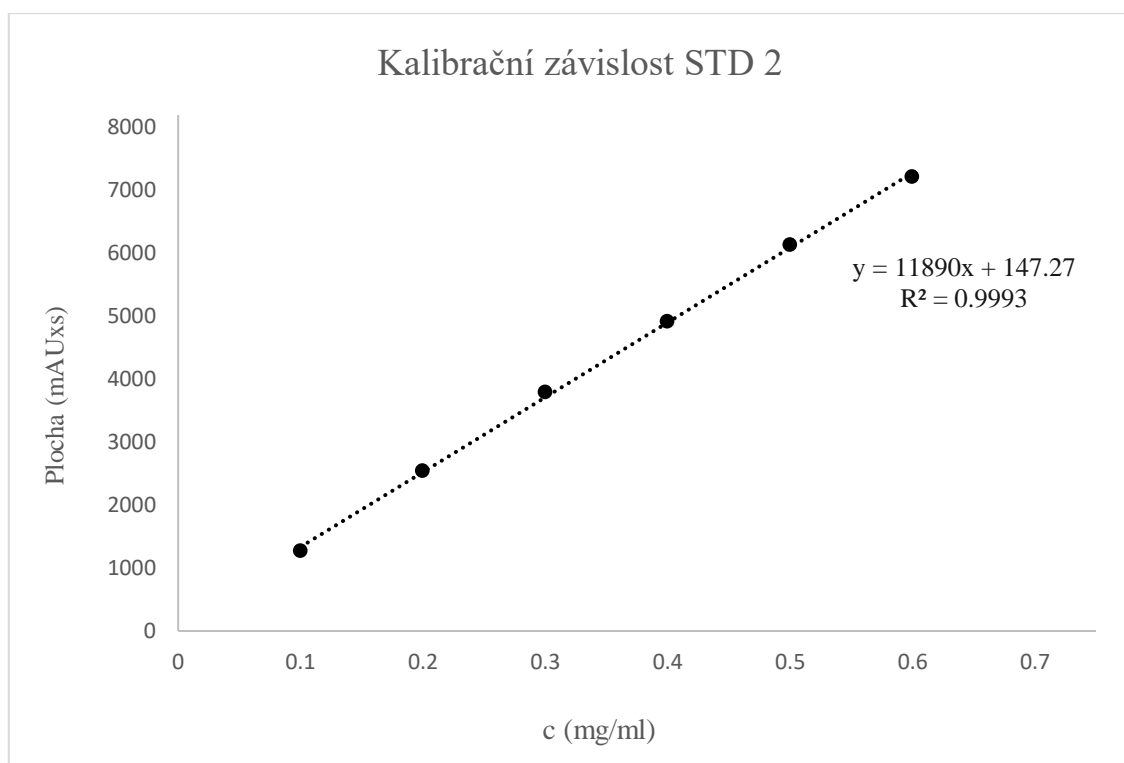
Tabulka 10: Kalibrační závislost STD 2

STD 2			
$V_{\text{pipet.}}$ [ml]	V_{OB} [ml]	c [mg/ml]	S [mAU \times s] 228 nm
1	10	0,1	1273
2	10	0,2	2513
3	10	0,3	3775
4	10	0,4	4990
5	10	0,5	6248
6	10	0,6	7231
7	10	0,7	8289

$V_{\text{pipet.}}$ = pipetovaný objem zásobního roztoku standardu v ml; V_{OB} = objem odměrné baňky;
 c = koncentrace kalibračních roztoků 1-7 v mg/ml, S = plocha kalibračních roztoků 1-7 (mAU \times s)

Tabulka 11: Kalibrační parametry pro vzorky 051/297A, 051/297B, 051/266C

Vzorek	Rozp.	S [mAU \times s] 228 nm
051/266C	voda	4859
	ACN	5018
051/297A	voda	2576
	ACN	2803
051/297B	voda	3604
	ACN	3704



Obrázek 21: Kalibrační závislost STD 2 (1,3,6,8-tetrasulfony pyren)

Tabulka 12: Parametry kalibrační křivky

Složka	Koncentrace c (mg/ml)	Rovnice regrese	R ²	LOD [mg/ml]	LOQ [mg/ml]
STD 2	0,1 – 0,7	$y = 11890x + 147,27$	0,9990	0,053	0,16

Pomocí kalibrační závislosti byl zjištěn obsah tetrasulfony pyrenu ve vzorcích 051/266C, 051/297A a 051/297B. Výsledky kalibračního měření jsou uvedeny v tabulkách č. 13-15. Každá analýza byla opakována 3x. Pomocí statistického t-testu bylo zjištěno, že rozdíl výsledků analýz vzorků rozpuštěných v 70 % ACN a vzorků rozpuštěných ve vodě je statisticky významný na hladině významnosti $\alpha = 0,5$.

Tabulka 13: Výsledky kalibrační závislosti pro vzorek 051/266C (n=3)

051/266C	
Rovnice:	$y = 11890x + 147,27$
x_{ACN} (mg/ml):	0,4096
x_{voda} (mg/ml):	0,3962
hm% x_{ACN}	39,01 ± 0,43
hm% x_{voda}	37,74 ± 0,54

Tabulka 14: Výsledky kalibrační závislosti pro vzorek 051/297A (n=3)

051/297A	
Rovnice:	$y = 11890x + 147,27$
X _{ACN} (mg/ml):	0,2235
X _{voda} (mg/ml):	0,2042
hm% X_{ACN}	21,27 ± 0,4
hm% X_{voda}	19,45 ± 0,23

Tabulka 15: Výsledky kalibrační závislosti pro vzorek 051/297B (n=3)

051/297B	
Rovnice:	$y = 11890x + 147,27$
X _{ACN} (mg/ml):	0,2991
X _{voda} (mg/ml):	0,2907
hm% X_{ACN}	28,68 ± 0,23
hm% X_{voda}	27,68 ± 0,77

Vedle obsahu sulfonovaného pyrenu byly ve vzorcích stanoveny sírany, chloridy (na externím pracovišti) a vlhkost (viz kapitola 2.6). Celkové výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 16. Pro vzorek 051/266C je uvedené pouze procentuální zastoupení chloridů z důvodu nedostatečného množství vzorku k získání dalších zmíněných stanovení.

Tabulka 16: Přehled výsledků analýz vybraných složek vzorků sulfonovaného pyrenu

Vzorek	Sírany (jako Na ₂ SO ₄)	Chloridy (jako NaCl)	Vlhkost	STD 2 (ACN/Voda)		Σ (%) (ACN/Voda)	
051/266C	-	10,0 %	-	39,01	37,74	-	-
051/297A	35,6 %	30,2 %	12,3 %	21,27	19,45	99,50	97,65
051/297B	26,2 %	2,1 %	12,5 %	28,68	27,68	69,77	68,945

3.1.3 Shrnutí výsledků analýz sulfonovaných pyrenů pomocí HPLC

Z výsledků analýz vzorků sulfonovaného pyrenu vyplývá, že po provedení sulfonace je hlavním reakčním produktem 1,3,6,8-tetrasulfonovaný pyren a obsah dalších sulfonovaných pyrenů včetně nesulfonovaného pyrenu nebyl ve vzorku zaznamenán. Z toho důvodu byla kalibrační měření realizována pouze pro standard tetrasulfonovaného pyrenu. Drobné rozdíly v nalezeném obsahu tetrasulfonovaného pyrenu ve vzorcích rozpuštěných ve vodě a v 70 % ACN mohou být způsobeny tím, že k vyhodnocení výsledků byla použita pouze kalibrační řada roztoků připravených v čisté vodě. Z tabulky č. 16 vyplývá, že vzorek 051/297A obsahuje prakticky pouze výše jmenované složky (tetrasulfonovaný pyren, sírany, chloridy, vlhkost) zatímco součet procentuálního obsahu těchto složek ve vzorku 051/297B je cca 70 %. Při přípravě vzorku B bylo použito menší množství chloridu sodného k vysolení vzniklého tetrasulfonovaného pyrenu čemuž odpovídá i menší nález obsahu NaCl v tomto vzorku. I přesto je sumární obsah stanovovaných složek cca 70 %. Další možné složky (nečistoty) se nepodařilo identifikovat. Z pohledu obsahu tetrasulfonovaného pyrenu v analyzovaných vzorcích je jeho nejvyšší obsah ve vzorku 051/266C, avšak množství získaného produktu bylo natolik malé, že nemohly být stanoveny s výjimkou chloridu jeho další parametry. Pokud by se uvažoval obsah síranů a vlhkost podobná jako u vzorků 051/297A a 051/297B, tedy v rozmezí 25-35 % pro sírany a cca 12 % vlhkosti, lze předpokládat, že vzorek C obsahuje pouze výše jmenované složky (suma cca 95-100% hmotnosti vzorku).

3.2 Optimalizace separace sulfonovaných pyrenů pomocí CZE

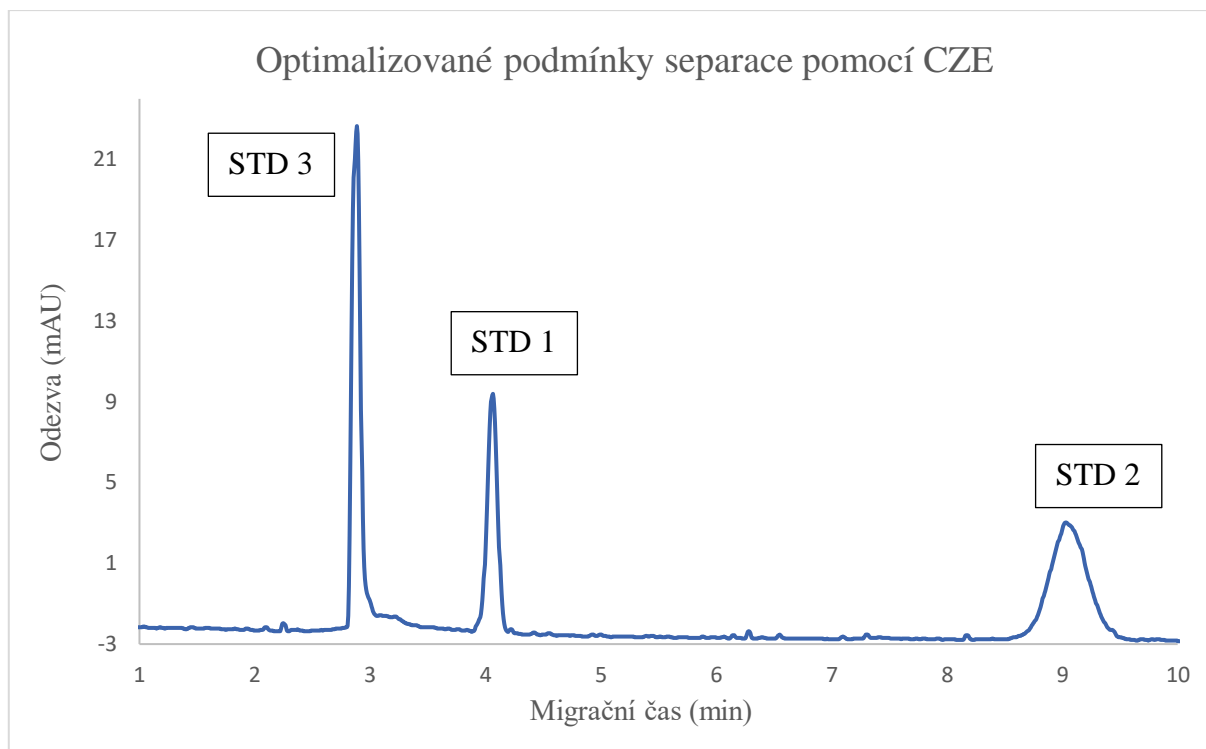
Vedle HPLC metody pro analýzu sulfonovaných pyrenů byla optimalizována i metoda kapilární elektroforetické separace. Při optimalizaci separace se vycházelo z poznatků uvedených v publikaci [37], která se zabývala optimalizací separace derivátu NS pomocí HPLC a CZE. K optimalizaci separace byly použity jak vzorky tetrasulfonovaného pyrenu, tak i modelových směsí standardů a optimalizováno bylo složení pracovního elektrolytu, jeho pH, teplota a aplikace přetlaku během analýzy. Nejprve byly vyzkoušeny separace 1,3,6,8-tetrasulfonovaného pyrenu (STD 2) bez působení přetlaku, jako elektrolyt byl použit 0,05 mol/l tetrahydroboritan sodný, pH = 9,3 + 0,01 mol/l β-cyklodextrin, napětí +25 kV a teplota kapiláry 25 °C. Avšak bez paralelního působení přetlaku na kapiláru na straně dávkování během analýzy nebylo možné proměřovaný standard vůbec zaznamenat, protože rychlost samotného elektroosmotického toku je nižší než opačná rychlost elektroforetické migrace testovaného

tetrasulfonové kyseliny. Zároveň se jedná o kyselinu zcela ionizovanou v širokém rozsahu pH a není možné upravit její elektroforetické vlastnosti pouhou úpravou pH pufru případně teplotou. I přesto byly vyzkoušeny i jiné typy elektrolytu jako např. boritanový pufr o pH = 9, v němž se analýzy od předchozích nijak významně nelišily a neměl tedy zásadní vliv na analýzu. Dále byl vyzkoušen elektrolyt, boritanový pufr o pH = 9,3 bez přídavku β - cyklodextrinu avšak za těchto podmínek nebyl zaregistrován na záznamu žádný pík. Pro úspěšnou separaci bylo tedy nutné, aby pracovní elektrolyty obsahovaly i cyklodextrin, který se již dříve osvědčil pro separaci polohových izomerů naftalensulfonových kyselin [36][37]. Zcela zásadní vliv na kvalitu, respektive délku separace má aplikace přetlaku na kapiláře během analýzy, která zajišťuje dodatečný tok kapaliny kapilárou a tím urychluje/umožňuje i separaci látek s vysokou opačně orientovanou vlastní rychlostí migrace, než je směr EOF. Při aplikaci přetlaku 25 mbar byla celková doba analýzy 20 minut a při přetlaku 35 mbar bylo dosaženo celkové doby analýzy 14 minut včetně 3 minut potřebných na promytí separační kapiláry před další analýzou. Touto metodou proběhla analýza sulfonovaných pyrenů, tak i nesulfonovaného pyren v jedné analýze do 10 minut. Finální optimalizované podmínky analýzy jsou uvedené v kapitole 2.9 na straně č. 51.

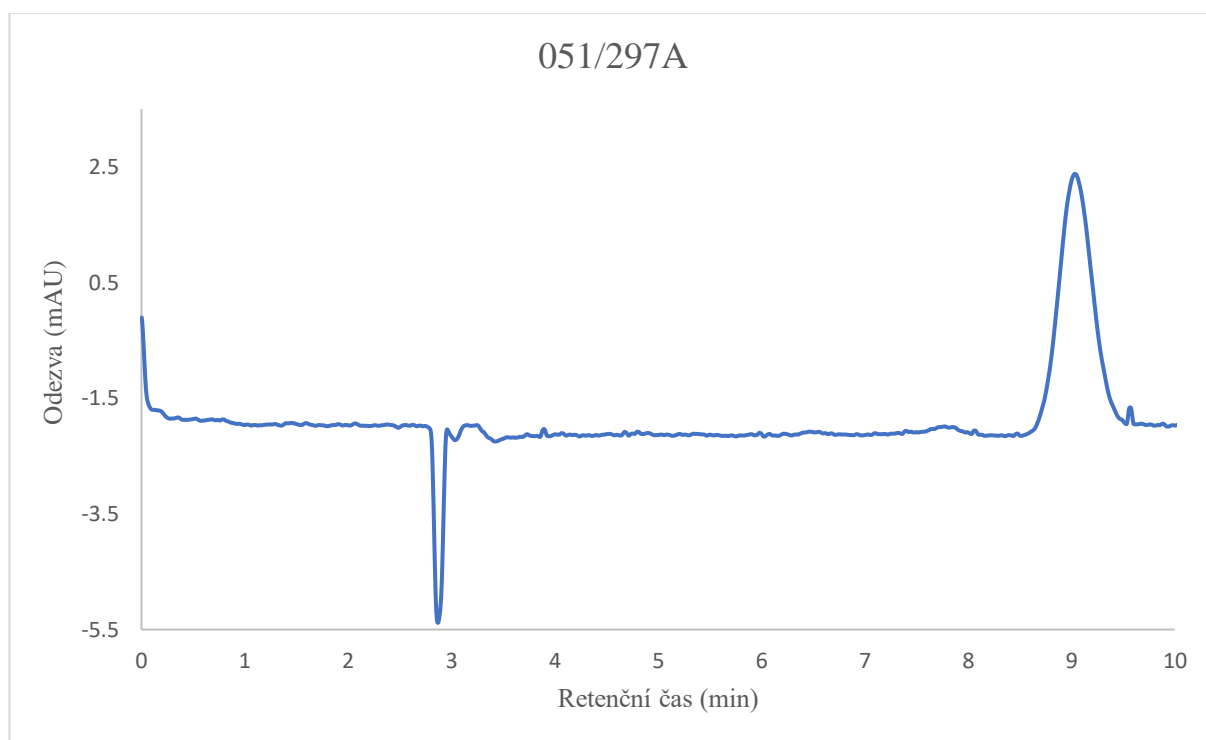
Separace směsi standardů za optimalizovaných podmínek je uvedena na obrázku č. 22 a separace jednotlivých vzorků sulfonovaného pyrenu je na obrázcích č. 23–25. Migrační časy standardů jsou uvedeny v tabulce č.17.

Tabulka 17: Identifikace sledovaných standardů

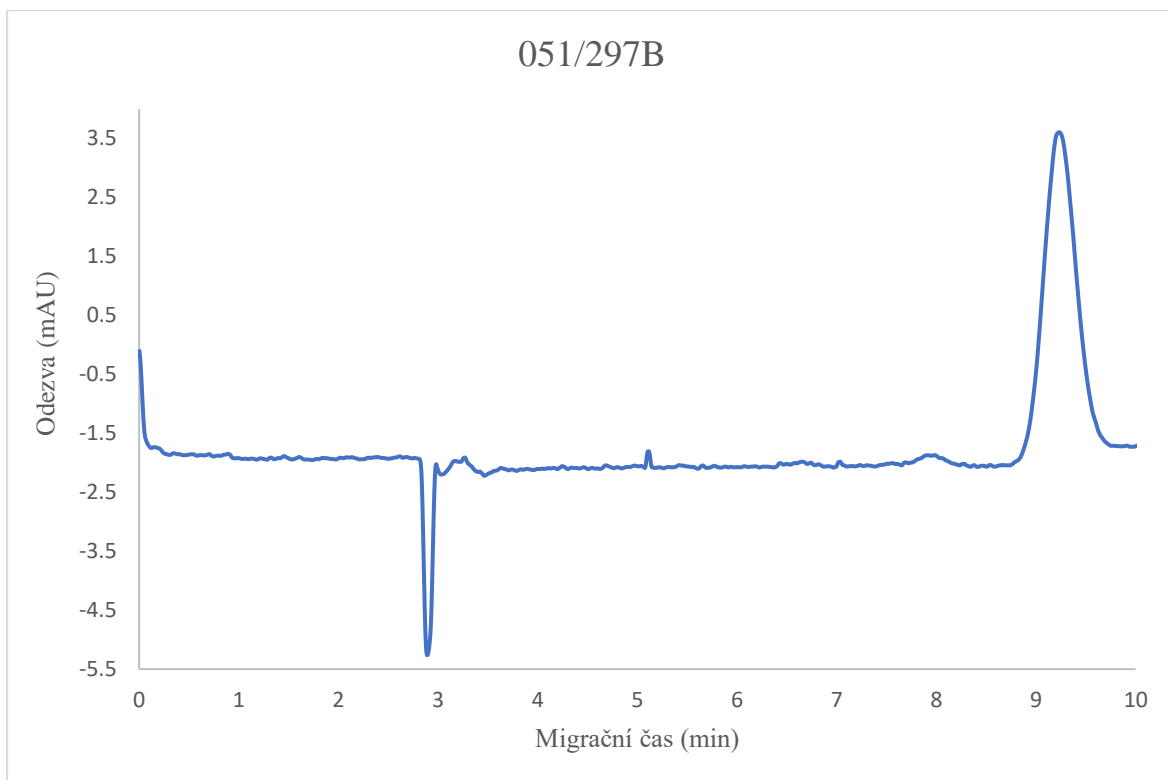
Složka	Retenční čas (min)
STD 3 (pyren)	3,036
STD 1 (pyren-1-sulfonová kyselina)	4,274
STD 2 (pyren-1,3,6,8-tetrasulfonová kyselina)	9,097



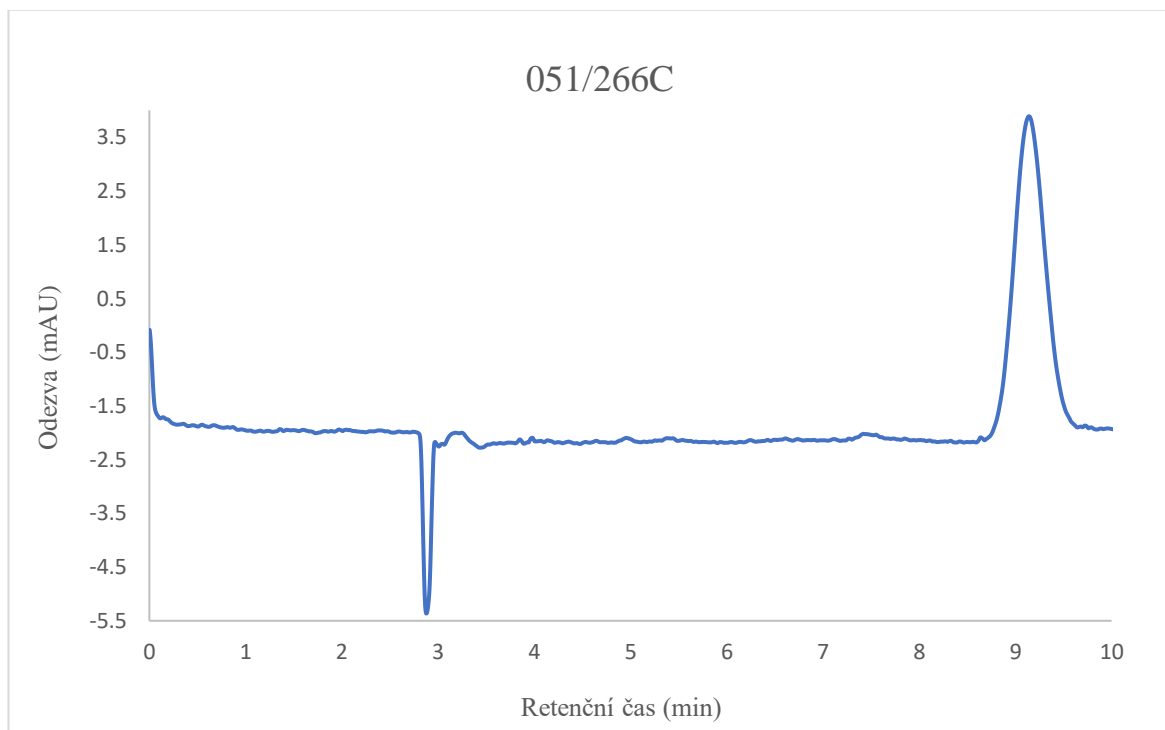
Obrázek 22: Optimalizovaná CZE separace standardů, nepokrytá křemenná kapilára o vnitřním průměru 75 μm , celková délka 75 cm (efektivní délka 62 cm), 0,05 mol/l tetraboritan sodný ve vodě (pH= 9,3) s přidavkem 0,01 mol/l β -cyklodextrinu; teplota: 25 $^{\circ}\text{C}$, zvolené napětí: +25 kV, dávkování: 10 s x 50 mbar, přetlak: 35 mbar na straně dávkování, UV detekce: 230 nm; STD 1: pyren-1-sulfonylá kyselina, STD 2: pyren-1,3,6,8-tetrasulfonylá kyselina, STD 3: pyren



Obrázek 23: CZE separace vzorku 051/297A o koncentraci 0,2 mg/ml ve vodě, experimentální podmínky viz obrázek č.22



Obrázek 24: CZE separace vzorku 051/297B o koncentraci 0,2 mg/ml ve vodě, experimentální podmínky viz obrázek č.22



Obrázek 25: CZE separace vzorku 051/266C o koncentraci 0,2 mg/ml ve vodě, detekce, experimentální podmínky viz obrázek č.22, detekce: 230 nm

3.2.1 Kalibrační měření pro sulfonované pyreny pomocí CZE

Na základě analýz vzorků a následným porovnáním se standardy, jak z hlediska migračního času a spektra, tak i z hlediska předchozích výsledků HPLC analýz bylo potvrzeno, že vzorky obsahují pouze jednu majoritní složku, a to tetrasulfoovaný pyren (STD 2). Pro kvantitativní účely CZE analýzy byla uvažována pouze jedna kalibrační řada a její příprava proběhla dle postupu uvedeného v kapitole 2.9.1. Kalibrace byla proměřena vždy třikrát a poté byla sestrojena kalibrační závislost plochy zón na koncentraci, která posloužila ke kvantitativnímu vyhodnocení obsahu tetrasulfovaného pyrenu ve vzorcích. Data kalibrační závislosti a kalibrační rovnice jsou uvedeny v tabulkách č. 18 - 20 a znázorněny na obrázku č. 26. Hodnota korelačního koeficientu R byla 0,9991, což je vyhovující pro lineární závislost. Mez stanovitelnosti (LOQ) a mez detekce (LOD) byly vypočítány v programu Excel nástrojem ANOVA při tvorbě kalibračních závislostí z hodnot uvedených v tabulce č. 18. Kvantifikace proběhla při 230 nm.

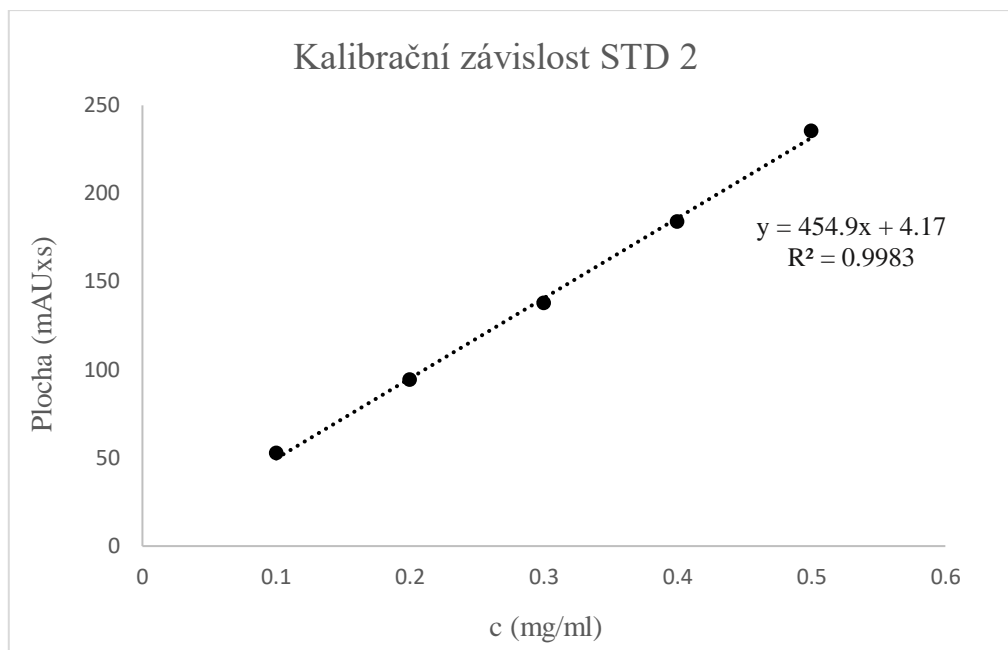
Tabulka 18: Kalibrační závislost STD 2

STD 2			
$V_{\text{pipet.}} [\text{ml}]$	$V_{\text{OB}} [\text{ml}]$	$c [\text{mg/ml}]$	$S [\text{mAU}\times\text{s}]$ 228 nm
1	10	0,1	52
2	10	0,2	94
3	10	0,3	138
4	10	0,4	184
5	10	0,5	235

$V_{\text{pipet.}}$ = pipetovaný objem zásobního roztoku standardu v ml; V_{OB} = objem odměrné baňky;
 c = koncentrace kalibračních roztoků 1-7 v mg/ml, S = plocha kalibračních roztoků 1-7 ($\text{mAU}\times\text{s}$)

Tabulka 19: Vyhodnocení chromatogramů vzorků 051/297A, 051/297B, 051/266C (rozpuštěných ve vodě)

Vzorek	Rozp.	$S [\text{mAU}\times\text{s}]$ 228 nm
051/266C	voda	137
051/297A	voda	104
051/297B	voda	126



Obrázek 26: Kalibrační závislost pro STD 2 (1,3,6,8-tetrasulfonovan pyren)

Tabulka 20: Parametry kalibrační křivky

Složka	Koncentrace c (mg/ml)	Rovnice regrese	R ²	LOD [mg/ml]	LOQ [mg/ml]
STD 2	0,1 – 0,5	y= 454,9x + 4,17	0,9991	0,059	0,17

Pomocí kalibrační závislosti byl zjištěn obsah tetrasulfonovaného pyrenu ve vzorcích 051/266C, 051/297A a 051/297B. Výsledky jsou uvedeny v tabulkách č. 22 - 24.

Tabulka 21: Výsledky kalibrační závislosti pro vzorek 051/266C (n=3)

051/266C	
Rovnice:	y= 454,9x + 4,17
x (mg/ml):	0,2929
hm%	28,58 ± 0,33

Tabulka 22: Výsledky kalibrační závislosti pro vzorek 051/297A (n=3)

051/297A	
Rovnice:	y= 454,9x + 4,17
x (mg/ml):	0,2184
hm%	21,31 ± 0,40

Tabulka 23: Výsledky kalibrační závislosti pro vzorek 051/297B (n=3)

051/297B	
Rovnice:	$y = 454,9x + 4,17$
x (mg/ml):	0,2687
hm%	26,86 ± 0,41

Do celkového výsledku analýz vzorků bylo jako v předchozí kapitole (kapitole 3.1) zahrnuto i dílčí stanovení síranů, chloridů a vlhkosti. Pro vzorek 051/266C je uvedené pouze procentuální zastoupení chloridů z důvodu nedostatečného množství vzorku. Celkové shrnutí všech naměřených a získaných výsledků obsahuje tabulka č. 24.

Tabulka 24: Přehled výsledků analýz vybraných složek vzorků sulfonovaného pyrenu v procentech (%)

Vzorek	Sírany (jako Na ₂ SO ₄)	Chloridy (jako NaCl)	Vlhkost	Tetrasulfonovaný pyren	Σ (%)
051/266C	-	10,0	-	28,58	-
051/297A	35,6	30,2	12,3	21,31	99,64
051/297B	26,2	2,1	12,5	26,86	67,48

3.2.2 Shrnutí výsledků analýz sulfonovaných pyrenů pomocí CZE

Byl stanoven obsah 1,3,6,8-tetrasulfonovaného pyrenu ve vzorcích sulfonovaného pyrenu na základě optimalizovaných podmínek CZE separace. Analyzovány byly pouze vzorky rozpuštěné ve vodě, celkové výsledky jsou shrnuty v tabulce č. 24. Ve vzorku 051/297A byl zjištěn obsah tetrasulfonovaného pyrenu 21,3 hm %, ve vzorku 051/297B 26,7 hm % a ve vzorku 051/266C 28,6 hm %. Dále je v tabulce uvedeno zastoupení dalších analyzovaných složek podobně jako v kapitole 3.1.

Jak vyplývá ze analýz ve vzorku A nebyly zjištěny žádné další neidentifikované nečistoty. Podobně jako při HPLC analýze vzorek 051/297B obsahuje další nečistoty, procentuální suma nalezených látek je 67,5 %. Ve vzorku 051/266C byl stanoven pouze tetrasulfonovaný pyren a chloridy. Vychází-li se z podobné úvahy jako pro hodnocení výsledků z HPLC analýzy tohoto vzorku (vlhkost cca 12 %, sírany 25 – 35 %), lze odhadnout celkovou sumu analyzovaných látek na cca 90 % hmotnosti vzorku.

3.3 Porovnání výsledků stanovení tetrasulfonovaného pyrenů pomocí HPLC a CZE

Jak vyplývá z tabulky č. 25, výsledky stanovení obsahu tetrasulfonovaného pyrenu ve vzorcích 051/297A a 051/297B jsou mezi sebou v dobré shodě. Obsah tetrasulfonovaného pyrenu stanoveného ve vzorku 051/266C je ve srovnání s analýzou pomocí HPLC přibližně o 10 % nižší. Chyba mohla být zapříčiněná přípravou vzorku, kterého již nebylo k dispozici v dostatečném množství pro opakovanou analýzu.

Tabulka 25: Porovnání výsledků získaných z HPLC/CZE

Vzorek	Rozp.	HPLC (hm %)	CZE (hm %)
051/266C	ACN	39,2	-
	voda	37,9	28,6
051/297A	ACN	21,2	-
	voda	19,3	21,3
051/297B	ACN	28,5	-
	voda	27,7	26,9

3.4 Optimalizace separace sulfonovaných naftalenů pomocí HPLC

Pro potřeby analýzy sulfonovaných naftalenů obsažených ve vzorcích technických a v superplastifikátorech do betonu byla optimalizována metoda gradientové HPLC separace. K analýzám modelových standardů a vzorků byly vyzkoušeny různé průběhy gradientů (tabulka č. 26). Cílem bylo dosáhnout úplné separace vybraných sulfonovaných naftalenů a naftalenů v jedné metodě za co možná nejkratší čas. Na základě určité podobnosti zkoumaných látek se pro optimalizaci podmínek separace sulfonovaných naftalenů vycházelo z metod použitých pro sulfonované pyreny (kapitola 3.1).

Z testovaných gradientů byla Metoda 3 vybrána jako nejvýhodnější a umožňovala jak separaci sulfonovaných naftalenů a samotného naftalenu, tak i polykondenzátu naftalensulfonové kyseliny s formaldehydem, který je obsažen ve vzorcích superplastifikátoru (spolostan). Celková doba analýzy je 37 minut včetně reekvilibraci kolony na počáteční

podmínky. V příloze B pod čísly 1-7 jsou uvedeny záznamy analýz s odlišnými průběhy gradientu testovanými během optimalizace.

Tabulka 26: Optimalizace podmínek metody

Metoda 1			Metoda 2			Metoda 3		
Čas (min)	% MF A	% MF B	Čas (min)	% MF A	% MF B	Čas (min)	% MF A	% MF B
0	100	0	0	100	0	0	100	0
1	100	0	1	100	0	1	100	0
3	98	2	3	98	2	3	98	2
10	85	15	10	55	45	10	85	15
15	85	15	12	55	45	15	85	15
15,5	100	0	12,5	100	0	25	10	90
25	100	0	22	100	0	27	10	90
						27,5	100	0
						37	100	0

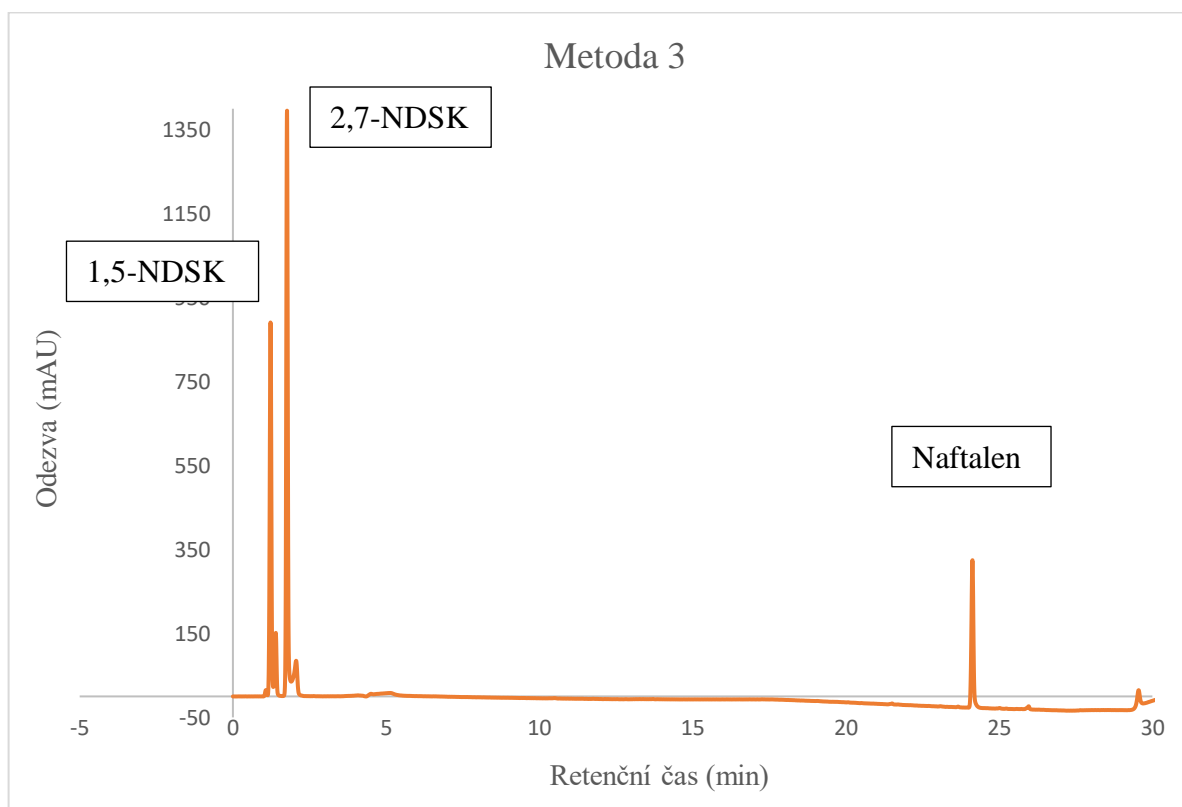
MF A: octan amonný (1g/l) ve vodě; MF B: acetonitril HPLC kvality

Pro identifikaci látek byly analyzovány jak samotné standardy jednotlivých sodných solí sulfonovaného naftalenu a standard naftalenu, tak i zároveň jejich vybrané směsi. Na základě porovnání retenční časů a UV/Vis spekter byly ve vzorcích technických směsí a v superplastifikátorech do betonu identifikovány jednotlivé naftalendisulfonové kyseliny uvedené v tabulce č. 27.

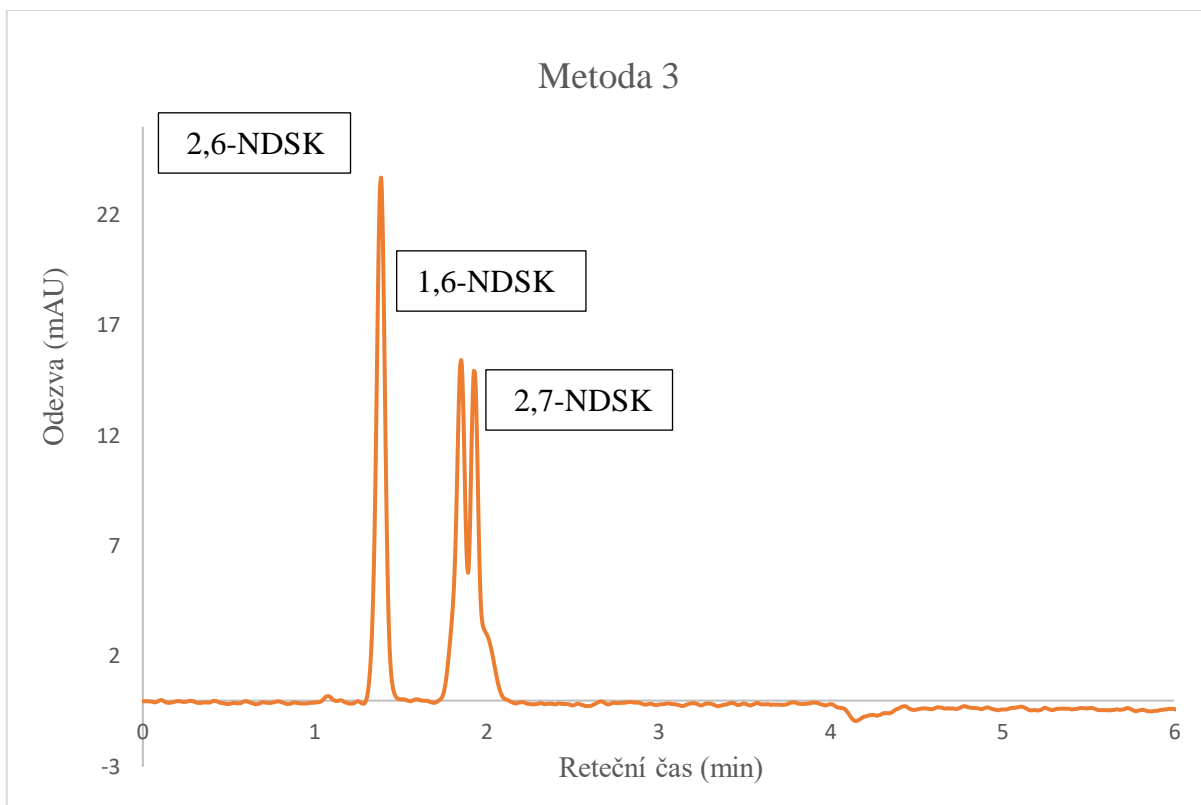
Separace vybraných směsí standardů za optimalizovaných podmínek (metoda 3) je uvedena na obrázcích č. 27 - 28 a separace reálných vzorků na obrázcích č. 29 - 36. Žádnou z testovaných metod se nepodařilo dokonale rozseparovat polohové izomery 2,6-NDSK a 2,7-NDSK (obrázek č. 28 a záznamy v příloze B č. 7 - 9). V analýzách některých vzorků se vyskytují píky jejichž retenční časy neodpovídají žádným z analyzovaných naftalendisulfonovaných kyselin (standardům). Široký difúzní pík vyskytující se v záznamech analýz vzorků spolestanů v retenčním čase okolo 20 minut může odpovídat polykondenzátu naftalensulfonové kyseliny s formaldehydem.

Tabulka 27: Identifikované standardy ve vzorcích Spolostanu 7G, 4P, vzorcích A, B a C naftalensulfonových kyselin

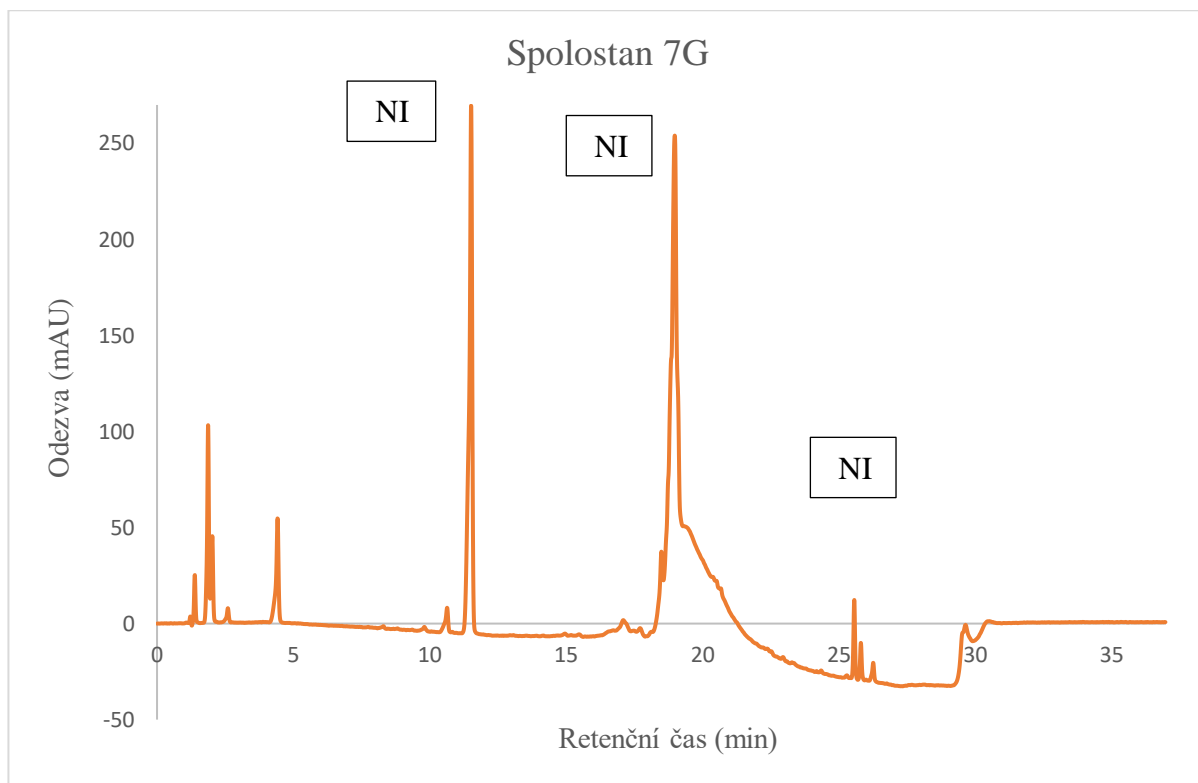
Standardy		Vzorky				
Název	t _R (min)	Spolostan		Naftalensulfonová kys.		
		4P	7G	A	B	C
1,3 – NDSK - Na	2,633	2,569	2,590	2,711	-	-
1,5 – NDSK - Na	1,238	1,220	1,226	1,237	1,242	-
1,6 – NDSK - Na	1,908	1,858	1,870	1,919	-	-
1,7 – NDSK - Mg	4,559	4,368	4,407	4,517	-	-
2,6 – NDSK - Na	1,400	1,373	1,383	1,404	-	-
2,7 – NDSK - Na	2,078	2,011	2,024	2,084	-	1,980
Naftalen	24,145	-	-	-	-	24,023



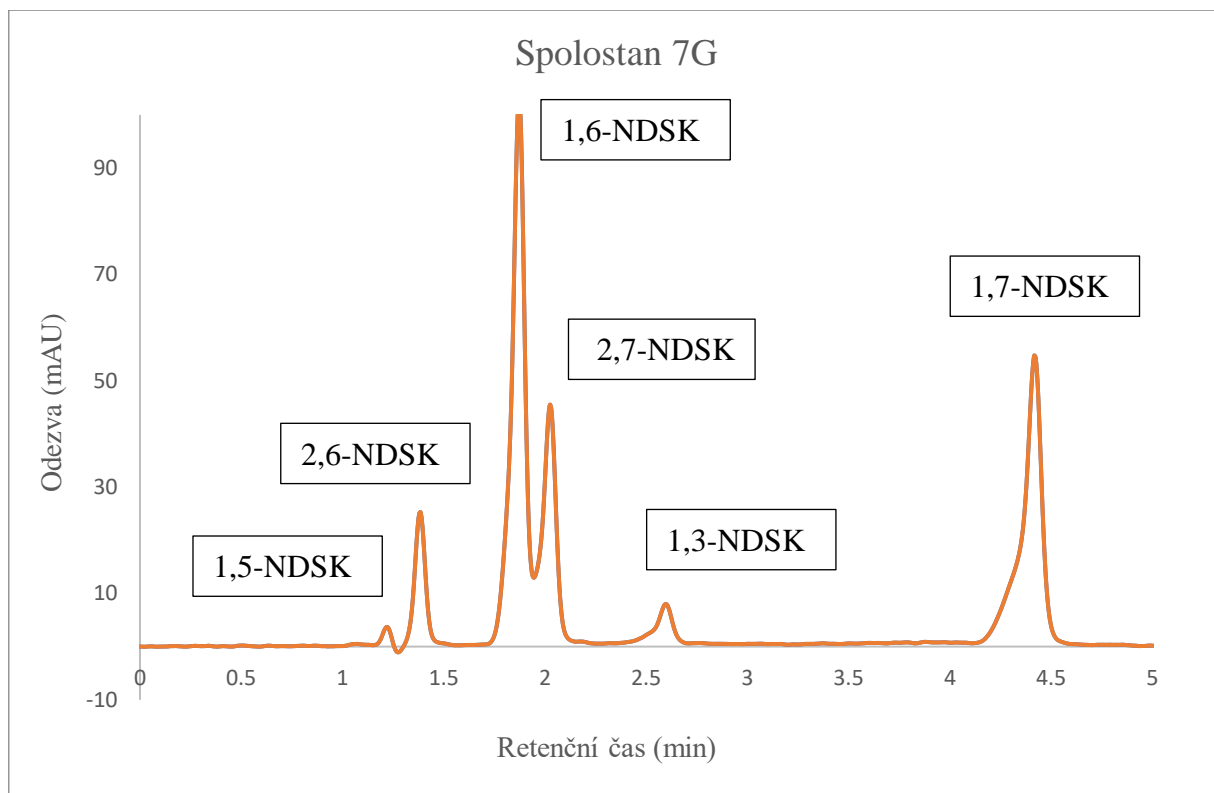
Obrázek 27: Optimalizovaná HPLC podmínky separace standardů sulfonovaných derivátů naftalenu, Kolona: Kinetex® Polar C18, 15 cm x 2,6 mm, 100Å, 2,6 μm, gradientová eluce podle metody 3 (tabulka č. 26, průtok: 0,5 ml/min, detekce: UV 228 nm)



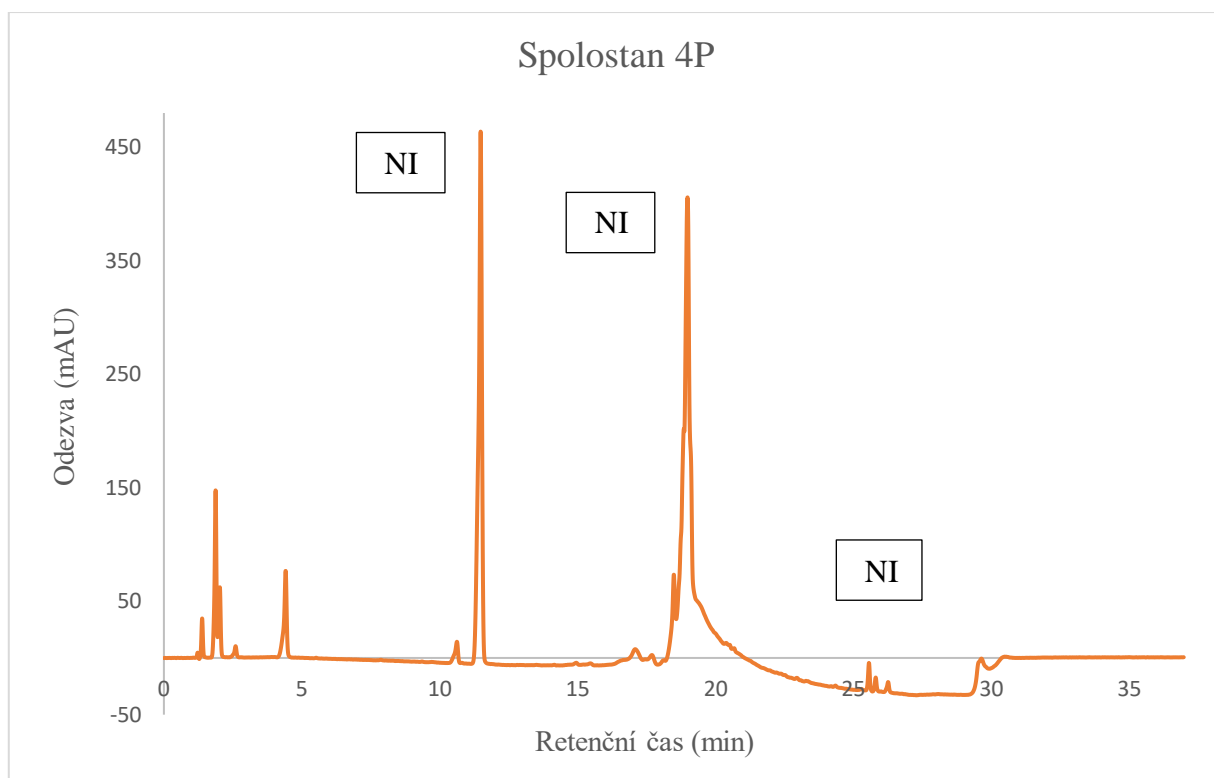
Obrázek 28: Optimalizovaná HPLC separace standardů sulfonovaných derivátů naftalenů, metoda 3, experimentální podmínky viz obrázek č. 27



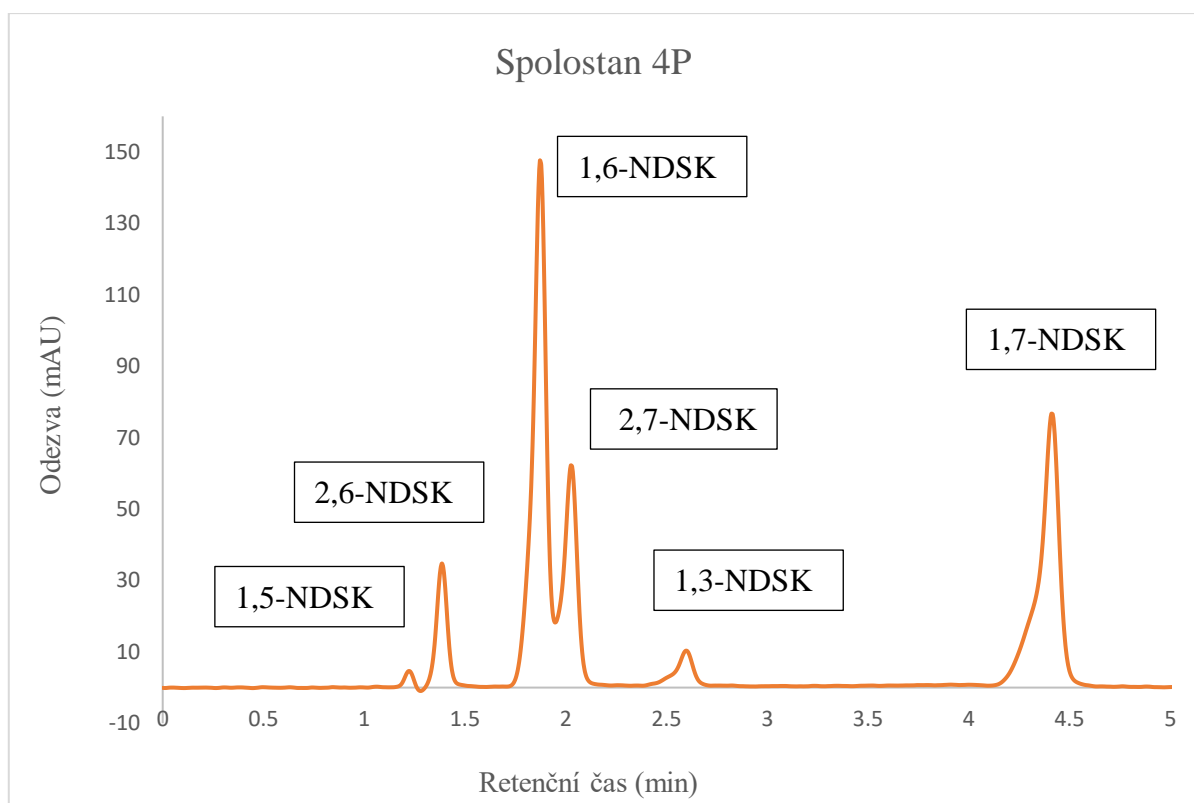
Obrázek 29: Optimalizovaná HPLC vzorku Spolostanu 7G rozpuštěného ve vodě o koncentraci 1 g/l, metoda 3, experimentální podmínky viz obrázek č. 27.



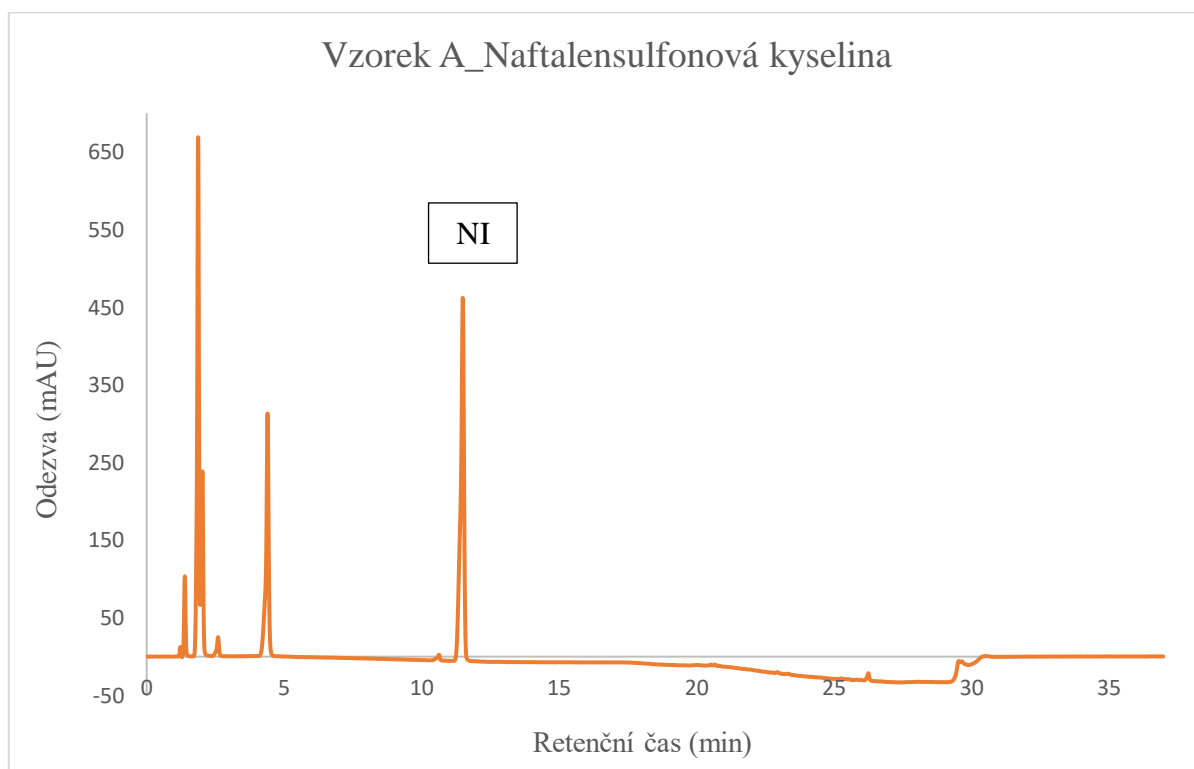
Obrázek 30: Výřez přední části záznamu optimalizované HPLC separace vzorku Spolostanu 7G rozpuštěného ve vodě o koncentraci 1 g/l, metoda 3, experimentální podmínky viz obrázek č. 27.



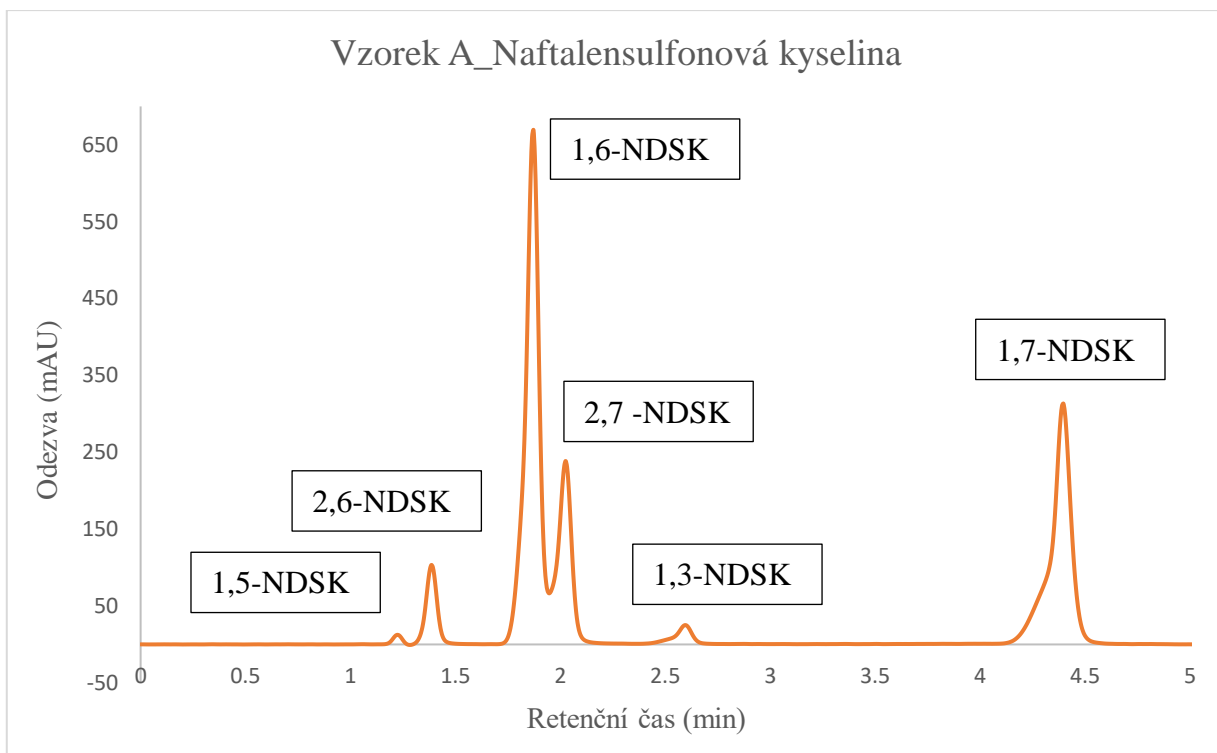
Obrázek 31: Optimalizovaná HPLC separace vzorku Spolostanu 4P rozpuštěného ve vodě o koncentraci 1 g/l, metoda 3, experimentální podmínky viz obrázek č. 27.



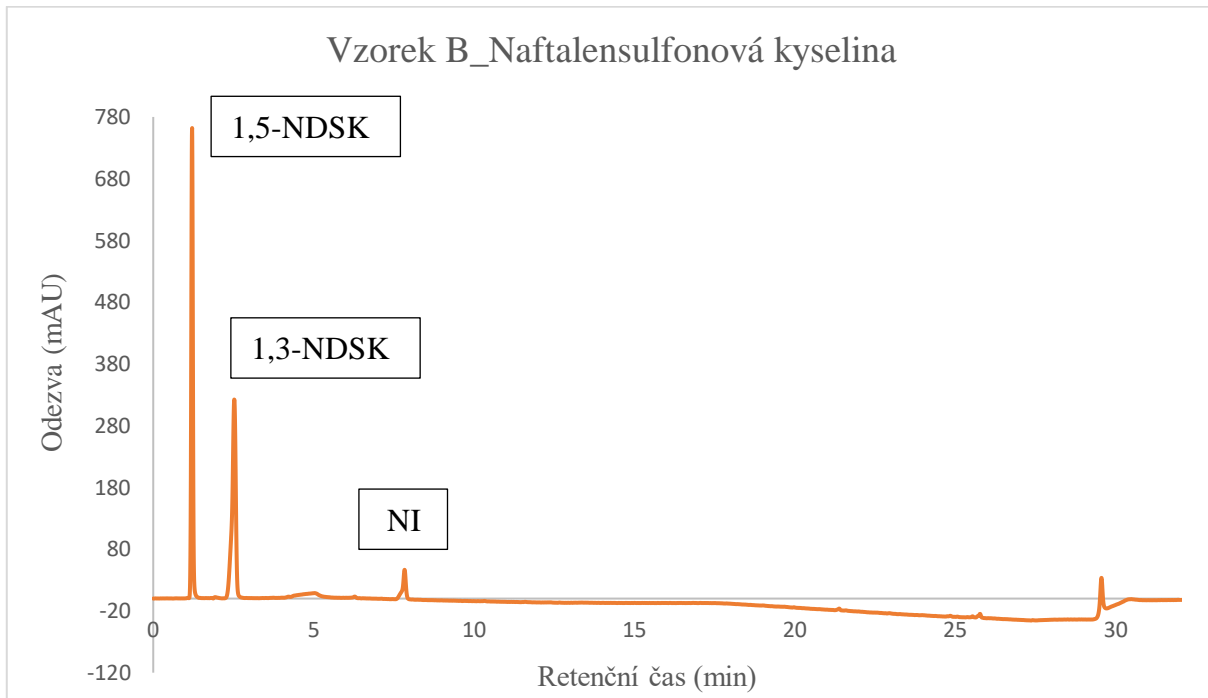
Obrázek 32: Výřez přední části záznamu optimalizované HPLC separace vzorku Spolostanu 4P rozpuštěného ve vodě o koncentraci 1 g/l, metoda 3, experimentální podmínky viz obrázek č. 27.



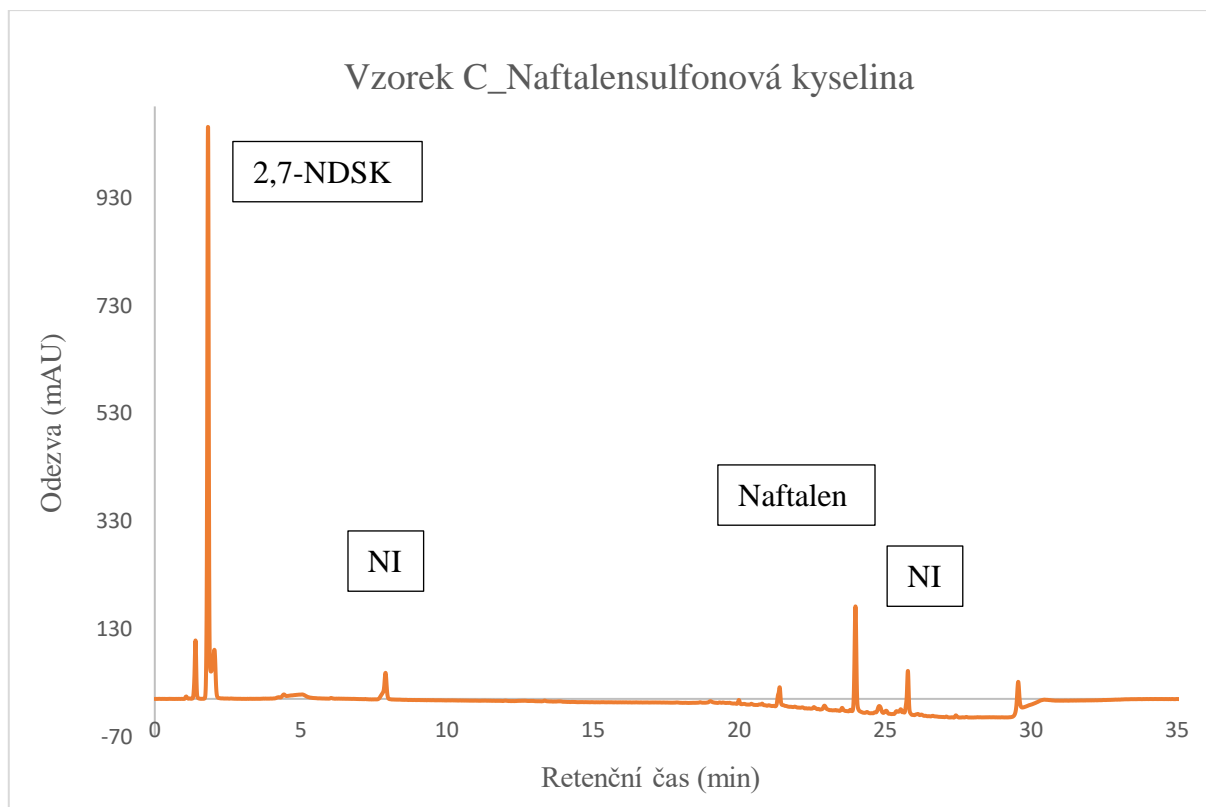
Obrázek 33: Optimalizovaná HPLC separace vzorku A naftalensulfonové kys. rozpuštěného ve vodě o koncentraci 1 g/l, metoda 3, experimentální podmínky viz obrázek č. 27.



Obrázek 34: Výřez přední části záznamu optimalizované HPLC separace vzorku A naftalensulfonové kyseliny rozpuštěného ve vodě o koncentraci 1 g/l, metoda 3, experimentální podmínky viz obrázek č. 27.



Obrázek 35: Optimalizovaná HPLC separace vzorku B naftalensulfonové kys. rozpuštěného ve vodě o koncentraci 1 g/l, metoda 3, experimentální podmínky viz obrázek č. 27



Obrázek 36: Optimalizovaná HPLC vzorku C naftalensulfonové kys. rozpuštěného ve vodě o koncentraci 1 g/l, metoda 3, experimentální podmínky viz obrázek č. 27.

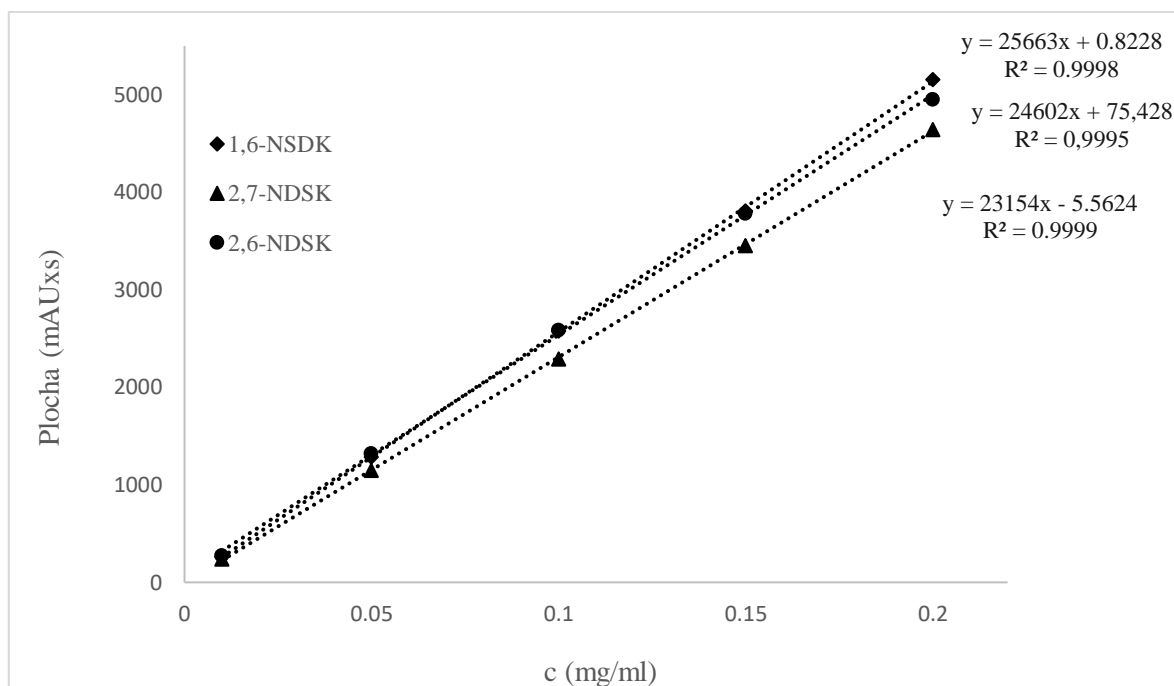
3.4.1 Kalibrační měření pro sulfonované naftaleny pomocí HPLC

Porovnáním výsledků analýz vzorků se standardy z hlediska retenčních časů i spekter bylo zjištěno, že vzorky obsahují následující látky: 1,3-naftalendisulfonová kyselina, 1,5-naftalendisulfonová kyselina, 1,7-naftalendisulfonová kyselina, 1,6-naftalendisulfonová kyselina, 2,6-naftalendisulfonová kyselina, 2,7-naftalendisulfonová kyselina a naftalen. Standardů 1,3- a 1,7-naftalendisulfonových kyselin nebylo k dispozici dostatečném množství pro kalibrační měření, proto bylo uvažováno pouze pět kalibračních řad. Kalibrační roztoky byly připraveny dle postupu uvedeného v kapitole 2.10.1. Analýzy kalibrační roztoků byly 3x opakovány a poté byla sestrojena kalibrační závislost plochy píku na jejich koncentraci, která posloužila ke kvantitativnímu vyhodnocení obsahů jednotlivých standardů v technických vzorcích sulfonovaných naftalenů a ve vzorcích spolestanů. Protože vzorky byly analyzovány postupně v delším časovém rozmezí byly k vyhodnocení použity dvě série kalibračních měření: první série zahrnující 1,6-, 2,6, 2,7-NDSK pro vzorky spolestanů a technického vzorku A naftalensulfonové směsi kyselin a druhá série zahrnující 1,5-, 2,7-NDSK a naftalen pro technické vzorky B a C naftalensulfonových směsí kyselin. Data kalibrační závislosti a kalibračních rovnic jsou uvedena v tabulkách č. 28 - 32. Kalibrační křivky jsou znázorněny na

obrázcích č. 37 - 38. Hodnota korelačního koeficientu R je pro všechny kalibrační závislosti cca 0,999, což je vyhovující pro lineární závislost. Mez stanovitelnosti (LOQ) a mez detekce (LOD) byly vypočítány v programu Excel nástrojem ANOVA při tvorbě kalibračních závislostí z hodnot uvedených v tabulkách č. 28 a č. 30. Kvantifikace proběhla při 228 nm.

Tabulka 28: Kalibrační závislost vybraných standardů (1,6-NDSK; 2,6-NDSK a 2,7-NDSK) pro vzorky spolostanů 7G, 4P a vzorek A naftalensulfonové kyseliny (směsi) – série 1

V _{pipet.} [ml]	V _{OB} [ml]	c [mg/ml]	1,6 - NDSK	2,6 - NDSK	2,7 - NDSK
			S [mAUxs] 228 nm	S [mAUxs] 228 nm	S [mAUxs] 228 nm
0,1	10	0,01	260	278	242
0,5	10	0,05	1286	1322	1150
1	10	0,1	2580	2585	2290
1,5	10	0,15	3810	3784	3453
2	10	0,2	5157	4956	4646



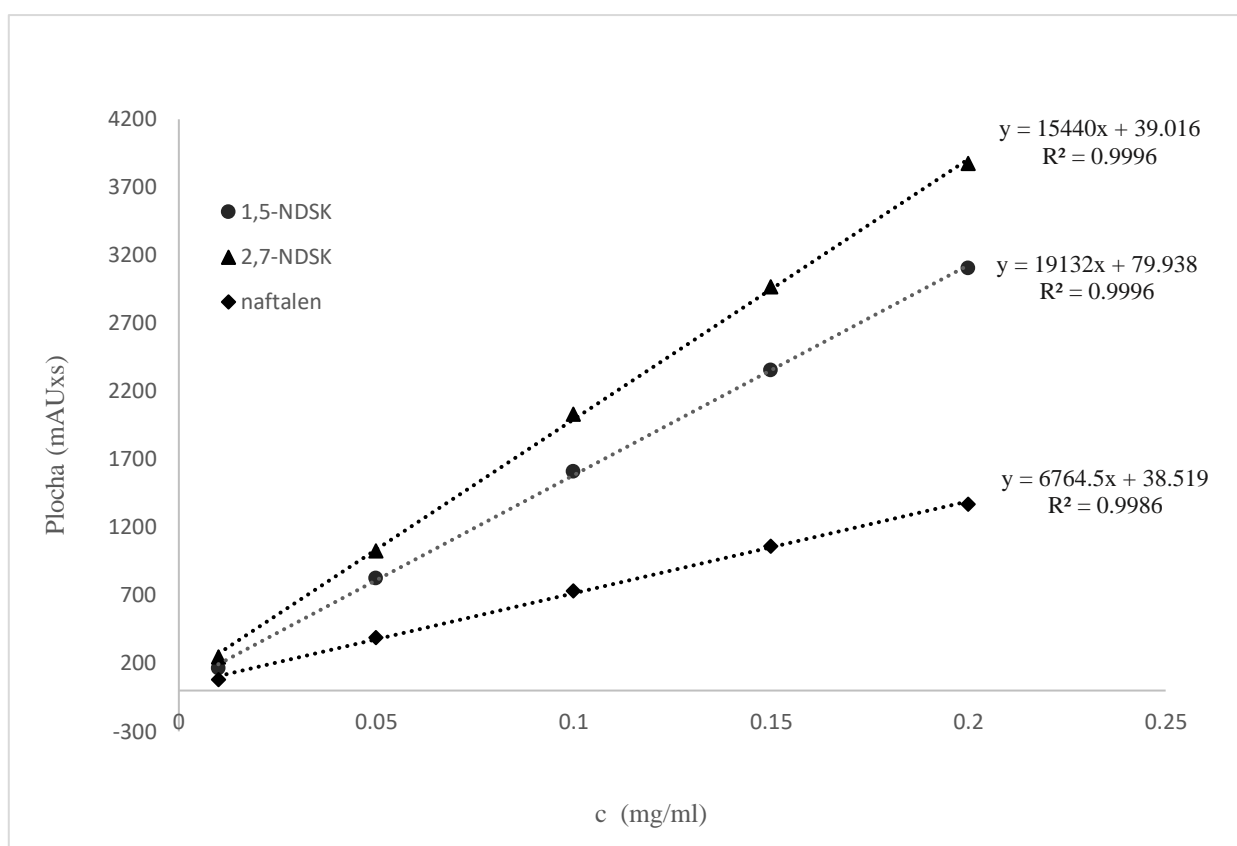
Obrázek 37: Kalibrační křivka pro standardy 1,6-NDSK; 2,6-NDSK a 2,7-NDSK – série 1

Tabulka 29: Parametry kalibrační křivky pro 1,6-NDSK; 2,6-NDSK a 2,7-NDSK – série 1

Složka	Koncentrace c (mg/ml)	Rovnice regrese	R ²	LOD [mg/ml]	LOQ [mg/ml]
1,6 - NDSK	0,01 – 0,2	$y = 25663x + 0,8228$	0,9998	0,007	0,020
2,6 - NDSK	0,01 – 0,2	$y = 24602x + 75,428$	0,9995	0,010	0,033
2,7 - NDSK	0,01 – 0,2	$y = 23254x - 5,5624$	0,9999	0,005	0,016

Tabulka 30: Kalibrační závislost vybraných standardů (1,5-NDSK; 2,7-NDSK; naftalen) pro vzorky B a C naftalensulfonových kyselin (směsí) – série 2

V _{pipet.} [ml]	V _{OB} [ml]	c [mg/ml]	1,5 - NDSK	2,7- NDSK	Naftalen
			S [mAU×s] 228 nm	S [mAU×s] 228 nm	S [mAU×s] 228 nm
0,1	10	0,01	165	251	84
0,5	10	0,05	828	1029	389
1	10	0,1	1612	2035	736
1,5	10	0,15	2359	2968	1062
2	10	0,2	3108	3875	1373
2,5	10	0,25	3595	4557	1675



Obrázek 38: Kalibrační křivka pro standardy 1,5-NDSK; 2,7-NDSK a naftalen – série 2

Tabulka 31: Parametry kalibrační křivky pro 1,5-NDSK; 2,7-NDSK a naftalen – série 2

Složka	Koncentrace c (mg/ml)	Rovnice regrese	R ²	LOD [mg/ml]	LOQ [mg/ml]
1,5 - NDSK	0,01 – 0,25	$y = 15440x + 39,016$	0,9996	0,017	0,053
2,7 - NDSK	0,01 – 0,25	$y = 19132x + 79,938$	0,9996	0,017	0,053
Naftalen	0,01 – 0,25	$y = 6764,5x + 38,519$	0,9986	0,019	0,060

Tabulka 32: Vyhodnocení chromatogramů vzorků Spolostanů 7G, 4P a vzorků A, B a C naftalensulfonových kyselin

Standardy	S [mAU×s], 228 nm				
	Spolostan		Naftalensulfonová kys.		
	4P	7G	A	B	C
1,5 – NDSK	-	-	-	2900	-
1,6 – NDSK	2071	1426	3083	-	-
2,6 – NDSK	404	294	387	-	-
2,7 – NDSK	869	622	1114	-	3988
Naftalen	-	-	884	-	884

Pomocí uvedených kalibračních závislostí byl zjištěn obsah jednotlivých izomerů disulfonovaných naftalenů ve vzorcích spolostanu 7G, 4P a ve vzorcích A, B a C naftalensulfonových kyselin. Dílčí výsledky standardů obsažených ve vzorcích jsou uvedeny v tabulkách č. 33 - 38 a celkové shrnutí analýz všech vzorků je uvedeno v tabulce č. 39.

Tabulka 33: Nalezená množství 1,6-naftalensulfonové kyseliny ve vzorcích Spolostanu 7G, 4P a vzorku A naftalensulfonové kyselin, uvedeny pouze vzorky, kde daná kyselina byla nalezena

1,6-NDSK	Spolostan 7G	Spolostan 4P	Naftalensulfo. kys (vzorek A)
Rovnice:	$y = 25663x + 0,8228$		
x (mg/ml):	0,055	0,081	0,120
hm%	1,80 ± 0,07	0,20 ± 0,08	10,56 ± 0,30

Tabulka 34: Nalezená množství 2,6-naftalensulfonové kyseliny ve vzorcích Spolostanu 7G, 4P a vzorku A naftalensulfonové kyselin, uvedeny pouze vzorky, kde daná kyselina byla nalezena

2,6-NDSK	Spolostan 7G	Spolostan 4P	Naftalensulfo. kys (vzorek A)
Rovnice:	$y = 24602x + 75,428$		
x (mg/ml):	0,008	0,013	0,012
hm%	0,29 ± 0,01	0,43 ± 0,02	1,11 ± 0,26

Tabulka 35: Nalezená množství 2,7-naftalensulfonové kyseliny ve vzorcích Spolostanu 7G, 4P a vzorku A naftalensulfonové kyselin, uvedeny pouze vzorky, kde daná kyselina byla nalezena

2,7-NDSK	Spolostan 7G	Spolostan 4P	Naftalensulfo. kys (vzorek A)
Rovnice:	$y = 23254x - 5,5624$		
x (mg/ml):	0,027	0,037	0,048
hm%	0,88 ± 0,03	1,22 ± 0,10	4,25 ± 0,37

Tabulka 36: Nalezené množství 1,5-naftalensulfonové kyseliny ve vzorku B naftalensulfonové kyseliny

1,5-NDSK	Naftalensulfo. kys (vzorek B)
Rovnice:	$y = 15440x + 39,016$
x (mg/ml):	0,147
x (mg/100ml)	3,685
hm%	29,48 ± 0,96

Tabulka 37: Nalezené množství 2,7-naftalensulfonové kyseliny ve vzorku C naftalensulfonové kyseliny

2,7-NDSK	Naftalensulfo. kys (vzorek C)
Rovnice:	$y = 19132x + 79,938$
x (mg/ml):	0,256
x (mg/100ml)	6,394
hm%	51,15 ± 0,55

Tabulka 38: Nalezené množství naftalenu ve vzorku C naftalensulfonové kyseliny

naftalen	Naftalensulfo. kys (vzorek C)
Rovnice:	$y = 6764,5x + 38,519$
x (mg/ml):	0,125
x (mg/100ml)	3,124
hm%	25,00 ± 0,73

Tabulka 39: Souhrn výsledků analýz jednotlivých standardů ve vzorcích spolostanů 7G, 4P a vzorcích A, B a C naftalensulfonových kyselin v hmotnostních procentech (%)

Standardy	Spolostan		Naftalensulfonová kys.		
	4P	7G	A	B	C
1,5 – NDSK	-	-	-	29,48 %	-
1,6 – NDSK	1,80 %	0,29 %	10,56 %	-	-
2,6 – NDSK	0,29 %	0,43 %	1,11 %	-	-
2,7 – NDSK	0,88 %	1,22 %	4,25 %	-	51,15 %
Naftalen	-	-	-	-	25,00 %
Σ	2,97 %	1,94 %	15,92 %	29,48 %	76,15 %

3.4.2 Shrnutí výsledků analýz sulfonovaných naftalenů pomocí HPLC

Byly stanoveny obsahy jednotlivých izomerů naftalensulfonových kyselin ve vzorcích technických směsí (naftalensulfonové kyseliny, vzorky A, B a C) a ve vzorcích superplastifikátorů do betonu (Spolostan 7G a 4P).

Ve vzorcích Spolostanu 7G a 4P byl výsledný obsah nalezených standardů 1,6-, 2,6-, 2,7- NDSK v rozmezí cca 2 - 3 % z celkové hmotnosti vzorku. Jak vyplývá z obrázku č. 29 a č. 30 vedle identifikovaných a kvantifikovaných izomerů naftalendisulfonových kyselin, byly nalezeny i další složky a to: 1,3 - NDSK a 1,7-NDSK, které ovšem nemohly být kvantifikovány z důvodu nedostatečného množství standardů potřebných pro kalibraci. Dále jsou na záznamu píky, které přísluší neidentifikovaným sloučeninám (retenční časy: 11,5 min, 19 min a 25,5 min) a široký difúzní pík v retenčním čase cca 18 - 21 minut, který může být hlavní složkou Spolostanu, tj. polykondenzát naftalensulfonové kyseliny s formaldehydem.

Ve vzorku A směsi naftalensulfonové kyseliny byl výsledný obsah kvantifikovaných izomerů (1,6-, 2,6-, 2,7- NDSK) přibližně 16 % z celkové hmotnosti vzorku. Ve vzorku byly dále identifikovány další izomery 1,3 - NDSK a 1,7-NDSK, které nebyly kvantifikovány ze stejných důvodů jako v případě spolostanů. Na chromatogramu (obrázek č. 33) je vidět dále pík neidentifikované látky s retenčním časem 11,5 min.

Ve vzorku B byl kvantifikován pouze obsah izomeru 1,5-NDSK v zastoupení 29,5 %. Ostatní izomery nebyly kvantifikovány (1,3-NDSK). Vzorek dále obsahuje neidentifikovanou látku s retenčním časem okolo 8 minuty. Ve vzorku C byla kvantifikována 2,7-NDSK (51 %) a naftalen (25 %). Dále jsou nekvantifikované izomery naftalendisulfonových kyselin a nečistoty s retenčními časy 8 minut a 26 minut.

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo vyvinout metody, které umožní současnou analýzu vysoce polárních (iontových) pyrensulfonových kyselin a pyrenu, respektive izomerů naftalensulfonových kyselin a naftalenu v jedné analýze. Tento požadavek vyplývá z technologie výroby uvedených sulfonovaných polyaromátů, kde se v reakční směsi mohou vyskytovat jak produkty sulfonace, tak i nezreagovaný substrát, tj. pyren/naftalen. Zoptimalizovaná metoda HPLC analýzy využívá k separaci gradientovou eluci v přítomnosti octanu amonného ve vodě (1 g/l) jako polární složku mobilní fáze a acetonitril jako organickou složku mobilní fáze. Byly testovány různé kolony s odlišnými stacionárními fázemi primárně určenými pro analýzu vysoce polárních látek, z nichž byla vybrána kolona Kinetex® Polar C18, která umožnila separaci sulfonovaných produktů i nezreagovaného pyrenu/naftalenu v jedné analýze.

Vedle HPLC analýzy byla vyvinuta i CZE metoda pro separaci sulfonovaných pyrenů. K elektroforetické separaci byl použit elektrolyt β -cyklodextrin jehož přidavek umožňuje separaci polohových izomerů sulfonovaných polyaromátů. Hlavním produktem sulfonace pyrenu je tetrasulfonovaný pyren, jehož opačně orientovaná efektivní mobilita je větší než mobilita elektroosmotického toku, proto bylo nutno během analýzy aplikovat dodatečný přetlak 35 mbar na kapiláru, čímž byla umožněna analýza tohoto izomeru. Výsledky analýz z CZE a HPLC u vzorků sulfonovaných pyrenů (051/297A, 051/297B) jsou v dobré shodě a výsledky HPLC analýzy a CZE analýzy u vzorku 051/266C jsou odlišné o cca 10 %. Opakované elektroforetické měření pro vzorek 051/266C nebylo možné realizovat z důvodu jeho nedostatečného množství.

V analyzovaných vzorcích Spolostanů a směsí naftalensulfonových kyselin byly kvantifikovány vybrané izomery. Jak vyplývá z uvedených záznamů, vzorky dále ještě obsahují další neidentifikované látky.

Stanovené cíle práce, tj. vyvinutí metody pro separaci sulfonovaných aromátů a jejich výchozích substrátů společně v jedné metodě se podařilo splnit. Tato metoda byla následně aplikována na analýzu reakčních směsí a průmyslových vzorků.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] A. T. Lawal, „Polycyclic aromatic hydrocarbons. A review", *Cogent Environ. Sci.*, roč. 3, č. 1, s. 1339841, led. 2017, doi: 10.1080/23311843.2017.1339841.
- [2] „Synthesia a.s.", *Synthesia a.s.*, 2011. <https://www.synthesia.eu/cze>
- [3] „DEZA a. s." <http://www.deza.cz/> (viděno 25. říjen 2022).
- [4] B. Galabov, D. Nalbantova, P. von R. Schleyer, a H. F. I. Schaefer, „Electrophilic Aromatic Substitution: New Insights into an Old Class of Reactions", *Acc. Chem. Res.*, roč. 49, č. 6, s. 1191–1199, čer. 2016, doi: 10.1021/acs.accounts.6b00120.
- [5] A. R. Katritzky, M. S. Kim, D. Fedoseyenko, K. Widyan, M. Siskin, a M. Francisco, „The sulfonation of aromatic and heteroaromatic polycyclic compounds", *Tetrahedron*, roč. 65, č. 6, s. 1111–1114, úno. 2009, doi: 10.1016/j.tet.2008.11.023.
- [6] P. Šimůnek, „Organická chemie 1", in *Organická chemie 1 (pro posluchače kombinovaného studia oboru Speciální chemickobiologické obory)*, Univerzita Pardubice, s. 1–133.
- [7] S. Q. A. Rizvi, „Chapter 2 - Anionic surfactants", in *Surfactants and Detergents – Chemistry and Applications*, West Conshohocken, USA: ASTM International, 2021, s. 1–43.
- [8] T. M. Figueira-Duarte a K. Müllen, „Pyrene-Based Materials for Organic Electronics", *Chem. Rev.*, roč. 111, č. 11, s. 7260–7314, lis. 2011, doi: 10.1021/cr100428a.
- [9] L. Chen *et al.*, „A facile synthesis of 1,3,6,8-pyrenesulfonic acid tetrasodium salt as a hydrosoluble fluorescent ink for anti-counterfeiting applications", *RSC Adv.*, roč. 9, č. 1, s. 476–481, pro. 2018, doi: 10.1039/C8RA09106D.
- [10] Y. Jeong a S. M. Kang, „Universal Surface Coating with a Non-Phenolic Molecule, Sulfonated Pyrene", *Langmuir*, roč. 37, č. 23, s. 7227–7236, čer. 2021, doi: 10.1021/acs.langmuir.1c00784.
- [11] J. Xu, S. Miyamoto, S. Tojo, a K. Kawai, „Sulfonated Pyrene as a Photoregulator for Single-Stranded DNA Looping", *Chem. – Eur. J.*, roč. 26, č. 22, s. 5075–5084, 2020, doi: 10.1002/chem.202000184.
- [12] L. de C. Bertozzo, E. A. Philot, A. N. Lima, P. T. de Resende Lara, A. L. Scott, a V. F. Ximenes, „Interaction between 1-pyrenesulfonic acid and albumin: Moving inside the protein", *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.*, roč. 208, s. 243–254, úno. 2019, doi: 10.1016/j.saa.2018.10.013.
- [13] H. Yang *et al.*, „A simple method for graphene production based on exfoliation of graphite in water using 1-pyrenesulfonic acid sodium salt", *Carbon*, roč. 53, s. 357–365, bře. 2013, doi: 10.1016/j.carbon.2012.11.022.

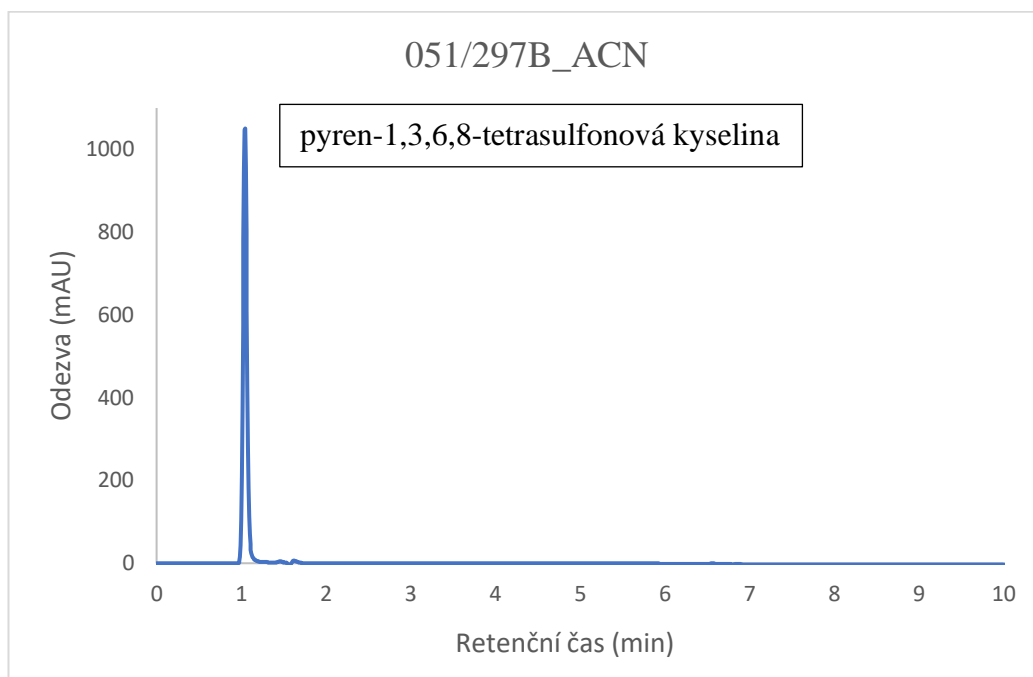
- [14] S. K. Kundu a A. Bhaumik, „Pyrene-Based Porous Organic Polymers as Efficient Catalytic Support for the Synthesis of Biodiesels at Room Temperature", *ACS Sustain. Chem. Eng.*, roč. 3, č. 8, s. 1715–1723, srp. 2015, doi: 10.1021/acssuschemeng.5b00238.
- [15] R. Preuss, J. Angerer, a H. Drexler, „Naphthalene—an environmental and occupational toxicant", *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, roč. 76, č. 8, s. 556–576, říj. 2003, doi: 10.1007/s00420-003-0458-1.
- [16] Y. M. Zhang, G. Z. Guo, L. L. Zhang, a J. H. Song, „Synthesis, analysis and application of naphthalene sulfonic acid formaldehyde condensate", *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.*, roč. 237, č. 2, s. 022029, úno. 2019, doi: 10.1088/1755-1315/237/2/022029.
- [17] T. Schweizer, H. Kubach, a T. Koch, „Investigations to characterize the interactions of light radiation, engine operating media and fluorescence tracers for the use of qualitative light-induced fluorescence in engine systems", *Automot. Engine Technol.*, roč. 6, s. 1–13, pro. 2021, doi: 10.1007/s41104-021-00092-3.
- [18] Z. Yan-Min, „Study on Naphthalene Sulfonic Acid Formaldehyde Condensate by Ultraviolet Absorption Spectrum", *J. Phys. Conf. Ser.*, roč. 1237, č. 2, s. 022107, čer. 2019, doi: 10.1088/1742-6596/1237/2/022107.
- [19] A. A. El Gindy, E. A. Gomaa, H. I. Abdelkader, A. Mohsen, a A. O. Habib, „The effect of a sulfonated naphthalene-based polymer on redox reaction data, potassium ferrocyanide complexation, and the compressive strength of Portland cement paste", *J. Mol. Liq.*, roč. 356, s. 119000, čer. 2022, doi: 10.1016/j.molliq.2022.119000.
- [20] S. Animato (www.animato.cz), „Enaspol a. s.", *Webová prezentace firmy Enaspol*. <https://www.enaspol.cz/> (viděno 20. duben 2023).
- [21] L. Sajkowski, T. M. Seward, B. W. Mountain, a L. Marynowski, „1,5-Naphthalene disulfonate stability and breakdown kinetics in aqueous solutions under geothermal conditions", *Geothermics*, roč. 91, s. 102038, bře. 2021, doi: 10.1016/j.geothermics.2020.102038.
- [22] P. Jandera, *Atomová a molekulová spektroskopie se zaměřením na stopovou analýzu kontaminantů. Díl B. Molekulová spektroskopie v organické analýze*, 3. vyd. Univerzita Pardubice, 2011.
- [23] L. Nováková, M. Douška, a P. Česla, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II - přepracované a rozšířené vydání*, 2021. vyd., 2 roč. Praha: Česká chromatografická škola.
- [24] J. Cvačka, „Vysokoúčinná kapalinová chromatografie-Instrumentace", 19. říjen 2020. [Online]. Dostupné z: http://www.muji-web.cz/vyuka/HPLC/HPLC_soubory/03_HPLC%20instrumentace_2020-21.pdf
- [25] P. Klouda, *Moderní analytické metody*, 1 vydání. Ostrava: Nakladatelství Pavel Klouda, 1996.
- [26] M. Pavonič, *Možnosti využití metod kapilární elektroforézy pro analýzu malých iontů ve vodách*. Praha: Výzkumný ústav vodohospodářský T.G.Masaryka, 2002.

- [27] J. Fischer a P. Česla, „Kapilární elektroforéza“, Univerzita Pardubice. [Online]. Dostupné z: <https://dokumenty.upce.cz/FCHT/kbbv-vk/pokrocila-instrumentalyza/kapilarni-elektroforeza.pdf>
- [28] S. Jitian, S. R. White, H.-H. W. Yang, a A. Weisz, „Conventional high-performance liquid chromatography versus derivative spectrophotometry for the determination of 1,3,6-pyrenetrisulfonic acid trisodium salt and 1,3,6,8-pyrenetetrasulfonic acid tetrasodium salt in the color additive D&C Green No. 8 (Pyranine)“, *J. Chromatogr. A*, roč. 1324, s. 238–241, led. 2014, doi: 10.1016/j.chroma.2013.11.033.
- [29] A. Weisz a Y. Ito, „Preparative separation of 1,3,6-pyrenetrisulfonic acid trisodium salt from the color additive D&C Green No. 8 (pyranine) by pH-zone-refining counter-current chromatography“, *J. Chromatogr. A*, roč. 1218, č. 45, s. 8249–8254, lis. 2011, doi: 10.1016/j.chroma.2011.09.049.
- [30] F.-T. A. Chen, G. Shen, a R. A. Evangelista, „Characterization of highly sulfated cyclodextrins“, *J. Chromatogr. A*, roč. 924, č. 1, s. 523–532, čvc. 2001, doi: 10.1016/S0021-9673(01)00757-9.
- [31] A. K. Malik, J. S. Aulakh, A. Fekete, a P. Schmitt-Kopplin, „Separation of the Phenoxy Acid Herbicides and Their Enantiomers by Capillary Zone Electrophoresis in Presence of Highly Sulphated Cyclodextrins“, *J. Chin. Chem. Soc.*, roč. 56, č. 6, s. 1163–1167, 2009, doi: 10.1002/jccs.200900167.
- [32] A. Luo *et al.*, „Simultaneous determination of uric acid, xanthine and hypoxanthine based on sulfonic groups functionalized nitrogen-doped graphene“, *J. Electroanal. Chem.*, roč. 756, s. 22–29, lis. 2015, doi: 10.1016/j.jelechem.2015.08.008.
- [33] S. H. Hashemi a M. Kaykhahi, „Developments in Methods of Analysis for Naphthalene Sulfonates“, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, roč. 47, č. 2, s. 127–137, bř. 2017, doi: 10.1080/10408347.2016.1225256.
- [34] R. A. Gimeno, J. L. Beltrán, R. M. Marcé, a F. Borrull, „Determination of naphthalenesulfonates in water by on-line ion-pair solid-phase extraction and ion-pair liquid chromatography with fast-scanning fluorescence detection“, *J. Chromatogr. A*, roč. 890, č. 2, s. 289–294, srp. 2000, doi: 10.1016/S0021-9673(00)00599-9.
- [35] V. David, S. C. Moldoveanu, a T. Galaon, „Derivatization procedures and their analytical performances for HPLC determination in bioanalysis“, *Biomed. Chromatogr.*, roč. 35, č. 1, s. e5008, 2021, doi: 10.1002/bmc.5008.
- [36] C.-H. Liu a W.-H. Ding, „Determination of naphthalenesulfonic acid isomers by large-volume on-line derivatization and gas chromatography–mass spectrometry“, *J. Chromatogr. A*, roč. 926, č. 2, s. 341–346, srp. 2001, doi: 10.1016/S0021-9673(01)01075-5.
- [37] P. Jandera, J. Fischer, V. Staněk, M. Kučerová, a P. Zvoníček, „Separation of aromatic sulphonic acid dye intermediates by high-performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis“, *J. Chromatogr. A*, roč. 738, č. 2, s. 201–213, čvc. 1996, doi: 10.1016/0021-9673(96)00082-9.

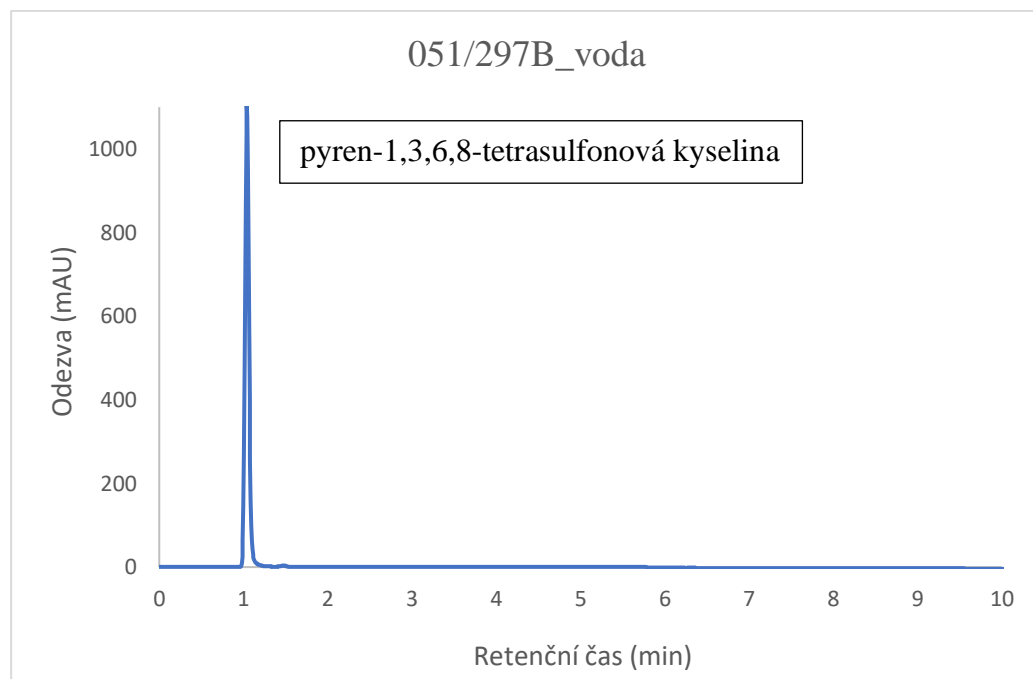
- [38] J. Fischer, P. Jandera, a V. Staněk, „Effects of the working electrolyte (cyclodextrin type and pH) on the separation of aromatic sulphonic acids by capillary zone electrophoresis", *J. Chromatogr. A*, roč. 772, č. 1, s. 385–396, čer. 1997, doi: 10.1016/S0021-9673(97)00076-9.
- [39] R. Loos a R. Niessner, „Analysis of aromatic sulfonates in water by solid-phase extraction and capillary electrophoresis", *J. Chromatogr. A*, roč. 822, č. 2, s. 291–303, říj. 1998, doi: 10.1016/S0021-9673(98)00620-7.
- [40] M. J. Cugat, F. Borrull, a M. Calull, „An overview of electrophoretic methods for the determination of benzene – and naphthalenesulfonates in water samples", *TrAC Trends Anal. Chem.*, roč. 20, č. 9, s. 487–499, zář. 2001, doi: 10.1016/S0165-9936(01)00084-X.
- [41] S. J. Kok, E. H. M. Koster, C. Gooijer, N. H. Velthorst, U. A. Th. Brinkman, a O. Zerbinati, „Separation of twenty-one naphthalene sulfonates by means of capillary electrophoresis", *J. High Resolut. Chromatogr.*, roč. 19, č. 2, s. 99–104, 1996, doi: 10.1002/jhrc.1240190208.
- [42] S. Angelino, A. B. Prevot, M. C. Gennaro, a E. Pramauro, „Ion-interaction high-performance liquid chromatography and micellar electrokinetic capillary chromatography: two complementary techniques for the separation of aromatic sulfonated compounds", *J. Chromatogr. A*, roč. 845, č. 1, s. 257–271, čer. 1999, doi: 10.1016/S0021-9673(98)01020-6.

PŘÍLOHA A: Sulfonované pyreny

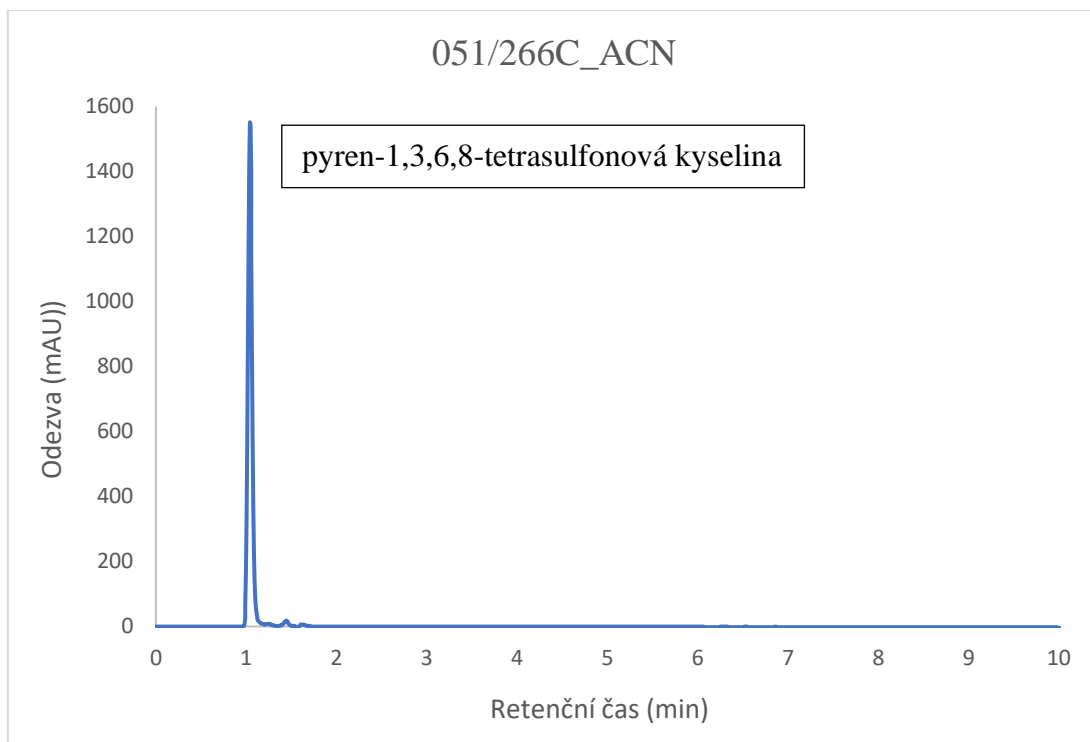
1. Optimalizované podmínky separace sulfonovaných pyrenů pomocí HPLC



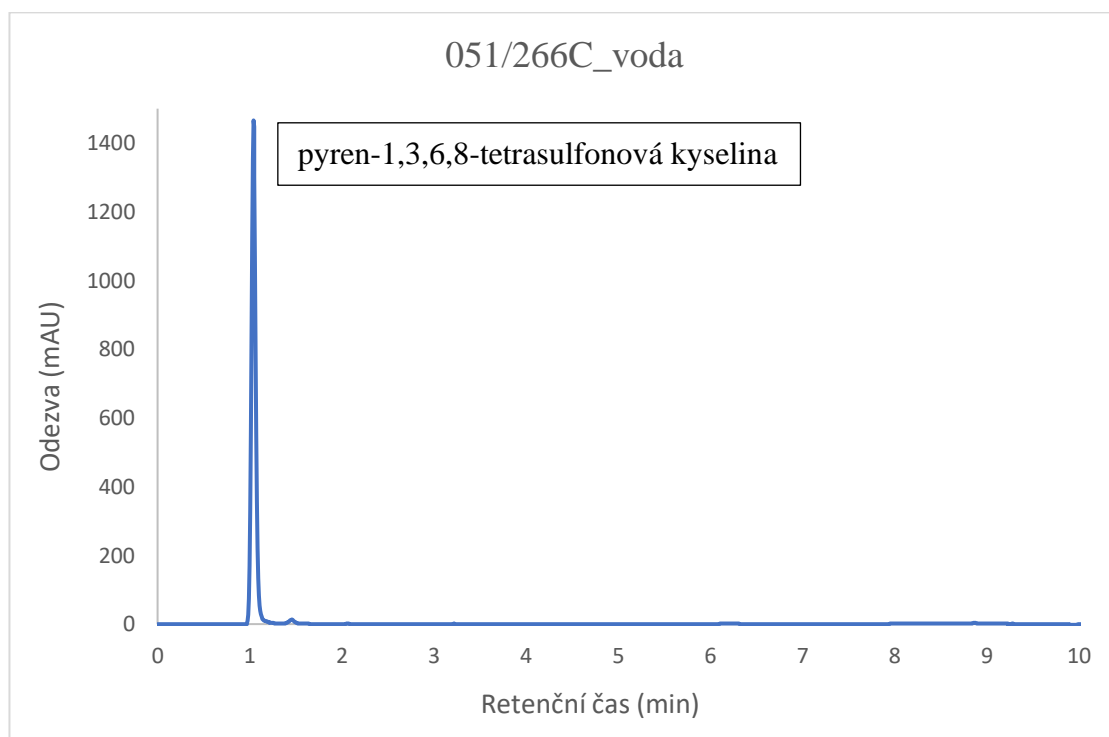
Příloha 1: Optimalizovaná HPLC separace pro vzorek 051/297B rozpuštěn v acetonitrilu. Kolona: Kinetex® Polar C18, 15 cm x 3 mm, 100Å, 2,6 µm, MF lineární gradient podle metody 3.



Příloha 2: Optimalizovaná HPLC separace pro vzorek 051/297B rozpuštěn ve vodě. Kolona: Kinetex® Polar C18, 15 cm x 3 mm, 100Å, 2,6 µm, MF lineární gradient podle metody 3.

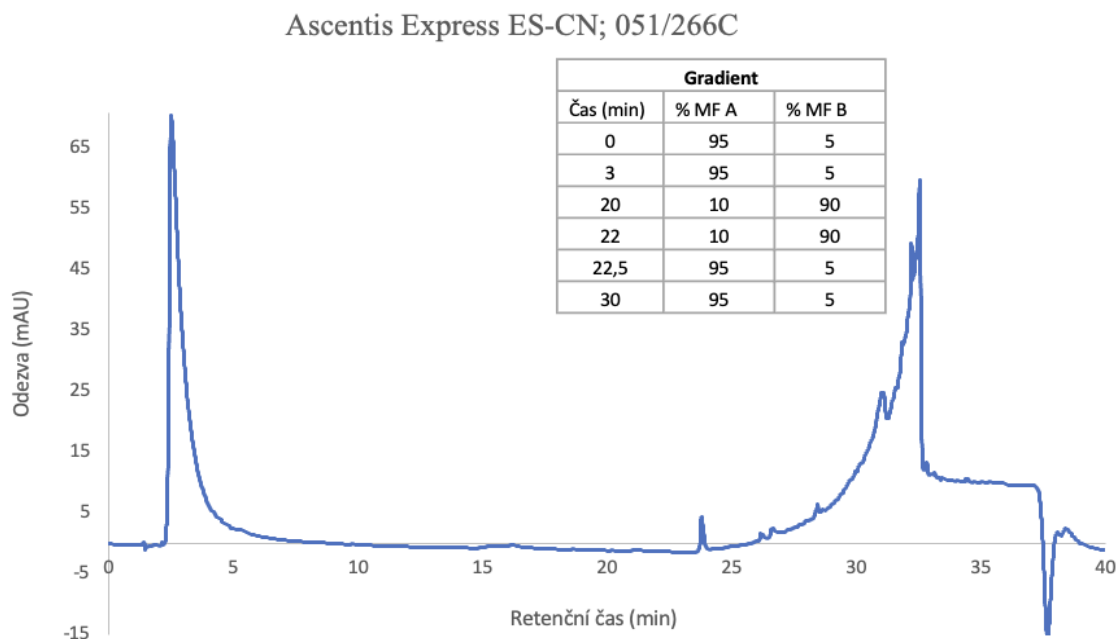


Příloha 3: Optimalizovaná HPLC separace pro vzorek 051/266C rozpuštěn v acetonitrilu. Kolona: Kinetex® Polar C18, 15 cm x 3 mm, 100Å, 2,6 µm, MF lineární gradient podle metody 3.

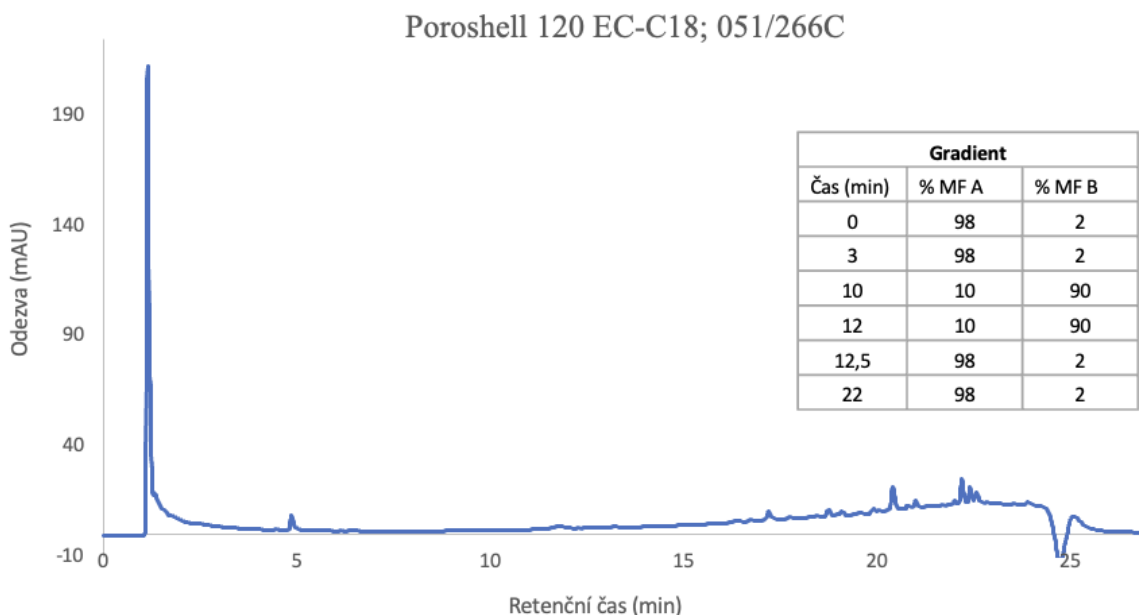


Příloha 4: Optimalizovaná HPLC separace pro vzorek 051/266C rozpuštěn ve vodě. Kolona: Kinetex® Polar C18, 15 cm x 3 mm, 100Å, 2,6 µm, MF lineární gradient podle metody 3.

2. Ukázky testování HPLC separace sulfonovaných pyrenů, vybrané metody

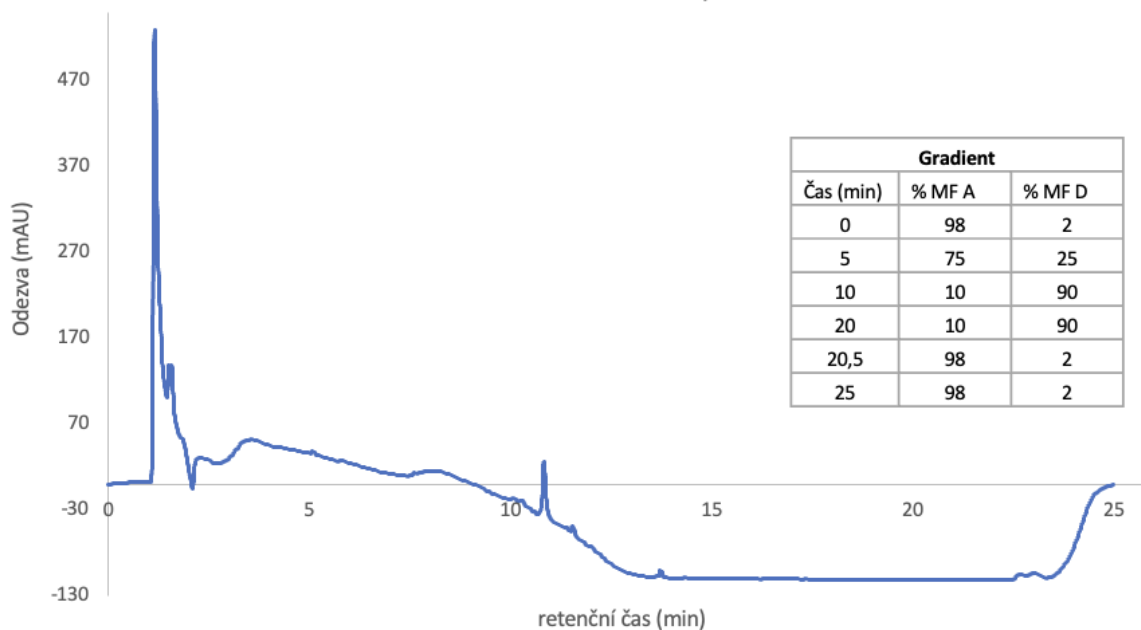


Příloha 5: Separace vzorku 051/266C na koloně Ascentis® Express ES-CN.
 Kolona: Ascentis® Express ES-CN, 10 cm x 4.6 mm, 2.7 μ m, MF lineární gradient 5-95 % ACN v 0,1 % octanu amonném ve vodě, viz tabulka. Průtok MF: 0,5 ml/min, detekce: UV 254 nm.



Příloha 6: Separace vzorku 051/266C na koloně Poroshell 120 EC-C18.
 Kolona: Poroshell 120 EC-C18 15 cm x 3.0 mm, 2.7 μ m, MF lineární gradient 2-90 % ACN v 0,1 % octanu amonném ve vodě, viz tabulka. Průtok MF: 0,5 ml/min, detekce: UV 254 nm.

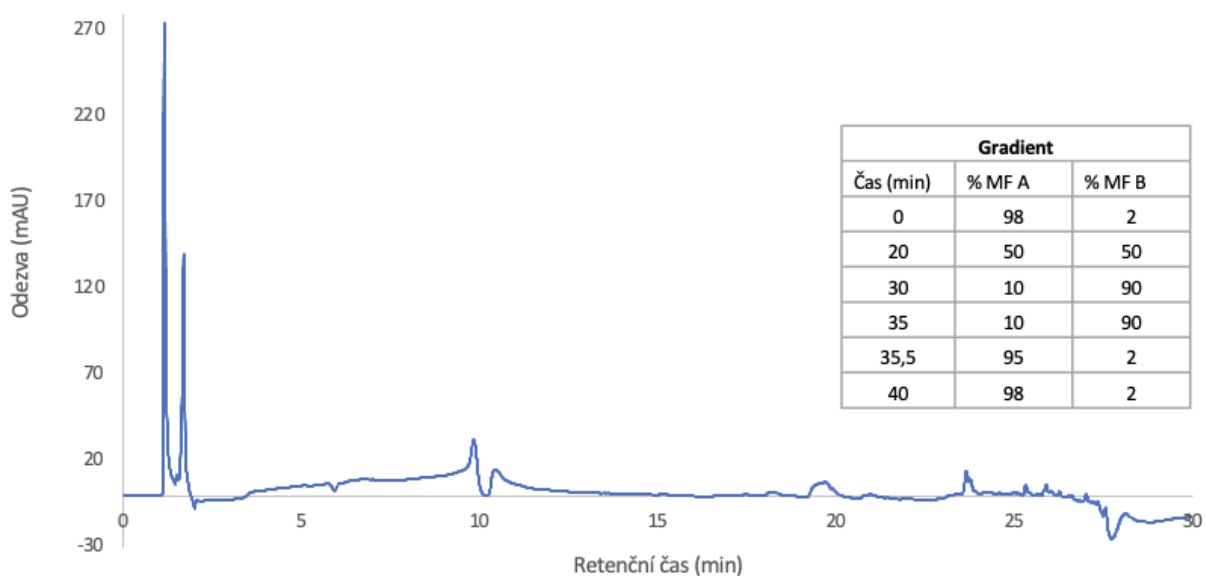
Poroshell 120 EC-C18; 051/266C



Příloha 7: Separace vzorku 051/266C na koloně Poroshell 120 EC-C18.

Kolona: Poroshell 120 EC-C18, 15 cm x 3.0 mm, 2.7 μ m, MF lineární gradient 25–90 % MeOH v 0,1 % octanu amonném ve vodě, viz tabulka. Průtok MF: 0,5 ml/min, detekce: UV 254 nm.

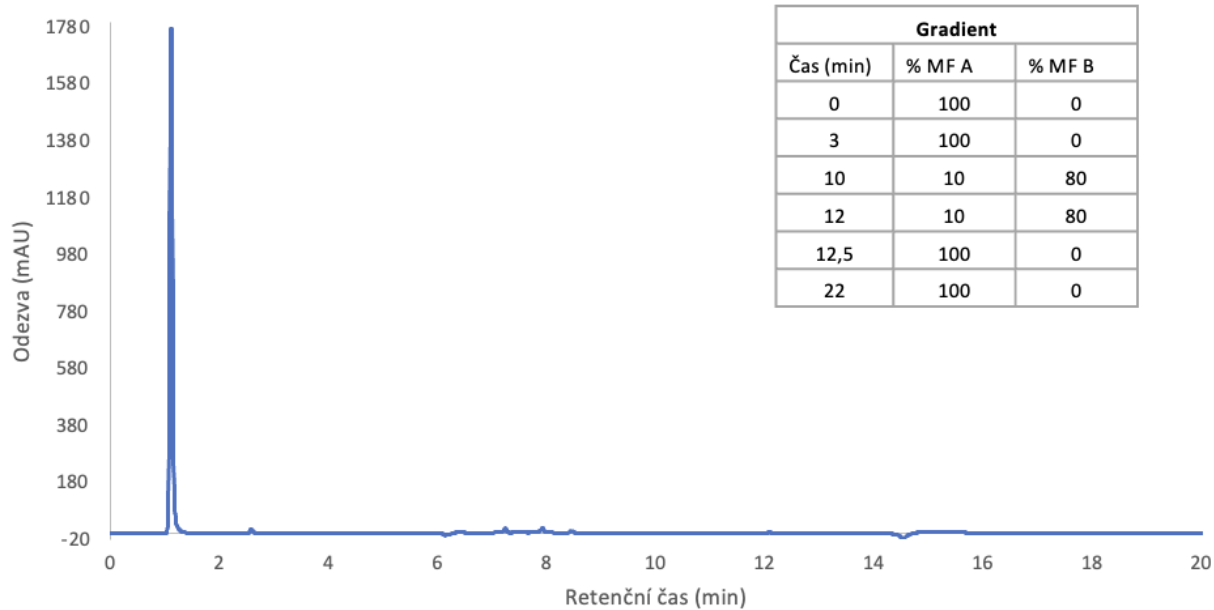
Supercosil LC – NH₂; 051/266C



Příloha 8: Separace vzorku 051/266C na koloně Supercosil® LC-NH₂.

Kolona Supercosil® LC-NH₂, 15 cm x 3.0 mm, 3 μ m, MF lineární gradient 2-50 % MeOH v 0,1 % octanu amonném ve vodě (pH = 3,5), viz tabulka. Průtok MF: 0,5 ml/min, detekce: UV 254 nm.

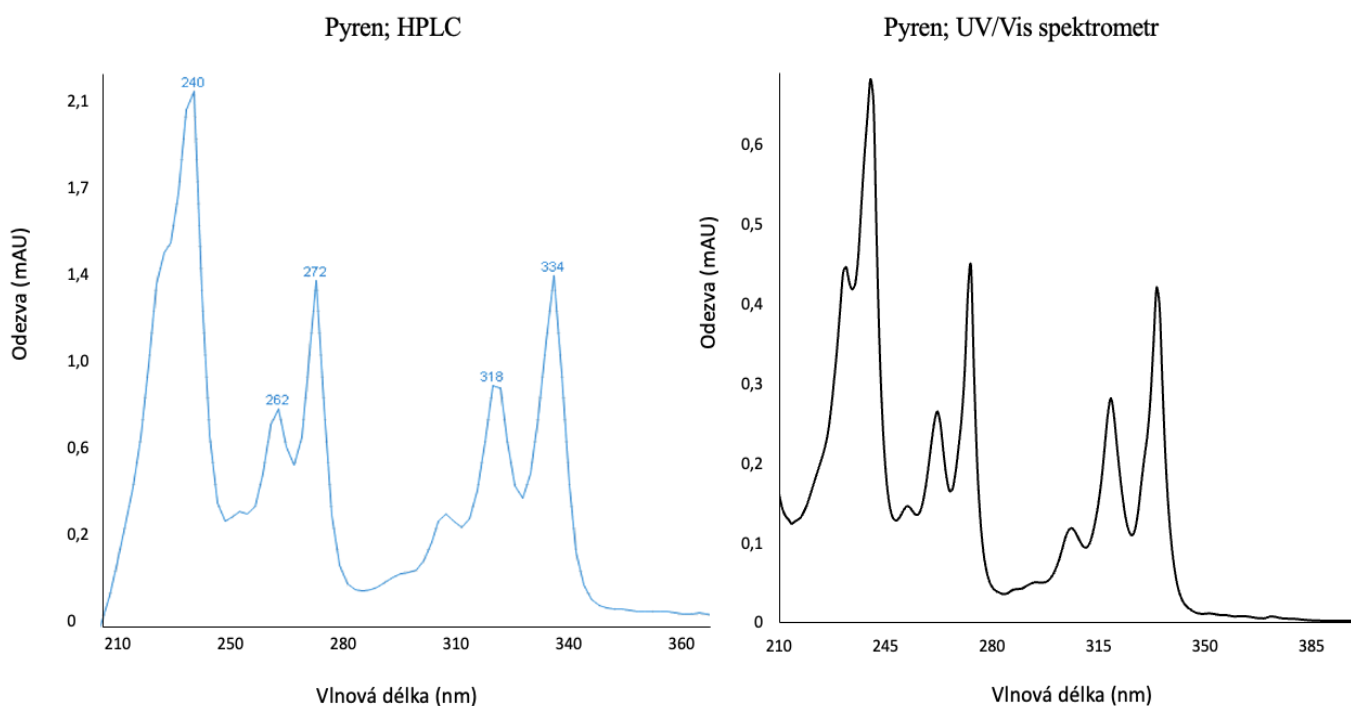
Kolona Polar C18_STD tetra



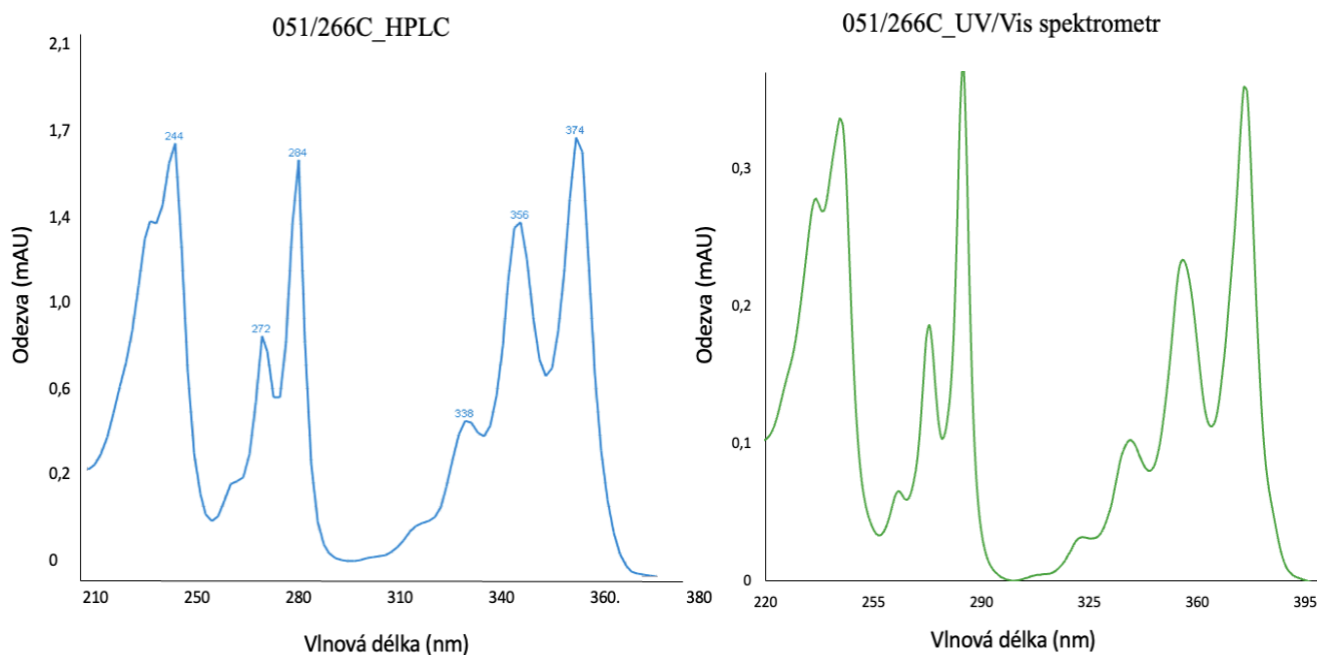
Příloha 9: Separace pro standard 1,3,6,8-tetrasulfonovaného pyrenu na koloně Kinetex® Polar C18.

Kolona: Kinetex® Polar C18, 15 cm x 3 mm, 100Å, 2,6 µm, MF lineární gradient 0–80 % ACN, v 0,1 % octanu amonném ve vodě, viz tabulka. Průtok MF: 0,5 ml/min, detekce: UV 238 nm.

3. Porovnání záznamů spekter sulfonovaných pyrenů změřených na stolním spektrometru spolu se změřenými spektry na HPLC detektoru, vybrané záznamy



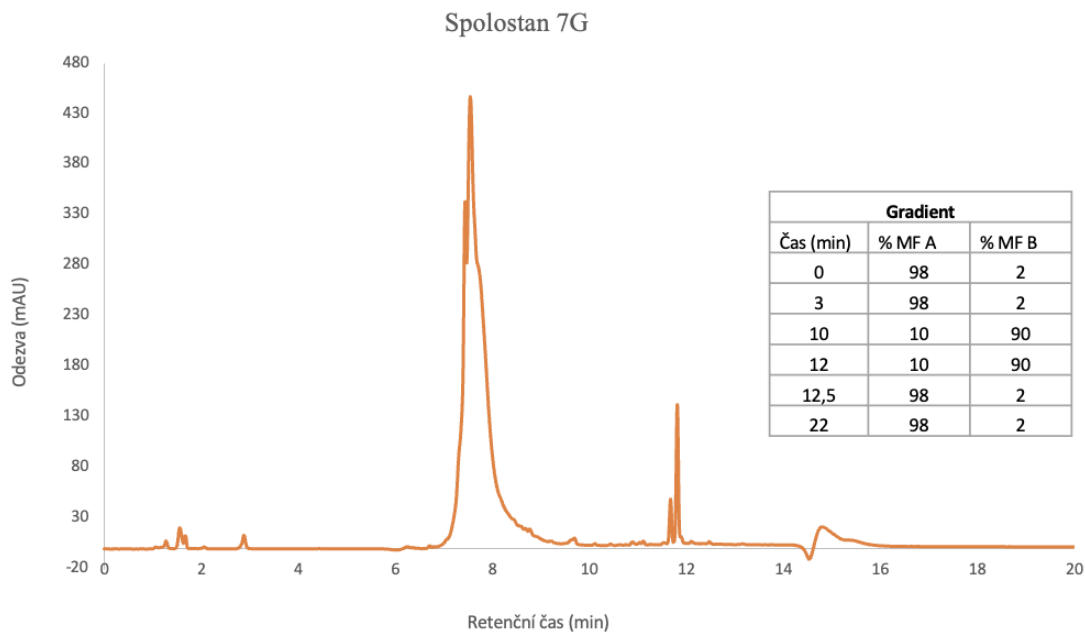
Příloha 10: Porovnání záznamu UV/Vis spektra standardu pyrenu změřeného na HPLC detektoru Agilent Infinity II. spolu se spektrem získaným na spektrometru SPECORD 50.



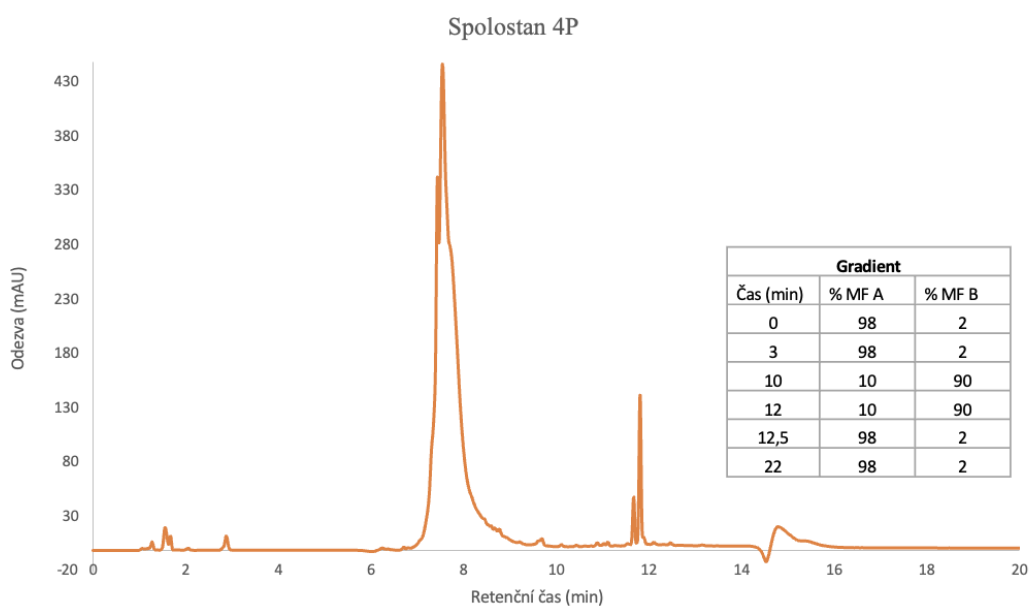
Příloha 11: Porovnání záznamu UV/Vis spektra vzorku sulfonovaného derivátu pyrenu 051/266C změřeného na HPLC detektoru Agilent 1260 Infinity II. spolu se spektrem získaným na spektrometru SPECORD 50.

PŘÍLOHA B: Sulfonované naftaleny

1. Optimalizace podmínek pro separaci sulfonovaných naftalenů pomocí HPLC, vybrané metody

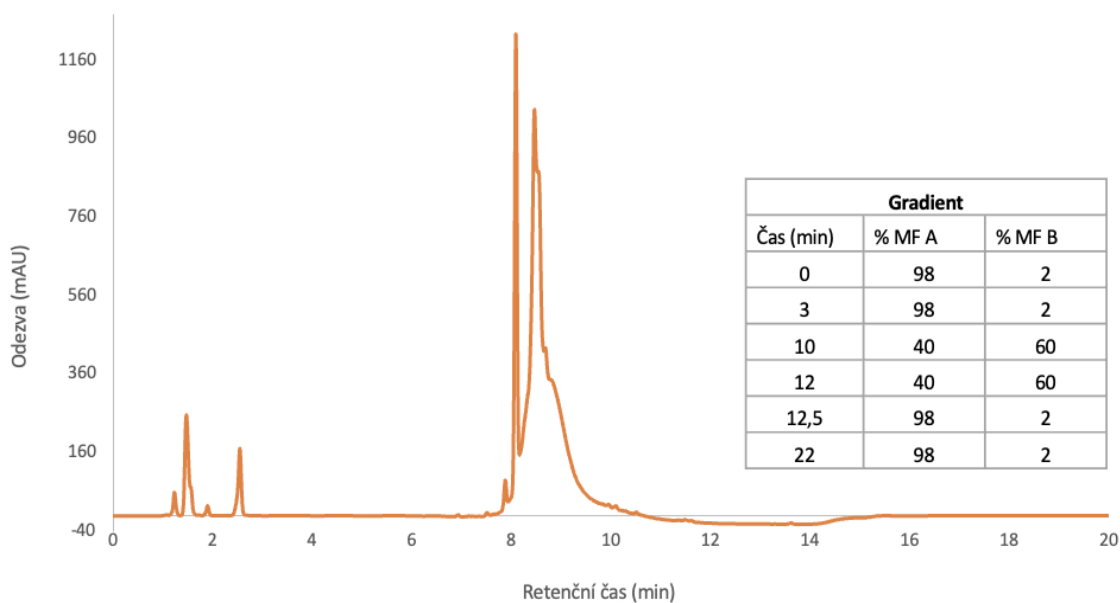


Příloha 1: HPLC separace vzorku Spolostanu 7G na koloně Kinetex® Polar C18. Kolona: Kinetex® Polar C18, 15 cm x 3 mm, 100Å, 2,6 µm, MF lineární gradient od 2-90 % ACN v 0,1 % octanu amonném ve vodě, viz tabulka. Průtok MF: 0,5 ml/min, detekce: UV 228 nm.



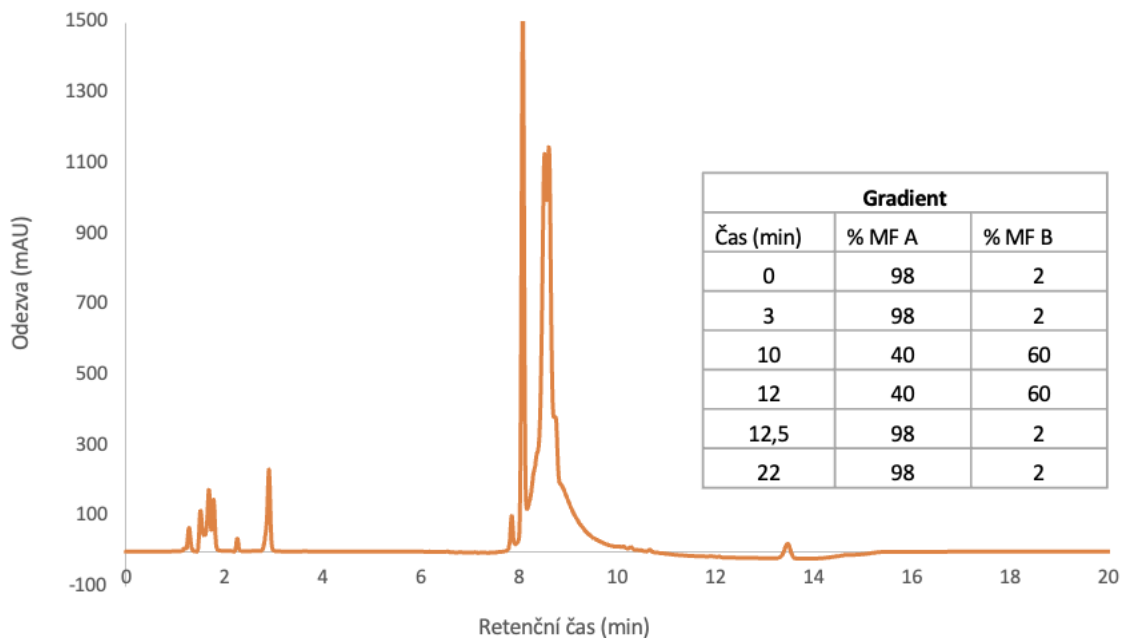
Příloha 2: HPLC separace vzorku Spolostanu 4P na koloně Kinetex® Polar C18. Kolona: Kinetex® Polar C18, 15 cm x 3 mm, 100Å, 2,6 µm, MF lineární gradient od 2-90 % ACN v 0,1 % octanu amonném ve vodě, viz tabulka. Průtok MF: 0,5 ml/min, detekce: UV 228 nm.

Spolostan 7G

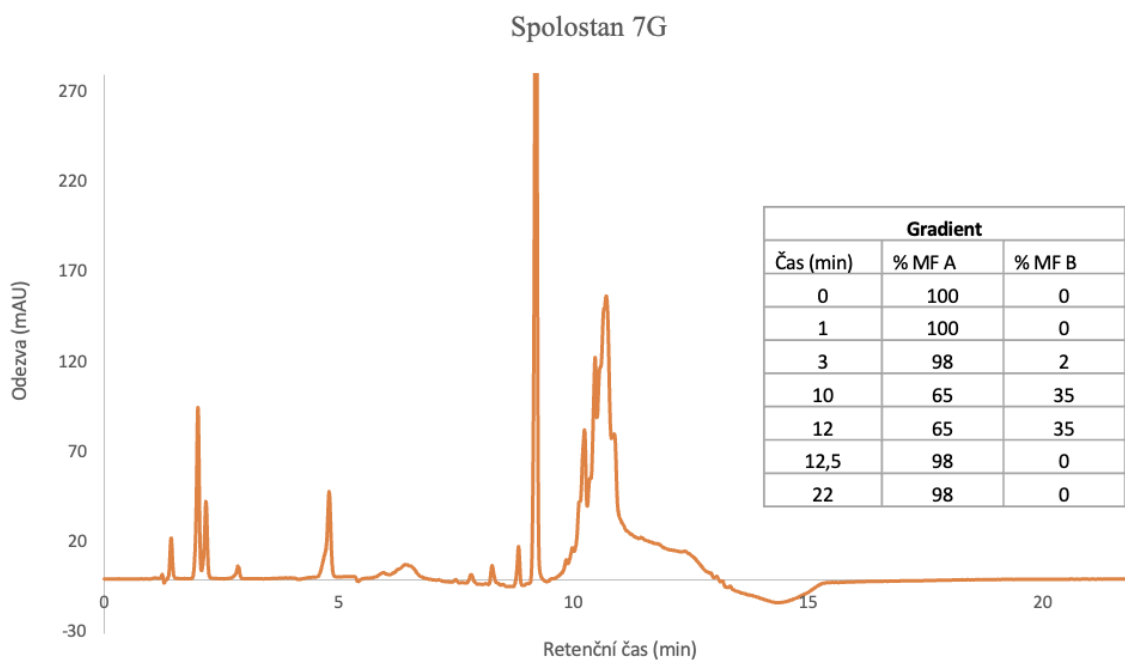


Příloha 3: HPLC separace vzorku Spolostanu 7G na koloně Kinetex® Polar C18.
 Kolona: Kinetex® Polar C18, 15 cm x 3 mm, 100Å, 2,6 µm, MF lineární gradient od 2-60 % ACN v 0,1 % octanu amonném ve vodě, viz tabulka. Průtok MF: 0,5 ml/min, detekce: UV 228 nm.

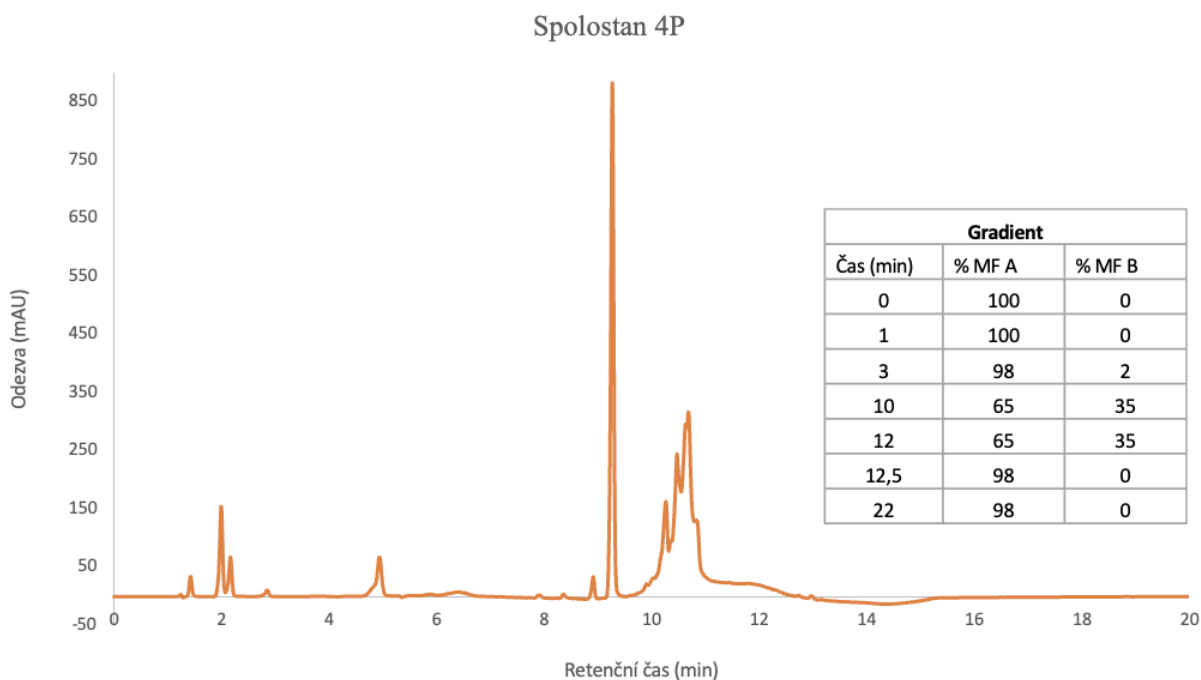
Spolostan 4P



Příloha 4: HPLC separace vzorku Spolostanu 4P na koloně Kinetex® Polar C18.
 Kolona: Kinetex® Polar C18, 15 cm x 3 mm, 100Å, 2,6 µm, MF lineární gradient od 2-60 % ACN v 0,1 % octanu amonném ve vodě, viz tabulka. Průtok MF: 0,5 ml/min, detekce: UV 228 nm.

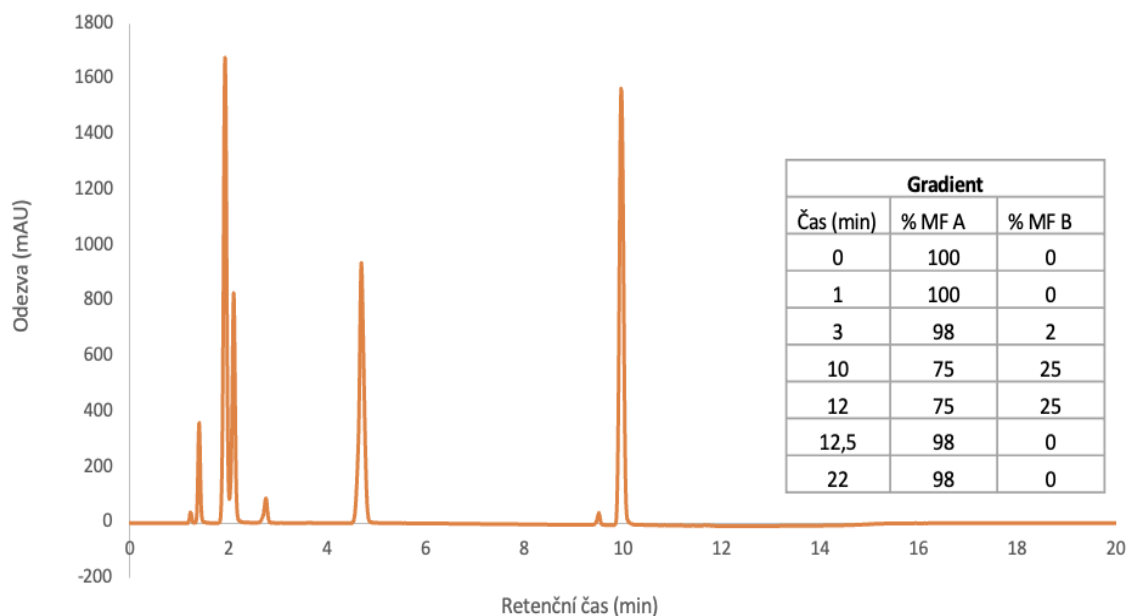


Příloha 5: HPLC separace vzorku Spolostanu 7G na koloně Kinetex® Polar C18.
 Kolona: Kinetex® Polar C18, 15 cm x 3 mm, 100Å, 2,6 µm, MF lineární gradient od 2-35 % ACN v 0,1 % octanu amonném ve vodě, viz tabulka. Průtok MF: 0,5 ml/min, detekce: UV 228 nm.



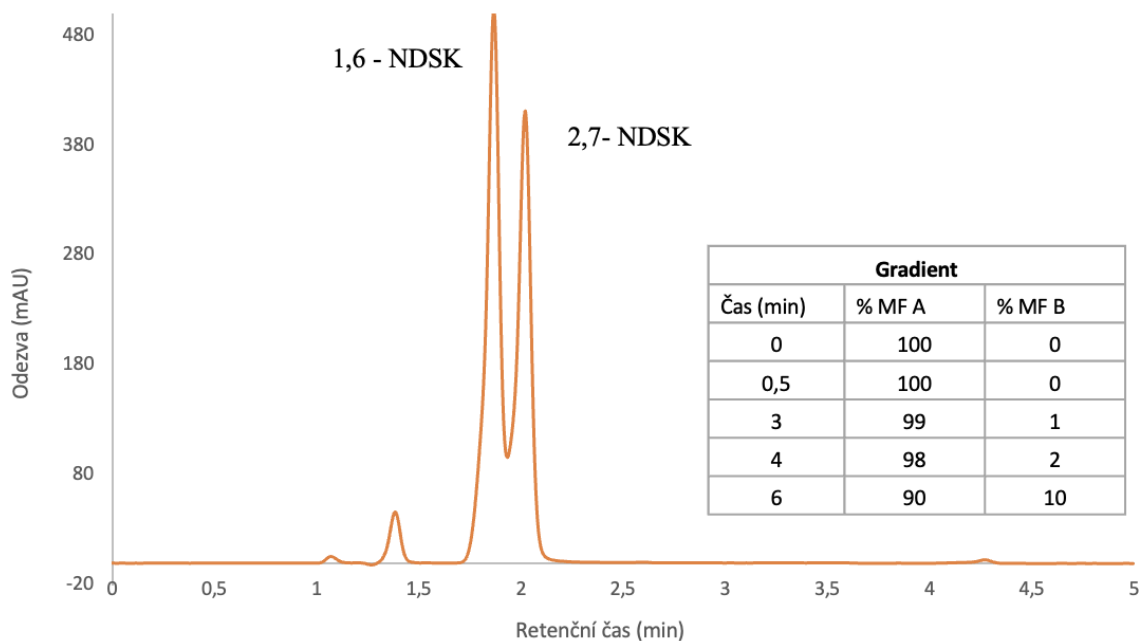
Příloha 6: HPLC separace vzorku Spolostanu 4P na koloně Kinetex® Polar C18.
 Kolona: Kinetex® Polar C18, 15 cm x 3 mm, 100Å, 2,6 µm, MF lineární gradient od 2-35 % ACN v 0,1 % octanu amonném ve vodě, viz tabulka. Průtok MF: 0,5 ml/min, detekce: UV 228 nm.

Naftalensulfonová kys. (vzorek A)



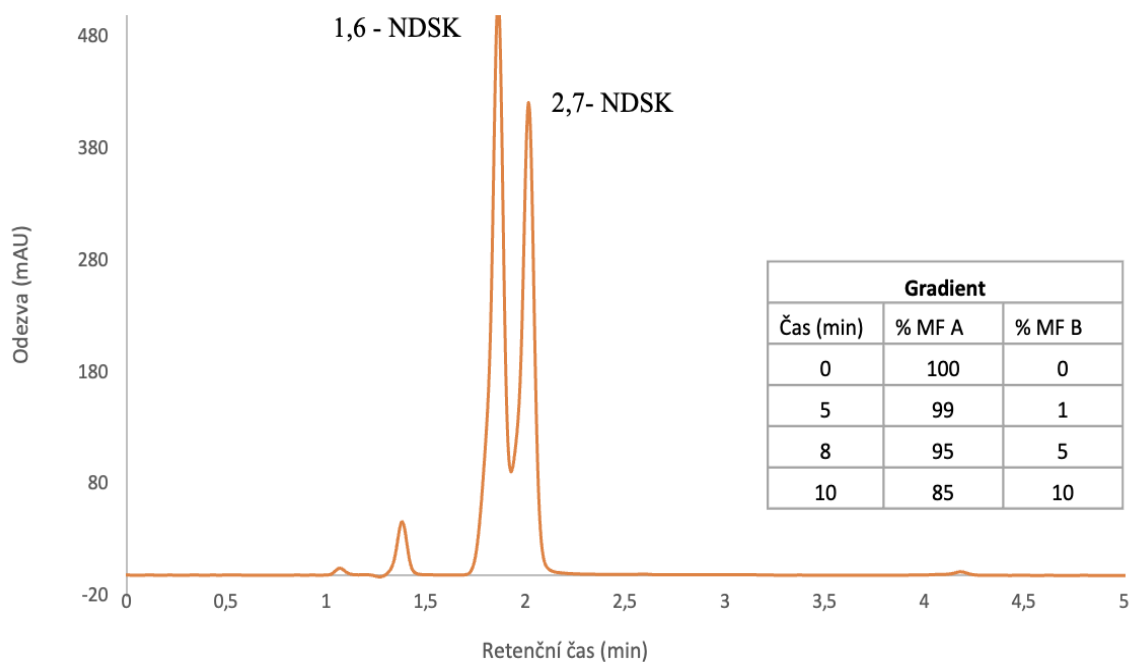
Příloha 8: HPLC separace vzorku A směsi naftalensulfonové kyseliny na koloně Kinetex® Polar C18.

Kolona: Kinetex® Polar C18, 15 cm x 3 mm, 100Å, 2,6 µm, MF lineární gradient od 2-25 % ACN v 0,1 % octanu amonném ve vodě, viz tabulka. Průtok MF: 0,5 ml/min, detekce: UV 228 nm.



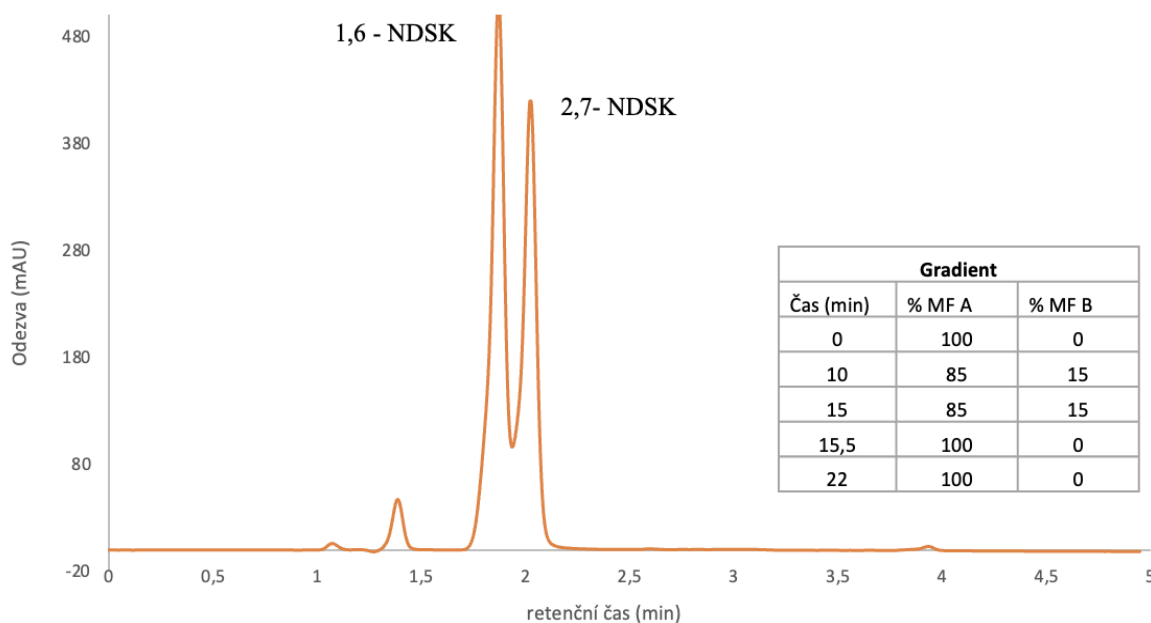
Příloha 7: HPLC separace izomerů naftalensulfonových kyselin 1,6 – NDSK a STD 2,7 - NDSK na koloně Kinetex® Polar C18.

Kolona: Kinetex® Polar C18, 15 cm x 3 mm, 100Å, 2,6 µm, gradient viz tabulka. Průtok MF: 0,5 ml/min, detekce: UV 228 nm.



Příloha 8: HPLC separace izomerů naftalensulfonových kyselin 1,6 – NDSK a STD 2,7 - NDSK na koloně Kinetex® Polar C18.

Kolona: Kinetex® Polar C18, 15 cm x 3 mm, 100Å, 2,6 µm, gradient viz tabulka. Průtok MF: 0,5 ml/min, detekce: UV 228 nm.



Příloha 9: HPLC separace izomerů naftalensulfonových kyselin 1,6 – NDSK a STD 2,7 - NDSK na koloně Kinetex® Polar C18.

Kolona: Kinetex® Polar C18, 15 cm x 3 mm, 100Å, 2,6 µm, gradient viz tabulka. Průtok MF: 0,5 ml/min, detekce: UV 228 nm.