

**Univerzita Pardubice**

Fakulta chemicko-technologická

Katedra analytické chemie

**Kapalinová chromatografie v analýze nitrosloučenin.**

*Bakalářská práce*

Pardubice 2018

Švejdar Vojtěch

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2017/2018

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Vojtěch Švejdar**  
Osobní číslo: **C15071**  
Studijní program: **B2802 Chemie a technická chemie**  
Studijní obor: **Chemie a technická chemie**  
Název tématu: **Kapalinová chromatografie v analýze nitrosloučenin**  
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

### Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na analýzu nitrosloučenin vzniklých jako produkty po výbuchu granátu na bázi trinitrotoluenu. Věnujte se aplikaci separačních technik v kapalně a plynné fázi.
2. Získané poznatky z literatury využijte při analýze nitrosloučenin s využitím kapalinové chromatografie.
3. Výsledky porovnejte a kriticky zhodnoťte.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**Podle pokynů vedoucí práce.**

Vedoucí bakalářské práce:

**doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.**

Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce:

**20. února 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**4. července 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Votruba, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2018

Prohlašuji: Tuto práci jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, 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., autorský zákon, 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. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 04. 07. 2018

*Vojtěch Švejdar*

*Děkuji doc. Ing. Lence Česlové, Ph.D. za odborné vedení a užitečné rady při řešení této bakalářské práce, cenné připomínky a pomoc při získávání experimentálních dat a jejich vyhodnocení. Děkuji Policii ČR, Majoru Pavinskému za přístup do trhací jámy a možnost odebrání vzorků po odstřelu. Velké díky patří také studentům analytické chemie Univerzity Pardubice, kteří mi vždy ochotně pomohli a vyšli vstříc.*

## **Anotace**

Práce je věnována identifikaci nitrosloučenin vzniklých po výbuchu armádní protiletadlové zbroje obsahující trinitrotoluen vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií v systému s obrácenými fázemi. Zabývá se optimalizací podmínek separace pro přesné a rychlé stanovení povýbuchových zplodin. Závěrem byl stanoven obsah identifikované látky (2,4-DNT) a výsledná koncentrace zhodnocena z chemického a pyrotechnického hlediska.

## **Klíčová slova**

trinitrotoluen, trhavina, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

## **Liquid Chromatography in the Analysis of Nitro Compounds**

### **Anotation**

The thesis deals with the identification of nitro compounds formed after the explosion of armored antiaircraft charge containing trinitrotoluene by reversed-phase high-performance liquid chromatography. The thesis is focused on the optimization of the separation conditions for fast determination of the explosion products. Identified compound (2,4-DNT) were quantified and the resulting concentrations were evaluated in terms of analytical chemistry and pyrotechnics.

### **Key words**

Trinitrotoluene, explosive, high-performance liquid chromatography

# Obsah

Úvod.....	11
1 Teoretická část.....	12
1.1. Kapalinová chromatografie .....	12
1.1.1 Chromatografické systémy .....	13
1.1.1.1 Systémy s normálními fázemi .....	13
1.1.1.2 Systémy s obrácenými fázemi .....	14
1.1.2 Separační parametry v HPLC .....	14
1.1.3 Instrumentace v kapalinové chromatografii.....	15
1.1.3.1 Čerpadla mobilní fáze.....	16
1.1.3.2 Mobilní fáze.....	17
1.1.3.3 Dávkovače vzorku .....	18
1.1.3.4 Chromatografická kolona .....	18
1.1.3.5 Detektory .....	19
1.1.3.5.1 Spektrofotometrický detektor .....	19
1.1.3.5.2 Fluorimetrický detektor .....	20
1.1.3.5.3 Refraktometrický detektor .....	20
1.1.3.5.4 Elektrochemické detektory .....	20
1.1.4 Kvalitativní analýza.....	22
1.1.5 Kvantitativní analýza.....	23
1.2 Nitroaromatické sloučeniny.....	25
1.2.1 Zástupci nitroaromatických sloučenin .....	25

1.3	Nitroaromatické výbušniny .....	26
1.4	Trinitrotoluen.....	27
1.4.1	Historie TNT .....	27
1.4.2	Vlastnosti .....	28
1.4.3	Syntéza .....	29
1.4.4	Využití TNT.....	30
1.4.5	Toxicita a dopad na životní prostředí.....	30
1.4.6	Extrakce .....	30
1.4.7	Metody stanovení.....	31
2.	Experimentální část.....	34
2.1	Přístrojové vybavení .....	34
2.2	Chemikálie.....	34
2.3	Vzorky .....	35
2.4	Postup práce.....	35
2.4.1	Podmínky měření .....	35
2.4.2	Příprava standardu .....	35
2.4.3	Příprava vzorku.....	35
3	Výsledky a diskuze.....	37
3.1	Optimalizace měření .....	37
3.2	Analýza vzorku z epicentra výbuchu.....	38
3.3	Analýza vzorku z odletové zeminy.....	40
3.4	Kvantitativní analýza .....	41
4	Závěr.....	43
5.	Citovaná literatura .....	44

## Seznam obrázků

Obrázek 1 Schéma kapalinového chromatografu.....	16
Obrázek 2 Schéma pístového čerpadla.....	17
Obrázek 3 Strukturní vzorec TNT.....	27
Obrázek 4 Možné produkty biodegradace TNT.....	28
Obrázek 5 Schéma výroby TNT.....	29
Obrázek 6 Kvartace půdy .....	36
Obrázek 7 Chromatografická separace standardů vybraných nitroaromatických sloučenin ...	38
Obrázek 8 Chromatografická separace extraktu vzorku odebraného z epicentra výbuchu .....	39
Obrázek 9 UV spektrum 2,4-DNT .....	39
Obrázek 10 Chromatografická separace standardu 2,3-DNT .....	40
Obrázek 11 Chromatografický záznam - Vzorek z odletové zeminy .....	40
Obrázek 12 Kalibrační křivka 2,4-DNT.....	41
Tabulka 1 Obsah 2,4-DNT ve vzorku z epicentra výbuchu .....	41
Tabulka 2 Obsah 2,4-DNT ve vzorku z odletové zeminy .....	42

## Seznam zkratek

1,3,5-TNB	1,3,5-trinitrobenzen
1,3-DNB	1,3-dinitrobenzen
1,5-DNN	1,5-dinitronaftalen
2,4,6-TNT	2,4,6-trinitrotoluen
2,4,6-TNP	2,4,6-trinitrofenol
2,3-DNT	2,3-dinitrotoluen
2,4-DNT	2,4-dinitrotoluen
2,6-DNT	2,6-dinitrotoluen
3,4-DNT	3,4-diitrotoluen
2a-4,6-DNT	2-amino-4,6-dinitrotoluen
4a-2,6-DNT	4-amino-2,6-dinitrotoluen
C18	oktadecylsilikagel
DNB	dinitrobenzen
DNT	dinitronaftalen
ECD	detektor elektronového záchytu
EI	elektronová ionizace
EP	elektropolymerace
F5	penta-fluor-fenyl
GC	plynová chromatografie
GC-MS	spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HMX	oktahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie

LLE	extrakce kapalina-kapalina
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
mNT	meta-nitrotoluen
MSPE	magnetická extrakce s pevnou fází
MS	hmotnostní spektrometrie
NB	nitrobenzen
NT	nitrotoluen
oNT	orto-nitrotoluen
pNT	para-nitrotoluen
PSE	vysokotlaká extrakce rozpouštědlem
RDX	1,3,5-triazin
TNT	trinitrotoluen
UHPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie

# Úvod

Nitro-aromáty mají široké využití v oblasti pyrotechnického a vojenského průmyslu jako trhaviny. Mezi nejvýznamnější patří 2,4,6-trinitrotoluen (TNT), 2,4-dinitrotoluen (DNT) a 2,4,6-trinitrofenol (TNP) [1].

Trinitrotoluen patří k nejběžnějším armádně využívaným trhavinám užívaným jako náplň do militárních náloží, granátů a nábojů ve formě šupinkového tritolu nebo jako hydraulicky lisovaný. Jako trhavina vykazuje TNT mimořádně dobré vlastnosti. Je relativně stabilní a málo citlivý vůči vnějším vlivům. Z pyrotechnického hlediska TNT disponuje velmi vysokou brizancí a razancí výbuchu [2].

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC, High Performance Liquid Chromatography) je významná analytická metoda sloužící k separaci látek. Její velkou předností je možnost separace širokého spektra látek, zejména organických, a to s velkou citlivostí a přesností [3].

Hlavním cílem práce je identifikace povýbuchových zplodin po detonaci armádní výbroje 8,8 cm BrSchrgr. Patr. Flak/36 s náplní TNT ve formě sedmi lisovaných válečků metodou HPLC.

# 1 Teoretická část

## 1.1. Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je separační proces, ve kterém je směs vzorku rozdělena mezi dvě fáze, mobilní a stacionární. Stacionární fáze jsou nejčastěji porézní nebo povrchově porézní částice nebo monolit. Jako nosič se zpravidla používá silikagel, který je chemicky modifikovaný funkčními skupinami na potřebnou polaritu. Mobilní fáze je kapalina různé polarity v závislosti na používaném chromatografickém systému [3].

Kapalinová chromatografie má široké využití v analýze převážně organických látek jak nízkomolekulárních tak vysokomolekulárních. Hlavní oblastí využití kapalinové chromatografie jsou biochemická, farmaceutická a environmentální analýza. [4]

Nejrozšířenější technikou kapalinové chromatografie je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – High Performance Liquid Chromatography). Tato technika je založená na dávkování velmi malých objemů vzorku ( $\mu\text{l}$ ), stacionárních fázích s malými průměry částic (1,9-7  $\mu\text{m}$ ), přesně definovaných vlastnostech a vysoké účinnosti. Detekce signálu probíhá za pomoci průtočných detektorů s malým objemem detekčních cel. HPLC vyniká velmi vysokou účinností, velkou možností opakovatelnosti a robustnosti. Tato metoda je vhodná pro dělení v širokém rozmezí polarity.

Speciální technikou v oblasti vysokoúčinné kapalinové chromatografie je UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography), která využívá stacionárních fází s částicemi  $\leq 2 \mu\text{m}$  vynikající svojí mechanickou pevností a mimořádnou separační schopností. Celý proces probíhá za velmi vysokých tlaků (150-200 MPa). Hlavní výhodou je kratší doba analýzy a zvýšení separační účinnosti [6].

### 1.1.1 Chromatografické systémy

HPLC je založena na separaci analytů na základě jejich distribuce mezi stacionární a mobilní fází, která je čerpána vysokotlakým čerpadlem. Během separace dochází k mnoha typům intramolekulových a částicových interakcí [3]. Dle specifické interakce látek se stacionární fází se chromatografické systémy dělí na rozdělovací a adsorpční chromatografii [3] [4].

U adsorpční chromatografie se jako stacionární fáze používá relativně polární materiál o velkém specifickém povrchu. Mobilní fáze je poměrně nepolární (např.: heptan a tetrahydrofuran). Látky, které jsou za daných podmínek silněji vázány sorpčními silami, jsou v jednotlivých úsecích častěji a déle adsorbovány než látky jiné [3].

U rozdělovací chromatografie dochází dělení látek na základě rozdílné rozpustnosti ve dvou nemísitelných kapalinách. Jedna z kapalin je mobilní fází, druhá zakotvena na nosiči a tvoří tak stacionární fází. Dále můžeme kapalinovou chromatografii rozdělit dle použitých fázových systémů na chromatografii s normálními fázemi, chromatografii s obrácenými fázemi, bioafinitní, ion-párovou a chirální chromatografii a chromatografii stérické výluky. Nejběžnější systémy jsou s normálními a obrácenými fázemi [3].

#### 1.1.1.1 Systémy s normálními fázemi

Jako stacionární fáze se využívá polárního adsorbentu silikagelu nebo chemicky vázaných aminových, diolových nebo nitrilových středně polárních fází. Mobilní fáze je v případě systému s normálními fázemi (NP) méně polární než stacionární. Je tvořena organickými rozpouštědly nebo jejich směsí, kde se jednotlivé složky liší polaritou (např.: hexan a 2-propanol). Adsorpce probíhá na aktivních centrech na povrchu stacionární fáze. Retence vzorku se zvyšuje s rostoucí polaritou adsorbentu a vzorku [3].

Speciálním případem chromatografie s normálními fázemi je chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC), která se liší složením mobilní fáze, která je obdobná jako chromatografie v systémech s obrácenými fázemi (RP). Mobilní fáze je často voda nebo pufr s organickým rozpouštědlem. Hydrofilnější stacionární fáze více poutá vodu z mobilní fáze a retence látky se zvyšuje. Retenční mechanismus se může vysvětlit jako rozdělování solutu mezi na vodu bohatší stacionární fází a na vodu chudší mobilní fází [5].

### 1.1.1.2 Systémy s obrácenými fázemi

U HPLC systémů s obrácenými fázemi užíváme nepolární stacionární fázi. Mezi nejběžnější patří oktadecylsilikagel (C18), hydrofobní polymery a porézní grafický uhlík. Mobilní fáze, která je polárnější, je nejčastěji směs organických rozpouštědel a vody (MeOH/W, ACN/W). Adsorpce není lokalizována na přesná aktivní centra a hnací silou je solvofóbní interakce v mobilní fázi. Retence se zvyšuje s rostoucí lipofilitou stacionární fáze. Až 85% aplikací využívá systému RP-HPLC [3].

### 1.1.2 Separční parametry v HPLC

Při přechodu analytu z mobilní fáze do fáze stacionární se chromatografický systém přibližuje rovnovážnému stavu, kde lze tuto distribuci popsat distribuční konstantou,  $K_D$

$$K_D = \frac{[A]_S}{[A]_M}$$

kde  $[A]_S$  je rovnovážná koncentrace analytu ve stacionární fázi,  $[A]_M$  rovnovážná koncentrace analytu v mobilní fázi [7].

Na základě rozdílné velikosti této distribuční konstanty jsou některé analyty na koloně zadržovány méně a některé více. To se projeví rozdílem v jejich retenci, která je většinou porovnávána pomocí retenčních faktorů,  $k$ .

$$k = \frac{(t_R - t_M)}{t_M}$$

Kde  $t_{Rj}$  je retenční čas analytu neboli doba od nadávkování vzorku po čas, kdy detektor zaznamená maximum píku, a  $t_M$  je mrtvý čas, neboli retenční čas látky neinteragující se stacionární fází [7].

Dalším důležitým separčním faktorem je účinnost separčního systému  $n$ , která je dána vztahem:

$$n = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w}\right)^2 = 5,545 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{1/2}}\right)^2$$

kde  $t_R$  je retenční čas,  $w$  je šířka píku v základně a  $w_{1/2}$  je šířka píku v polovině výšky píku [7].

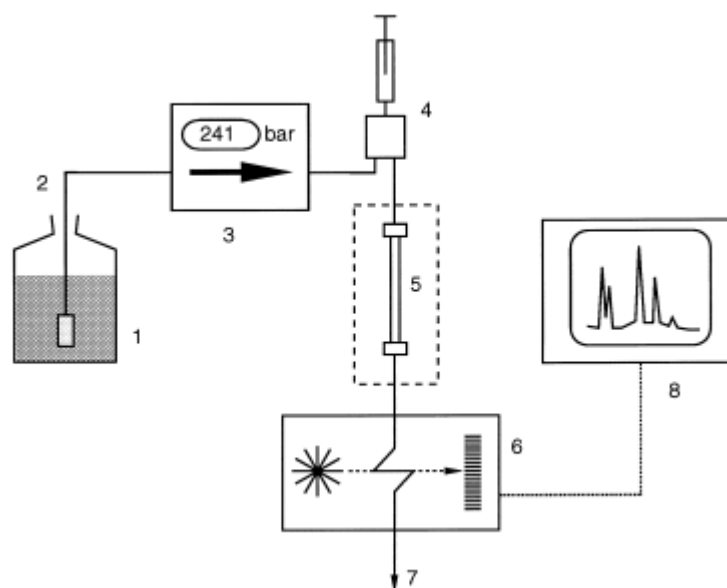
Dalším důležitým faktorem posouzení kvality separačního procesu je výškový ekvivalent teoretického patra,  $H$ :

$$H = \frac{L}{n}$$

kde  $L$  je délka kolony [7].

### 1.1.3 Instrumentace v kapalinové chromatografii

Základní prvky kapalinového chromatografu jsou zásobníky mobilní fáze, ze kterých je čerpána mobilní fáze vysokotlakým čerpadlem přes dávkovací ventil na kolonu, kde dochází k vlastní separaci. Eluát je dále veden do detektoru, který zaznamenává změnu signálu v čase eluce. Kompletní schéma kapalinového chromatografu je na obrázku 1.



Obrázek 1 Schéma kapalinového chromatografu

1 – Zásobník mobilní fáze, 2 – Převodní trubice s fritou a programováním gradientu, 3 – Vysokotlaké čerpadlo s manometrem, 4- Vstříkování vzorku, 5 – Kolona s termostatem, 6 – detektor, 7 – Odpad, 8 – Zpracování dat [3]

Technické požadavky na chromatografickou sestavu jsou náročné. Z hlediska práce s vysokými tlaky musí být všechny části aparatury vysoce mechanicky odolné. Kvůli práci s agresivními materiály je důležitá volba materiálu kolony. Nejvíce se využívá součástí z plastu a nerezové oceli [3].

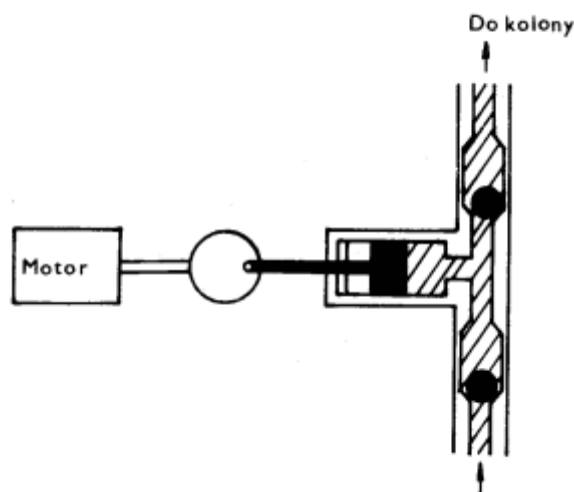
### 1.1.3.1 Čerpadla mobilní fáze

Čerpadla musí být robustní, chemicky a korozivně odolné a schopné generovat tlak 40-60 MPa, v některých aplikacích až 130 MPa. Zároveň musí poskytovat vysokou přesnost při jakémkoli zvoleném průtoku mobilní fáze a musí vykazovat stálý nekolísavý průtok [3].

Rozsah průtoku se obvykle pohybuje od 0,1 ml/min do 10 ml/min. Dodávaný průtok musí být nezávislý na protitlaku, a to i v případě, že se tlak změní během separace, což je obvykle v případě gradientové eluce. Tok mobilní fáze musí být bez pulsů, zvláště pokud pracujeme s detektory sledující index lomu, vodivost nebo elektrochemické parametry [3]

K nejvyužívanějším typům patří pístová čerpadla (Obrázek 2) a to z důvodu úspornosti a rozsáhlé volby průtoku mobilní fáze [4]. Toto čerpadlo je elektricky poháněno motorem, který

se pohybuje tam a zpět v uzavřené hydraulické komoře. Při zpětném zdvihu píst nasává eluent ze zásobníku mobilní fáze a kvůli zpětným ventilům je přívod do separační kolony uzavřen. Během předního zdvihu čerpadla píst tlačí eluent do kolony a vstup do zásobníku je uzavřen. Tato čerpadla poskytují vysoký výstupní tlak s konstantním průtokem a možnost použití pro gradientovou eluci [3].



Obrázek 2 Schéma pístového čerpadla

### 1.1.3.2 Mobilní fáze

Volba mobilní fáze patří k nejdůležitějším parametrům při optimalizaci chromatografické separace. Složení mobilní fáze se může v průběhu analýzy měnit, nebo může zůstat po celou analýzu konstantní. Podle tohoto kritéria rozdělujeme eluci na gradientovou o izokratickou [3].

Výběr mobilní fáze ovlivňuje průběh separace, proto je kladen důraz na určitá kritéria sledované při volbě mobilní fáze jako jsou viskozita, bod varu, čistota a inertní chování ke vzorku [3].

### 1.1.3.3 *Dávkovače vzorku*

Účinnost analýzy také určuje volba dávkovacího zařízení. Dávkovače zajišťují to, aby byl nekonečně malý objem vzorku vložen do středu hlavy chromatografické kolony, přičemž je třeba dbát na to, aby se zabránilo vstupu vzduchu ve stejný čas [3]. Nejběžnějším dávkovacím zařízením je šesticestný ventil, který umožňuje dávkování bez přerušování toku mobilní fáze. Moderní chromatografické sestavy jsou doplněny o automatický dávkovací ventil (autosampler) [4].

### 1.1.3.4 *Chromatografická kolona*

Výběr kolony má v kapalinové chromatografii rozhodující význam, protože analytický výsledek závisí hlavně na náplni kolony a na kvalitě jejího zpracování. Účinnost kolony závisí na materiálu, ze kterého je kolona vyrobena, jejím tvaru, vnitřním povrchu a její délce [3].

Většina HPLC kolon je nejčastěji vyrobena z odolné nerezové oceli. Vnitřní prostor kolony by neměl být drsný, nesmí obsahovat drážky ani mikroporézní struktury, takže ocelové trubky musí být přesně vyvrtány a leštěny. Alternativním materiálem jsou skleněné trubice, které jsou hladké, chemicky inertní a nekorodují. Pro HPLC se používají sklo-lemované ocelové trubky, které jsou silně odolné vůči vnějšímu i vnitřnímu tlaku. Zřídka se můžeme setkat s tantalovými kolonami, které jsou méně náchylné ke korozi než ocelové a jejich povrch je hladký, ale je moc tvrdý, takže šroubení musí být lepené spíše než hydraulicky lisované, a navíc jsou velmi drahé [3].

Pro analytické účely se obecně používají kolony s vnitřním průměrem 2-5 mm. Širší kolony s průměrem 10-25 mm jsou využívány pro preparativní účely [4].

Délka chromatografické kolony závisí na náplni stacionární fáze, účinnosti a s ní spojeným počtem teoretických pater. Kolony 5, 10, 15 nebo 25 cm jsou běžně užívané v případě, že jsou mikročástice stacionární fáze 7  $\mu\text{m}$  nebo menší. Pokud je zapotřebí vyšší účinnosti kolony, je obvykle lepší použití náplní s menšími částicemi, než prodlužování délky kolony se kterou se zvyšuje retenční objem a snižuje se tím koncentraci látky [3].

Kolony se dělí podle obsahující stacionární fáze na klasické, které jsou plněny sorbentem složeným z jednotlivých částic, kdy je nevýhodou možná komprese stacionární

fáze. Další možnou modifikací jsou monolity, u kterých je náplň tvořena jediným kusem sorbentu, např. polymerem. V tomto případě lze pracovat i za vyššího tlaku [6].

### 1.1.3.5 Detektory

V dnešní době je možné rozdělit používané detektory na dva základní typy, a to selektivní, které detekují specifické vlastnosti určité skupiny látek, a univerzální, který reaguje na všechny analyty.

Je důležité, aby detektor splňoval určité požadavky. Musí být schopen detekovat veškeré přítomné komponenty, a to s nejkratší možnou odezvou v co nejširším koncentračním rozmezí. Je vyžadována vysoká citlivost společně s nízkou úrovní šumu. Detektory musí být odolné vůči změnám tlaku, průtoku mobilní fáze a zvolené teplotě při separaci [6].

#### 1.1.3.5.1 Spektrofotometrický detektor

Jedná se o nejčastěji používaný typ detektoru z důvodu jeho citlivosti, širokého lineárního rozsahu, relativní stability kolísání teploty a jeho vhodného použití pro gradientovou eluci. Tyto detektory zaznamenávají sloučeniny a látky, které absorbují záření v ultrafialové nebo viditelné oblasti. Spektrofotometrický detektor měří absorbanci eluátu, přičemž mobilní fáze by neměla záření při dané vlnové délce absorbovat [3].

Existují detektory s fixní vlnovou délkou, u kterých probíhá detekce změny signálu při jedné vlnové délce. Jako zdroj záření se užívá rtuťová výbojka. U detektorů s programovatelnou vlnovou délkou lze nastavovat vlnovou délku v určitém rozmezí, nejčastěji od 200 do 700 nm. Vlnovou délku lze měnit i během analýzy [6].

Detektory diodového pole (DAD) snímají celé spektrum v reálném čase bez přerušení chromatografické separace. Detektorem je pole fotodiod, jejich počet určuje spektrální rozlišení detektoru. Tyto detektory umožňují ve spolupráci s řídicí jednotkou (počítačem) detekci látky při jakékoliv zvolené vlnové délce a umožňují porovnávat snímaná spektra s dostupnou databází spekter [5].

#### 1.1.3.5.2 Fluorimetrický detektor

Sloučeniny, které disponují schopností fluorescence nebo ty, které mohou být získány s pomocí fluoreskujících derivátů, jsou snímány s vysokou citlivostí fluorimetrickým detektorem. Citlivost tohoto detektoru může být až 1000krát větší než při detekci UV záření.

Světlo o vhodné vlnové délce prochází celou a sekundární záření o vyšší vlnová délce je detekováno v pravouhlém směru. Intenzita světla a citlivost se zvyšuje použitím relativně velké měřicí cely [3].

Jednoduché fluorimetrické detektory mají pevnou excitační vlnovou délku, šířka optické štěrbiny nesmí být příliš úzká a rozsah vlnových délek pro detekci fluorescenčního světla musí být neměnný. Modernější zařízení obsahuje monochromátor pro excitaci fluorescenčního světla, poskytující vysoce specifickou úroveň detekce. Je třeba dbát na to, aby nevhodné rozpouštědlo nebo kyslík nebylo obsaženo v mobilní fázi, protože by mohlo stínit fluorescenci [3].

#### 1.1.3.5.3 Refraktometrický detektor

Detektory indexu lomu jsou málo citlivé a univerzální. Zaznamenávají všechny eluční zóny, které mají index lomu odlišný od čisté mobilní fáze. Signál je intenzivnější s rostoucím rozdílem mezi indexem lomu vzorku a eluentu. Cela je zabudována do kovového bloku, který působí jako tepelný izolant. Odezva je závislá na teplotě, proto je nutné detekční celu temperovat. Paprsek prochází měřenou a srovnávací celou, měří se rozdíl intenzity světla, které dopadá na detektor. Jakékoliv kolísání průtoku mobilní fáze výrazně zvyšuje hladinu hluku detekce, takže pulzace musí být pečlivě potlačena. Nelze ho použít při gradientové eluci [3].

#### 1.1.3.5.4 Elektrochemické detektory

Elektrochemie poskytuje užitečný prostředek pro snadnou detekci oxidovatelných a redukovatelných organických sloučenin s velkou selektivitou. Detekční mezní hodnota může být mimořádně nízká a detektory jsou jednoduché a levné. Cela, ve které probíhá elektrochemická reakce, má tři elektrody – pracovní, referenční a pomocnou. Potenciál mezi pracovní a referenční elektrodou může být zvolen. Proud, který vzniká elektrochemickou reakcí

je veden pomocnou elektrodou tak, aby nemohl ovlivnit potenciál referenční elektrody. Pracovní elektroda je ze skleněného uhlíku, uhlíkové pasty nebo zlata a argentochloridová elektroda použita jako referenční. Ocelový blok představuje pomocnou elektrodu, díky které se udržuje konstantní proud generovaný elektrochemickou reakcí, tj. konstantní potenciál v cele [3].

Elektrochemickými detektory můžou být detekovány například: aromatické hydroxy sloučeniny, aromatické aminy, nitroaminy, indoly a merkaptany [7].

Reduktivní detekce se používá jen zřídka, protože rozpuštěný kyslík a těžké kovy (například z oceli kapiláry) mohou způsobit problémy při samotné analýze. Mobilní fáze musí být vodivá, nesmí obsahovat chloridy nebo hydroxykarboxylové sloučeniny. Nepochlápá rozpouštědla a adsorpční chromatografie nejsou kompatibilní s elektrochemickou detekcí [7] [5].

#### 1.1.3.5.4.1 Amperometrická detekce

Amperometrické detektory měří proud vyvolaný průchodem redukované nebo oxidované látky průtokovou celou detektoru. Mobilní fáze je přiváděna na povrch pracovní elektrody, kdy vlastní elektrochemická reakce probíhá pouze na velmi tenké vrstvě. Existuje několik technických řešení konstrukce měrných cel – válcové měrné cely a "wall-jet" měrné cely. Vnitřní objem průtokových cel se pohybuje kolem 1  $\mu\text{l}$  [5].

Účinnost elektrody je silně závislá na ploše povrchu znečištění díky elektrodepozicím a adsorpci, která na povrchu elektrody probíhá, z tohoto důvodu klesá i její analytický signál a detektor nikdy neposkytuje stejný analytický signál pro stejné analytické koncentrace analytu. V důsledku toho je signál obdrženy z amperometrického detektoru závislý na průtoku mobilní fáze, kdežto signál obdrženy z coulometrického detektoru nikoliv [5].

#### 1.1.3.5.4.2 Coulometrická detekce

Coulometrické detektory měří náboj potřebný k oxidaci či redukci celkového množství látky při jejím průtoku měrnou celou detektoru a dosahuje se tak vyšší citlivosti detekce než u amperometrických detektorů. Je využíváno grafitové porézní elektrody, která má proti jiným elektrodám mnohem větší povrch a redoxní reakci podléhá až 100% analyzované látky. Výhodami coulometrické elektrody jsou stabilita a zvýšení selektivity v zapojení dvou a více

elektrod v sérii, na které je přiváděno různé napětí. Analyzovaná látka se na coulometrické elektrodě vystavuje elektrolýze [5].

#### 1.1.4 Kvalitativní analýza

Cílem kvalitativní analýzy je identifikovat chromatografické píky nebo specifickou složku v eluátu. Je-li chemická povaha píku zcela neznámá, speciální techniky a následné zpracování s odbornými tabulkovými hodnotami nabízí jediné řešení ke kvalitativní analýze..

Pokud se předpokládá jedna nebo několik složek ve směsi vzorků, považuje se porovnání referenčních hodnot retenčních faktorů,  $k$ , se vzorkem za stejných chromatografických podmínek, za nejjednodušší způsob analýzy. Pokud má referenční sloučenina stejný retenční čas,  $t_R$ , jako vzorek, pak dvě látky mohou být totožné. Pro zajištění větší jistoty při kvalitativní analýze můžeme využít metody [3]:

- a) Referenční sloučenina se smíchá s částí vzorku a směs je analyzována. Podezřelý vrchol by měl být vyšší, aniž by došlo k nežádoucímu chvostování píku. Čím větší je počet teoretických pater kolony, tím lepší je pravděpodobnost alespoň částečného oddělení dvou různých složek s podobným chromatografickým chováním.
- b) Provedení stejné zkoušky s jinou mobilní fází a nejlépe i jinou stacionární fází. Fázové páry, které mají zcela jiné polární chování, tj. systémy s normálními a reverzními fázemi, jsou testovány při analýze a pokud vzorek nadále nevykazuje žádné známky odlišnosti, potom je totožnost poměrně jistá.

Nicméně kvalitativní analýzu lze zlepšit volbou specifického detektoru. Refraktometrický detektor může identifikovat veškeré látky, kdežto spektrofotometrický a fluorescenční detektor nám umožní stanovit látky splňující jen určité podmínky, ale s mnohem větší citlivostí. U spektrofotometrického detektoru můžeme zajistit kvalitativní analýzu pomocí porovnání UV spekter vzorku standardu [3].

### 1.1.5 *Kvantitativní analýza*

Pro kvantitativní analýzu se využívá plocha či výška píku. Kvantifikace vzorku se provádí s využitím metody vnitřního a vnějšího standardu, standardního přídatku či vnitřní normalizace [3] [4].

#### **Metoda vnějšího standardu**

U této metody je využíváno kalibrační křivky nebo přímého srovnání. U metody přímého srovnání se provedou dva nástřiky, vzorek a standardní látka o známé koncentraci a následně dojde k matematickému vyhodnocení ploch nebo výšek píku. Metoda kalibrační křivky vyžaduje sestavení koncentrační řady standardů s volenou koncentrací analyzované látky. Poté dosazením do dané funkce vypočítáme obsah látky ve vzorku [4].

#### **Metoda standardního přídatku**

Nejdříve dochází k analýze samotného vzorku. Následně se ke vzorku přidá určité množství roztoku standardu o známé koncentraci a po opětovné analýze se plochy chromatografických píků porovnají. Tato metoda se využívá u složitých vícesložkových směsí [4].

#### **Metoda vnitřního standardu**

Z roztoku vzorku o známém objemu se přidá látka – vnitřní standard, která není obsažena ve vzorku a je známa její koncentrace a objem. Následně proběhne analýza a vyhodnocení píku vzorku a vnitřního standardu. Porovnáním ploch píku se vypočítá koncentrace analytu. Nalezení vhodného standardu je obtížné, protože musí být dobře separován od analytu a nesmí s ním interagovat [4].

## **Metoda vnitřní normalizace**

Nutným základním předpokladem pro použití této metody je jistota, že všechny složky jsou eluovány a posléze detekovány. Nástřik se provede pouze jednou a poté se vyhodnotí plochy píku a určí zastoupení jednotlivých složek směsi. Výhodou této metody je, že není potřeba znát přesné objemy dávkovaných vzorků [4].

## 1.2 Nitroaromatické sloučeniny

V rámci průmyslového využití řadíme aromatické nitrosloučeniny do jedné z největších a nejdůležitějších skupin. Jsou to organické molekuly vyznačující se zejména jednou či více charakteristickými nitroskupinami – NO<sub>2</sub> napojenými na aromatický uhlíkový atom. V prostředí kyseliny dusičné a sírové podléhají reakci zvaná nitrace. Reakcí nitroaromatických sloučenin v kyselém prostředí vzniká prakticky vždy amin, naopak v alkalickém prostředí dochází ke vzniku azo, hydrazo, případně azoxy sloučenin, vyznačujících se vazbou dusík – dusík. Pokud dojde k redukci v neutrálním prostředí, produktem může být hydroxylamin [8].

Vzhledem k tomu, že se jedná o synteticky vyráběné sloučeniny, je na ně v poslední době soustředěna pozornost hlavně v ohledu k životnímu prostředí. Mají širokou oblast využití, jako například rozpouštědla nebo látky používané k syntéze výbušnin, léků, pesticidů a insekticidů. Vznikají také jako vedlejší produkty spalování pohonných hmot nebo produkty spojené s výrobou elektrické energie [8].

Aromatické nitrosloučeniny mají nežádoucí karcinogenní a mutagenní účinky na živé organismy. Proto je nezbytné omezit jejich kontakt s živými bytostmi, ale také s životním prostředím, kde dochází nejčastěji ke znečištění půdy a podzemních vod [9].

### 1.2.1 Zástupci nitroaromatických sloučenin

Nitrobenzen (NB) je jedovatá, nažloutlá a hořlavá kapalina. Je špatně rozpustná ve vodě, naopak snadno rozpustná v organických rozpouštědlech. Má široké spektrum využití, například jako rozpouštědlo při speciálních syntézách a prostředek k výrobě průmyslových výbušnin a anilínových barviv. Vyrábí se vícestupňovou nitrací benzenu. Nejčastější reakce NB jsou elektrofilní substituce, halogenace, chlorace nebo sulfonace. Nitrobenzen se řadí do skupiny velmi toxických látek, u kterých dochází lehce k absorpci skrze kůži nebo prostřednictvím dýchacích cest, následkem čehož může být způsobena akutní otrava organismu [8] [9].

Dinitrobenzeny (DNB) jsou čiré až nažloutlé krystalické látky, které jsou značně toxické a nerozpustné ve vodě. Vyrábí se nitrací nitrobenzenu za kyselých katalýz kyselinou sírovou. V důsledku substitučního efektu v 90% při výrobě vzniká izomer 1,3-DNB. Vyskytuje se ve formě tří izomerů, ortho-, meta- a para-. Využívají se hlavně pro výrobu průmyslových

výbušnin. Ve styku s DNB dochází ke snadnému vstřebání skrze kůži nebo dýchacími cestami. Vlivem intoxikace u člověka dochází k cyanóze [9] [10].

Mononitrotolueny (NT) jsou nažloutlé látky nerozpustné ve vodě, vyskytující se ve formě tří izomerů. 2-nitrotoluen (2NT), 3-nitrotoluen (3NT) a 4-nitrotoluen (4NT). 2NT a 3NT jsou v kapalné formě, naopak 4NT ve formě pevných žlutých krystalů. Mononitrotolueny se používají k výrobě výbušnin, pigmentu a dalších chemikálií [10] [9].

2,4-dinitrotoluen (2,4-DNT) je pevná, žlutá a vysoce toxická látka nerozpustná ve vodě. Používá se k výrobě výbušnin, plastů a barviv. Přesto, že je řazen do skupiny výbušnin, samotný se k průmyslovým aplikacím nevyužívá [10].

Trinitrofenol (TNP, kyselina pikrová) je žlutá krystalická látka s příchutí po hořkých mandlích. Je nerozpustná ve vodě. Přípravuje se sulfonací fenolu a následnou nitrací kyselinou dusičnou. Řadí se do látek výbušných, za normálních teplot je však velmi stabilní. Byla hojně využívána britskou armádou pod názvem Lyddit. Nyní se hlavně využívá jako složka důlních výbušnin, histologické medicíně barvivo nebo fixační látka [8].

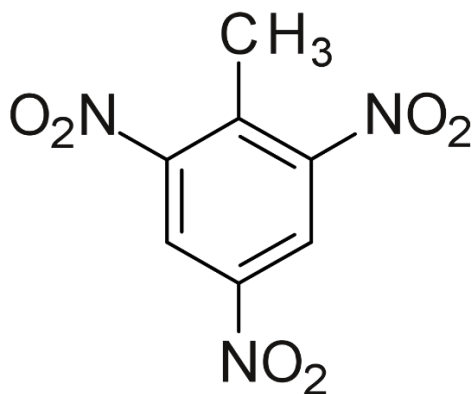
### 1.3 Nitroaromatické výbušniny

Mezi výbušné látky patří především nitroaromatické sloučeniny na bázi benzenu a toluenu. Pravděpodobně nejznámější zástupci této třídy látek jsou 2,4,6-trinitrotoluen (TNT) a 2,4,6-trinitrofenol (TNP), které byly ve většině případů používány jako hlavní složka vojenských výbušnin od počátku 20. století a nyní jsou stále využívány. Výbušné směsi obvykle obsahují další nitroaromatické složky, což umožňuje úpravu výbušné síly. Jedná se především o dinitrotolueny a poly-nitrované benzeny. Po druhé světové válce byly také vyvinuty výbušniny na bázi nitrovaných heterocyklů, např. hexogen a oktogen [1].

Nitroaromatické výbušniny však stále přispívají k potenciálním zdravotním rizikům způsobeným kontaminací armádních prostorů. Kontaminované místa obvykle zahrnují povýbuchové zplodiny a ložiska odpadů z výroby střeliva, bojových prostředků a jiné militární munice. Problém s kontaminovanými lokalitami vyplývá především ze skutečnosti, že jsou stále častěji používány pro civilní účely, kdy hrozí především dermální absorpce výbušných chemikálií při styku pokožky s půdou, vdechováním prachu a zejména absorpcí látek domácky pěstovanými potravinami v kontaminovaných oblastech [1].

## 1.4 Trinitrotoluen

2,4,6-Trinitrotoluen (Obrázek 3) patří do skupiny nitroaromátů, které se nenachází volně v přírodě a spadá do třídy xenobiotik. Je to organická sloučenina obsahující dusík se sumárním vzorcem  $C_7H_5N_3O_6$  [2].



Obrázek 3 Strukturální vzorec TNT

Molekula TNT obsahuje tři nitro skupiny vázané na aromatickém jádře toluenu. Při působení degradačních chemických procesů se rozpadá na izomery. Mezi nejdůležitější patří 2,4-DNT a 2,6 DNT [2].

### 1.4.1 Historie TNT

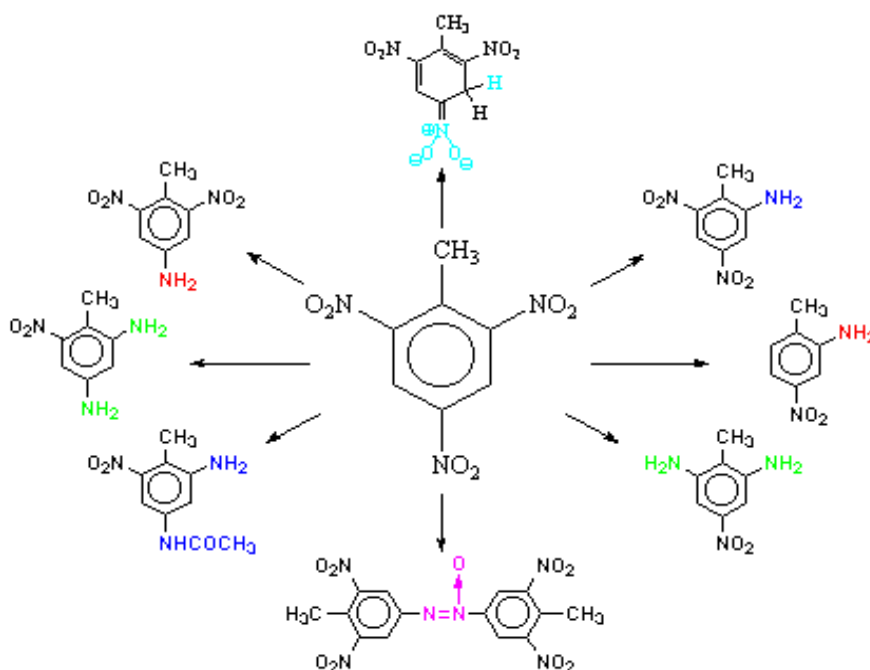
TNT byl poprvé vyroben v roce 1863 německým chemikem Josephem Wilbrandem jako žluté barvivo, ale jeho potenciál jako výbušnina byl rozpoznán až za několik let, hlavně proto, že byl na tu dobu obtížný detonovat a byl zdánlivě méně výkonný než jiné výbušniny. Mezi jeho výhody však patřilo a stále patří jeho schopnost se bezpečně roztavit pomocí páry nebo horké vody, což umožňuje jeho přípravu do určených forem [11].

Německé ozbrojené síly ho přijaly jako dělostřelecká náplň v roce 1902. Během první světové války německé námořnictvo mělo zvláštní výhodu odpálení pancíře poté, co pronikly do zbrojení britských kapitálových lodí. Vzhledem k nenasycené poptávce po výbušninách během druhé světové války byl TNT často smíchán s 40 až 80% dusičnanem amonným, čímž vznikla výbušnina nazvaná amatol. Přestože byl téměř tak silný jako TNT, měl amatol nepatrnou nevýhodu v jeho hygroscopických vlastnostech [11].

Přestože válce čistého TNT jsou stále k dispozici v různých velikostech (250 g, 500 g a 1 kg), nachází se častěji ve výbušných směsích, které obsahují proměnlivé procento TNT a další složky, jako jsou torpex, tritonální pentolit [11].

## 1.4.2 Vlastnosti

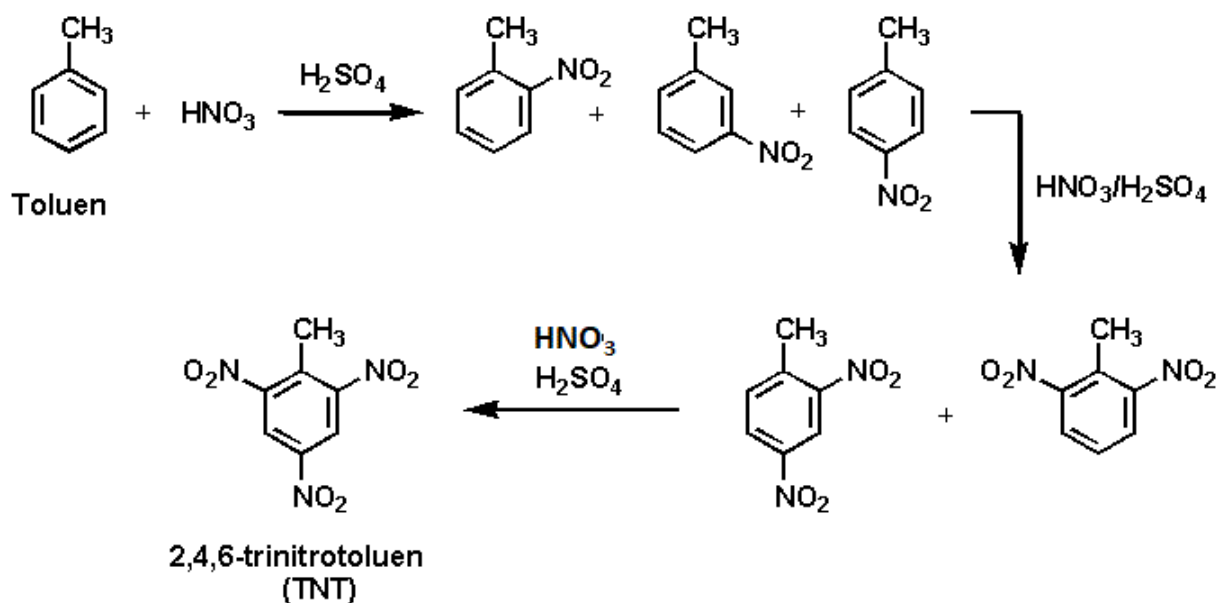
Trinitrotoluen je krystalická žlutá látka s molekulovou hmotností 227,131 g/mol. Je bez zápachu a bez chuti. Působením světelného záření postupem času tmavne. Rozpadá se na optické izomery dinitrotolueny a vlivem biologické degradace na amino deriváty nitrotoluenů (Obrázek 4). Jeho pKa je 16,99 a teplota tání 80,1°C. Je dobře rozpustný téměř ve všech organických rozpouštědlech. Dá se převést na kapalinu rozpuštěním v horké páře. V bázičném prostředí se transformuje do nestabilních tryolátů, u kterých hrozí riziko samodetonace. TNT musí být uchováváno v chladném prostředí za nepřístupu alkáliím [2].



Obrázek 4 Možné produkty biodegradace TNT

Z pyrotechnického hlediska TNT disponuje výbornou trhavostí a průrazností. Je velmi stabilní a dobře odolává vnějším vlivům [2].

### 1.4.3 Syntéza



Obrázek 5 Schéma výroby TNT

Trinitrotoluen se vyrábí postupnou nitrací toluenu za relativně mírných reakčních podmínek (Obrázek 5). Nejprve se toluen nitruje směsí kyseliny sírové a kyseliny dusičné při teplotě 30-40°C. Vzniká mono a dinitrotoluen. Nitroskupiny drasticky snižují reaktivitu toluenu, protože jsou elektronovými akceptory. V dalším stupni se mono a dinitrotoluen úplně nitruje směsí kyseliny dusičné a olea při teplotě do 100°C. Tato směs je mnohem reaktivnější a je schopná zavést poslední nitroskupinu na kruhu. Odpadní kyselina z tohoto procesu se používá pro první krok reakce v průmyslové syntéze [2].

#### 1.4.4 Využití TNT

2,4,6-trinitrotoluen byl klasifikován jako vysoce výbušná sloučenina využívající se jako vojenská trhavina v bombách a granátech. Je široce používán pro plnění protiletadlových náloží, protože disponuje malou citlivostí na šok při vystřelení z hlavně zbraně. Trinitrotoluen se používá buď jako čistá výbušnina nebo v binárních směsích. Nejběžnější binární směsi obsahující TNT jsou cyklotoly (RDX), oktoly (směsi s HMX), amatoly (směsi s dusičnanem amonným) a tritonály (směsi s hliníkem) [12].

Kromě vojenských aplikací se používá malého množství TNT pro průmyslové aplikace, jako jsou hlubinné a podvodní odstřely. Jiné průmyslové využití zahrnuje TNT jako chemický meziprodukt při výrobě barviv a fotografických chemikálií [12].

#### 1.4.5 Toxicita a dopad na životní prostředí

TNT vstupuje do životního prostředí v odpadních vodách a pevných odpadech, které jsou výsledkem průmyslové výroby sloučeniny, zpracování a ničení bomb a granátů a recyklace výbušnin. TNT se rychle rozkládá v povrchové vodě vlivem slunečního záření. [12].

Při chronické dispozici TNT na člověka je prokázána karcinogenita a možnost onemocnění methemoglobinémií a anémií [13].

#### 1.4.6 Extrakce

Konvenčně se nitro aromáty ze vzorků půdy či vzduchu extrahují kapalinou [14] nebo tekutinou v nadkritickém stavu [15]. Existuje velké množství metod vhodných pro extrakci nitrosloučenin jako jsou Soxhletova extrakce (SE), magnetická extrakce s pevnou fází (MSPE) [16], jednoduchá extrakce kapalinou [15] nebo za využití ultrazvuku [17] či vysokotlaká extrakce rozpouštědlem (PSE) [18]. Technika zvolená pro extrakci může mít značný vliv na výtěžnost a složení látek obsažených v extraktu. Pro termolabilní organické látky je důležitá kontrola teploty v průběhu extrakce [19].

### 1.4.7 Metody stanovení

Pro kvalitativní a kvantitativní analýzu TNT v různých matricích patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie v systémech s obrácenými fázemi se spektrofotometrickou detekcí při vlnových délkách 240-255 nm [20] [21] [22]) k nejvíce rozšířeným metodám. Důležitým faktorem při úpravě vzorků k analýze je volba extrakční techniky [23].

#### *Kapalinová chromatografie*

Ve studii N. Tawengva [24] bylo provedeno stanovení nitroaromatických sloučenin v odpadních vodách. Bylo využito techniky magnetických molekulárních polymerů sestavených hromadnou polymerací, pro extrakci nitroaromatických sloučenin. Analýza byla provedena v HPLC systému s obrácenými fázemi. Pro větší rozlišení separace bylo okyselením upraveno pH na 8. Na základě správně zvolené extrakční techniky byly výtěžky extrakce 2,4-DNT, NB a oNT více než 82% a bylo prokázáno znečištění odpadních vod ohrožující životní prostředí. LOD pro zjištění 2,4-dinitrotoluen, nitrobenzen a 2-nitrotoluen byl 13,6, 7,7 a 27,2  $\mu\text{g/l}$  [24]

M. Amin [25] realizoval v roce 2016 experiment, kdy pro HPLC separaci TNT v kontaminovaných vodách byla porovnávána metoda oxidace TNT za použití jednoduché ozonizace a peroxidu vodíku. Velký vliv na degradaci TNT byl rozpoznán při změnách pH roztoku dále upravené kyselinou mravenčí na pH 6. Bylo zjištěno, že účinnost degradace značně ovlivňovala i dávka ozonu a peroxidu vodíku aplikovaná pro určitou reakční dobu. Optimalizovanou separací bylo prokázáno, že oxidace s využitím peroxidu vodíku byla o 27% účinnější než prostá ozonizace, a proto byla metoda dále zkoumána [25].

D. Harvey a spol [20] analyzovali s využitím metody HPLC obsah TNT v tkáních rostlin rostoucích v uměle kontaminované půdě trinitrotoluenem. Byla vyvinuta metoda analýzy, která zahrnovala frakcionaci organických extraktů na Florisilově adsorbentu za účelem odstranění rušivých pigmentů a následné kvantitativní analýze TNT a primárních biometabolitů, 2-amino-2,4-dinitrotoluen (2a-2,4-DNT) a 4-amino-2,6-dinitrotoluen (4a-2,6-DNT). Pro snížení chvostování píku byl přidán 10% isopropanol. Metodika byla použita ke zkoumání metabolismu TNT u rostlin pěstovaných v hydroponických roztocích TNT [20]. H. Guan [22] popsal v roce 2014 techniku jednorázové extrakce pro jednoduché a rychlé stanovení sedmi velkých výbušnin (cyklotrimethylen-trinitro-amin, cyklotetramethylen-tetranitro-amin, 2,4,6-

trinitrofenyl-methylnitro-amin, 2,4,6-trinitrotoluen, 2,4-dinitrotoluen, nitroglycerin a tetranitrát pentaerytritol) v kontaminované vodě. Cílem výzkumu bylo stanovení mírně polárních a nepolárních výbušnin ve vodě s využitím extrakce styren-divinylbenzenovým sorbentem umístěným uvnitř 5 ml pipetového hrotu a následnou RP-HPLC separací ve spojení se spektrofotometrickým detektorem. Byla zjištěna, že použitá metoda extrakce je univerzální, ale kvůli rozdílným vlastnostem zkoumaných výbušnin se výtěžky pohybovaly v širokém rozmezí (60-80%) [22].

T. Brewer [21] v roce 2016 studoval využití HPLC analýzy při studiu výbušnin v polymerních mikrosférách výbušných kuliček. Množství výbušniny zapouzdřeného ve vytvrzených mikrokuličkách bylo extrahováno od zbylých látek LLE (extrakce kapalina/kapalina) extrakcí a následně analyzováno. Výsledky ukazují, že zhruba 30% TNT se při výrobě mikrosfér ztrácí a dalším ztrátám z vytvrzených mikrosfér se zamezí, jestliže se vzorek uchovává při teplotě 4 °C. Bylo zjištěno, že výbušné zapouzdřené mikrokuličky se ukázaly být cenným zkušebním materiálem pro detekci stopových množství výbušnin z důvodu jejich přesné velikosti, tvaru a složení [21].

#### *Jiné metody stanovení TNT*

M. Walsh [26] popsal využití plynové chromatografie ve spojení s detektorem elektronového záhytu (GC/ECD) pro stanovení nízkých koncentrací výbušnin (TNT, 1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin (RDX), 2,4-dinitrotoluen, 1,3,5-trinitrobenzen (TNB), octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocin (HMX)) v kontaminované půdě a vodě. Výsledné koncentrace byly porovnány s HPLC metodou. Mezi studovanými separačními technikami byla zjištěna dobrá korelace. Analyty byly extrahovány z půdy ultrazvukovou extrakcí po dobu 18 hodin. Výzkum ukázal, že s využitím GC/ECD bylo dosaženo lepší separace a větších kvantitativních výsledků [26].

H. Ma a spol. [27] v roce 2014 vyvinuli metodu využívající duálně emisního fluorescenčního filmu připraveného metodou elektropolymerace, ke stanovení nitroaromatických výbušnin v uměle kontaminované půdě. Fluorescenční filmy poskytovali duální emise kolem 431 nm a 540 nm, Poté byly tyto dva emisní filmy použity jako fluorescenční senzory pro TNT a TNP (trinitrofenol) v roztoku. Na základě poměru intenzity fluorescence lze TNT a TNP selektivně rozlišit odpovídajícími změnami barev fluorescence. Tento výsledek je způsoben jejich odlišným detekčním mechanismem [27].

G. Dhingra [28] ve svém výzkumu vyvinul nový způsob extrakce 12 nitroaromatických sloučenin včetně 2,4,6-trinitrotoluenu a jeho metabolitů. Nová metoda spočívala ve využití zabaleného mikroextrakčního sorbentu s následnou plynovou chromatografií GC/MS v biologických vzorcích. Mikroextrakční zařízení obsahovalo 4 mg oktadecylsilikagelu vloženého do injekční stříkačky určené pro přípravu vzorku. Bylo optimalizováno několik parametrů schopných ovlivnit postup mikroextrakce, jmenovitě počet extrakčních cyklů, objem promývacího a elučního rozpouštědla a pH matrice. Vyvinutá metoda produkovala uspokojivé výsledky s výtěžky (> 89,32%) u vodných vzorků a (> 87,45%) pro kapalné biologické vzorky [28].

## 2. Experimentální část

### 2.1 Přístrojové vybavení

Optimalizovaná HPLC analýza vzorků byla provedena na kapalinovém chromatografu složeném ze dvou čerpadel mobilní fáze LC-AD 20XR, spektrofotometrického detektoru s diodovým polem SPD-M30A, s autosamplerem SIL 20AC s automatickým dávkováním vzorku (vše vyrobeno Shimadzu, Kyoto, Japonsko). Separace probíhala na koloně Ascentis RP-Amide (150x4,6 mm; 3  $\mu$ m částice, Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA). Pro optimalizaci byly dále použity kolony: Kinetex C18 Polar (150x3 mm; 3  $\mu$ m částice, Phenomenex, Torrance, Kalifornie, USA) a Ascentis Express F5 (150x3 mm; 2.7  $\mu$ m částice, Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, USA).

Extrakce byla prováděna na Soxhletově extraktoru model Kimex74 (Fisher Scientific, Pittsburgh, US) s celulóзовými patronami (44mm, 123mm).

Pro odpaření přebytečného rozpouštědla byla použita odparka Hei-VAP Value Digital G3 (Heidolph, Schwabach, Německo) s 250ml destilační baňkou.

Zpracování dat z UV detektoru a chromatografických píků bylo prováděno pomocí programu LabSolutions (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) a výsledné grafické a matematické zpracování v programu Excel (Microsoft, Redmont, Washington, USA).

### 2.2 Chemikálie

K analýze byly využity standardy 2-nitrotoluenu (oNT), 3-nitrotoluenu (mNT), 4-nitrotoluenu (pNT), 2,3-dinitrotoluenu (2,3-DNT), 3,4-dinitrotoluenu (3,4-DNT), 2,4-dinitrotoluenu (2,4-DNT), 2,6-nitrotoluenu (2,6-DNT), 2,4,6-trinitrotoluenu (TNT), nitrobenzenu (NB), 1,2-dinitrobenzenu (1,2-DNB) a 1,3,5-trinitrobenzenu (TNB) poskytnuté Ing. Eisnerem, Ph.D., KAlCh, FCHT, Univerzita Pardubice. Methanol a acetonitril (LC/MS čistota) byla použita pro extrakci a přípravu mobilní fáze.

## 2.3 Vzorky

Vzorky půdy byly odebrány ihned po odstřelu na trhací jámě (Pyrotechnické oddělení, Policie ČR). Detonovaná byla německá protiletadlová výzbroj 8,8 cm BrSchrgr. Patr. Flak/36 s náplní sedmi lisovaných válečků z TNT (2,4,6-trinitrotoluen FP 02).

## 2.4 Postup práce

### 2.4.1 Podmínky měření

Měření probíhalo za isokratické eluce 60% (v/v) methanolu na koloně Ascentis RP-Amide (150x4,6 mm; 3  $\mu$ m částice) s teplotou nastavenou termostatem na 30°C s průtokem mobilní fáze 0,6 ml/min. Dávkovaný objem byl 5  $\mu$ l a vlnová délka 249nm.

### 2.4.2 Příprava standardu

Standardy nitroaromatických sloučenin byly pro kvalitativní analýzu a zředěny na koncentraci 10 mg/ml. Pro kvantitativní analýzu byla připravena kalibrační řada 2,4-dinitrotoluenu v methanolu o koncentracích 5; 10; 20; 40; 60, 80 mg/l. Připravené kalibrační roztoky byly ihned proměřeny.

### 2.4.3 Příprava vzorku

Protiletadlová výzbroj 8,8 cm BrSchrgr. Patr. Flak/36 s náplní sedmi lisovaných válečků z TNT (2,4,6-trinitrotoluene FP 02) byla opatřena rozbuškou, vsazena do čerstvě navezené čisté zeminy a detonována ve střežené policejní trhací jámě.

První vzorek půdy z epicentra výbuchu byl odebrán přesně 2 minuty po detonaci. Druhý vzorek byl odebrán 4 minuty po detonaci trhaviny z povýbuchových odletů zeminy 20 metrů od epicentra výbuchu. Vzorky byly vloženy do hermeticky uzavřených nádob a uchovány při 4 °C.

Před analýzou byla zemina ponechána 24 hodin na vzduchu za laboratorní teploty pro odstranění nadbytečné vlhkosti. Následně byly vzorky půdy mechanicky rozmělněny a prosáty

na sítích (1 mm). Byla provedena kvartace (obrázek 6) a vzorky připraveny k následné extrakci.



*Obrázek 6 Kvartace půdy*

Bylo naváženo 40 gramů zeminy a celé množství převedeno do speciálních celulózových patron 1,5 mm určených pro Soxhletův extraktor. Patrony byly vloženy do extrakčních nástavců a přelity 150 ml methanolu použitým jako rozpouštědlo pro extrakci. Extrakce byla prováděna 10 hodin za konstantních podmínek.

Výsledné extrakty v 250 ml destilační baňce byly převedeny do vakuové odparky při tlaku 400 mbar a teplotě 55 °C pro odstranění přebytečného rozpouštědla. K odpařenému vzorku byly pipetou přidány 4 ml methanolu a roztok byl převeden do 5 ml odměrné baňky a doplněn po rysku methanolem. Pro HPLC analýzu byl vzorek centrifugován a filtrován přes stříkačkový PTFE filtr (0.45 µm).

## 3 Výsledky a diskuze

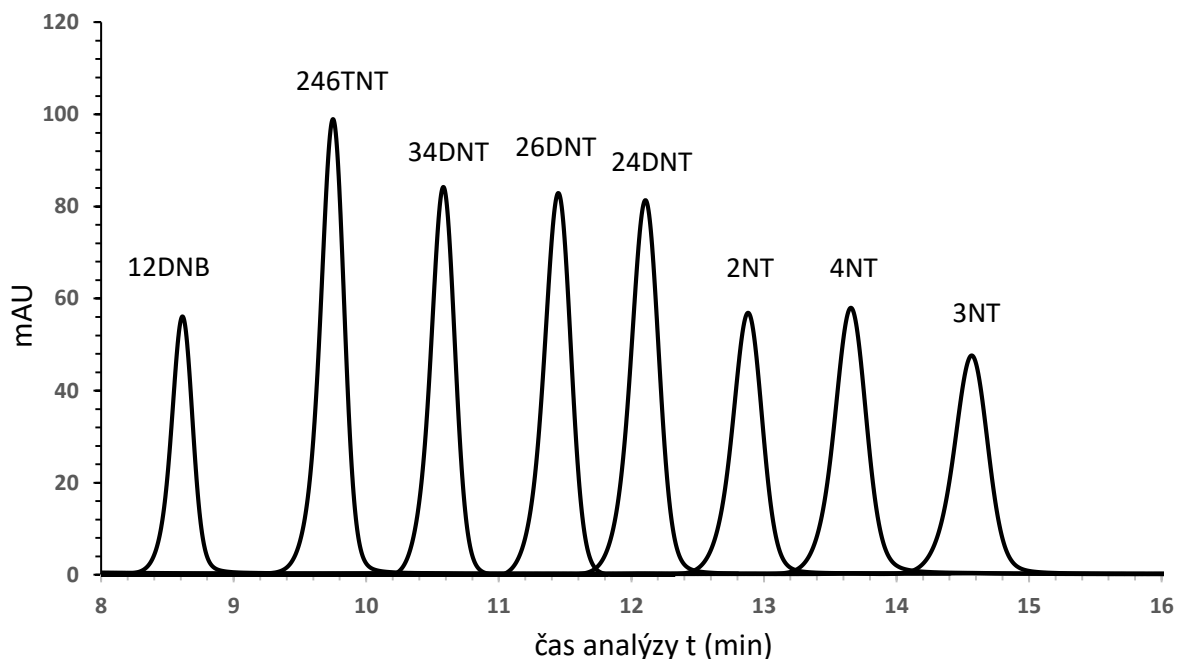
Experimentální část je založena na identifikaci povýbuchových zplodin ve vzorcích půdy metodou HPLC s UV spektrofotometrickou detekcí.

### 3.1 Optimalizace měření

Nejprve byla provedena optimalizace chromatografické separace 8 nitro aromatických látek s cílem separace všech derivátů s maximálním rozlišením a minimální délkou analýzy. Bylo zjištěno, že při změně teploty nedochází k výraznému ovlivnění analýzy a proto byla separace provedena při 30 °C. V závislosti na rozměrech kolony a pracovním tlaku byl průtok mobilní fáze nastaven na 0,6 mL/min.

Měření bylo provedeno nejprve s acetonitrilem (ACN) jako mobilní fází, ale z důvodu chvostování píků a špatné selektivity daného rozpouštědla byl nahrazen methanolem (MeOH). V případě MeOH jako mobilní fáze došlo k výraznému zlepšení rozlišení a tvaru píků.

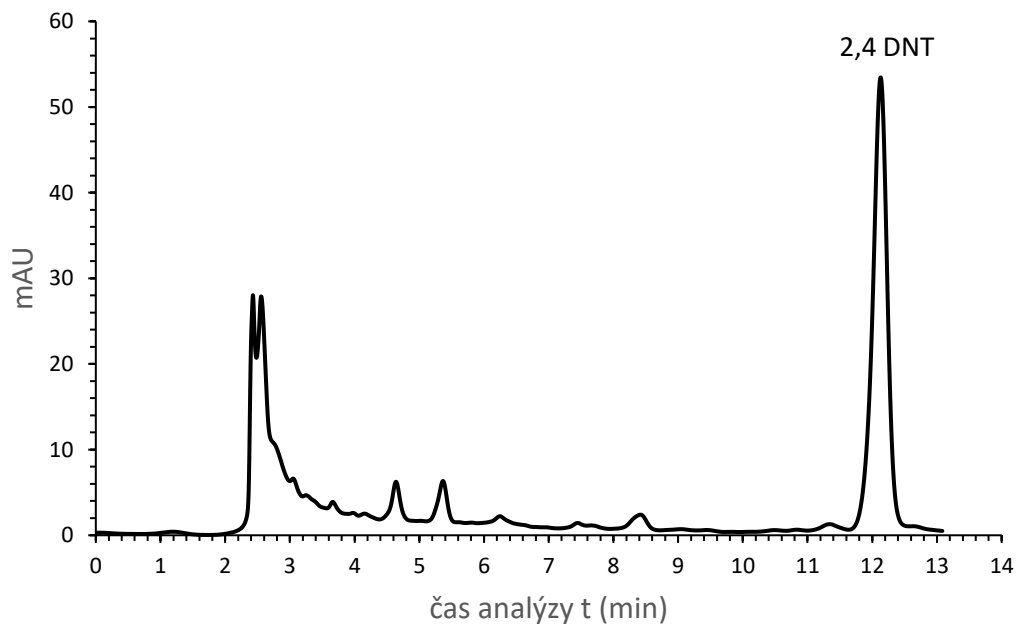
Dále byla nutná optimalizace stacionární fáze. Jako první byla použita oktadecylsilikagelová kolona, kde nedocházelo k separaci jednotlivých izomerů nitrosloučenin. Dále byla zvolena kolona Kinetex C18 Polar s upravenou oktadecyl silikagelovou fází, ovšem ani v tomto případě nedocházelo k rozlišení kritických párů analyzovaných derivátů 2,4-DNT a 2,6 DNT. Dále byla testována kolona Ascentis Express F5, která má zvýšenou selektivitu pro separaci polohových izomerů. Ani v tomto případě nebyly jednotlivé izomery separovány. Pouze v případě Ascentis RP-Amidové kolony došlo k rozlišení jednotlivých izomerů. Optimalizovaná separace je znázorněna na obrázku 7.



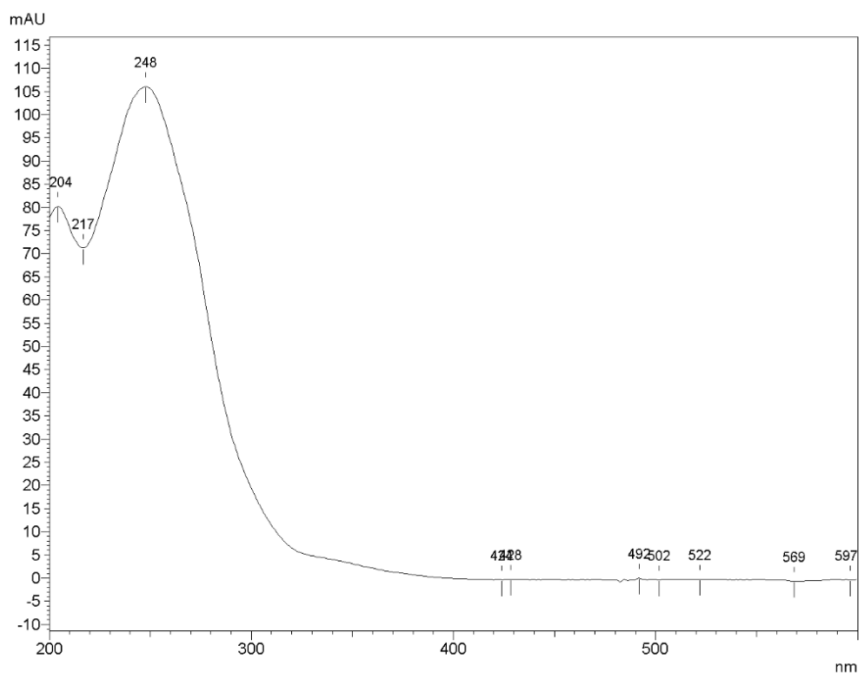
Obrázek 7 Chromatografická separace standardů vybraných nitroaromatických sloučenin

### 3.2 Analýza vzorku z epicentra výbuchu

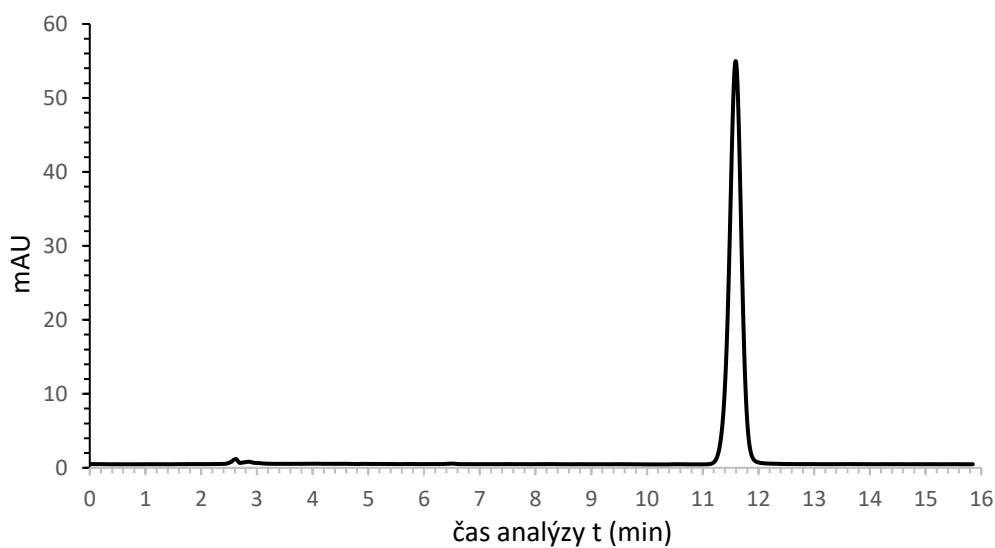
Při analýze vzorku pomocí optimalizované chromatografické separace byly porovnány retenční časy a UV spektra eluovaných látek se standardy (Obrázek 8) a byl identifikován 2,4-DNT elující v čase 12,23 min (Obrázek 9). Při identifikaci zbylých píků byly doměřeny retenční charakteristiky 2,3-DNT, ale na základě porovnání retenčních časů (Obrázek 10) a UV spekter nebylo potvrzeno, že se jedná o tento derivát TNT. Další standardy nebyly k dispozici, ale domníváme se, že by neidentifikované píky mohli odpovídat stopám aminoderivátů nitrosloúčenin. Píky s nižším retenčním časem jsou pravděpodobně biologicky aktivní látky obsažené v půdě.



Obrázek 8 Chromatografická separace extraktu vzorku odebraného z epicentra výbuchu



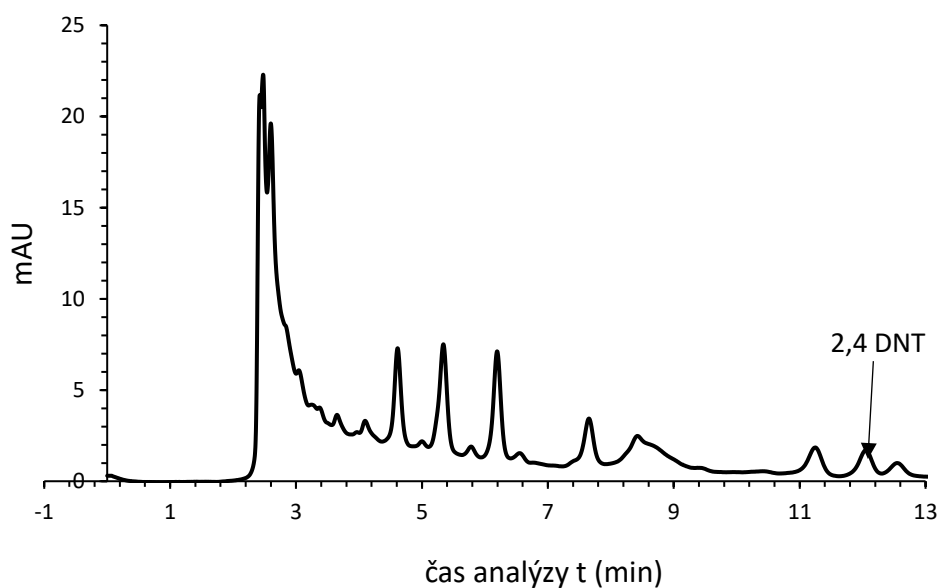
Obrázek 9 UV spektrum 2,4-DNT



Obrázek 10 Chromatografická separace standardu 2,3-DNT

### 3.3 Analýza vzorku z odletové zeminy

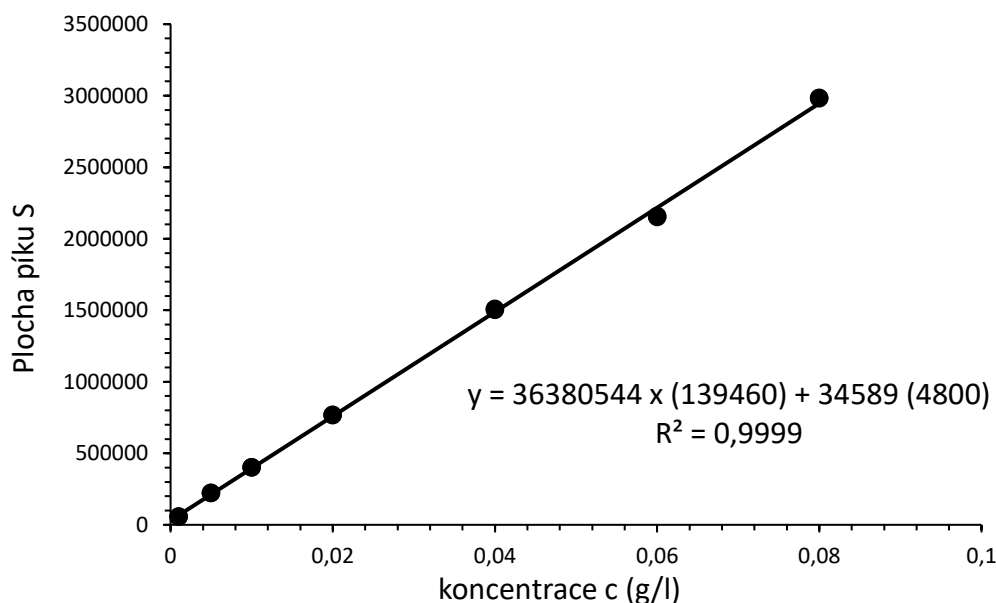
U chromatografické separace vzorku z odletové (Obrázek 11) zeminy analyzovaného optimalizovanou metodou byl porovnáním retenčních časů a UV spekter opět identifikován 2,4-DNT, ale v mnohem menší koncentraci, než je tomu u vzorku z epicentra výbuchu. Profil ostatních látek přítomných ve vzorku je podobný.



Obrázek 11 Chromatografický záznam - Vzorek z odletové zeminy

### 3.4 Kvantitativní analýza

S využitím metody kalibrační křivky (Obrázek 12) byl stanoven obsah 2,4-dinitrotoluenu v půdě. Mez detekce (LOD) byla stanovena jako trojnásobek odstupů signálu od šumu a mez stanovitelnosti (LOQ) jako desetinásobek odstupů signálu od šumu. LOD vyšla 0,0129 µg/l a LOQ 0,0644 µg/l.



Obrázek 12 Kalibrační křivka 2,4-DNT

Z rovnice regrese přímky (obrázek 12) byl vypočítán obsah 2,4DNT v půdě. Výsledky měření jsou shrnuty v tabulce 1 a 2. Kalibrační křivka byla v celém rozsahu testovaných koncentrací lineární.

Tabulka 1 Obsah 2,4-DNT ve vzorku z epicentra výbuchu

Vzorek	c (mg/l)	Plocha píku	Výška píku	m/40 g půdy (mg)
1	45,17	1676759	104958	0,859
1	45,11	1674420	106278	0,858
2	43,17	1603919	104747	0,821
2	42,47	1578440	102891	0,807
3	41,82	1554759	101881	0,795
3	41,35	1537460	101820	0,786

Tabulka 2 Obsah 2,4-DNT ve vzorku z odletové zeminy

Vzorek	c (mg/l)	Plocha píku	Výška píku	m/40 g půdy (mg)
1	2,15	23415	1467	0,012
1	2,21	24754	1528	0,013
2	2,09	22965	1412	0,012
2	2,14	23198	1458	0,012

Ve sledovaných vzorcích byl stanoven obsah 2,4-dinitrotoluenu  $0,821 \pm 0,028$  mg ve vzorku z epicentra výbuchu a  $0,012 \pm 0,002$  mg ve vzorku z odletové zeminy. Domníváme se, že se vzdáleností od epicentra detonace TNT se snižuje koncentrace vzniklých zplodin.

Vzorek zeminy byl uchovávan v bez přístupu světla, nemohlo tedy dojít ke vzniku derivátů a biologických produktů ovlivňujících analýzu. Působením vnějších vlivů jako jsou biologické mikroorganismy a sluneční světlo se TNT a jeho deriváty transformují na amino deriváty nitrotoluenu, což by mohli být neidentifikované píky v analýze [29].

Extrakce na Soxhletově extraktoru byla provedena dvakrát pro oba vzorky, poté znovu čtyřikrát pro vzorek odebraný z epicentra výbuchu vojenského náboje. Značnou nevýhodou použité extrakční metody byla doba potřebná k extrakci. Extrakce byla prováděna 10 hodin, což je v porovnání s obdobným vědeckým výzkumem (48 hod.) znatelně méně [19]. Při delším cyklu extrakce je zřejmé, že by bylo možné dosáhnout přesnějších výsledků kvantitativní analýzy. V porovnání s ultrazvukovou extrakcí bylo dosaženo nižších výtěžků extrakce, je tedy zřejmé, že SE není nejúčinnější extrakční metodou pro nitro aromatické výbušniny [19].

V porovnání s referenčními výzkumy, kdy bylo využito 50 % acetonitrilu jako mobilní fáze při použití izokratické eluce s kolonou Kinetex 2.6 $\mu$ m C18 100A bylo za stejných laboratorních podmínek dosaženo času analýzy 6 min s dostatečným rozlišením píků [24]. U analýzy s použitím 70 % methanolu při isokratické eluci bylo dosaženo s kolonou Ascentis® C18 HPLC 5 $\mu$ m při teplotě 40 °C času analýzy 8 min [20]. Tyto výzkumy jsme nebyli schopni reprodukovat, pro neúspěšné rozlišení píků 2,4-DNT, 2,6-DNT a 2,3-DNT.

## 4 Závěr

V teoretické části byla pozornost věnována popisu a instrumentaci HPLC, dále byla pozornost věnována syntéze, vlastnostem a využitím nitroaromatických látek. V závěrečných kapitolách teoretické části jsou uvedeny analytické techniky, které jsou nejčastěji používané ke stanovení trinitrotoluenu s důrazem na extrakční a separační techniku. Z přehledu analytických technik vyplynulo, že nejčastěji používanou metodou je HPLC se spektrofotometrickou detekcí.

V rámci řešení praktické části byla použita metoda HPLC se spektrofotometrickou detekcí využívající dobré optické vlastnosti nitroaromátů. Měření probíhalo při vlnové délce 249 nm. Vhodná vlnová délka byla vybrána na základě odečtu ideální vlnové délky z UV spektra standardu 2,4DNT.

Obsah 2,4DNT byl stanoven ve dvou vzorcích, z epicentra výbuchu a z odletové zeminy vzdálené 20 m od epicentra. Výsledky stanovení 2,4DNT v půdě byly porovnány s toxikologickými tabulkami a prodiskutovány s pyrotechniky Policie ČR. U vzorku z epicentra výbuchu bylo zjištěno překročení maximální netoxické koncentrace, kdy naměřená koncentrace 2,4DNT byla 42 mg/l a nejvyšší možná koncentrace, která je brána jako netoxická je 3,13 mg/l [12] [13]. Vzorek z odletové zeminy byl analyzován ve stejných podmínkách a bylo zjištěna koncentrace 2,15 mg/l.

Tato koncentrace je brána z pyrotechnického hlediska jako nevýbušná směs, nevykazuje katalytický či podpůrně výbušný charakter. Je však možné, že při určitých teplotních podmínkách ( $>32^{\circ}\text{C}$ ) může dojít při této koncentraci k samovznícení půdy [29].

Kontaminovaná půda byla zpracována metodou Soxhletovy extrakce po dobu 10 hodin. Po HPLC analýze byl 2,4-dinitrotoluen kvantifikován metodou kalibrační přímky, kdy jeho obsah byl stanoven na  $20,523 \pm 0,694$  mg/1kg. Popsaná technika, která byla aplikována na vybrané vzorky půdy poskytovala dobré výsledky s malou časovou náročností na analýzu vzorku.

## 5. Citovaná literatura

- [1] HALASZ, A, C GROOM, E ZHOU, et al. Detection of explosives and their degradation products in soil environments. *Journal of Chromatography A* [online]. 2002, **963**(1-2), 411-418 [cit. 2018-07-01]. DOI: 10.1016/S0021-9673(02)00553-8. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967302005538>
- [2] SZALA, Mateusz a Jesse J. SABATINI. 2,4,6-Trinitrotoluene - A Useful Starting Compound in the Synthesis of Modern Energetic Compounds. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie* [online]. 2018, 644(5), 262-269 [cit. 2018-06-22]. DOI: 10.1002/zaac..
- [3] MEYER, Veronika R. *Practical High-Performance Liquid Chromatography* [online]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, 2004 [cit. 2018-06-22]. ISBN 9780470032671..
- [4] CHURÁČEK, Jaroslav a Pavel JANDERA. *Úvod do vysokoúčinné kapalinové kolonové chromatografie*. Praha: Státní nakladatelství technické literatury, 1985. Knižnice technických aktualit. Dostupné také z: <http://www.digitalniknihovna.cz/mzk/uuid/uuid:8144fcb0-06a5-11e4-b1a4-005056827e52>
- [5] D. GUILLARME AND J.L. VEUTHEY. *UHPLC in life sciences*. Cambridge, U.K: Royal Society of Chemistry, 2012. ISBN 9781849735490.
- [6] DOUŠA.M, <http://www.hplc.cz/> [online]. [cit. 2018-05-22]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/>.
- [7] A. PRYDE AND M. T. GILBERT. *Applications of high performance liquid chromatography*. Reprinted. London [u.a.]: Chapman & Hall, 1980. ISBN 9780412142208..
- [8] JIU, K.-S. a R. E. PARALES. Nitroaromatic Compounds, from Synthesis to Biodegradation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*[online]. 2010, **74**(2), 250-272 [cit. 2018-07-01]. DOI: 10.1128/MMBR.00006-10. ISSN 1092-2172. Dostupné z: <http://mibr.asm.org/cgi/doi/10.1128/MMBR.00006-10>

- [9] POURETEDAL, H. R. a M. H. KESHAVARZ. Prediction of toxicity of nitroaromatic compounds through their molecular structures. *Journal of the Iranian Chemical Society* [online]. 2011, **8**(1), 78-89 [cit. 2018-07-01]. DOI: 10.1007/BF03246204. ISSN 1735-207X. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF03246204>
- [10] BOOTH, Gerald, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2000 [cit. 2018-07-01]. ISBN 9783527306732..
- [11] BADER, M., R. HEINRICH-RAMM, U. KNECHT, T. GÖEN a A. HARTWIG. Nitroaromatic explosives (Nitrobenzene; 2-Nitrotoluene; 3-Nitrotoluene; 4-Nitrotoluene; 1,2-Dinitrobenzene; 1,3-Dinitrobenzene; 2,4-Dinitrotoluene; 2,6-Dinitrotoluene; 2,4,6-Trinitrotoluene) in urine [Biomonitoring Methods, 2015]. *The MAK-Collection for Occupational Health and Safety* [online]. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2002, 2016-04-27, s. 1380-1398 [cit. 2018-07-01]. DOI: 10.1002/3527600418.bi9895e2115. ISBN 9783527600410. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/3527600418.bi9895e2115>
- [12] RICHTER-TORRES. P, *TOXICOLOGICAL PROFILE FOR TNT* [online]. [cit. 2018-05-22]. Dostupné z: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/>.
- [13] LEVINE, B.S., E.M. FUREDI, D.E. GORDON, P.M. LISH a J.J. BARKLEY. Subchronic toxicity of trinitrotoluene in Fischer 344 rats rats. *Toxicology* [online]. 1984, **32**(3), 253-265 [cit. 2018-07-01]. DOI: 10.1016/0300-483X(84)90078-7. ISSN 0300483X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0300483X84900787>
- [14] TOLEDO, Marcelo, Fernando M. LANÇAS a Emanuel CARRILHO. Solid-phase extraction of nitro-PAH from aquatic samples and its separation by reverse-phase capillary liquid chromatography. *Journal of the Brazilian Chemical Society* [online]. 2007, **18**(5), 1004-1010 [cit. 2018-07-01]. DOI: 10.1590/S0103-50532007000500019. ISSN 0103-5053. Dostupné z: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-50532007000500019&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532007000500019&lng=en&nrm=iso&tlng=en).

- [15] BAJEROVÁ, Petra, Aleš EISNER, Věra JEŽOVÁ, Martin ADAM a Karel VENTURA. Comparison of supercritical fluid and Soxhlet extractions for the isolation of nitro compounds from soils. *Journal of Separation Science* [online]. 2008, **31**(8), 1408-1414 [cit. 2018-07-01]. DOI: 10.1002/jssc.200700561. ISSN 16159306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200700561>.
- [16] COSTA DOS REIS, Luciana, Lorena VIDAL a Antonio CANALS. Graphene oxide/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> as sorbent for magnetic solid-phase extraction coupled with liquid chromatography to determine 2,4,6-trinitrotoluene in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2017, **409**(10), 2665-2674 [cit. 2018-07-01]. DOI: 10.1007/s00216-017-0211-3. ISSN 1618-2642. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-017-0211-3>
- [17] XU, Wenjie, Zhenming JIANG, Quanlin ZHAO, Zhenzhong ZHANG, Hongping SU, Xuewen GAO a Zhengfang YE. Acute toxicity assessment of explosive-contaminated soil extracting solution by luminescent bacteria assays. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2016, **23**(22), 22803-22809 [cit. 2018-07-01]. DOI: 10.1007/s11356-016-7492-5. ISSN 0944-1344. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11356-016-7492-5>
- [18] HOLMGREN, Erik, Stefan EK a Anders COLMSJÖ. Extraction of explosives from soil followed by gas chromatography–mass spectrometry analysis with negative chemical ionization. *Journal of Chromatography A* [online]. 2012, **1222**, 109-115 [cit. 2018-07-01]. DOI: 10.1016/j.chroma.2011.12.014. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967311017985>.
- [19] 5. UNGRÁDOVÁ, Ivana, Zdeněk ŠIMEK, Milada VÁVROVÁ, Michaela STOUPALOVÁ a Ludmila MRAVCOVÁ. Comparison of extraction techniques for the isolation of explosives and their degradation products from soil. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* [online]. 2013, 93(9), 984-998 [cit. 2018-06-23]. DOI: 10.1080/03067319.2012.736972. ISSN 0306-7319. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/03067319.2012.736972>

- [20] HARVEY, Scott D., Robert J. FELLOWS, Dominic A. CATALDO a Robert M. BEAN. Analysis of 2,4,6-trinitrotoluene and its transformation products in soils and plant tissues by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 1990, **518**, 361-374 [cit. 2018-07-01]. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)93196-6. ISSN 00219673. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021967301931966>
- [21] BREWER, Timothy, Matthew STAYMATES a Robert FLETCHER. Quantifying Trace 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) in Polymer Microspheres. *Propellants, Explosives, Pyrotechnics* [online]. 2016, **41**(1), 160-165 [cit. 2018-07-01]. DOI: 10.1002/prop.201500141. ISSN 07213115. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/prop.201500141>
- [22] GUAN, Hongxia a Katelyn STEWART. Determination of Explosives in Water Using Disposable Pipette Extraction and High Performance Liquid Chromatography. *Analytical Letters* [online]. 2014, **47**(8), 1434-1447 [cit. 2018-07-01]. DOI: 10.1080/00032719.2013.869826. ISSN 0003-2719. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00032719.2013.869826>
- [23] JENKINS, Thomas F. Development of a Simplified Field Method for the Determination of TNT in Soil. No. CRREL-SR-90-38. COLD REGIONS RESEARCH AND ENGINEERING LAB HANOVER NH, 1990
- [24] TAVENGWA, Nikita Tawanda, Ewa CUKROWSKA a Luke CHIMUKA. Application of magnetic molecularly imprinted polymers for the solid phase extraction of selected nitroaromatic compounds from contaminated aqueous environments. *Separation Science and Technology* [online]. 2016, 52(3), 467-475 [cit. 2018-06-23]. DOI: 10.1080/01496395.2016.1250779. ISSN 0149-6395. Dostupné z: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/01496395.2016.1250779>.
- [25] AMIN, M. M. a F. TEIMOURI. Comparison of simple ozonation and direct hydrogen peroxide processes in TNT removal from aqueous solution. *Journal of Water Supply: Research and Technology - Aqua*[online]. 2016, **65**(7), 564-569 [cit. 2018-07-03]. DOI: 10.2166/aqua.2016.044. ISSN 0003-7214. Dostupné z: <http://aqua.iwaponline.com/cgi/doi/10.2166/aqua.2016.044>

- [26] WALSH, M. Determination of nitroaromatic, nitramine, and nitrate ester explosives in soil by gas chromatography and an electron capture detector. *Talanta* [online]. **54**(3), 427-438 [cit. 2018-07-01]. DOI: 10.1016/S0039-9140(00)00541-5. ISSN 00399140. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914000005415>
- [27] GU, Cheng, Wenyue DONG, Liang YAO, Ying LV, Zhongbo ZHANG, Dan LU a Yuguang MA. Cross-Linked Multifunctional Conjugated Polymers Prepared by In Situ Electrochemical Deposition for a Highly-Efficient Blue-Emitting and Electron-Transport Layer. *Advanced Materials*[online]. 2012, **24**(18), 2413-2417 [cit. 2018-07-03]. DOI: 10.1002/adma.201200559. ISSN 09359648. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/adma.201200559>
- [28] DHINGRA, Gaurav, Pooja BANSAL, Nidhi DHINGRA, Susheela RANI a Ashok Kumar MALIK. Development of a microextraction by packed sorbent with gas chromatography-mass spectrometry method for quantification of nitroexplosives in aqueous and fluidic biological samples. *Journal of Separation Science* [online]. 2018, **41**(3), 639-647 [cit. 2018-07-01]. DOI: 10.1002/jssc.201700470. ISSN 16159306. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201700470>
- [29] ROBERTSON, A. J. B. The decomposition, boiling and explosion of trinitrotoluene at high temperatures. *Transactions of the Faraday Society* [online]. 1948, **44**, 977- [cit. 2018-07-01]. DOI: 10.1039/tf9484400977. ISSN 0014-7672. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=tf9484400977>