

UNIVERZITA PARDUBICE  
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2017

Bc. JAKUB ŠULC

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Termodesorpce

Bc. Jakub Šulc

Diplomová práce

2017

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

Thermodesorption

Bc. Jakub Šulc

Thesis

2017

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2016/2017

**ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE**  
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Jakub Šulc**  
Osobní číslo: **C15590**  
Studijní program: **N1407 Chemie**  
Studijní obor: **Analytická chemie**  
Název tématu: **Termodesorpce**  
Zadávací katedra: **Katedra analytické chemie**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Provedte literární rešerši zaměřenou na využití programově řízeného nástřiku a jeho využití při dávkování velkých objemů vzorků a termodesorpci.
2. V experimentální části otestujte možnosti využití nástřiku s programově řízenou teplotou při analýze aromatických nitrosloučenin. Připravte metodu pro jejich stanovení pomocí GC-MS a vypracovanou metodu ověřte na reálných vzorcích.
3. Dosažené výsledky kriticky zhodnoťte.

Rozsah grafických prací:  
Rozsah pracovní zprávy:  
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury:  
**Podle pokynů vedoucího práce.**

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Aleš Eisner, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie  
Konzultant diplomové práce: **doc. Ing. Petra Bajerová, Ph.D.**  
Katedra analytické chemie  
Ostatní konzultanti: **Ing. Silvie Surmová**  
Katedra analytické chemie  
Datum zadání diplomové práce: **20. února 2017**  
Termín odevzdání diplomové práce: **12. května 2017**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.  
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2017

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.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 11. 5. 2017

Bc. Jakub Šulc

Děkuji panu Ing. Eisnerovi PhD. za jeho optimistický přístup, za důvěru ve mě kladenou, za cenné rady a psychickou podporu. Všem členům své rodiny, od nejmladších po ty nejzkušenější, za rozptýlení i za podporu.

## ANOTACE

Diplomová práce se zabývá hledáním vhodných podmínek termodesorpce při stanovování nitrosloučenin. V teoretické části této práce jsou zpracovány informace o možnostech přípravy vzorku k analýze, možné nástřikové techniky a způsoby stanovení nitrosloučenin. Experimentální část popisuje způsob a parametry stanovení nitrosloučenin a zahrnuje výsledky jednotlivých experimentů. Testuje možnost využití nástřiku s programově řízenou teplotou a systému automatického vyměňování linerů. Stanovuje výtěžnosti pro linery s různými náplněmi a při dávkování velkých objemů.

## Klíčová slova

Výbušniny, nitrosloučeniny, GC-MS, PTV, termodesorpce

## ANNOTATION

The diploma thesis deals with finding suitable conditions of thermodesorption in the determination of nitro compounds. In the theoretical part of this work are elaborated information about possibilities of sample preparation for analysis, possible injection techniques and methods of determination of nitro compounds. The experimental part describes the manner and parameters of the determination of nitro compounds and includes the results of individual experiments. The possibility of using programmed controlled temperature injection and automatic liner exchange system is being tested. It determines recoveries for the liners with various fillings and injections of large volumes.

## Keywords

Explosives, nitro compounds, GC-MS, PTV, thermodesorption

# OBSAH

SEZNAM ZKRATEK .....	11
SEZNAM OBRÁZKŮ .....	14
SEZNAM TABULEK .....	16
1. TEORETICKÁ ČÁST .....	18
1.1. Příprava vzorku k analýze .....	18
1.1.1. Extrakce tuhou látkou (SPE).....	18
1.1.2. Extrakce kapalinou.....	20
1.1.3. Extrakce plynem .....	21
1.2. Nástřikové techniky .....	22
1.2.1. Split/Splitless nástřikový port .....	22
1.2.2. On-Column .....	23
1.2.3. Nástřik s programově řízenou teplotou (PTV).....	23
1.2.3.1. Studený split nástřik.....	25
1.2.3.2. Studený splitless nástřik.....	25
1.2.3.3. Studený splitless nástřik s odstraňováním rozpouštědla.....	25
1.3. Vhodné analytické metody.....	26
1.3.1. Plynová chromatografie .....	26
1.3.2. Hmotnostní spektrometrie.....	27
1.3.3. Spojení GC-MS .....	28
1.4. Nitrosloučeniny.....	29
1.4.1. Obecná charakteristika .....	29
1.4.2. Významné nitrosloučeniny .....	29
1.4.3. Způsoby stanovení .....	31
1.4.3.1. Použití plynové chromatografie.....	31
1.4.3.2. Použití kapalinové chromatografie .....	34
1.4.3.3. Použití ostatních technik.....	37
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	39
2.1. Intrumetace.....	39

2.1.1.	Plynový chromatograf s hmotnostní detekcí.....	39
2.1.2.	Analytické váhy .....	40
2.2.	Použité chemikálie .....	41
2.2.1.	Chemikálie a standardy.....	41
2.3.	Příprava standardních a kalibračních roztoků.....	41
2.4.	Pracovní postup .....	42
2.4.1.	Podmínky měření kalibračních roztoků .....	42
2.4.2.	Podmínky měření pomocí LINEX GC-MS .....	44
3.	VÝSLEDKY A DISKUSE .....	45
3.1.	Výsledky měření kalibrační křivky.....	45
3.2.	Výsledky měření pomocí LINEX GC-MS.....	48
4.	ZÁVĚR .....	52
5.	LITERATURA.....	53
6.	PŘÍLOHY .....	58

## SEZNAM ZKRATEK

LINEX	LINer Exchange, automatický měnič linerů
GC-MS	Spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií
ECD	Detektor elektronového záchytu
LC-MS	Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií
FT-IR	Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
SPE	Extrakce pevnou fází
SPME	Mikroextrakce pevnou fází
LLE	Extrakce kapaliny kapalinou
LVI	Nástřik velkých objemů
SVE	Vypouštění par rozpouštědla
PTV	Teplotně programovaný nástřik
GC	Plynová chromatografie
LC	Kapalinová chromatografie
CE	Kapilární elektroforéza
TCD	Tepelně vodivostní detektor
FID	Plamenově ionizační detektor
MS	Hmotnostní spektrometrie
EI	Elektronová ionizace
SEI	Simolovaná elektronová ionizace
PCI	Positivní chemická ionizace
NCI	Negativní chemická ionizace
SIM	Monitorování vybraných iontů

TNT	Trinitrotoluen
RDX	1,3,5-trinitro-1,3,5-triazacyklohexan
NB	Nitrobenzen
2-NT	2-nitrotoluen
3-NT	3-nitrotoluen
4-NT	4-nitrotoluen
1,3-DNB	1,3-dinitrobenzen
2,4-DNT	2,4-dinitrotoluen
2,6-DNT	2,6-dinitrotoluen
PDMS	Polydimethylsiloxan
CW/DVB	Carbowax/divinylbenzen
PA	Polyakrylát
SEM	Skenující elektronový mikroskop
HVOC	Vysokovroucí těkavé organické látky
FPD	Plamenový fotometrický detektor
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
UV	Ultrafialové
PS	Polystyren
LOD	Limit detekce
RSD	Relativní standardní odchylka
OSD	Oktadecylsilan
LPPI	Nízkotlaká fotoionizace
PI-MS	Hmotnostní spektrometrie s fotoionizací

IMS	Iontová mobilní spektrometrie
PTR-MS	Hmotnostní spektrometrie s protonovou ionizací
MFC	Hmotnostní průtokoměr
PVF	Polyvinyl fluorid
SPCE	Sítotisková uhlíková elektroda
MWCNT	Mnohostěnné uhlíkové nanotrubičky

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 - Schéma extrakce tuhou látkou (3) .....	19
Obrázek 2 - Schéma použití mikroextrakce pevnou fází (4).....	20
Obrázek 3 - Schéma konstrukce plynového chromatografu (13).....	26
Obrázek 4 - Schéma hmotnostního spektrometru (14).....	27
Obrázek 5 - Reakční schéma nitrace benzenu (18) .....	29
Obrázek 6 - Srovnání účinnosti extrakce s komerčně dostupnými vlákny (32).....	31
Obrázek 7 - Záznam ze skenujícího elektronového mikroskopu zobrazující grafenový povlak vlákna. (A) 200x zvětšení, (B) 1000x zvětšení (32) .....	32
Obrázek 8 - Chromatogram 27 vysokovroucích těkavých organických látek paralelně detekovaných FID, ECD a FPD při koncentraci 100 µl/l. Pro nás zajímavé látky: nitrobenzen (18), 3-nitrotoluen (24) a 4-nitrotoluen (25). (33) .....	33
Obrázek 9 - Efekt doby styku s antracitem (A) a efekt množství antracitu (B) na výtěžnost nitrobenzenu (NB) a 1,3-dinitrobenzenu (DNB) (38).....	34
Obrázek 10 - Chromatogram NB a DNB z výchozího roztoku před extrakcí (a), z výchozího roztoku po extrakci (b) a po desorpci sorbentu acetonitrilem (c) (38) .....	34
Obrázek 11 - Výtěžnost při opakovaném použití antracitu (38) .....	35
Obrázek 12 - Vliv různých typů nanovláken na extrakci. Nitrobenzen (Nitr), 2-naphtol (2-Naph), benzene (Benz), n-butyl p-hydroxybenzoate (n-Buty), naphtalene (Naph), p-dichlorobenzene (p-Dich). (39).....	36
Obrázek 13 - Schéma instrumentace, MFC - hmotnostní průtokoměry, LPPI - nízkotlaká fotoionizace, PVF - polyvinyl fluorid (40).....	37
Obrázek 14 – GCMS-TQ 8030; GC-2010; Optic-4; AOC-5000 .....	39
Obrázek 15 – Analytické váhy HR-120-EC.....	40
Obrázek 16 - Chromatografický záznam v modu SCAN sedmi nitrosloučenin. Měřeno na kapilární koloně Rtx® - TNT, 15 m x 0,25 mm x 0,25 µm tloušťka filmu (Restec, USA). .....	43
Obrázek 17 - Liner s kroužkovým těsněním a párem čepiček (A). Začepičkovaný liner připravený na analýzu (B).....	44
Obrázek 18 - Porovnání průměrných ploch píků jednotlivých látek v závislosti na použité ionizační technice.....	46

Obrázek 19 - Chromatogram lineru s Carbotrapem bez nadávkování vzorku.....	48
Obrázek 20 – Chromatogram stanovovaných nitrosloučenin při použití lineru s Carbotrapem.....	49
Obrázek 21 - Chromatogram stanovovaných nitrosloučenin při použití lineru s Carbosievem. Byl nadávkován 1 $\mu$ l o koncentraci 1 $\mu$ g/ml a konečná teplota nástřikového portu byla 340 °C. Možné porovnání s obrázkem 17. ....	49
Obrázek 22 - Chromatogram ukazující vliv zuhelnatěné části kolony. Na všech sedmi pících je patrné rozmývání a asymetričnost. Měřeno v režimu SCAN, vybrané ionty jsou v levém horním rohu a jejich intenzity jsou 5 znásobené, kromě iontu 182 který je znásoben pouze dvakrát. ....	50
Obrázek 23 - Chromatogram při nadávkování 5 $\mu$ l roztoku o koncentraci 0,02 $\mu$ g/ml. Výrazný rušivý pík ve 3,9 minutě. ....	51
Obrázek 24 - Chromatogram při nadávkování 20 $\mu$ l roztoku o koncentraci 0,005 $\mu$ g/ml.....	51

## SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 - Pět možných modů dávkování u PTV. (10).....	24
Tabulka 2 - Lineární rozsah (LR), limity detekce (LODs) a korelační koeficienty (r) pro vodní a půdní vzorky (32).....	32
Tabulka 3 - Výtěžnosti a relativní standardní odchylky pro pět nitrobenzenových látek ve vodných a půdních vzorcích získané SPME-GC-MS (32).....	32
Tabulka 4 - Výtěžnosti stanovení NB a DNB ve vzorcích říční vody bez a se standardním přídávkem (38) .....	35
Tabulka 5 - Lineární rozsah, opakovatelnost, limit detekce (LOD) a absolutní výtěžnost metody. (39).....	36
Tabulka 6 - Porovnání dvou druhů SPE sorbentů (39) .....	37
Tabulka 7 - Limity detekce vybraných látek stanovených pomocí PI-MS, IMS, PTR-MS a psí čuch. PI-MS - hmotnostní detekce s fotoionizací, IMS – iontová mobilní spektrometrie, PTR-MS – hmotnostní spektrometrie s protonovou ionizací, $\sigma$ – standardní odchylka šumu (40) .....	38
Tabulka 8 - Stanovení nitrobenzenu pomocí MWCNT/SPCE ve vzorcích vody (41).....	38
Tabulka 9 - Parametry nástřiku, plynového chromatografu a hmotnostního spektrometru.....	42
Tabulka 10 - Program oplachu septa.....	42
Tabulka 11 - Teplotní program nástřiku a plynového chromatografu .....	42
Tabulka 12 - Vybrané parametry jednotlivých látek pro použití SIM modu.....	43
Tabulka 13 - Složení prvotních roztoků použité pro identifikaci retenčních časů a pořadí jednotlivých látek .....	45
Tabulka 14 - Koncentrace stanovovaných látek v jednotlivých kalibračních roztocích .....	46
Tabulka 15 - Validace metody GC-MS a příklad výpočtu.....	47
Tabulka 16 – Parametry výsledné kalibrační křivky .....	47
Tabulka 17 - Výsledné hodnoty výtěžnosti .....	50

# 1. ÚVOD

Nitrosloučeniny mohou být označeny jako látky mutagenní a karcinogenní. Jejich přítomnost v životním prostředí je způsobena používáním výbušnin a trhavin během válečných konfliktů či teroristických útocích nebo také v důsledku průmyslové a zemědělské činnosti. Pro stanovení obsahu nitrosloučenin je nutné hledat vhodné analytické metody, přičemž kritickým krokem může být úprava vzorku nebo způsob dávkování.

Pro stanovení nitrosloučenin z pevných a kapalných vzorků bylo v této práci zkoumáno možné použití dávkování vzorku pomocí měniče linerů (LINEX) a následné tepelné desorpce přítomných látek. Je zkoumána správnost a výtěžnost při použití této metody. Analýza nadávkovaných a uvolněných látek se pak provádí především pomocí spojení plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS) nebo je možné použití detektoru elektronového záchytu (ECD). Je možné také použít kapalinovou chromatografii s hmotnostní detekcí (LC-MS) či s UV detektorem, infračervenou spektrometrii s Fourierovou transformací (FT-IR) nebo elektrochemické stanovení pomocí uhlíkových elektrod.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1. Příprava vzorku k analýze

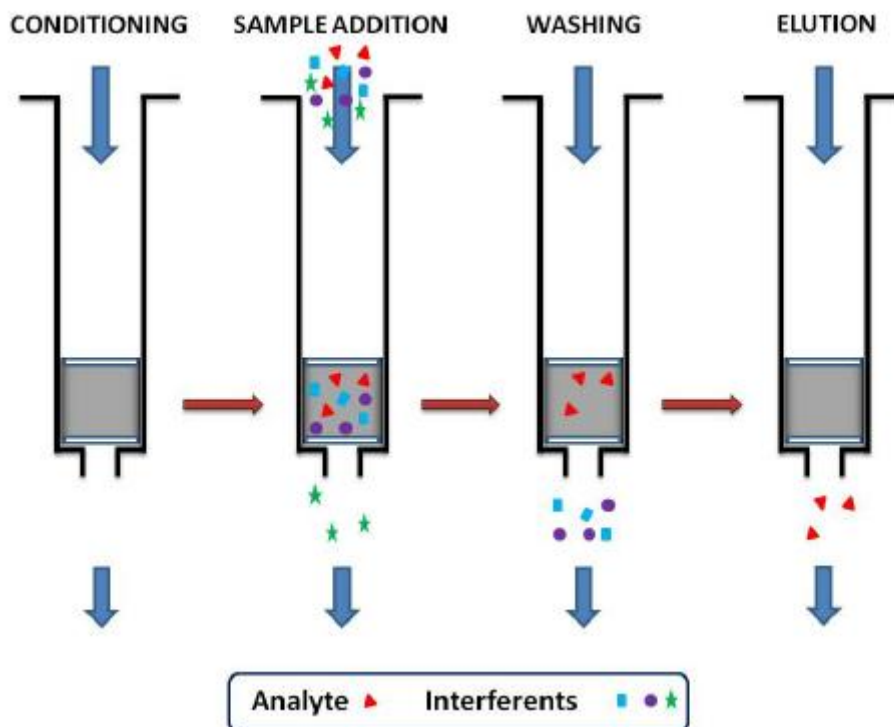
Ačkoliv moderní analytické metody jsou velmi přesné a spolehlivé, zůstává příprava vzorku klíčovým a důležitým bodem. V této práci používaná metoda plynová chromatografie se používá především pro analýzu těkavých a středně těkavých látek. Vyskytují-li se námi stanovované látky v nízkých koncentracích či v komplexních maticích, je nutné je zakonzentrovat, eventuálně izolovat. Obsahují-li vzorky nečistoty, které by zhoršovaly či přímo znemožňovaly separaci, nebo je-li koncentrace pod mezí detekce, volíme některou z extrakčních technik. Některé z nich se využívají přímo při odběru vzorku před transportem do laboratoře, jelikož vzorek zakonzervují, jiné až těsně před samotnou analytickou metodou. (1; 2)

V poslední době je snaha redukovat nebo přímo eliminovat použití škodlivých chemikálií a velké množství rozpouštědel, tedy snížit ekologickou a ekonomickou zátěž. Některé z těchto látek mohou poškozovat zdraví laboratorních pracovníků, poškozovat životní prostředí, zvyšovat dodatečné provozní náklady a náklady na likvidaci odpadů. Příprava vzorků by v ideálním případě měla být ekologicky rozumná, levná, rychlá, jednoduše použitelná a snadno kompatibilní s co největším počtem analytických přístrojů. (1)

- Extrakční techniky
  - Extrakce tuhou látkou (sorbent)
  - Extrakce kapalinou (trapping)
  - Extrakce plynem (headspace)
- Vymrazovací (kryogenní) techniky
- Metody využívající chemických reakcí

#### 2.1.1. Extrakce tuhou látkou (SPE)

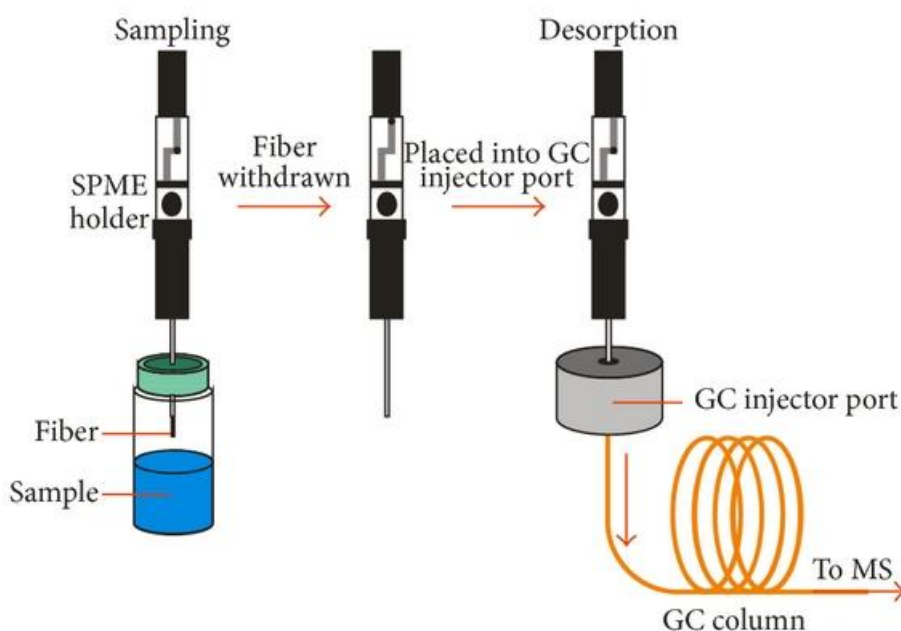
Výhodu tuhých sorbentů nalezneme v rychlém stanovení sorbované složky a v jednoduchém odběru, uchování a dopravě vzorků. Principem je zachycení molekul látky na tuhém sorbentu, přes který vzorek protéká. K zachytávání molekul na sorbentu dochází v důsledku mezimolekulových interakcí. Další výhody této metody spočívají v její snadné možnosti automatizace, univerzálnosti a návazatelnosti na další instrumentální metody. Lze využít k čištění látek, zakonzentrování stopových množství, výměně rozpouštědel či k derivatizaci.



Obrázek 1 - Schéma extrakce tuhou látkou (3)

Sorbenty se hodnotí z několika různých hledisek. Z těch základních to jsou zrnitost, specifický povrch, hydrofilní/hydrofobní charakter, polarita, tepelná stabilita, schopnost desorpce vlivem teploty nebo rozpouštědel. Nejčastěji se jedná o sorbenty na bázi chemicky modifikovaných částic silikagelu, kdy se povrchové silanolové skupiny nechají volné nebo se na ně chemicky navazují skupiny o různých vlastnostech, čímž se mění charakteristické vlastnosti sorbentu. Jako tři běžně používané interakce můžeme uvést interakce nepolární (van der Waalsovy síly), polární (vodíkové vazby a dipól-dipólové interakce) a interakce kation-aniontové (interakce elektrostatických přitažlivých sil mezi opačně nabitými ionty).

Mikroextrakce tuhou fází (SPME) je jednou z mnoha modifikací klasické extrakce tuhou fází. Nevyžaduje složitou instrumentaci ani použití organických rozpouštědel. Křemenné vlákno pokryté zakotvenou fází se ponoří do kapalného vzorku nebo do prostředí nasyceného těkavými látkami. Vlákno se nechá ponořené po přesně daný čas, aby došlo k reprodukovatelné sorpci na tuhou fází. Poté se vlákno zasune do dávkovacího zařízení obvykle plynové chromatografie, aby zde při teplotě okolo 300 °C došlo k tepelné desorpci. Uvolněné analyty vstupují na kolonu a dojde k separaci. (2)



Obrázek 2 - Schéma použití mikroextrakce pevnou fází (4)

### 2.1.2. Extrakce kapalinou

Extrakce kapalina-kapalina (LLE) je klasickou a jednou z nejstarších extrakčních technik pro přípravu vzorku k analýze. Kapalná fáze A a B musí být nemísitelné, zpravidla se jedná o vodnou fázi a organické rozpouštědlo. Analyty se rozdělí mezi vodnou a organickou fází podle Nernstova rozdělovacího zákona, kde distribuční koeficient  $K_D$  je roven poměru látek v každé fázi v rovnovážném stavu.  $K_D$  je mírou rozdílu v rozpustnosti analytu v těchto dvou fázích. Organické sloučeniny je možné snadno extrahovat přímo do vhodného rozpouštědla, zatímco anorganické sloučeniny lze extrahovat až po převedení na neutrální komplexní sloučeniny, jelikož není možné extrahovat anorganické sloučeniny ve formě iontů. Nejčastěji jsou používána rozpouštědla, která mají vysokou extrakční kapacitu, nízkou teplotu varu a

nízkou polaritu. Konkrétně to mohou být n-hexan, toluen, chloroform, methanol, acetonitril atd. Tato metoda má i několik podstatných nevýhod. Problematická může být volba rozpouštědla, tak aby bylo nemísitelné se vzorkem. Následně bývá častá velká spotřeba organického rozpouštědla, následkem čehož bývají látky zbytečně moc zředěny. Komplikovaná bývá také extrakce polárních a iontových sloučenin z vodných roztoků. (5)

### 2.1.3. Extrakce plynem

Headspace (HS) analýza označuje metodu založenou na extrakci analytu plynnou fází. Principem je analýza těkavých složek v plynné fázi, která je v kontaktu s kapalnou fází, popřípadě tuhou fází. Poměr koncentrace těkavého analytu v plynné fázi a koncentrace v kapalně fázi bývá zpravidla v rovnováze. Jedná se tedy o nepřímou metodu, kdy koncentraci analytu v kapalně fázi určujeme analýzou vzorku z plynné fáze. Pro účely kvalitativní analýzy se jedná o bezproblémovou metodu, v případě kvantitativní analýzy je zapotřebí brát v potaz celkové vlastnosti analyzovaného systému, zejména ty, co charakterizují systém plyn-kapalina (popř.: plyn-tuhá látka). Tato technika se dělí na dva hlavní druhy v závislosti na způsobu odběru plynné fáze: statická a dynamická.

Při statické headspace analýze je plynná fáze odebírána z uzavřeného systému, v kterém je koncentrace analytu v plynné a kapalně fázi v rovnováze. Samotný odběr vzorku do jisté míry porušuje rovnováhu systému. Míra ovlivnění rovnováhy je závislá na způsobu odběru a odebraném množství.

Během dynamické headspace analýzy (také označována jako „purge and trap“) nedochází k ustálení rovnováhy mezi kapalnou a plynnou fází. Namísto toho probublává proud inertního plynu kapalnou fází, čímž poskytuje koncentrační gradient, který napomáhá úplné extrakci analyzované látky. (6)

## 2.2. Nástřikové techniky

Dalším klíčovým bodem celé analýzy je způsob dávkování vzorku do plynového chromatografu. Hlavním cílem nástřikového systému je přenést vzorek do chromatografické kolony rychlým a kvantitativně reprodukovatelným způsobem. V ideálním případě by měly být splněny následující podmínky: vzorek musí do kolony vstoupit jako co nejužší pás; relativní zastoupení látek ve vzorku před nástřikem by mělo zůstat zachované i po nástřiku; během přenosu na kolonu by spolu jednotlivé látky ve vzorku neměly reagovat, zároveň by nemělo docházet k jejich chemickým změnám (izomerizaci, hydrolýze, polymerizaci apod.) ani adsorpci na komponenty nástřikového systému. Nástřik vzorku by měl být přesný (precise), správný (accurate), reprodukovatelný, předpověditelný, kvantitativní a bez jakékoliv diskriminace některé látky. Nástřikové techniky můžeme dělit do dvou skupin, bleskově odpařující (vaporization injection) a chladné (cold injection).

- Bleskově odpařující
  - Split
  - Splitless
  - On-Column
- Chladné
  - Nástřik velkých objemů (LVI, large volume injection)
  - Cold On-Column
  - Cold On Column – s výstupem par rozpouštědla (SVE, solvent vapor exit)
  - Teplotně programovaný nástřik (PTV, programmed temperature vaporization)

### 2.2.1. Split/Splitless nástřikový port

Pro koncentrované a neznámé vzorky je vhodné použití splitovacího modu. Vzorek je odpařen do proudu nosného plynu a jen část směsi vzorku a nosného plynu putuje na kolonu. Zbytek, v závislosti na splitovacím poměru, je odváděn mimo kolonu. Obvyklé rozpětí splitovacích poměrů je od 10:1 až po 100:1 a standardně dávkované množství vzorku se pohybuje od 1 po 2  $\mu\text{l}$ , ale je možné dávkovat i objemy od 3 do 5  $\mu\text{l}$ . (7)

Analyzujeme-li vzorky se stopovou koncentrací, může být výhodné použití splitless modu. V tomto případě je splitovací ventil uzavřen a celý objem vzorku je tak veden na kolonu. Splitless mód je nastaven po specifickou dobu (například jedné minuty), poté se splitovací ventil otevře, aby došlo k vyčištění nástřikového portu od rozpouštědla a neodpařených sloučenin. Teplota varu rozpouštědla by nejlépe měla být o 20 °C nižší než látka, která má ve

vzorku nejnižší bod varu. Vzhledem k tomu, že vzorek stráví ve vyhřátém nástřikovém prostoru delší dobu než u splitovacího modu, je zde větší pravděpodobnost tepelného rozkladu a/nebo izomerizace některých sloučenin ve vzorku. (7)

### 2.2.2. On-Column

V tomto případě je vzorek nadávkován přímo na kolonu použitím velmi úzké injekční jehly. Používáme-li kolony s větším průměrem, je samozřejmě dávkování snazší, ale moderní plynové chromatografy jsou schopny velice přesně kontrolovat proces dávkování, včetně automatické kontroly vyhřívání a chlazení. Tato technika dává dobré kvantitativní výsledky a je obzvláště výhodná při analýze látek s širokým rozmezím teplot varu, vysoko vroucích látek a tepelně labilních látek. (7)

### 2.2.3. Nástřik s programově řízenou teplotou (PTV)

PTV bylo původně vyvinuto pro nástřik velkých objemů (LVI) u kapilární GC. V současné době se jedná o nejuniverzálnější dostupnou a velmi flexibilní nástřikovou techniku vůbec, která umožňuje nástřik několika způsoby bez nutnosti konstrukčních změn. Dovoluje teplou i studenou split/splitless metodu nástřiku, nástřik velkých objemů (LVI), termální desorpce, termální extrakce a další možnosti už jen spíše pro představu: pyrolýza do 600 °C, derivatizace během nástřiku (inlet derivatization) a nástřik vzorku s neodpařitelnou maticí (DMI). Kombinací kroku chladného nástřiku vzorku a kontrolovaného odpaření lze eliminovat mnoho důležitých nevýhod spojených s běžnými nástřikovými technikami. Krok chladného nástřiku eliminuje diskriminaci jehlou a minimalizuje diskriminaci různých složek vzorku nástřikem, jelikož vzorek je nadávkován v kapalném stavu. Dále se snižuje možnost tepelné degradace vzorku. Při výběru nástřikového modu u PTV je nejprve nutné určit jaká má být teplota při samotném nástřiku vzorku, tedy teplota v okamžiku, kdy je jehla vsunuta do nástřikového portu. Dále je nutné vybrat, zda je odstraňování rozpouštědla z nástřikového prostoru (solvent vent injection) důležitější než přenos komponent na kolonu. A v poslední řadě je zapotřebí rozhodnout, jestli má být vzorek přenesen na kolonu ve splitovacím modu nebo splitless modu. Tím získáváme na výběr celkem 5 možných modů dávkování, které jsou popsány v tabulce 1. (8; 9)

Tabulka 1 - Pět možných modů dávkování u PTV. (10)

Vyhřáté split dávkování:	Splitovací ventil je nepřetržitě otevřen, vzorek je nadávkován do vyhřátého dávkovacího prostoru. Jedná se o analogii konvenčního split dávkování.
Studené split dávkování:	Splitovací ventil je nepřetržitě otevřen, vzorek je nadávkován do chladného lineru, který je ihned po nadávkování vyhřát.
Vyhřáté splitless dávkování:	Dávkovací prostor je během dávkování vzorku již vyhřátý. Splitovací ventil je zpočátku uzavřen a po uplynutí daného času se otevře. Jedná se o klasické konvenční splitless dávkování.
Studené splitless dávkování:	Splitovací ventil je zpočátku uzavřený a vzorek je nadávkován do chladného lineru. Dávkovací prostor je vyhřát okamžitě po nadávkování vzorku a splitovací ventil je opět otevřen po uplynutí daného času.
Studené splitless dávkování s odstraňováním rozpouštědla:	Splitovací ventil je od začátku otevřen a vzorek je nadávkován do chladného lineru. Než se dávkovací prostor vyhřeje, je rozpouštědlo ventilováno za nižší teploty. Jakmile je rozpouštědlo odstraněno, splitovací ventil se uzavře a dojde k vyhřátí.

Největší výhodou studeného dávkování je absence diskriminace způsobené na základě rozdílných bodů varu. Vzorek je nadávkován do lineru v kapalném stavu, aniž by byl okamžitě odpařen. Jakmile je nástřík vyhřát, dojde k odpaření složek a jejich následnému transportu z lineru na kolonu. Jelikož proces odpaření probíhá řízeným a kontrolovaným způsobem, je opakovatelnost a správnost v porovnání s ostatními nástříkovými technikami lepší. Navíc relativně pomalé zahřátí složek vzorku snižuje tepelný stres působící na molekuly vzorku. To v obecné rovině znamená snížení tepelné degradace ve srovnání s odpovídající technikou teplého nástříku. Vyhřátý splitovací mód a vyhřátý splitless mód jsou prakticky srovnatelné s konvenčními split/splitless nástříkovými technikami, který jsou již diskutovány výše (viz. kapitola 2.2.1). Zbylé tři jsou unikátní pouze pro PTV. (10)

### 2.2.3.1. Studený split nástřík

Kapalný vzorek je nadávkován přímo do nevyhřátého lineru, jehož teplota je pod bodem varu rozpouštědla. Jelikož není liner vyhřátý, je předem zamezeno selektivnímu odpařování z jehly, což znamená zamezení diskriminace některých sloučenin ve vzorku. Navíc tento způsob nástříku umožňuje nadávkování známého množství kapalného vzorku s větší správností. V případě okamžitě odpařujících technik je toto prakticky nemožné, protože skutečně dávkovaný objem kapaliny je obecně větší, než kolik požadujeme. Příčinou je, že dochází k odpaření i části vzorku, který jinak zůstává v jehle. U této techniky je nástříkový port ohřát na požadovanou teplotu až poté, co jehla stříkačky opustí nástříkový prostor. Konečná teplota by měla být dostatečně vysoká na to, aby došlo k transportu i látek s vyšším bodem varu. Funkce splitovacího módu u této techniky je totožná jako u vyhřátého split nástříku.

### 2.2.3.2. Studený splitless nástřík

Obdobně jako je tomu u vyhřátého splitless nástříku, tak i u této techniky zůstává splitovací ventil uzavřen po celou dobu, co je vzorek dávkován na liner. Rozdílem je, že liner není v době nástříku vyhřátý. Jak jehla opustí nástříkový prostor dojde k zahřátí na požadovanou teplotu a vzorek je veden na kolonu. Teplota kolony by měla být zhruba 10 °C až 20 °C nižší, než je teplota varu rozpouštědla, aby se na vstupní části kolony utvořil film opět zkondenzované kapaliny. V tomto filmu kapaliny jsou zakoncentrovány více těkavé složky vzorku. Jakmile uplyne požadovaná doba, během níž by měly být všechny složky vzorku převedeny na kolonu, splitovací ventil se otevře, aby došlo k odstranění zbytkových stopových množství rozpouštědla z lineru. Proces optimalizace času, kdy je splitovací ventil otevřen, je totožný jako u konvenčních splitless nástříků.

### 2.2.3.3. Studený splitless nástřík s odstraňováním rozpouštědla

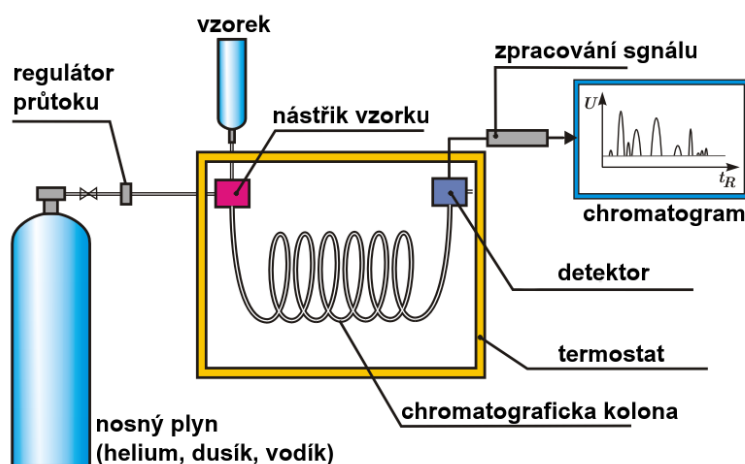
V této technice dochází k selektivnímu odstraňování rozpouštědla z PTV lineru ještě předtím, než je vzorek převeden na kolonu. Podmínky jsou nastaveny tak, aby všechny složky vzorku zůstaly v lineru a zároveň aby byly páry rozpouštědla odváděny pryč splitovacím ventilem. Na konci tohoto procesu je ventil uzavřen a začne ohřívání nástříku. Tato technika má několik zajímavých oblastí aplikace. Je vhodná pro nástřík velkých objemů, kde pomáhá snižovat detekční limity. Může být použita pro odstranění malého množství rozpouštědla než je vzorek převeden na kolonu. Odstranění rozpouštědla může být výhodou v případě, kdy není kompatibilní s detektorem.

## 2.3. Vhodné analytické metody

Konečným cílem přípravy vzorku by měla být izolace a přečištění analytu a jeho následné nadávkování do separačního systému. Tím může být plynová chromatografie (GC), kapalinová chromatografie (LC) či kapilární elektroforéza (CE). Stanovujeme-li těkavé látky, je vhodnou volbou spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). (11)

### 2.3.1. Plynová chromatografie

Analyzovaný vzorek může být kapalina či molekuly naadsorbované na povrchu tuhé látky (SPME). Během dávkování do GC systému je vzorek odpařen bleskovým nanesením do zóny temperované při vysoké teplotě (200-300 °C) a současně vmíchán do proudu nosného plynu (He, Ar, N<sub>2</sub> nebo H<sub>2</sub>). Výsledná plynná směs vstupuje do separační části, tj. chromatografické kolony, což je křemenná kapilára zvnějšku potažená polyamidovým povlakem a uvnitř potažená tenkým polymerním filmem. Během průchodu kolonou se molekuly analytu rozdělují mezi proudem nosného plynu (mobilní fází) a polymerním filmem (stacionární fází) takovým způsobem, který závisí především na jejich chemické struktuře. Na konci této separační části dosáhnou rozseparované molekuly do detekčního systému, ve kterém specifická fyzikální vlastnost (tepelně vodivostní detektor – TCD) nebo fyzicko-chemický proces (plamenový ionizační detektor – FID, detektor elektronového záchytu – ECD) dává vzniknout elektrickému signálu, který je úměrný množství molekul stejné identity. Datový systém zpracovává vzniklý elektrický signál a vytváří graf závislosti elektrického signálu na čase (chromatogram). (12)

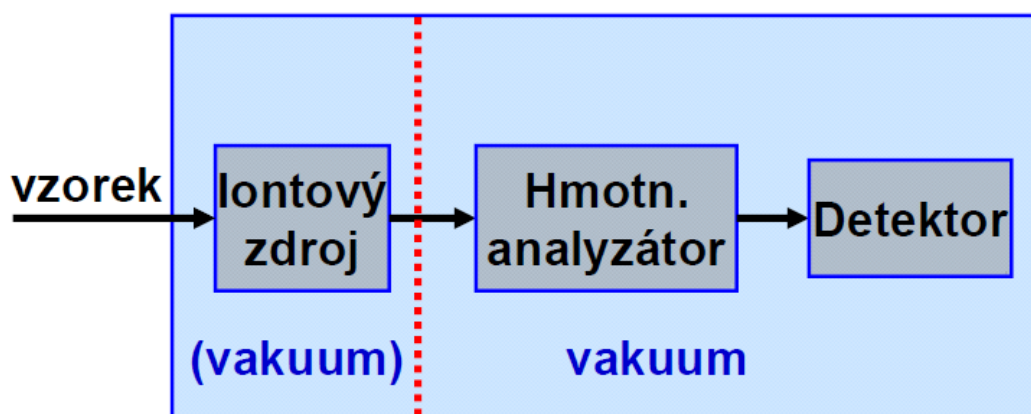


Obrázek 3 - Schéma konstrukce plynového chromatografu (13)

Takto můžeme rozdělit plynový chromatograf na čtyři důležité části, viz obr. 3: dávkování vzorku (nástřikový port), separace (chromatografická kolona), detekce a zpracování dat.

Každá část má svou charakteristickou funkci a podíl na kvalitě analýzy a získaných výsledků. O části nástřiku vzorku je již psáno v kapitole 2.2. Hlavním a nezbytným požadavkem je dostatečná těkavost analytu tak, aby byl v mobilní fázi přítomen v detekovatelném množství. Látky s nízkým tlakem par nebudou vstupovat na kolonu a budou zůstat a hromadit se v nástřikovém portu, který mohou eventuálně i ucpat. Velmi polární, termolabilní, iontové a látky s vysokou molekulární hmotností nejsou kompatibilní s běžnou plynovou chromatografií. V závislosti na molekulární struktuře analytu a dostupných funkčních skupinách je v určitých případech možné analyt chemicky derivatizovat a získat tak látku s vyšším tlakem par, čímž je také vhodnější pro GC analýzu. (12)

### 2.3.2. Hmotnostní spektrometrie



Obrázek 4 - Schéma hmotnostního spektrometru (14)

Hmotnostní spektrometr (MS) se obvykle skládá z několika částí: vstupu, iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru, detektoru, vakuového systému, zesilovače a záznamového zařízení, viz obr. 4. Vstupem zavádíme vzorek do MS. Nástříknutý vzorek se zde bleskově vypaří při tlaku jen několika pascalů, pára je pak vedena malým otvorem do iontového zdroje. Málo těkavé látky se do něj mohou nástřikovat přímo. V iontovém zdroji dochází k ionizaci molekul vzorku, tzn. že jsou molekulám odštěpeny valenční elektrony. Dělí se na tvrdé a měkké ionizační techniky, přičemž při spojení s GC/MS jsou významnější tvrdé ionizační techniky. Elektronová ionizace (EI) patří mezi tvrdé ionizační techniky a jedná se o první a nejvýznamnější způsob ionizace. Chemická ionizace (pozitivní PCI, negativní NCI) má obdobné konstrukční uspořádání jako EI, navíc do iontového zdroje přivádí reakční plyn, nejčastěji metan nebo isobutan, který je pak primárně ionizován a až následně dochází k ionizaci molekul vzorku. V hmotnostním analyzátoru iontů dochází k dělení vytvořených iontů podle jejich efektivní hmotnosti  $m/z$ . Většina iontů nese jeden elementární náboj; proto

Ize také říci, že jsou ionty děleny podle jejich hmotnosti. V úvahu připadají několik typů hmotnostních analyzátorů: sektorový (probíhá v magnetickém poli), kvadrupólový (využívá vysokofrekvenční pole), průletový (měří dobu letu iontu mezi iontovým zdrojem a detektorem) iontová past či orbitrap. Kvadrupólový analyzátor je zkonstruován z 4 tyčí kruhové průřezu, jež jsou symetricky uspořádány podélně k ose. Každá protilehlá dvojice je napojena na stejný potenciál. Ionty putují elektrickým polem, které se skládá ze statické složky a radiofrekvenční. Ionty během svého průchodu oscilují mezi elektrodami s opačnou polaritou a pouze určité ionty dosáhnou stabilních oscilací, zatímco u ostatních iontů s jinou hmotností amplituda oscilací nadále roste až dojde k zachycení na tyčích kvadrupólu. Rozseparované ionty dopadají na detektor se zesilovačem a záznamovým zařízením. Jako zesilovač se většinou používá elektronový (iontový) násobič. Záznamové zařízení musí být dostatečně rychlé, proto se výhradně používá zpracování počítačem. Vakuový systém musí dosáhnout snížení tlaku na  $10^{-5}$  Pa v hmotnostním spektrometru. Musí se odčerpát přicházející nosný plyn, může se používat diferenciální čerpání, kdy se používají pro iontový zdroj a separátor dva nezávislé vakuové systémy. (1)

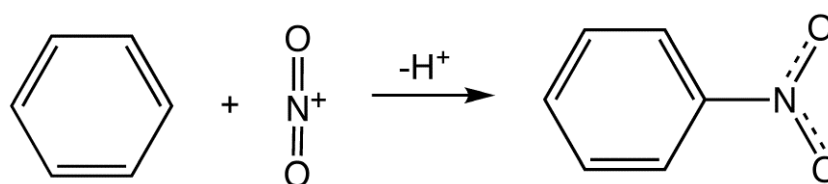
### 2.3.3. Spojení GC-MS

V současnosti je přímá kombinace chromatografických a spektrálních metod jednou z nejučinnějších metod identifikace a strukturní analýzy složitých organických vzorků po jejich předchozí separaci i ve stopové koncentraci. Citlivost je dále možné zlepšit monitorováním vybraných iontů charakteristických pro sledované látky (SIM, Selective Ion Monitoring). Nejčastější způsob ionizace vzorků je pomocí elektronové nebo chemické ionizace. Pro spojení GC-MS se nejčastěji používá kvadrupólový hmotnostní analyzátor, jelikož oproti sektorovému analyzátoru rychleji snímá spektra, má nižší požadavky na vakuum a je podstatně levnější. Je možné použít i ostatní hmotnostní analyzátory (iontová past, cyklotronová rezonance iontů). Takřka výhradně se používají kapilární kolony, kde je jako nosný plyn použito helium. Průtok bývá zpravidla 1-2 ml/min a eluát je přímo veden do iontového zdroje. Helium je pro použití výhodné z důvodů jeho snadného odčerpávání z iontového zdroje vakuovými pumpami, kvůli své nízké atomové hmotnosti nevádí jeho zbytkové koncentrace při interpretaci spekter, v poslední řadě také kvůli svému vyššímu ionizačnímu potenciálu (21 eV oproti běžně používaným organickým sloučeninám 7-16 eV), kdy se přímo účastní ionizace molekul. (15)

## 2.4. Nitrosloučeniny

### 2.4.1. Obecná charakteristika

Nitrosloučeniny patří mezi organické látky. Obsahují jednu nebo více funkčních skupin nitro- ( $-\text{NO}_2$ ), které jsou navázané na alifatický nebo aromatický skelet. Nitrosloučeniny jsou pro své vlastnosti často průmyslově vyráběny jako výbušniny nebo jako součásti výbušných směsí, dále jako rozpouštědla či jako meziprodukty určené pro výrobu dalších sloučenin. Ve většině případů jsou vyráběny nitrační reakcí pomocí nitrační směsi (tj. koncentrovaná kyselina dusičná a kyselina sírová), viz obr. 5: (16; 17)



Obrázek 5 - Reakční schéma nitrace benzenu (18)

Nitroskupina obecně má charakter polární. Jedná se o látky s malou těkavostí a jsou poměrně málo rozpustné ve vodě. Alifatické nitro sloučeniny jsou zpravidla bezbarvé nebo jen slabě nažloutlé a neposkytují žádný zápach. Aromatické nitro sloučeniny mají obecně nažloutlé zbarvení, poskytují zápach po hořkých mandlích a bývají jedovaté. Nitrosloučeniny jsou charakteristické svými silnými polárními efekty ( $-I$  a  $-M$ ) ovlivňující celou molekulu a její reaktivitu. Obsahuje-li látka více nitroskupin, roste i její reaktivita, což v konečném důsledku znamená nárůst jejich výbušnosti. Poslední dobou přitahují nitrosloučeniny mnoho pozornosti obzvláště kvůli národní bezpečnosti a ochraně lidského zdraví. Aromatické nitrosloučeniny mohou působit jako mutageny a karcinogeny, vzhledem k jejich toxickým vlastnostem. Jejich široká aplikace v armádě a vojenském průmyslu způsobuje znečištění životního prostředí. Navíc narůstající počet teroristických útoků a s nimi spojené bezpečnostní kontroly na klíčových místech (hromadná doprava, státní instituce apod.) má za následek zvýšený zájem o detekci nitrosloučenin a vyvinutí citlivých a rychlých metod pro jejich stanovení. (19)

### 2.4.2. Významné nitrosloučeniny

Mezi běžné a časté složky průmyslových trhavin patří 2,4,6-trinitrotoluen (TNT), 2,4-dinitrotoluen (2,4-DNT), 1,3,5-trinitro-1,3,5-triazacyklohexan (RDX), kyselina pikrová a trinitro-hexylmethylnitramin (tetryl). V této práci jsou sledovány především tyto látky

nitrobenzen (NB), 2-nitrotoluen (2-NT), 3-nitrotoluen (3-NT), 4-nitrotoluen (4-NT), 1,3-dinitrobenzen (1,3-DNB), 2,4-dinitrotoluen (2,4-DNT) a 2,6-dinitrotoluen (2,6-DNT) (20).

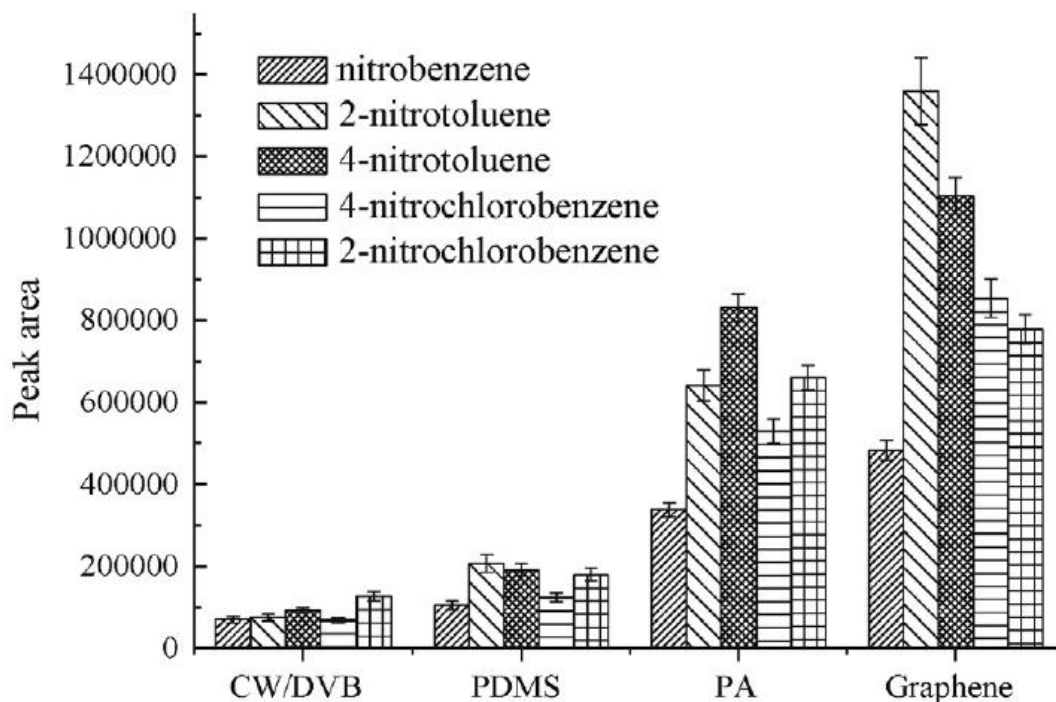
Nitrobenzen (NB) má molární hmotnost 123,1 g/mol, jedná se světle žlutou kapalinu, která poskytuje zápach po hořkých mandlích. Je rozpustná ve většině organických rozpouštědel a mísitelná s benzenem, naproti tomu ve vodě se rozpouští jen nepatrně (0,19 % při 20 °C). Jelikož dobře rozpouští chlorid hlinitý používá se při Friedl-Craftsově reakci. Průmyslové využití je zejména jako meziprojektu pro výrobu anilinu (až 95 % vyrobeného nitrobenzenu). Další neméně důležité využití je jako rozpouštědlo při specifických chemických reakcích. Jedná se o látku velmi toxickou, která může způsobit akutní otravu, jelikož je okamžitě vstřebávána kůží i dýchacími cestami. 1,3-dinitrobenzen (1,3-DNB) z ethanolu krystalizuje ve formě světle žlutých plátků, má molární hmotnost 168,1 g/mol. Používá se k výrobě m-fenylendiaminu, v menším množství pak k výrobě 3-nitroanilinu. 1,3-DNB a jeho izomery jsou látky vysoce toxické inhalací či kožním vstřebáváním. Dlouhodobá expozice může vést k akumulaci malých množství v tukových tkáních. (21)

Mononitrotolueny mají molární hmotnost 137,1 g/mol, jsou rozpustné ve většině organických látek a jen minimálně rozpustné ve vodě. Většinou se používají ve formě derivátů pro výrobu diazo meziprojektů, z kterých se dále vyrábí azobarviva. 2-nitrotoluen je čirá žlutá kapalina, krystalizující při nižších teplotách. 3-nitrotoluen (3-NT) je při okolní teplotě žlutá kapalina. 4-nitrotoluen (4-NT) je lehce nažloutlá až bezbarvá krystalická látka. Dinitrotolueny mají molární hmotnost 182,1 g/mol, krystalizují z ethanolu ve formě žlutých jehliček a ve vodě jsou opět jen minimálně rozpustné. Většina 2,4-dinitrotolunu se používá při výrobě polyuretanů. Menší část se využívá pak při výrobě výbušnin a pro další nitraci na TNT. Surová směs 2,4- a 2,6-dinitrotoluenů se také používá pro výrobu směsi diaminů (80 : 20 nebo 67 : 33, v závislosti na použitém nitračním procesu), které se využívají při výrobě polyuretanů. Použití směsi izomerů je výrazně levnější. Toxicita mononitrotoluenů je obdobná jako v případě nitrobenzenů. Jsou vstřebávány kůží a dýchacími cestami. S rostoucím počtem nitro skupin, roste i jejich toxicita. (21) EPA (Environmental Protection Agency) klasifikovala DNT jako skupinu B2, tedy jako látku s potenciálními karcinogenními účinky na lidi. Jsou také toxické pro běžné mikroorganismy, některé metabolity dinitrotoluenů vykazují vyšší toxicitu než původní látka a v životním prostředí setrvávají dlouhou dobu. (22)

### 2.4.3. Způsoby stanovení

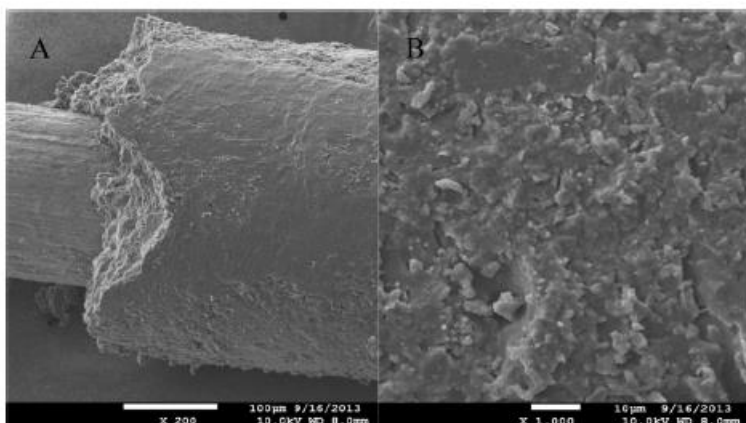
#### 2.4.3.1. Použití plynové chromatografie

V kombinaci s plynovou chromatografií lze využít termodesorpci v nástřiku (23; 24; 25) nebo extrakci na tuhé fázi (26; 27), popřípadě její miniaturizovanou podobu (28; 29; 30; 31). V práci Zhang a jeho kolektivu (32) byl vyvíjen grafenový materiál pro použití jako povlak při headspace mikroextrakci tuhými fázemi. Bylo stanovováno pět vybraných látek: nitrobenzen, 2-nitrotoluen, 4-nitrotoluen, 2-nitrochlorobenzen a 4-nitrochlorobenzen. Účinnost extrakce tohoto povlaku porovnali s komerčně dostupnými vlákny (PDMS 100  $\mu\text{m}$ , CW/DVB 70  $\mu\text{m}$ , PA 85  $\mu\text{m}$ ), viz obr. 6.



Obrázek 6 - Srovnání účinnosti extrakce s komerčně dostupnými vlákny (32)

Snímky ze SEM (skenující elektronový mikroskop) s nižším zvětšením ukazuje, že tloušťka vrstvy je přibližně 50  $\mu\text{m}$ , viz obrázek 4 A. Při vyšším zvětšení je možné pozorovat pórovitou a vrásčitou strukturu povrchu (obrázek 4 B), což podstatně zvětšuje velikost povrchu a zlepšuje účinnost extrakce. Optimalizovány byly tyto parametry: teplota a trvání extrakce, koncentrace soli, intenzita míchání, objem headspace a doba desorpce. Optimalizovaná metoda byla následně validována a použita při stanovení pěti nitrobenzenových látek v modelových i reálných vodních a půdních vzorcích, viz tabulka 2.



Obrázek 7 - Záznam ze skenujícího elektronového mikroskopu zobrazující grafenový povlak vlákna. (A) 200x zvětšení, (B) 1000x zvětšení (32)

Tabulka 2 - Lineární rozsah (LR), limity detekce (LODs) a korelační koeficienty (r) pro vodní a půdní vzorky (32)

Compound	Water samples			Soil samples			RSD (%)	
	LR (µg/L)	LOD (µg/L)	r	LR (µg/kg)	LOD (µg/kg)	r	RSD <sup>a</sup>	RSD <sup>b</sup>
Nitrobenzene	0.02–15.0	0.0025	0.9985	0.2–60.0	0.02	0.9976	4.5	9.8
2-Nitrotoluene	0.02–15.0	0.005	0.9982	0.2–60.0	0.04	0.9984	6.9	8.1
4-Nitrotoluene	0.02–15.0	0.005	0.9987	0.2–60.0	0.02	0.9968	4.3	6.9
4-Nitrochlorobenzene	0.02–15.0	0.005	0.9980	0.2–60.0	0.04	0.9972	5.2	7.3
2-Nitrochlorobenzene	0.02–15.0	0.005	0.9976	0.2–60.0	0.04	0.9966	7.1	10.5

<sup>a</sup> RSD of one fiber (n=5).

<sup>b</sup> RSD of fiber-to-fiber (n=3).

Výtěžnost byla použita k určení správnosti této metody. Výtěžnosti (viz. tabulka 3) pro pět stanovovaných nitrobenzenových sloučenin se pohybují od 72 % do 113,2 % s relativní směrodatnou odchylkou meší než 12,1 %, což demonstuje přijatelnou přesnost i správnost metody. (32)

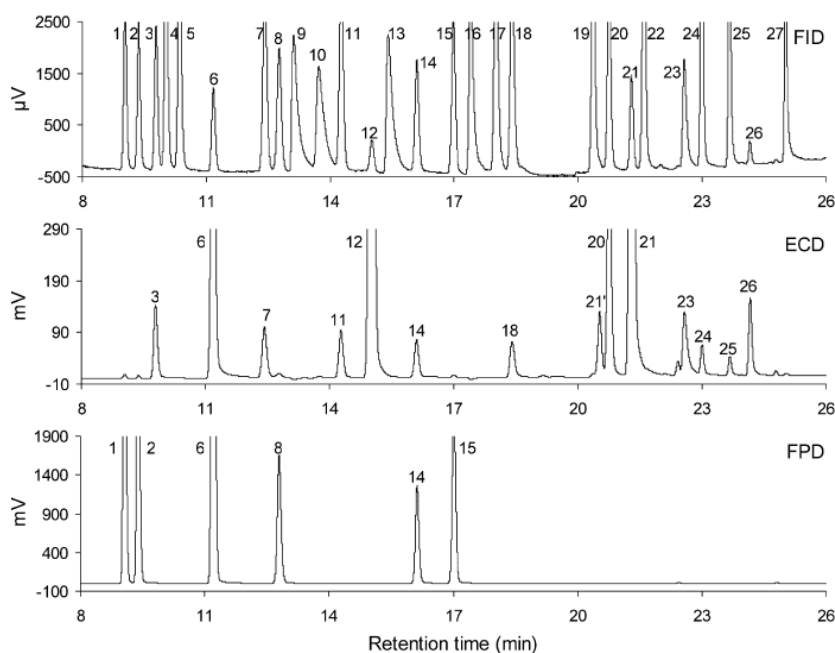
Tabulka 3 - Výtěžnosti a relativní standardní odchylky pro pět nitrobenzenových látek ve vodních a půdních vzorcích získané SPME-GC-MS (32)

Compound	Spiked (µg/L)	Recovery ± RSD (%)		Spiked (µg/kg)	Recovery ± RSD (%)	
		Lake water	River water		Farm soil	Campus soil
Nitrobenzene	0.0	nd	nd	0.0		nd
	0.5	96.0 ± 7.3	102.0 ± 5.5	2.0	87.0 ± 8.4	90.0 ± 5.4
	5.0	94.4 ± 8.7	86.1 ± 6.9	20.0	97.2 ± 9.7	86.0 ± 6.5
2-Nitrotoluene	0.0	nd	nd	0.0	nd	nd
	0.5	78.0 ± 6.1	90.3 ± 9.9	2.0	108.0 ± 11.1	105.0 ± 6.0
	5.0	86.2 ± 7.7	98.2 ± 8.4	20.0	92.2 ± 5.7	86.7 ± 7.4
4-Nitrotoluene	0.0	nd	nd	0.0	nd	nd
	0.5	94.0 ± 9.2	88.0 ± 12.1	2.0	95.0 ± 7.2	85.0 ± 10.1
	5.0	93.4 ± 5.2	101.6 ± 6.4	20.0	87.5 ± 4.1	101.8 ± 6.8
4-Nitrochlorobenzene	0.0	nd	nd	0.0	nd	nd
	0.5	88.2 ± 10.5	108.0 ± 5.9	2.0	79.8 ± 6.7	85.0 ± 7.8
	5.0	113.4 ± 6.8	86.8 ± 4.6	20.0	113.1 ± 7.7	92.3 ± 8.2
2-Nitrochlorobenzene	0.0	nd	nd	0.0	nd	nd
	0.5	74.0 ± 3.9	90.0 ± 8.6	2.0	72.0 ± 4.7	90.0 ± 4.6
	5.0	84.4 ± 4.6	92.4 ± 5.5	20.0	89.7 ± 7.6	97.8 ± 5.9

nd: not detected.

V práci Yu a kolektivu (33) optimalizují vylepšený sorbent na bázi 101W při extrakci 27 těžkých organických látek s vysokým bodem varu (HVOC). Analýza je provedena metodou

velkoobjemovým nástřikem (LVI) do plynového chromatografu se simultánní detekcí třemi paralelními detektory: plamenovým ionizačním detektorem (FID), detektorem elektronového záchytu (ECD) a plamenovým fotometrickým detektorem (FPD). Toho bylo dosaženo pomocí čtyřcestného děliče toku z nerezové deaktivované oceli. Na obrázku 8 můžeme vidět tři chromatogramy 27 vysokovroucích těkavých organických látek detekovaných paralelně FID, ECD a FPD.

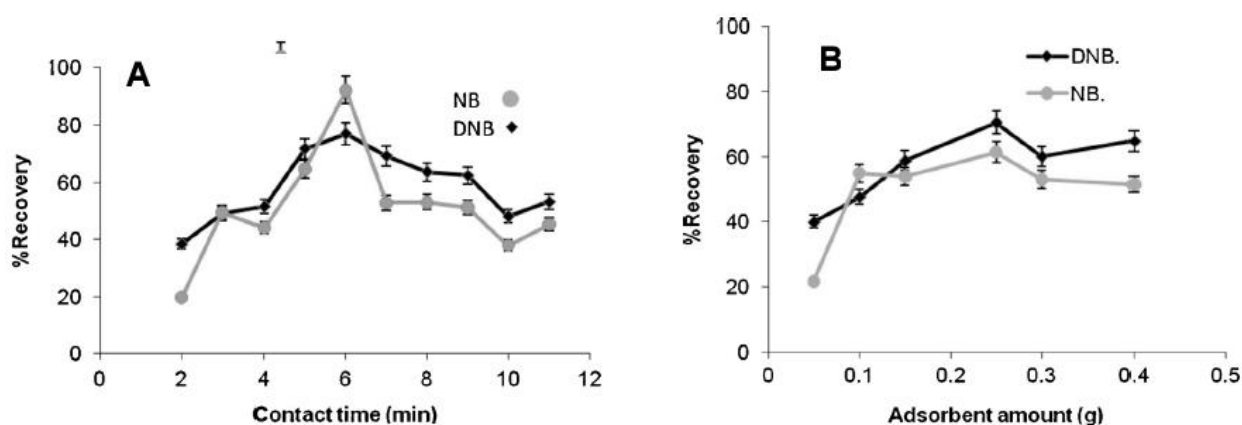


Obrázek 8 - Chromatogram 27 vysokovroucích těkavých organických látek paralelně detekovaných FID, ECD a FPD při koncentraci  $100 \mu\text{l/l}$ . Pro nás zajímavé látky: nitrobenzen (18), 3-nitrotoluen (24) a 4-nitrotoluen (25). (33)

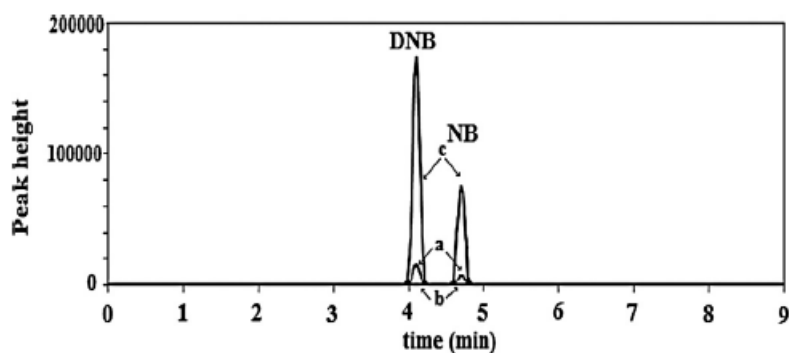
Zkoumaný kompozitní sorbent 101W&LiCl byl vytvořen smícháním sorbentu 101W jako nosiče a soli LiCl. Sorbent 101W nabízí dobrou fyzickou a chemickou stabilitu během opakovaných nástřiků vzorku a následných ohřevů na vyšší teploty během LVI. Dále má relativně velké póry, které dovolují snazší vstup sušidla LiCl. Jedná se o typ sušidla s velmi vysokou absorpční kapacitou pro vodu a může být jednoduše regenerovatelná zahřátím. Výsledný 101W&LiCl má oproti samotnému 101W desorpční křivky pravidelnější, hladší a ostřejší. Tato metoda se ukázala být schopnou měřit koncentrace v řádech jednotek  $\mu\text{g/l}$  s dobrou přesností, správností, dlouhodobou spolehlivostí a s přijatelnými paměťovými efekty. (33)

### 2.4.3.2. Použití kapalinové chromatografie

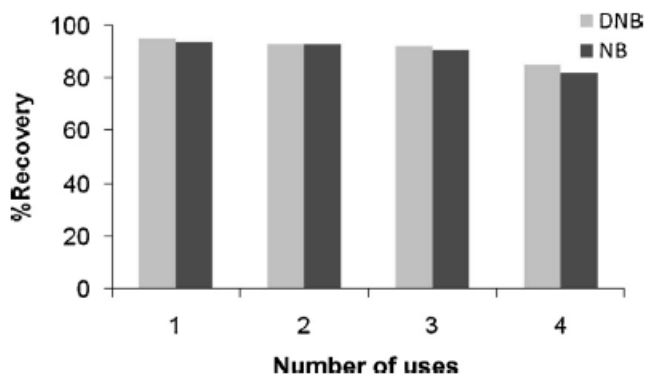
Kapalinovou chromatografi lze kombinovat s extrakcí (34) i mikroextrakci tuhou fází (35; 36; 37) Pro stanovení nitrobenzenu a 1,3-dinitrobenzenu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) s UV detektorem použil Parham a Saeed (38) ve své práci jako zakoncentrovávací prvek adsorpci na antracit. Antracit je tvrdý a kompaktní druh černého uhlí s vysokým obsahem uhlíku, menším podílem zastoupení nečistot. Pro zvýšení účinnosti adsorpce a předejití extrakci organických látek z matrice antracitu byl jednu hodinu povařen v čisté vodě a následně sušen při 200 °C po dobu 6 hodin. Bylo sledováno několik parametrů, které měly vliv na výslednou účinnost extrakce: pH, doba styku s antracitem (viz. obr. 9 A), množství antracitu (viz. obr. 9 B), způsob desorpce (viz. obr. 10), efekt iontové síly, efekt dalších přítomných látek a možnost opakovaného použití (viz. obr. 11).



Obrázek 9 - Efekt doby styku s antracitem (A) a efekt množství antracitu (B) na výtěžnost nitrobenzenu (NB) a 1,3-dinitrobenzenu (DNB) (38)



Obrázek 10 - Chromatogram NB a DNB z výchozího roztoku před extrakcí (a), z výchozího roztoku po extrakci (b) a po desorpci sorbentu acetonitrilem (c) (38)



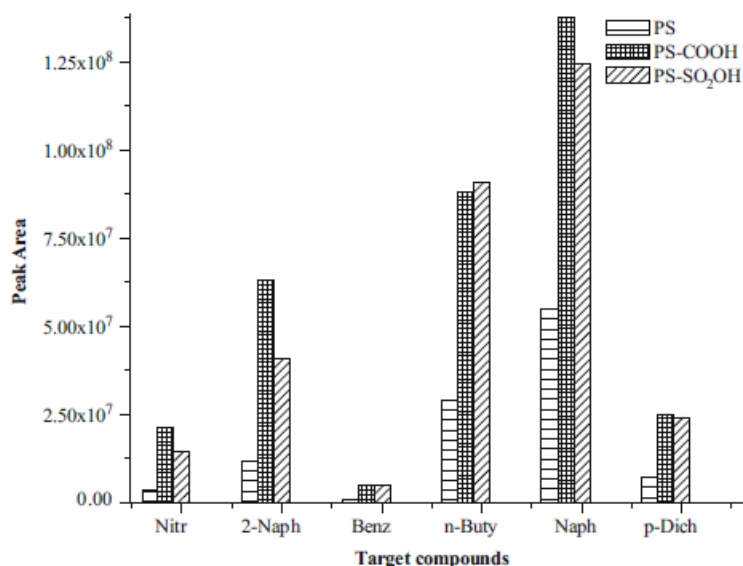
Obrázek 11 - Výtěžnost při opakovaném použití antracitu (38)

Aby byla ověřena schopnost stanovovat NB a DNB v reálných vzorcích, byly odebrány vzorky říční vody, které byly analyzovány bez i s přidavkem stanovovaných látek (0,5 a 1,0  $\mu\text{g/l}$ ). Před samotnou analýzou byl vzorek vody přefiltrován. Metoda standardního přidavku byla použita pro ověření spolehlivosti metody (viz. tabulka 4). Tato metoda poskytovala uspokojivé výtěžnosti při stanovování NB a DNB v reálných vzorcích, nedocházelo k interferencím s maticí neupravených reálných vzorků. (38)

Tabulka 4 - Výtěžnosti stanovení NB a DNB ve vzorcích říční vody bez a se standardním přidavkem (38)

	Conc. added to river water ( $\mu\text{gL}^{-1}$ )	Conc. quantified ( $\mu\text{gL}^{-1}$ )	%Recovery (RSD)
Raw water	–	<DL (DNB), (NB)	–
Raw water	0.50 (NB, DNB)	0.39 (DNB), 0.60 (NB)	77.0 (3.6), 120.0 (3.9)
Raw water	1.0 (NB, DNB)	1.02 (DNB), 1.00 (NB)	102.0 (3.2), 100.5 (4.1)

Qi a kolektiv (39) ve své práci používají elektricky svinutá polymerní nanovlákna jako sorbenty při extrakci tuhou fází (SPE). Stanovovali 6 sloučenin (včetně pro nás zajímavého nitrobenzenu) ve vzorcích říčních a odpadních vod za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detektorem. Testována byla tři polymerní vlákna: polystyren (PS), poly(styren-co-methacrylic acid) (PS-COOH) a poly(styrene-co-p-styrene sulfonate) (PS-SO<sub>2</sub>OH). Účinnost jejich extrakce je patrná z obrázku 11.



Obrázek 12 - Vliv různých typů nanovláken na extrakci. Nitrobenzen (Nitr), 2-naphthol (2-Naph), benzene (Benz), n-butyl p-hydroxybenzoate (n-Buty), naphthalene (Naph), p-dichlorobenzene (p-Dich). (39)

Po optimalizaci vykazovala tato metoda dobrou linearitu pro všech šest analyzovaných látek (viz. tabulka 5), dobrou reprodukovatelnost (vyjádřenou pomocí standardní relativní odchylky plochy píků) a přijatelnou výtěžnost.

Tabulka 5 - Lineární rozsah, opakovatelnost, limit detekce (LOD) a absolutní výtěžnost metody. (39)

Analytes	Linear range (ng mL <sup>-1</sup> )	Linearity $r^2$	Repeatability (RSD %)		LOD (ng mL <sup>-1</sup> )	Absolute recovery (%) ± RSD	
			25 ng mL <sup>-1</sup>	500 ng mL <sup>-1</sup>		25 ng mL <sup>-1</sup>	500 ng mL <sup>-1</sup>
Nitr	10–5000	0.9979	4.4	4.4	0.15	87.8(5.5)	88.5(4.8)
2-Naph	10–5000	0.9989	3.2	6.6	0.05	89.9(4.6)	90.9(4.9)
Benz	10–5000	0.9998	4.2	4.1	1.00	40.0(8.9)	40.6(5.8)
N-Buty	10–5000	0.9999	5.8	3.2	0.02	91.6(2.4)	92.9(7.0)
Naph	10–5000	0.9996	5.8	5.9	0.01	89.1(7.8)	90.4(8.1)
P-Dich	10–5000	0.9999	5.3	3.5	0.10	86.9(3.1)	89.0(6.4)

$n=3$

RSD relative standard deviation, Nitr nitrobenzene, 2-Naph 2-naphthol, Benz benzene, n-Buty n-butyl p-hydroxybenzoate, Naph naphthalene, p-Dich p-dichlorobenzene

Následně tuto svou metodu extrakce pomocí nanovláken porovnali s komerčně dostupným SPE sorbentem označeným jako OSD (octadecylsilane), který patří mezi jedny z nejméně efektivních sorbentů organických látek ve vodných vzorcích. Mezi oběma sorbenty byly porovnávány tyto aspekty: výtěžnost, detekční limit a přesnost. Výsledky porovnání jsou shrnuty v tabulce 6. (39)

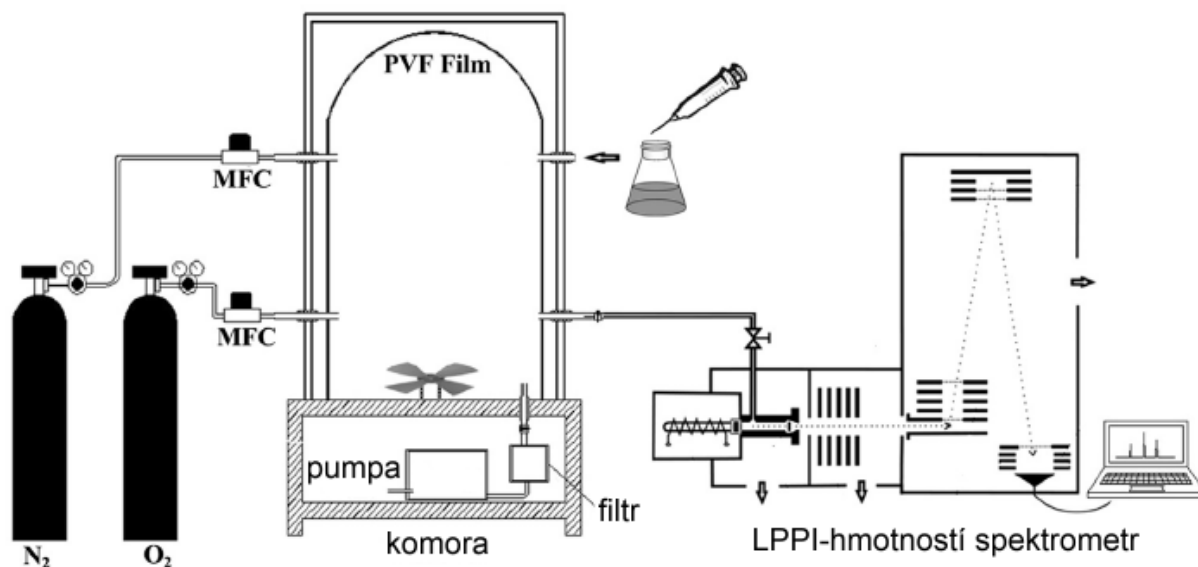
Tabulka 6 - Porovnání dvou druhů SPE sorbentů (39)

Analytes	Time/volume of solvent exhausted		Repeatability (RSD %)		LOD (ng mL <sup>-1</sup> )		Absolute recovery (%)	
	Nanofibers	ODS	Nanofibers	ODS	Nanofibers	ODS	Nanofibers	ODS
Nitr			4.4	7.8	0.15	1.00	87.8	20.8
2-Naph	<10 min/100–200 µL	30–40 min/10–20 mL	3.2	11.5	0.05	0.10	89.9	37.9
Benz			4.2	7.8	1.00	5.00	40.0	16.9
N-Buty			5.8	12.9	0.02	0.03	91.6	79.9
Naph			5.8	7.6	0.01	0.15	89.1	55.2
P-Dich			5.3	10.0	0.10	0.15	86.9	66.5

n=3

### 2.4.3.3. Použití ostatních technik

Sun a kolektiv (40) zkoumali použití hmotnostního spektrometru s nízkotlakou fotoionizací (LPPI) pro stanovení 4 látek včetně nitrobenzenu (NB), nitrotoluenu (NT), 2,4-dinitrotoluenu. LPPI ionizátor používá Kr vakuovou ultrafialovou výbojku a separaci iontů zajišťuje průletový analyzátor s krátkou dráhou odrazu. Ke spektrometru byla připojena 120 litrová kalibrační komora naplněná syntetickým vzduchem (80 % dusík a 20 % kyslík). Schéma instrumentace je znázorněna na obrázku 13.



Obrázek 13 - Schéma instrumentace, MFC - hmotnostní průtokoměry, LPPI - nízkotlaká fotoionizace, PVF - polyvinylfluorid (40)

Limity detekce této techniky byly porovnány s limity detekce technik PI-MS, IMS, PTR-MS a psím čuchem. Výsledky jsou shrnuty v tabuce 7. (40)

Tabulka 7 - Limity detekce vybraných látek stanovených pomocí PI-MS, IMS, PTR-MS a psi čuch. PI-MS - hmotnostní detekce s fotoionizací, IMS – iontová mobilní spektrometrie, PTR-MS – hmotnostní spektrometrie s protonovou ionizací,  $\sigma$  – standardní odchylka šumu (40)

LOD		
References		This study ( $2\sigma$ )
Gas chromatograph/ PI-MS:	~40 ppbv( $2\sigma$ )	30 pptv, i.e., 2.4 pg
PI-MS:	40 ppbv ( $3\sigma$ )	
–	–	0.5 pptv, i.e., 0.03 pg
Gas chromatograph/ PI-MS:	17–24 ppbv ( $2\sigma$ )	4 pptv, i.e., 0.22 pg
PI-MS:	20 ppbv ( $3\sigma$ )	
Thermal desorption- PI-MS:	750 ng ( $3\sigma$ )	1 pptv, i.e., 0.06 pg
miniature PI-MS:	10–100 ppbv ( $3\sigma$ )	
IMS:	10 pptv	0.5–30 pptv
PTR-MS:	2 pptv	0.5–30 pptv
Dog nose:	0.5–2 ppbv	0.5–30 pptv

Govindasami a kolektiv (41) ve své práci vyvíjeli cenově přístupnou, sítotiskovou uhlíkovou elektrodu (SPCE) modifikovanou mnohostěnnými uhlíkovými nanotrubičkami (MWCNT) pro detekci nitrobenzenu. MWCNT vyniká svou výbornou elektrickou vodivostí, mechanickou stabilitou, elektrokatalytickými schopnostmi, díky čemuž se jedná o dobré elektrody pro citlivou analýzu. Sítotisková uhlíková elektroda (SPCE) je levná, jednorázová elektroda speciálně navržená pro práci v mikroobjemech. Praktické použití bylo demonstrováno na vzorcích vodovodní a říční vody. Do nich bylo přidáno známé množství nitrobenzenu. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 8. (41)

Tabulka 8 - Stanovení nitrobenzenu pomocí MWCNT/SPCE ve vzorcích vody (41)

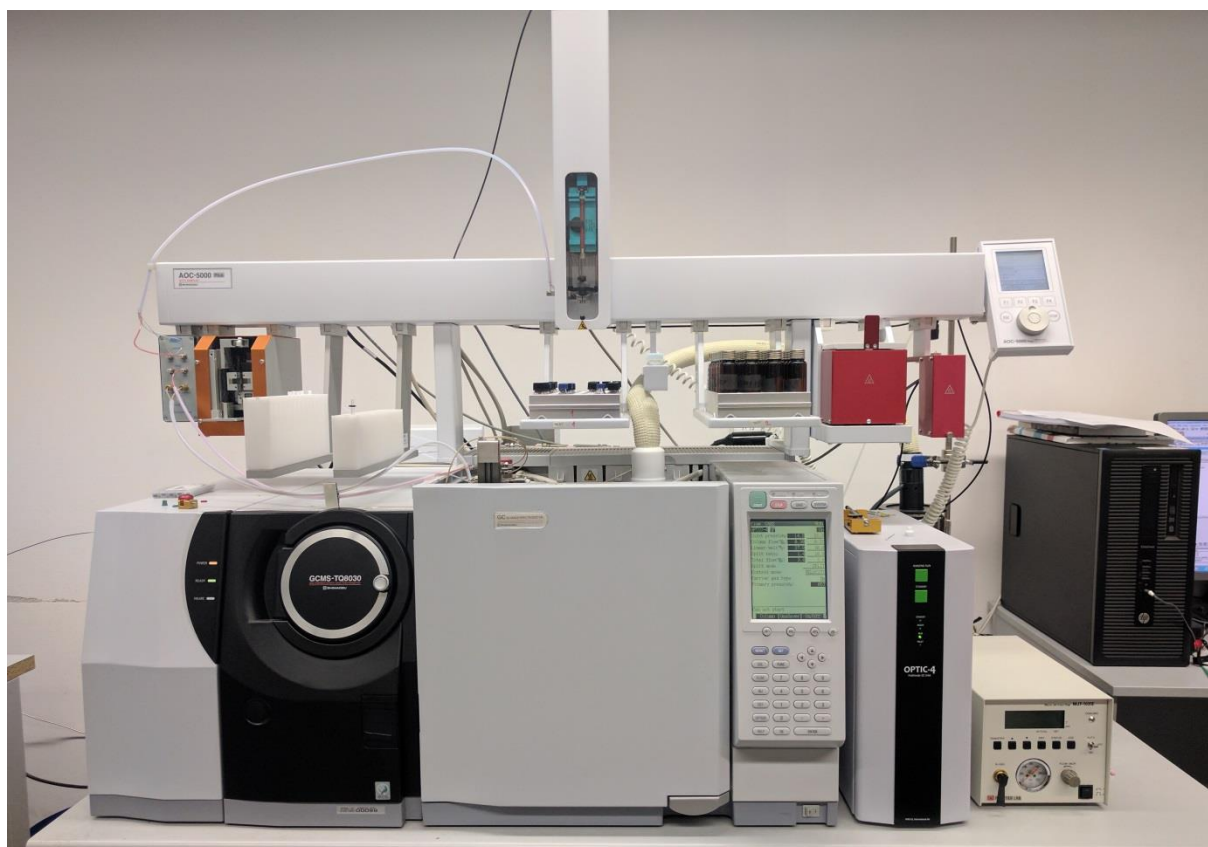
Sample	Added (nM)	Found (nM)	Recovery (%)	* RSD (%)
Tap water	100	99.17	99.17	3.02
	200	197.73	98.86	3.40
River water	100	97.30	97.30	3.95
	200	198.49	99.24	4.25

## 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 3.1. Intrumetace

#### 3.1.1. Plynový chromatograf s hmotnostní detekcí

Analýza nitrosloučenin byla prováděna na plynovém chromatografu GC-2010 spojeném s hmotnostním spektrometrem GCMS-TQ 8030 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko). Tento systém byl vybaven GC/MS převodníkem, elektronovou a chemickou ionizací, trojitým kvadrupólovým hmotnostním analyzátozem a elektronovým násobičem. Pro dělení nitrosloučenin byla použita kapilární kolona Rtx® - TNT1, 15 m x 0,25 mm x 0,25 µm tloušťka filmu (Restec, USA). Jako nosný plyn bylo používáno helium 5.0 (Linde, Praha). Dávkování kapalných standardů bylo provedeno pomocí automatického dávkovače AOC-5000 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) do vysokoúčinného multimodálního nástřikového systému OPTIC-4 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko). Dávkování vzorku v očepečkovaném lineru bylo provedeno pomocí systému LINEX (ATAS GL International B. V., Eindhoven, Netherlands). Celý přístroj je na obrázku 14.



Obrázek 14 – GCMS-TQ 8030; GC-2010; Optic-4; AOC-5000

### 3.1.2. Analytické váhy

Navazovací práce všech standardů a chemikálií proběhly na analytických vahách HR-120-EC (A&D instruments LTD, Japonsko) s maximální nosností 120 g a přesností na desetiny miligramů. místa, viz obrázek 15.



Obrázek 15 – Analytické váhy HR-120-EC

## 3.2. Použité chemikálie

### 3.2.1. Chemikálie a standardy

Při přípravě kalibrační řady a během optimalizace podmínek byly použity následující chemikálie:

- Nitrobenzen (NB); Explosia a.s., Pardubice
- 1,3-dinitrobenzen (1,3-DNB); Explosia a.s., Pardubice
- 2-nitrotoluen (2-NT); Explosia a.s., Pardubice
- 3-nitrotoluen (3-NT); Explosia a.s., Pardubice
- 4-nitrotoluen (4-NT); Explosia a.s., Pardubice
- 2,4-dinitrotoluen (2,4-DNT); Explosia a.s., Pardubice
- 2,6-dinitrotoluen (2,6-DNT); Explosia a.s., Pardubice
- Methanol; čistoty 99,9%, Sigma-Aldrich, Německo, Steinheim

### 3.3. Příprava standardních a kalibračních roztoků

Roztoky standardů o koncentraci 200 mg/l byly připraveny z pevných (4-NT, DNB, 2,4- a 2,6-DNT) a kapalných (NB, 2- a 3-NT) standardů. Látky byly rozpuštěny v metanolu. Z těchto standardních roztoků byla připravena šestibodová kalibrační řada do 5 ml odměrných baněk o koncentracích 0,5; 0,3; 0,1; 0,05; 0,01 a 0,005  $\mu\text{g/ml}$ .

### 3.4. Pracovní postup

#### 3.4.1. Podmínky měření kalibračních roztoků

Při hledání optimálních podmínek separace byly zkoušeny různé parametry způsobu nástřiku, teplotního programu a způsobu detekce pomocí MS. Nalezené optimální podmínky, které poskytovaly uspokojivý výsledek, jsou uvedeny v tabulkách 9, 10, 11 a výsledný chromatogram je na obrázku 16.

Tabulka 9 - Parametry nástřiku, plynového chromatografu a hmotnostního spektrometru

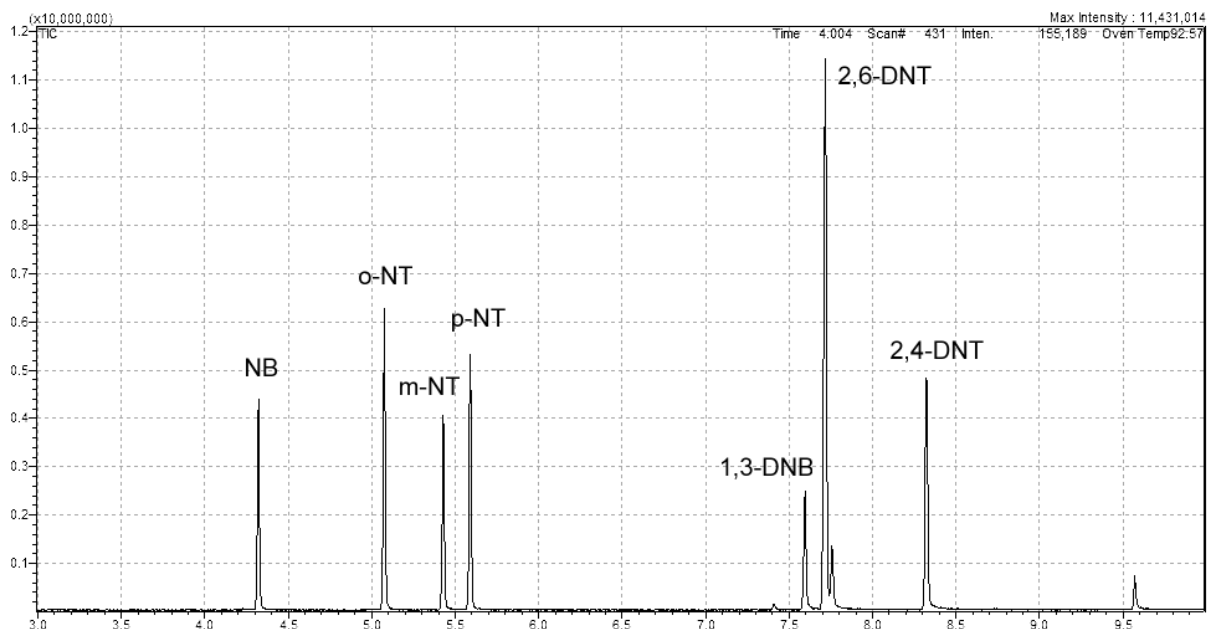
Dávkovaný objem	1 $\mu$ l
Způsob nástřiku	Split
Splitovací poměr	1:10
Nosný plyn	Helium 5.0 (Linde, Praha, ČR)
Konstantní lineární rychlost	60 cm/sek
Teplota převodníku do MS	230 °C
Teplota iontového zdroje	230 °C
Napětí detektoru	Podle výsledků ladění + 0,4 kV

Tabulka 10 - Program oplachu septa

	Nárůst průtoku	Konečný průtok [ml/min]	Doba udržení koneč. průtoku [min]
Oplach septa		0	0,01
	300	3	9,89

Tabulka 11 - Teplotní program nástřiku a plynového chromatografu

	Teplotní nárůst [°C/min]	Konečná teplota [°C]	Doba udržení koneč. teploty [min]
Nástřik		60	0,83
	60	300	9
GC		40	0,5
	15	160	0
	40	200	0,5



Obrázek 16 - Chromatografický záznam v modu SCAN sedmi nitroslooučenin. Měřeno na kapilární koloně Rtx® - TNT, 15 m x 0,25 mm x 0,25 µm tloušťka filmu (Restec, USA).

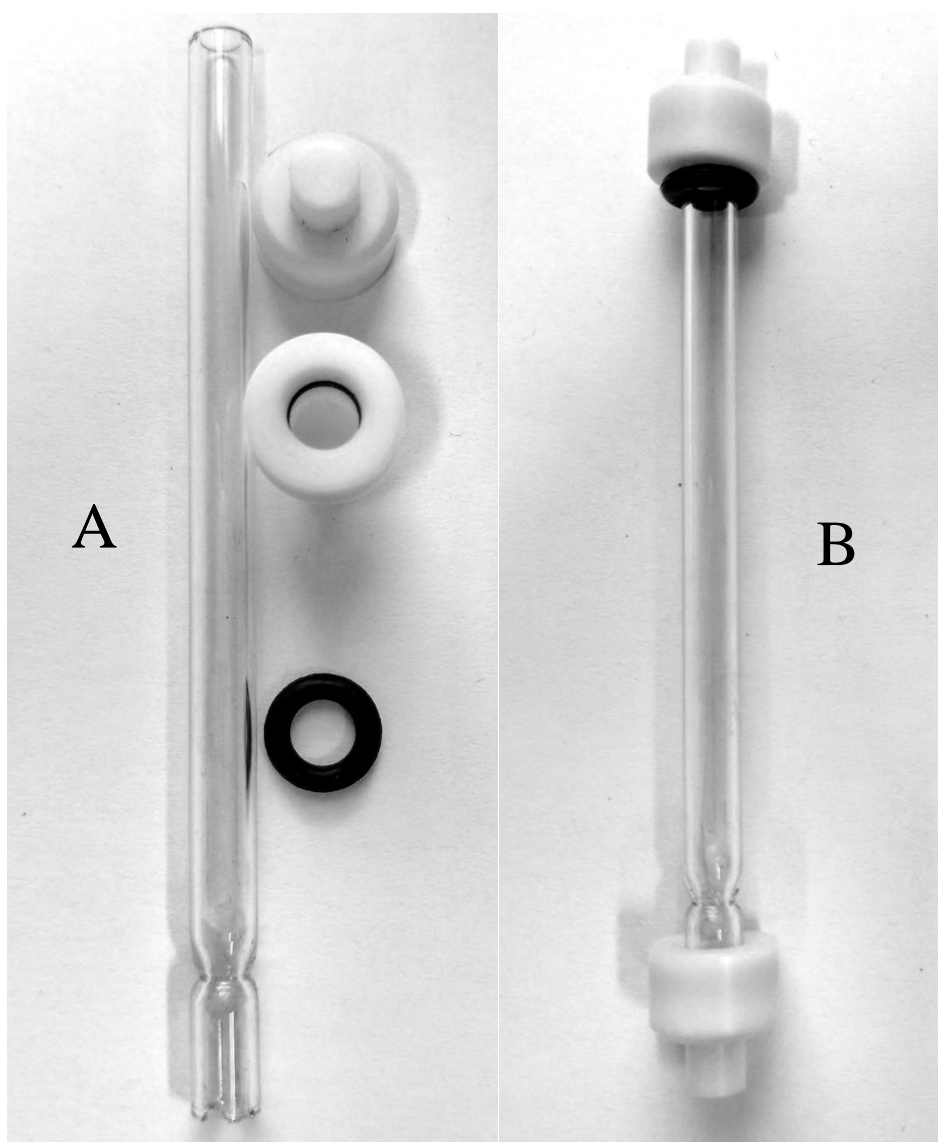
Po proměření vzorku o koncentraci 25 µg/ml v režimu SCAN byly označeny píky stanovovaných látek a následně byly vybrány charakteristické ionty a dva referenční ionty pro měření v režimu SIM. Tento režim poskytuje zvýšenou citlivost oproti režimu SCAN. Konkrétní hodnoty retenčních časů, charakteristických a referenčních iontů pro jednotlivé látky jsou uvedeny v tabulce 12. Hmotnostní spektra stanovovaných látek jsou uvedeny v přílohách 1-7.

Tabulka 12 - Vybrané parametry jednotlivých látek pro použití SIM modu.

Látka	Kvantifikátor (m/z)	Ret. čas [min]	Ref. ion 1	Ref. ion 2
NB	123	4,32	107	124
2-NT	137	5,07	121	138
3-NT	137	5,42	121	138
4-NT	137	5,59	121	138
1,3-DNB	168	7,59	138	152
2,6-DNT	182	7,71	152	166
2,4-DNT	182	8,32	152	165

### 3.4.2. Podmínky měření pomocí LINEX GC-MS

Linery s křemennou vatou byly naplněny, tak aby vznikl jemný smotek o velikosti 5 mm v místě zúžení lineru. Jakákoliv manuální práce s linery probíhala v rukavicích, aby nedošlo k případnému kontaminování vzorku kožními oleji a mazem. Linery s Carbotrapem a Carbosievem již byly pořízeny naplněné. Následně byly opatřeny kroužkovým těsněním a začepičkovány, viz obrázek 17. Systém LINEX si pak již sám podle nastavené sekvence vezme liner, odveze jej do čepičkovací/odčepičkovací stanice. Zde čepičky zůstanou a samotný liner putuje do nástříku. Po proběhnutí analýzy se vrací a dojde k opětovnému začepičkování a vrácení na místo do zásobníku.



Obrázek 17 - Liner s kroužkovým těsněním a párem čepiček (A). Začepičkovaný liner připravený na analýzu (B)

## 4. VÝSLEDKY A DISKUSE

### 4.1. Výsledky měření kalibrační křivky

V první řadě byly připraveny tři roztoky o koncentraci 100 µg/ml jejichž složení můžete vidět v tabulce 13. Po proměření byly určeny retenční časy a pořadí jednotlivých stanovovaných látek (nitrobenzen, 2-nitrotoluen, 3-nitrotoluen, 4-nitrotoluen, 1,3-dinitrobenzen, 2,4-dinitrotoluen a 2,6-dinitrotoluen). Získané chromatogramy i s popisky jednotlivých látek jsou uvedeny v přílohách 8-10.

Tabulka 13 - Složení prvotních roztoků použité pro identifikaci retenčních časů a pořadí jednotlivých látek.

Číslo roztoku	1	2	3
Stanovované látky	2-nitrotoluen 1,3-dinitrobenzen 2,4-dinitrotoluen	3-nitrotoluen 2,6-dinitrotoluen	nitrobenzen 4-nitrotoluen

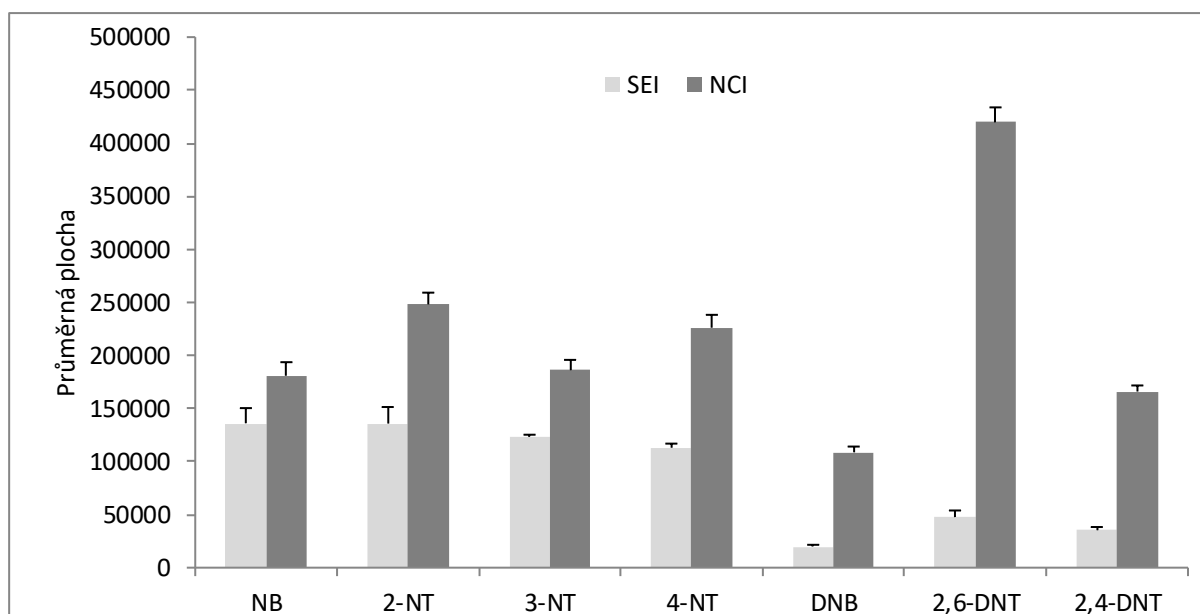
Následně s cílem stanovení nejnižších možných koncentrací stanovovaných látek byly odzkoušeny různé typy ionizačních technik:

Simultánní elektronová ionizace (SEI)

Pozitivní chemická ionizace (SCI)

Negativní chemická ionizace (NCI)

Použitím pozitivní chemické ionizace byly získány pouze „prázdné“ chromatogramy, bez žádných píků ani jinak výrazných iontů. Tento fakt je zřejmě způsoben nedostatečnou koncentrací látek, ale i tak podává výsledek. Dále budou diskutovány jen výsledky z SEI a NCI. Výsledné porovnání bylo provedeno pomocí ploch píků jednotlivých stanovovaných látek. Byl použit roztok všech sedmi nitrosloúčenin o koncentraci 25 µg/ml, který byl pro každý druh ionizace proměřen třikrát. Jako nejlepší ionizační technika se ukázala být NCI. Na obrázku 18 jsou porovnány průměrné plochy píků SEI a NCI.



Obrázek 18 - Porovnání průměrných ploch piků jednotlivých látek v závislosti na použité ionizační technice

Následně byla proměřena řada šesti kalibračních roztoků sedmi stanovovaných nitrosloúčenin. Každý roztok byl změřen devětkrát, odlehlé body byly vyloučeny a vybrané výsledky zprůměrovány. Koncentrace jednotlivých látek pro každý z kalibračních roztoků jsou uvedeny v tabulce 14. Správnost metody byla ověřena proměřením čtyř standardních roztoků v rozsahu kalibrační řady. Přípustná odchylka měření při validaci metody by pro první bod neměla přesáhnout 20 % a pro následujících bodů kalibrační křivky by chyba neměla být vyšší než 15 % (42). V rozsahu kalibrace 0,5 – 0,005 µg/ml tento předpoklad nebyl splněn, po odstranění posledních dvou kalibračních bodů již kalibrace splňovala podmínky validace. Příklady výpočtů a výsledné hodnoty validace jsou uvedeny v tabulce 15. Parametry výsledné čtyřbodové kalibrační křivky, limity detekce a limity kvantifikace jsou uvedeny v tabulce 16. Samotné kalibrační křivky jsou uvedeny v přílohách 11 – 17.

Tabulka 14 - Koncentrace stanovovaných látek v jednotlivých kalibračních roztocích

Látka	Koncentrace kalibračního roztoku [µg/ml]					
	0,5	0,3	0,1	0,05	0,01	0,005
NB	0,5320	0,3192	0,1064	0,0532	0,0106	0,0053
2-NT	0,5520	0,3312	0,1104	0,0552	0,0110	0,0055
3-NT	0,5040	0,3024	0,1008	0,0504	0,0101	0,0050
4-NT	0,5300	0,3180	0,1060	0,0530	0,0106	0,0053
1,3-DNB	0,5640	0,3384	0,1128	0,0564	0,0113	0,0056
2,6-DNT	0,5080	0,3048	0,1016	0,0508	0,0102	0,0051
2,4-DNT	0,5040	0,3024	0,1008	0,0504	0,0101	0,0050

Tabulka 15 - Validace metody GC-MS a příklad výpočtu

Látka	Koncentrace skutečná [µg/ml]	Koncentrace vypočítaná [µg/ml]	Odchylka měření [rel. %]
NB	0,5	0,4957	<b>1%</b>
	0,3	0,3089	<b>3%</b>
	0,1	0,0942	<b>6%</b>
	0,05	0,0512	<b>2%</b>
2-NT	0,5	0,4999	<b>0%</b>
	0,3	0,3017	<b>1%</b>
	0,1	0,0928	<b>7%</b>
	0,05	0,0556	<b>11%</b>
3-NT	0,5	0,4970	<b>1%</b>
	0,3	0,3075	<b>3%</b>
	0,1	0,0898	<b>10%</b>
	0,05	0,0557	<b>11%</b>
4-NT	0,5	0,5064	<b>1%</b>
	0,3	0,2890	<b>4%</b>
	0,1	0,0976	<b>2%</b>
	0,05	0,0570	<b>14%</b>
1,3-DNB	0,5	0,5072	<b>1%</b>
	0,3	0,2875	<b>4%</b>
	0,1	0,0983	<b>2%</b>
	0,05	0,0571	<b>14%</b>
2,6-DNT	0,5	0,5081	<b>2%</b>
	0,3	0,2855	<b>5%</b>
	0,1	0,0999	<b>0%</b>
	0,05	0,0565	<b>13%</b>
2,4-DNT	0,5	0,5092	<b>2%</b>
	0,3	0,2833	<b>6%</b>
	0,1	0,1008	<b>1%</b>
	0,05	0,0567	<b>13%</b>

Příklad výpočtu:

Průměrná plocha píku nitrobenzenu =  
41951,5

$$y = 86558,33x - 956,63$$

$$x = \frac{41951,5 - (-956,63)}{86558,33} = 0,4957 \mu\text{g/ml}$$

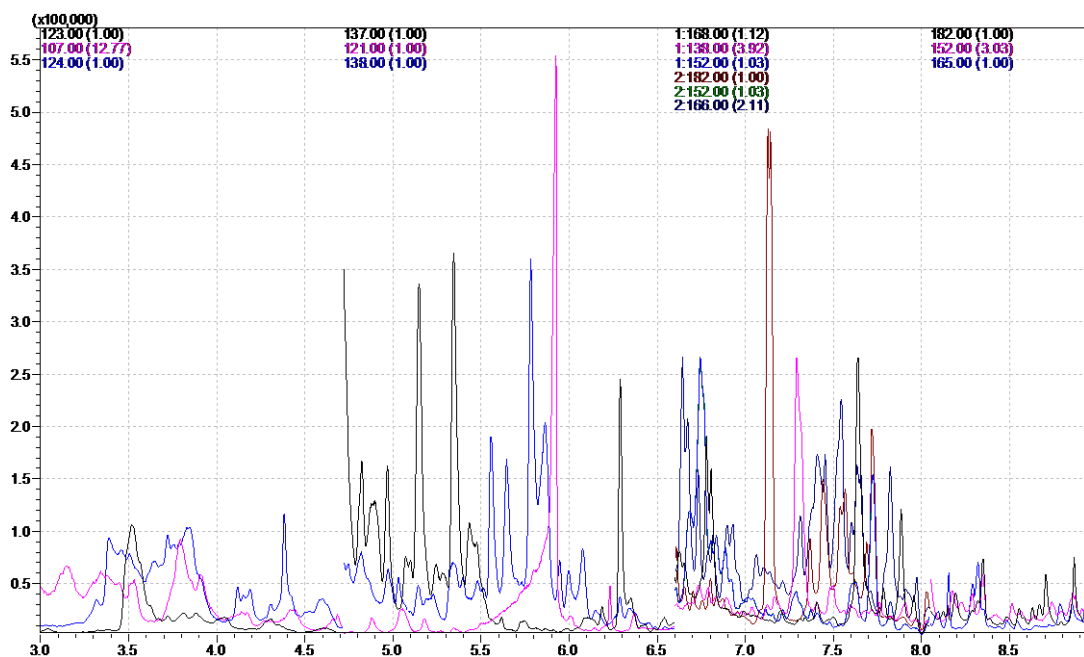
$$\left| 100 - \left( \frac{0,4957}{0,5} \cdot 100 \right) \right| = 1 \%$$

Tabulka 16 – Parametry výsledné kalibrační křivky

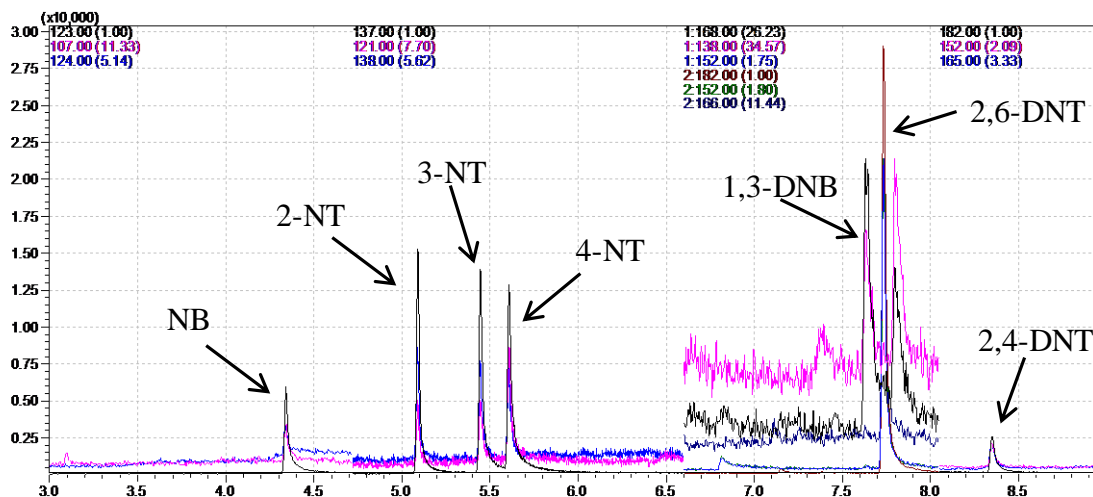
Látka	Rovnice regrese		R <sup>2</sup>	Rozsah kalibrace [µg/ml]	LOQ [µg/ml]	LOD [µg/ml]
	Směrnice	Úsek				
NB	86558,33	-956,63	0,9990	0,05 - 0,5	0,0532	0,0177
2-NT	117395,01	-1631,81	0,9993	0,05 - 0,5	0,0552	0,0184
3-NT	84569,62	-1281,42	0,9984	0,05 - 0,5	0,0504	0,0168
4-NT	78736,91	-1863,77	0,9983	0,05 - 0,5	0,0530	0,0177
1,3-DNB	61475,51	-1631,77	0,9979	0,05 - 0,5	0,0564	0,0188
2,6-DNT	493789,97	-4819,84	0,9975	0,05 - 0,5	0,0508	0,0169
2,4-DNT	107041,78	-2280,23	0,9968	0,05 - 0,5	0,0504	0,0168

## 4.2. Výsledky měření pomocí LINEX GC-MS

Zde byly sledovány výtěžnosti stanovení při použití linerů s různou náplní a při různých dávkovaných objemech. Použity byly linery naplněny křemennou vatou (5 mm smotek vaty umístěný do zúžené části lineru), sorbentem Carbotrap a Carbosieve. Ve všech případech bylo nutné naplněný liner nechat několikrát desorbovat v nástřiku, jelikož docházelo k uvolňování nasorbovaných látek. Příklad takového chromatogramu je uveden na obrázku 19. Po dvou až čtyřech stanovení, kdy došlo k desorpci většiny nechtěných látek a ustálení nulové linie, byl do každého lineru nadávkován 1  $\mu$ l směsného standardu o koncentraci 0,1  $\mu$ g/ml. Všechny linery byly změřeny dvakrát, poprvé pro stanovení výtěžnosti a podruhé pro zjištění (popř. i odstranění) nedesorbovaných zbytků. Linery s křemennou vatou a Carbotrapem stanovované nitrosloučeniny úspěšně desorbovaly, viz obrázek 20.

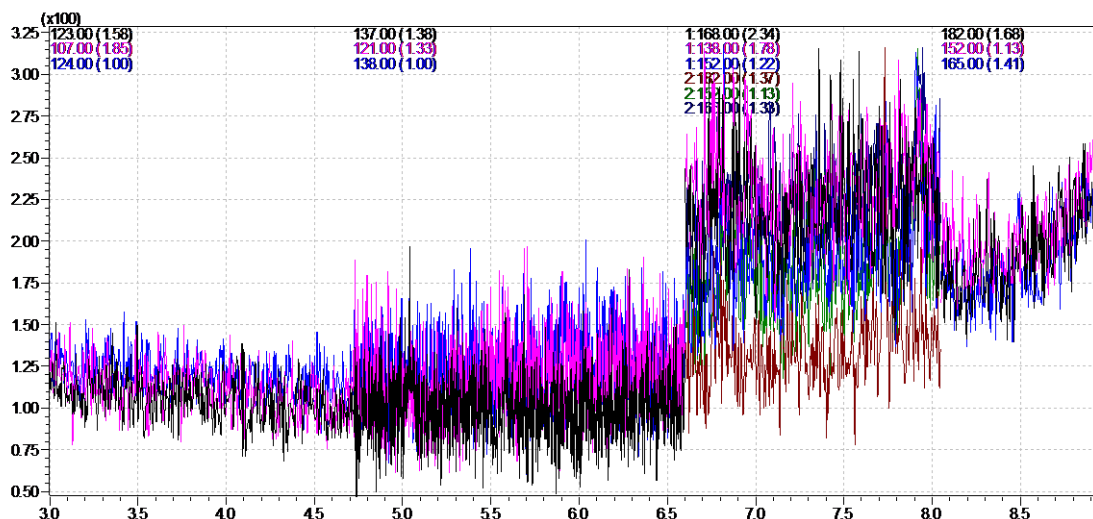


Obrázek 19 - Chromatogram lineru s Carbotrapem bez nadávkování vzorku

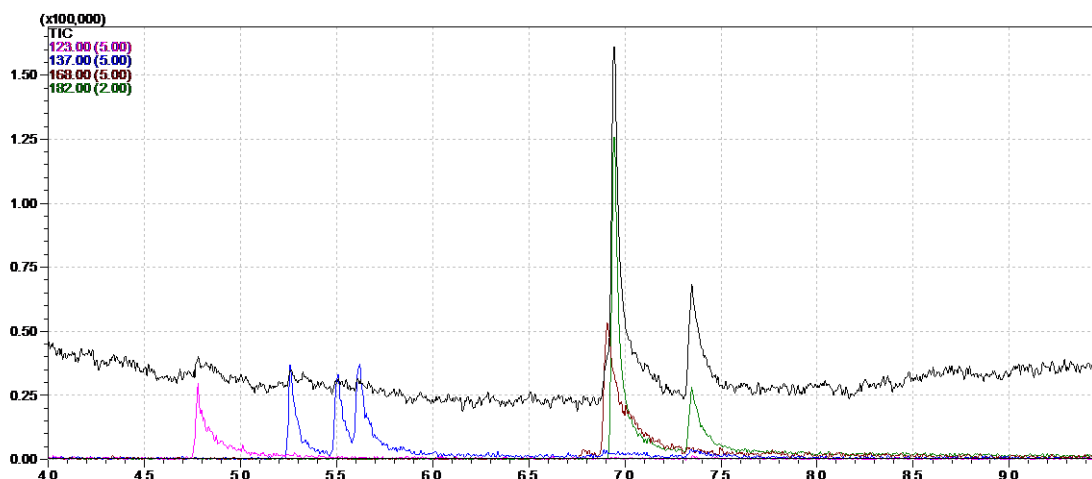


Obrázek 20 – Chromatogram stanovených nitrosloúčenin při použití lineru s Carbotrapem

V případě linerů s Carbosieve nebyly v chromatogramu nalezeny žádné píky. Na obrázku 21 je patrné, že lepších výsledků nebylo dosaženo ani při nadávkování desetinásobně vyšší koncentrace (tj. 1  $\mu\text{l}$  směšného standardu o koncentraci 1  $\mu\text{g/ml}$ ) a zároveň vyhřátí nástřiku na vyšší teplotu. Byly zkoušeny i vyšší teploty (až 600 °C – maximum, které OPTIC dovoluje), čímž patně došlo k zuhelnatění polyimidové vrstvy kusu kolony vedené do nástřikového prostoru. Výsledný efekt je možné vidět na obrázku 22.



Obrázek 21 - Chromatogram stanovených nitrosloúčenin při použití lineru s Carbosievem. Byl nadávkován 1  $\mu\text{l}$  o koncentraci 1  $\mu\text{g/ml}$  a konečná teplota nástřikového portu byla 340 °C. Možné porovnání s obrázkem 17.



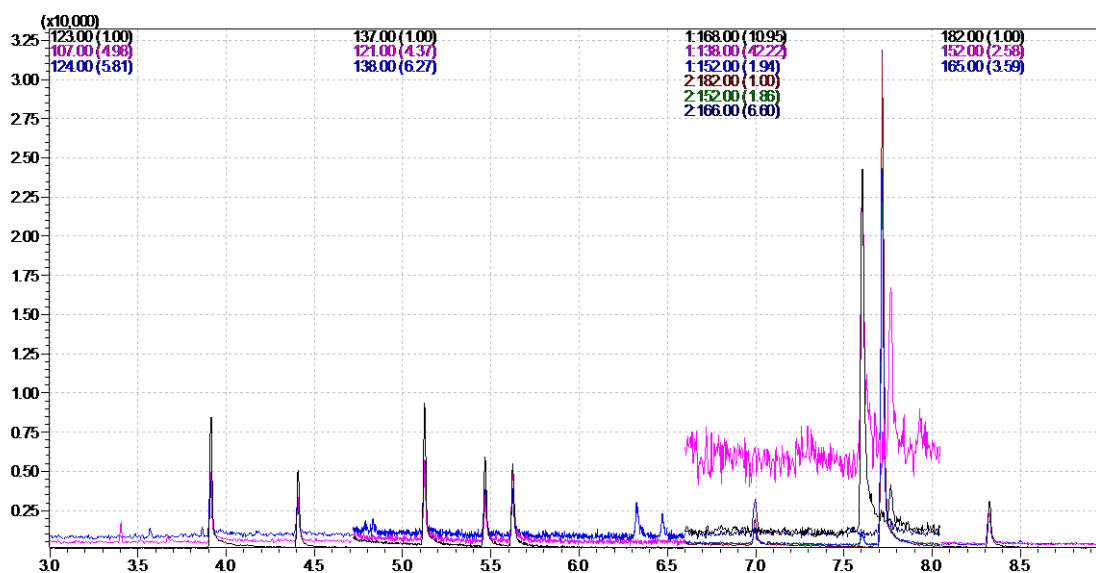
Obrázek 22 - Chromatogram ukazující vliv zuhelnatěné části kolony. Na všech sedmi píčích je patrné rozmývání a asymetričnost. Měřeno v režimu SCAN, vybrané ionty jsou v levém horním rohu a jejich intenzity jsou 5 znásobené, kromě iontu 182 který je znásoben pouze dvakrát.

Každý liner byl při dané koncentraci změřen sedmkrát a mezi jednotlivými analýzami byly linery vždy jednou změřeny bez nadávkovaného vzorku. Zjištěné koncentrace se zprůměrovaly a byla vypočtena výtěžnost pro daný druh lineru. Výsledné výtěžnosti pro každou látku a druh lineru jsou uvedeny v tabulce 17.

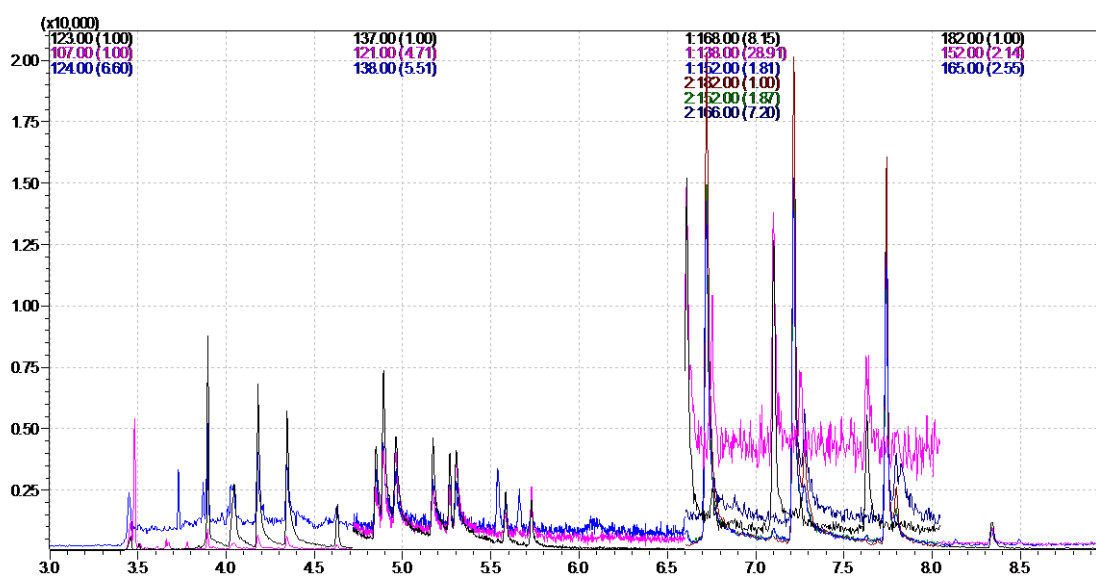
Tabulka 17 - Výsledné hodnoty výtěžnosti

Druh lineru	S křemennou vatou		Carbotrap		
	Látka	Průměrná naměřená koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Výtěžnost	Průměrná naměřená koncentrace [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Výtěžnost
	NB	0,0922 $\pm$ 0,0046	92,2%	0,0818 $\pm$ 0,0049	81,8%
	2-NT	0,0931 $\pm$ 0,0037	93,1%	0,0823 $\pm$ 0,0045	82,3%
	3-NT	0,0957 $\pm$ 0,0029	95,7%	0,0808 $\pm$ 0,0040	80,8%
	4-NT	0,0934 $\pm$ 0,0037	93,4%	0,0782 $\pm$ 0,0047	78,2%
	1,3-DNB	0,0882 $\pm$ 0,0053	88,2%	0,0753 $\pm$ 0,0068	75,3%
	2,6-DNT	0,1044 $\pm$ 0,0031	104,4%	0,0787 $\pm$ 0,0039	78,7%
	2,4-DNT	0,0950 $\pm$ 0,0038	95,0%	0,0746 $\pm$ 0,0052	74,6%

Dále bylo na lineru s křemennou vatou zkoušena možnost dávkování větších objemů. Dávkovány byly objemy od 1  $\mu\text{l}$  do 50  $\mu\text{l}$ . Do objemu 10  $\mu\text{l}$  vycházely výsledky relativně rozumně. 1  $\mu\text{l}$  je analogií dávkování pomocí autosampleru. V případě 5  $\mu\text{l}$  se na počátku chromatogramu objevují i rušivé píky, ale píky stanovovaných látek jsou rozlišitelné, odpovídají retenčním časům i referenčním iontům, viz obrázek 23. Hraniční hodnotou se ukázal být dávkovaný objem 10  $\mu\text{l}$ , kdy počet rušivých píků vzrostl, ale stále ještě nezabraňoval stanovení. U vyšších dávkovaných objemů (zkoušeno 20  $\mu\text{l}$  a 50  $\mu\text{l}$ ) docházelo k rozdělení jednotlivých píků stanovovaných látek na jakési trojice píků, viz obrázek 24.



Obrázek 23 - Chromatogram při nadávkování 5 µl roztoku o koncentraci 0,02 µg/ml. Výrazný rušivý pik ve 3,9 minutě.



Obrázek 24 - Chromatogram při nadávkování 20 µl roztoku o koncentraci 0,005 µg/ml.

## 5. ZÁVĚR

Hlavním cílem této práce bylo otestovat možnosti využití nástřiku s programově řízenou teplotou při analýze aromatických nitrosloučenin. Nalézt vhodné pracovní podmínky a vypracovat metodu pro jejich stanovení pomocí GC-MS.

V teoretické části jsou krátce popsány způsoby přípravy vzorku k analýze, dále je pak větší pozornost věnována způsobům nástřiku a popisu stanovovaných nitrosloučenin. V poslední řadě je zde provedena literární rešerše na možnosti stanovení nitrosloučenin a to především pomocí GC-MS, ale i pomocí jiné techniky.

V experimentální části byla vytvořena metoda pro stanovení aromatických nitrosloučenin. Byla testována metoda používající systém výměňování linerů a zjištěna výtěžnost pro linery naplněné smotkem křemenné vaty, Carbotrapem nebo Carbosiehem. Průměrná výtěžnost linerů s křemennou vatou byla 94,6 % a u linerů s Carbotrapem byla výtěžnost stanovena na 78,8 %. Linery s Carbosiehem v daném teplotním rozmezí stanovované látky nedesorbovaly. To by se dalo eliminovat vyhřátím nástřikového portu na vyšší teploty. Při použití vyšších teplot by bylo nutné odstranit polyimidový povlak z části kolony vsunuté do nástřiku, aby se zamezilo degradaci tohoto povlaku a její následné nechtěné sorpci. Dále bylo na lineru s křemennou vatou testováno dávkování větších objemů. Zde se ukázal být limitní hranicí dávkovaný objem 10  $\mu$ l, kde byly píky ještě přijatelně rozeznatelné. Při vyšších objemech již nebyly chromatogramy použitelné. Tento problém by se mohl dát eliminovat prodloužením času, kdy je teplota kolony i nástřiku na 40 °C, aby mohlo dojít k lepšímu odstranění většiny rozpouštědla, které by mohlo způsobovat tento problém rozdělení píků.

Spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií je jako takové spojením výhod obou technik, čímž vzniká velmi účinná a spolehlivá metoda, která je časově efektivní, citlivá a úsporná z hlediska spotřeby vzorku. Široká škála doplňkových zařízení umožňuje lepší automatizaci či zlepšení citlivosti. Využití nástřiku s programově řízenou teplotou spolu s automatickým vyměňováním linerů je slibným nástrojem nejen při analýze aromatických nitrosloučenin.

Ověření metody na reálných vzorcích se bohužel nepodařilo realizovat z důvodu neuskutečněných pokusných odpalů na dolech Bílina v průběhu měření diplomové práce a jiné reálné vzorky nebyly k dispozici.

## 6. LITERATURA

1. Churáček, Jaroslav. *Analytická separace látek*. Praha : Státní nakladatelství technické literatury, 1990.
2. Klouda, Ing. Pavel. *Moderní analytické metody*. Ostrava : nakladatelství Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
3. LUCCI, Paolo, Deborah PACETTI, Oscar NUNEZ a Natale G. Trends in Sample Treatment Techniques for Environmental and Food Analysis. [autor knihy] Leonardo de Azevedo, CALDERON. *The Most Versatile Method of Chemical Analysis*. Rijeka : InTech, 2012.
4. SCHMIDT, Kamila a Ian PODMORE. Current Challenges in Volatile Organic Compounds Analysis as Potential Biomarkers of Cancer. *Journal of Biomarkers*. 2015.
5. Opekar, František, a další. *Základní analytická chemie*. Praha : Karolinum, 2002. 80-246-0553-8.
6. Mitra, Somenat. *Sample preparation techniques in analytical chemistry*. Hoboken : John Wiley & Sons, 2003. 0-471-32845-6.
7. KITSON, Fulton G., Barbara Seliger. LARSEN a Charles N. MCEWEN. *Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide*. San Diego : Academic Press, 1996. 978-0-12-483385-2.
8. Clay, Don E., Wenske, Robert a Anderson, Rollen. A Programmed Temperature Vaporizing Injector for Large Volume Injections. [Online] [Citace: 11. 5 2017.] <https://static.thermoscientific.com/images/D14316~.pdf>.
9. Janssen, Hans-Gerd, Kaal, Erwin a Alkema, Geert. Large Volume Injection in Capillary Gas Chromatography. *GL Sciences B.V.* [Online] 1996. [Citace: 11. 5 2017.] [https://www.glsciences.eu/ap-note/030\\_LVI.pdf](https://www.glsciences.eu/ap-note/030_LVI.pdf).
10. Janssen, Hans-Gerd, Alkema, Geert a Kaal, Erwin. Sample Introduction in Capillary Gas Chromatography. *GL Sciences B.V.* [Online] [Citace: 11. 5 2017.] <https://www.glsciences.eu/optic/gc-injections-manual.pdf>.

11. Kataoka, Hiroyuki. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. 2003, Sv. 22, 4.
12. Guo, Xinghua. *Advances in Gas Chromatography*. místo neznámé : AvE4EvA, 2014. ISBN-10 9535112279.
13. Wikipedia. [Online] [Citace: 19. 5 2017.] <https://sk.wikipedia.org/wiki/S%C3%BAbor:SchemaGC.png>.
14. Holčápek, Michal. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Michal Holčápek - Mass Spectrometry Group*. [Online] [Citace: 6. 4 2017.] [http://holcapek.upce.cz/teaching/01\\_Uvod.pdf](http://holcapek.upce.cz/teaching/01_Uvod.pdf).
15. Jandera, Pavel. *Atomová a molekulová spektrometrie se zaměřením na stopovou analýzu kontaminantů Díl B - Molekulová spektrometrie v organické analýze*. Pardubice : Univerzita Pardubice, 2011. 978-80-7395-392-8.
16. Nitro compound. *Wikipedia*. [Online] [Citace: 8. Duben 2017.] [https://en.wikipedia.org/wiki/Nitro\\_compound](https://en.wikipedia.org/wiki/Nitro_compound).
17. Nitrosloúčeniny. *Wikipedia*. [Online] [Citace: 8. Duben 2017.] <https://cs.wikipedia.org/wiki/Nitroslou%C4%8Deniny>.
18. Wikipedia. [Online] [Citace: 8. Duben 2017.] [https://en.wikipedia.org/wiki/Nitro\\_compound#/media/File:NitrationofPh.png](https://en.wikipedia.org/wiki/Nitro_compound#/media/File:NitrationofPh.png).
19. Yuan, C., Fan, Y. a Guo, H. A new electrochemical sensor of nitro aromatic compound based on three-dimensional porous Pt–Pd nanoparticles supported by graphene–multiwalled carbon nanotube composite. *Biosensors and Bioelectronics*. 2014, 58.
20. Yingxin, Ma, Shiguo, Wang a Leyu, Wang. Nanomaterials for luminescence detection of nitroaromatic explosives. *Trends in Analytical Chemistry*. 2015, 65.
21. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim : Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2000. 9783527306732.
22. Wen, Donghui, Li, Guozheng a Xing, Rui. 2,4-DNT removal in intimately coupled photobiocatalysis: the roles of adsorption, photolysis, photocatalysis, and biotransformation. *Appl Microbiol Biotechnol*. ENVIRONMENTAL BIOTECHNOLOGY, 2012, 95.

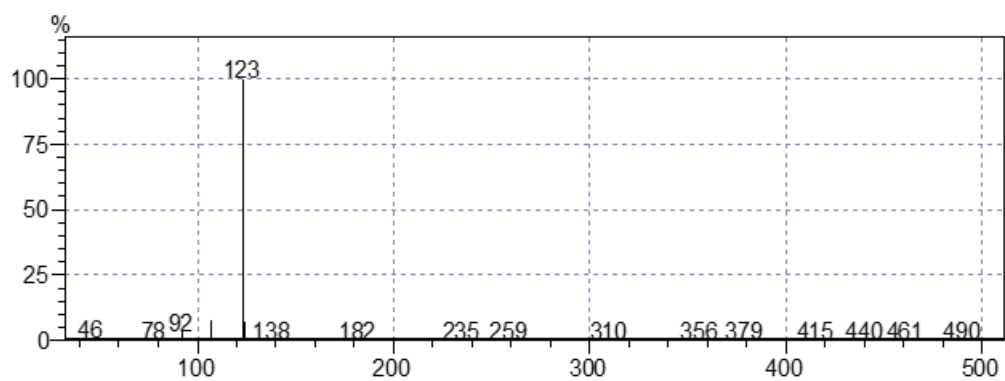
23. Sigman, Michael E., Ma, Cheng-Yu a Ilgner, Ralph H. Performance Evaluation of an Injection Port Thermal Desorption Gas Chromatographic Negative Ion Chemical Ionization Mass Spectrometric Method for Trace Explosive Vapor Analysis. *Analytical Chemistry*. 2001, Sv. 73, 4, stránky 792-798.
24. Field, Christopher R., a další. Direct liquid deposition calibration method for trace cyclotrimethylenetrinitramine using thermal desorption instrumentation. *Journal of Chromatography A*. 2013, Sv. 1282, stránky 178–182.
25. Field, Christopher R., a další. Characterization of thermal desorption instrumentation with a direct liquid deposition calibration method for trace 2,4,6-trinitrotoluene quantitation. *Journal of Chromatography A*. 2012, Sv. 1227, stránky 10-18.
26. Peng, Xi-Tiang, Zhao, Xing a Feng, Yu-Qi. Preparation of phenothiazine bonded silica gel as sorbents of solid phase extraction and their application for determination of nitrobenzene compounds in environmental water by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2011, 1218, stránky 9314–9320.
27. Speltini, Andrea, a další. Recent trends in the application of the newest carbonaceous materials for magnetic solid-phase extraction of environmental pollutants. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*. 2016, 10, stránky 11-23.
28. Anbia, Mansoor a Khazaei, Morteza. Ordered Nanoporous Carbon Based Solid-Phase Microextraction for the Analysis of Nitroaromatic Compounds in Aqueous Samples. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*. 2014, 33, stránky 29-39.
29. Li, Xiang, Chen, Jianmin a Du, Lichun. Analysis of chloro- and nitrobenzenes in water by a simple polyaniline-based solid-phase microextraction coupled with gas chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2007, 1140, stránky 21-28.
30. Jonsson, S., Gustavsson, L. a van Bavel, B. Analysis of nitroaromatic compounds in complex samples using solid-phase microextraction and isotope dilution quantification gas chromatography–electron-capture negative ionisation mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2007, 1164, stránky 65-73.
31. Calderara, Stéphane, Gardebas, Dominique a Martinez, Fabienne. Solid phase micro extraction coupled with on-column GC/ECD for the post-blast analysis of organic explosives. *Forensic Science International*. 2003, 137, stránky 6-12.

32. Zhang, Gui-Jiang, Zhou, Xin a Zang, Xiao-Huan. Analysis of nitrobenzene compounds in water and soil samples by graphene composite-based solid-phase microextraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry. *Chinese Chemical Letters*. 2014, 25.
33. Yu, Bofan, Song, Yonghui a Han, Lu. Optimizations of packed sorbent and inlet temperature for large volume-direct aqueous injection-gas chromatography to determine high boiling volatile organic compounds in water. *Journal of Chromatography A*. 2014, 1356.
34. Tavengwa, Nikita Tawanda, a další. Extraction of explosive compounds from aqueous solutions by solid phase extraction using b-cyclodextrin functionalized carbon nanofibers as sorbents. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2016, 4, stránky 2450–2457.
35. Gaurav, Malik, Ashok Kumar a Rai, P.K. Development of a new SPME–HPLC–UV method for the analysis of nitro explosives on reverse phase amide column and application to analysis of aqueous samples. *Journal of Hazardous Materials*. 2009, 172, stránky 1652–1658.
36. Cassada, D.A., a další. Sensitive determination of RDX, nitroso-RDX metabolites, and other munitions in ground water by solid-phase extraction and isotope dilution liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1999, 844, stránky 87-95.
37. Furton, K.G., a další. Application of solid-phase microextraction to the recovery of explosives and ignitable liquid residues from forensic specimens. *Journal of Chromatography A*. 2000, 885, stránky 419–432.
38. Parham, Hooshang a Saeed, Sedighe. Pre-concentration and determination of traces of nitrobenzene and 1,3-dinitrobenzene in water samples using anthracite adsorbent. *Journal of Industrial and Engeneering Chemistry*. 2013, 20.
39. Qi, Dongjin, Kang, Xuejun a Chen, Liqin. Electrospun polymer nanofibers as a solid-phase extraction sorbent for the determination of trace pollutants in environmental water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2008, 390.
40. Sun, Wanqi, Liang, Miao a Li, Zhen. Ultrasensitive detection of explosives and chemical warfare agents by low-pressure photoionization mass spectrometry. *Talanta*. 2016, Sv. 156-157.

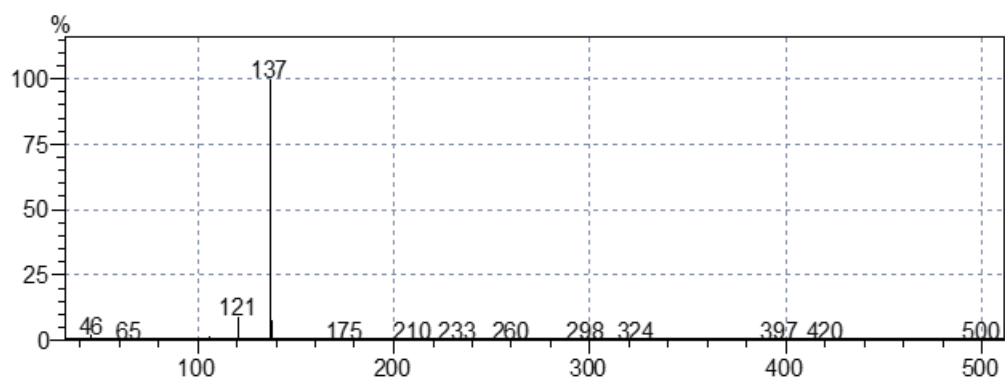
41. Govindasamy, Mani, Mani, Veerappan a Chen, Shen-Ming. Highly Sensitive Amperometric Sensor for Nitrobenzene Detection Using Functionalized Multiwalled-Carbon Nanotubes Modified Screen Printed Carbon Electrode. *International Journal of Electrochemical Science*. 2016, 11.

42. Suchánek, Miloslav a Milde, David. *KVALIMETRIE 20*. Praha : EURACHEM-ČR, 2015. 978-80-86322-00-1.

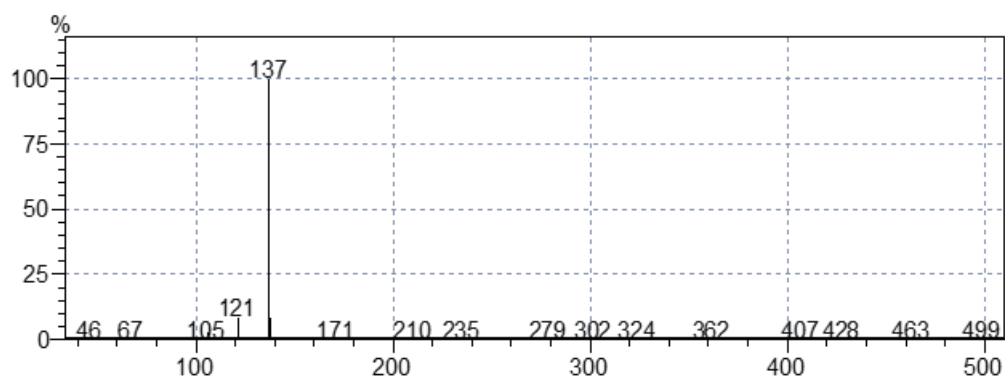
## 7. PŘÍLOHY



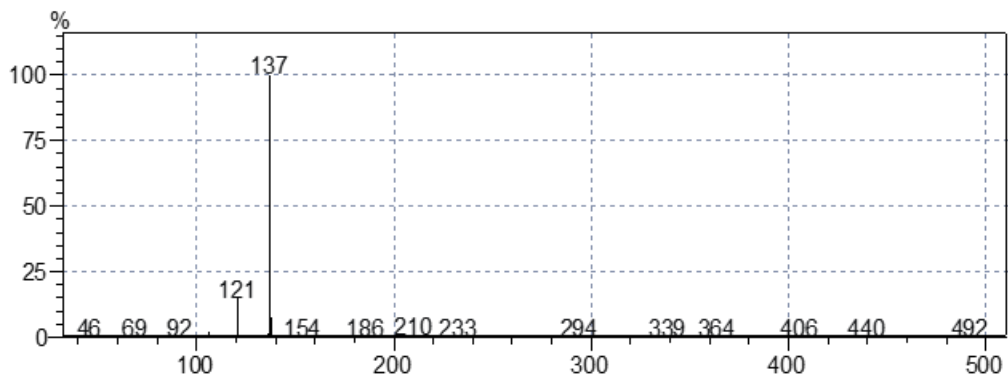
Příloha 1 - Spektrum nitrobenzenu



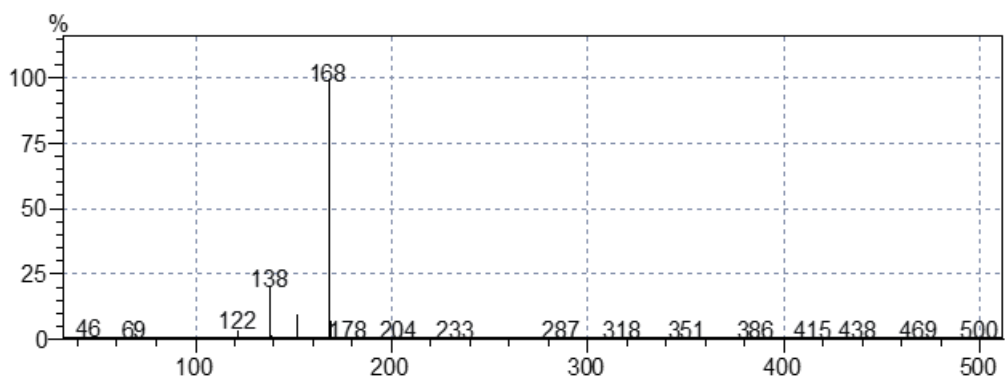
Příloha 2 - Spektrum 2-nitrotoluenu



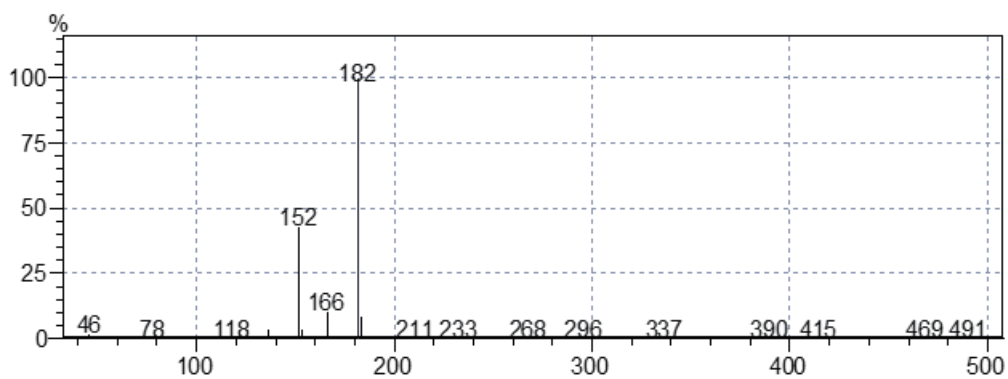
Příloha 3 - Spektrum 3-nitrotoluenu



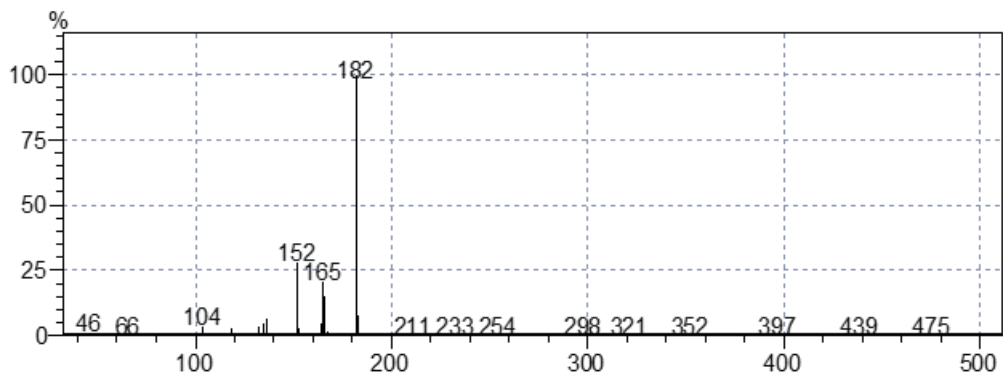
Příloha 4 - Spektrum 4-nitrotoluenu



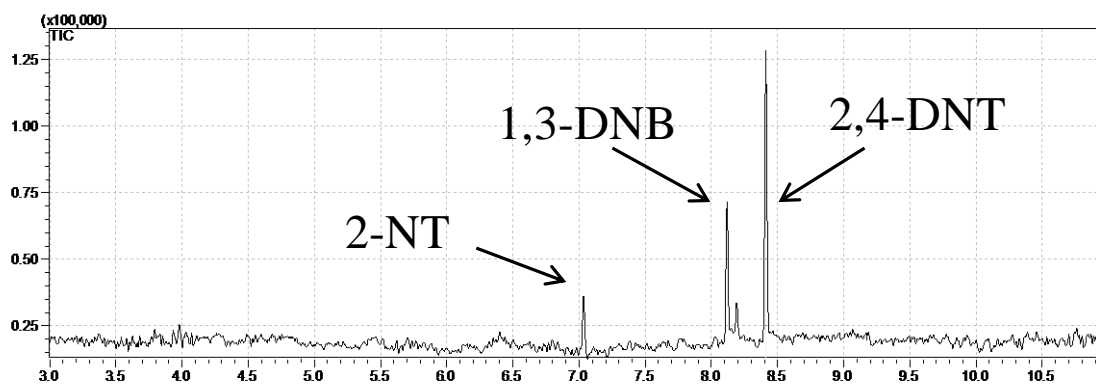
Příloha 5 - Spektrum 1,3-dinitrobenzenu



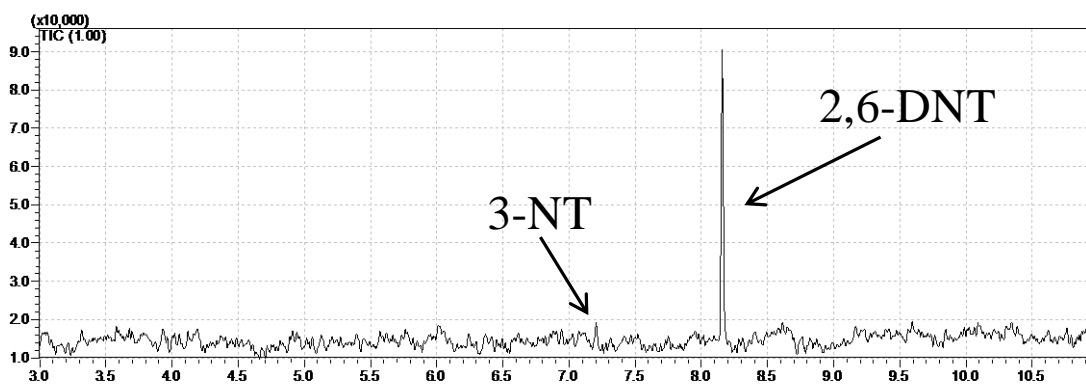
Příloha 6 - 2,6-dinitrotoluen



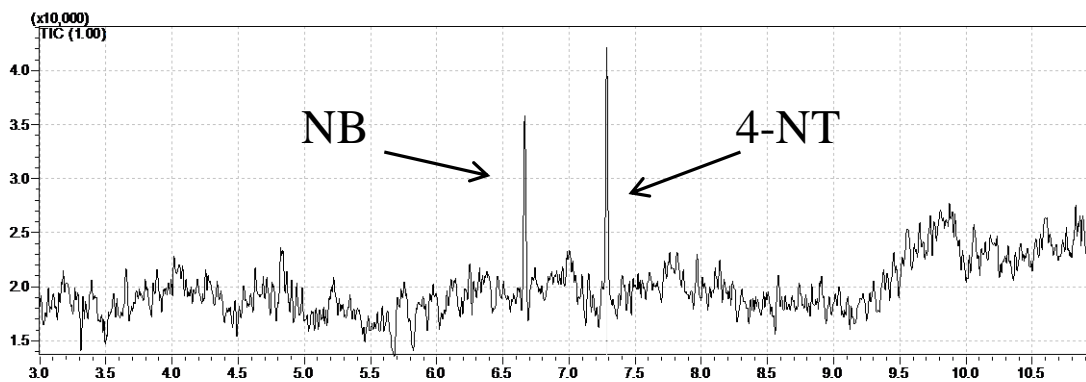
Příloha 7 - Spektrum 2,4-dinitrotoluenu



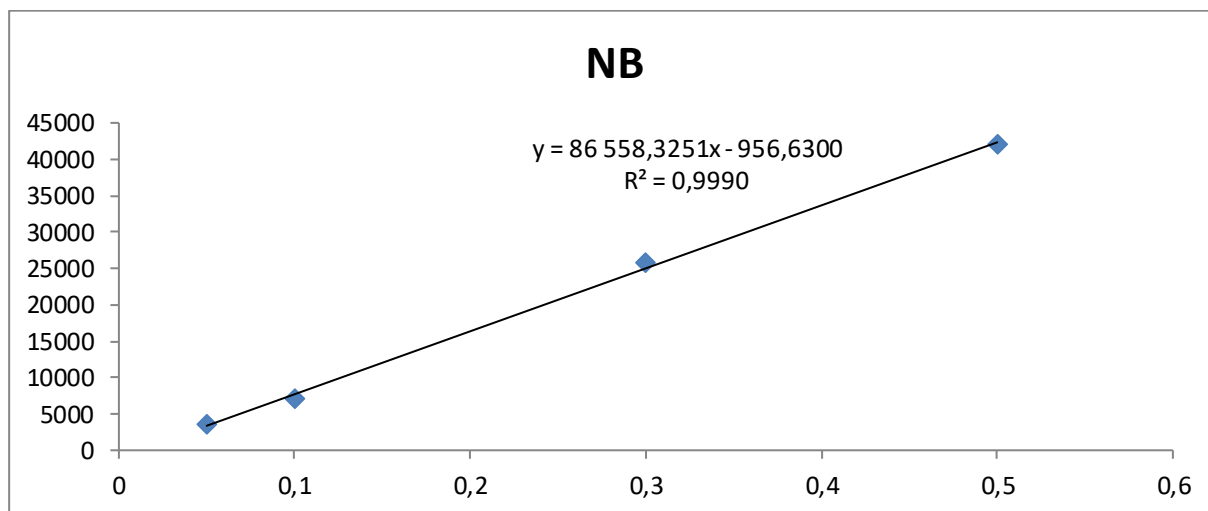
Příloha 8 - Chromatogram 1. roztoku. Obsahuje 2-nitrotoluen, 1,3-dinitrobenzen a 2,4-dinitrotoluen



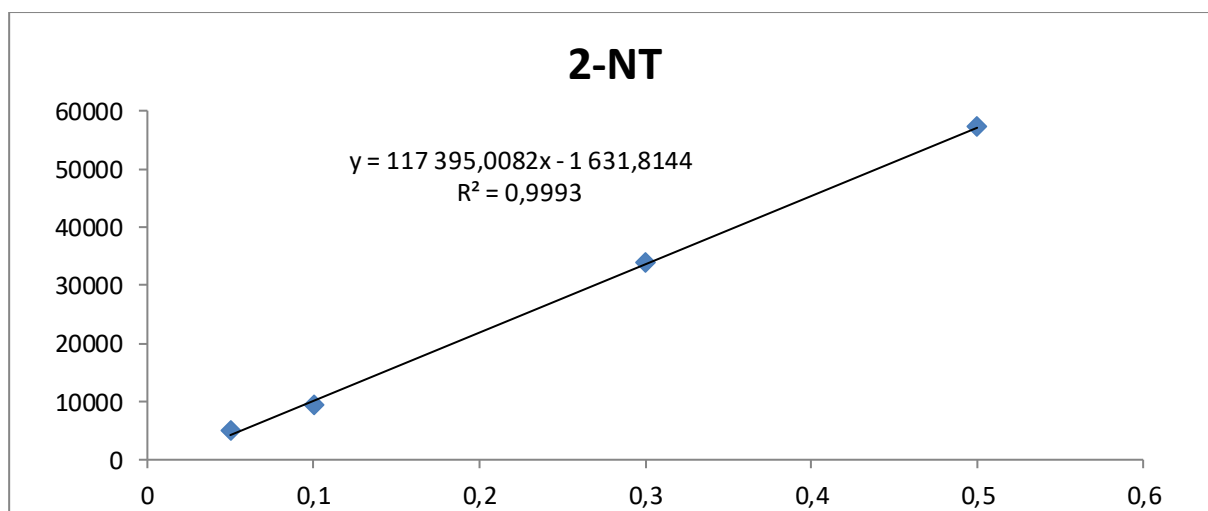
Příloha 9 - Chromatogram 2. roztoku. Obsahuje 3-nitrotoluen a 2,6-dinitrobenzen



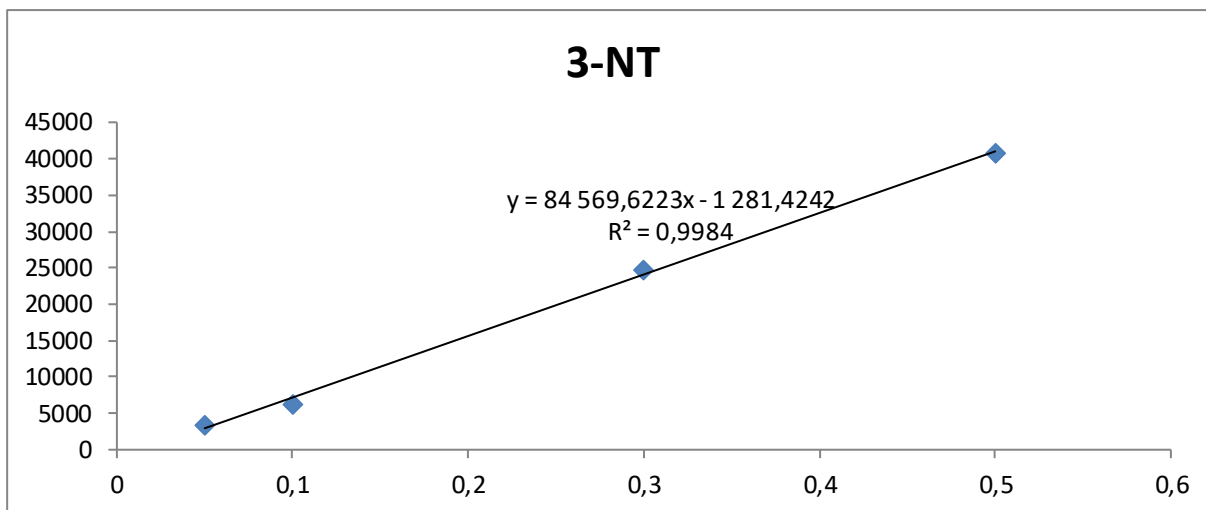
Příloha 10 - Chromatogram 3. roztoku. Obsahuje nitrobenzen a 4-nitrotoluen



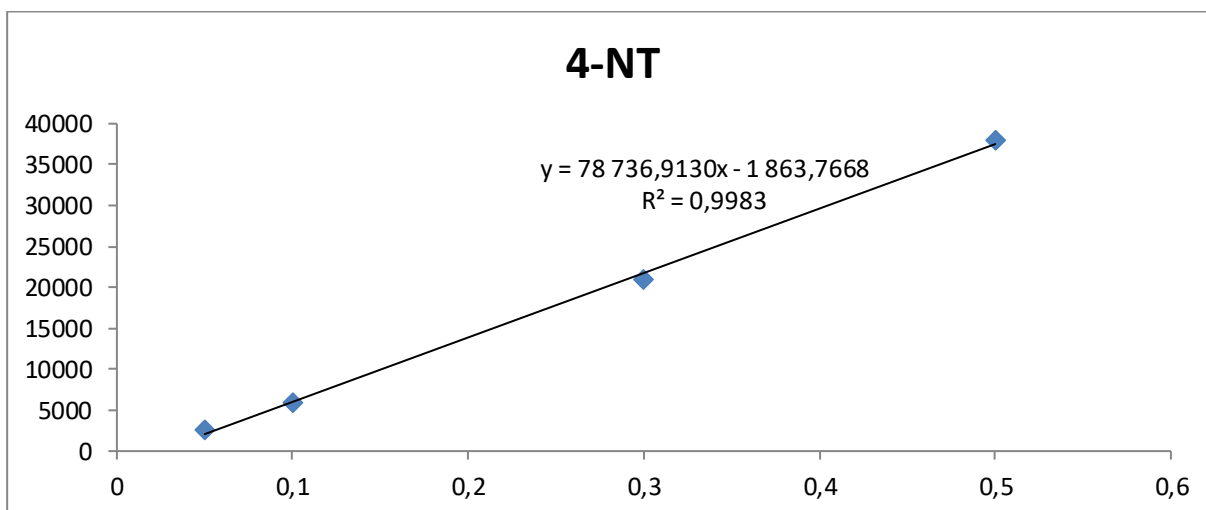
Příloha 11 - Kalibrační křivka nitrobenzenu



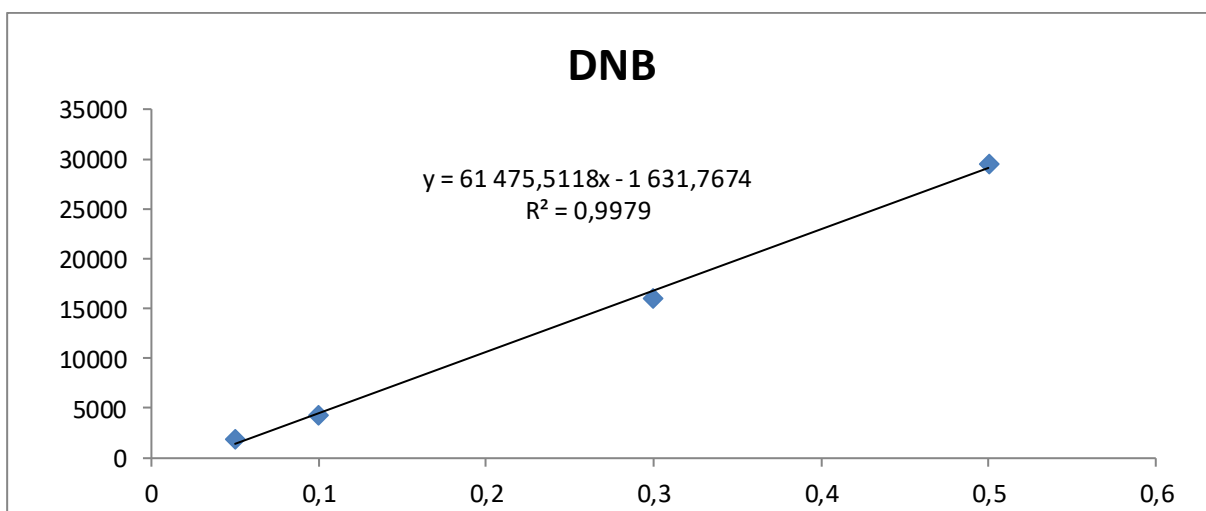
Příloha 12 - Kalibrační křivka 2-nitrotoluen



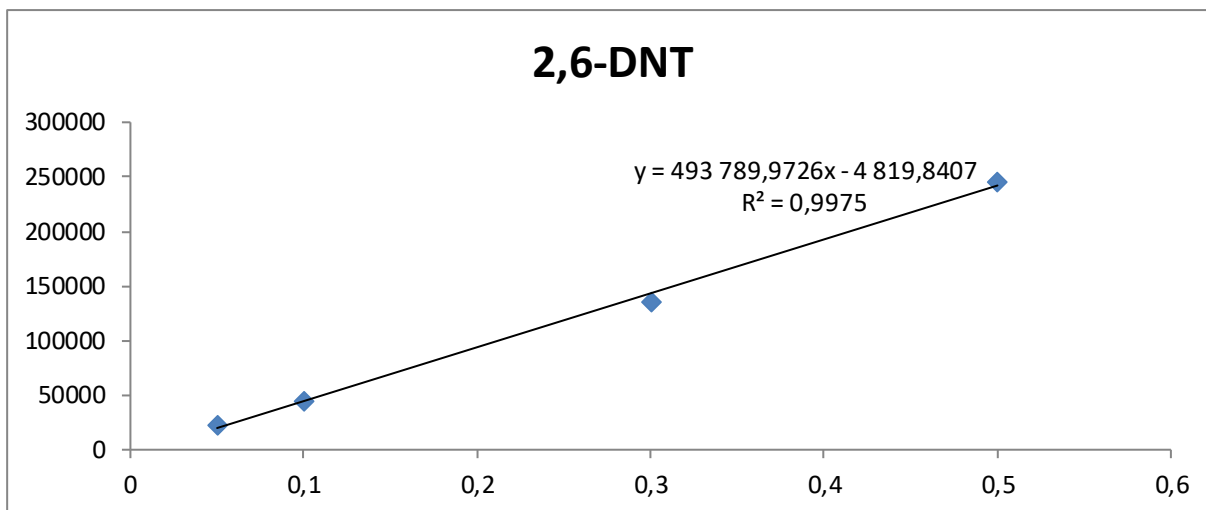
Příloha 13 - Kalibrační křivka 3-nitrotoluenu



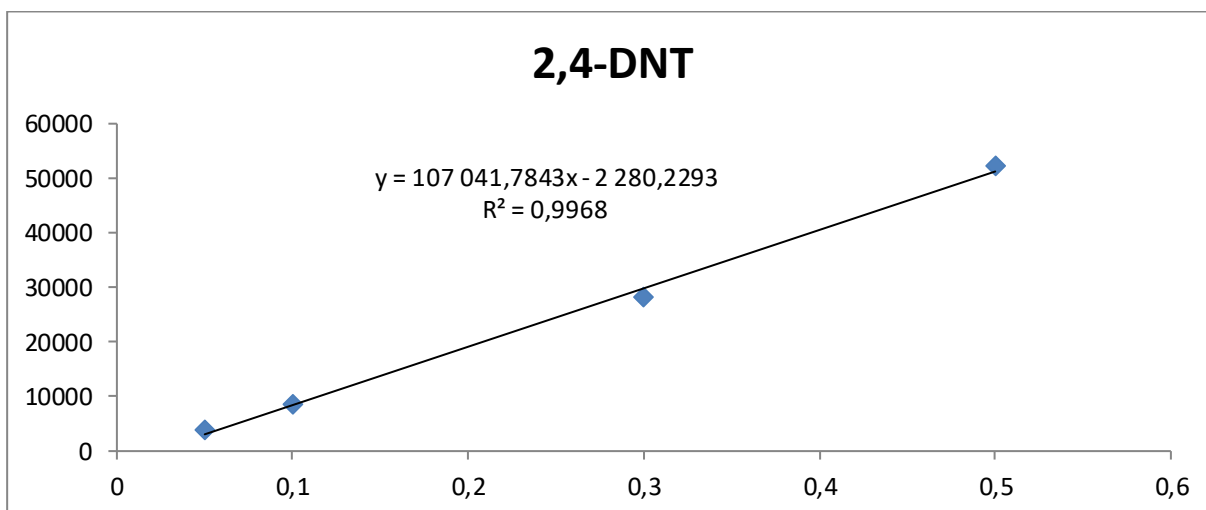
Příloha 14 - Kalibrační křivka 4-nitrotoluenu



Příloha 15 - Kalibrační křivka 1,3-dinitrobenzenu



*Příloha 16 - Kalibrační křivka 2,6-dinitrotoluenu*



*Příloha 17 - Kalibrační křivka 2,4-dinitrotoluenu*