

UNIVERZITA PARDUBICE
Fakulta chemicko-technologická

**STANOVENÍ REZIDUÍ VE VYBRANÝCH KOMODITÁCH PO
OŠTŘENÍ FUMAGANTY KYANOVODÍKEM A DIKYANEM**

Bc. Nikola Havelková

Diplomová práce

2017

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

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Nikola Havelková**
Osobní číslo: **C15580**
Studijní program: **N1407 Chemie**
Studijní obor: **Analytická chemie**
Název tématu: **Stanovení reziduí ve vybraných komoditách po ošetření fumiganty kyanovodíkem a dikyanem**
Zadávající 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. Proveďte literární rešerši zaměřenou na obecné rozdělení fumigantů a na možnosti stanovení kyanovodíku a dikyanu.
2. V experimentální části navrhnete a následně validujete metodu HS-SPME/GC. Tuto metodu aplikujte na reálné vzorky.
3. Závěry kriticky zhodnoťte.


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

Vedoucí diplomové práce: **prof. Ing. Karel Ventura, CSc.**
Katedra analytické chemie
Konzultant diplomové práce: **Mgr. Milan Dlouhý**
Lučební závody a.s., Draslovka, Kolín
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 vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena 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 12. 5. 2017

Bc. Nikola Havelková

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat vedoucímu práce prof. Ing. Karlu Venturovi CSc. za odborné vedení a za to, že mi bylo vyhověno pracovat na diplomové práci mimo fakultu. Chtěla bych také poděkovat odbornému konzultantovi Mgr. Milanu Dlouhému za odborné vedení a cenné rady, které mi pomohly tuto práci zkompletovat.

Velké poděkování náleží firmě Lučební závody Draslovka a.s. Kolín, že mi umožnila vypracovat mou diplomovou práci v rámci výzkumu.

V neposlední řadě patří poděkování mému příteli, celé mé rodině a nejbližším za podporu, trpělivost a povzbuzování po dobu mého studia.

V Pardubicích dne 12. 5. 2017

Bc. Nikola Havelková

Anotace

Tato diplomová práce se zabývá stanovením reziduí ve vybraných komoditách, a to v mouce a zrní, po ošetření fumiganty kyanovodíkem a dikyanem. Teoretická část se zabývá fumiganty a rozdělení fumigantů. Dále pojednává o využívaných fumigantech v této době, o fosfinu, kyanovodíku a dikyanu, o jejich vlastnostech, výrobě a použití. V druhé polovině popisuje analytické a instrumentální metody stanovení kyanovodíku a dikyanu a především pojednává o stanovení pomocí plynové chromatografie v kombinaci s technikou headspace mikroextrakce tuhou fází (HS-SPME/GC).

Cílem experimentální části bylo ověřit vybrané validační parametry metody HS-SPME/GC, konkrétně linearitu, mez detekce (LOD), mez stanovitelnosti (LOQ) a opakovatelnost. Poté byla metoda aplikována na vybrané komodity, zrní a hrubou mouku.

Klíčová slova

Kyanovodík, dikyan, fumigant, stanovení, HS-SPME/GC

Title

Determination of residues in selected commodities after treatment with hydrogen cyanide and cyanogen fumigants.

Annotation

This master's thesis deals with determination of residues in selected commodities, in flour and grain, after treatment with hydrogen cyanide and cyanogen fumigants. The theoretical part informs about fumigants and the distribution of fumigants. It also deals with the fumigants used at the time, about phosphine, hydrogen cyanide and cyanogen. It informs about their properties, preparation and use. In the second half, the analytical and instrumental methods of cyanide and cyanogen determination especially the gas chromatography combined with the headspace solid phase microextraction technique (HS-SPM/GC) are described.

The aim of the experimental part was to verify the selected validation parameters of the HS-SPME/GC method, namely linearity, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and repeatability. The method was then applied to selected commodities, grain and flour.

Keywords

Hydrogen cyanide, cyanogen, fumigant, determination, HS-SPME/GC-NPD

Obsah

1	Úvod	9
2	Fumigace	10
2.1	Fumiganty	10
2.2	Fosfin	11
2.2.1	Výroba	11
2.2.2	Využití	12
2.3	Kyanovodík	12
2.3.1	Výroba	13
2.3.2	Využití	14
2.4	Ethandinitril	14
2.4.1	Výroba	15
2.4.2	Využití	16
3	Stanovení vybraných fumigantů	17
3.1	Argentometrická titrace	17
3.2	Fotometrické stanovení	18
3.3	Plynová chromatografie	19
3.3.1	Nosný plyn	20
3.3.2	Dávkovací systémy	20
3.3.3	Chromatografické kolony	20
3.3.4	Detektory	20
3.3.5	Stanovení HCN, EDN	22
4	Mikroextrakce tuhou fází	23
4.1	Zařízení pro mikroextrakci tuhou fází	23
4.2	Princip metody HS-SPME	24
4.3	Optimalizace metody	25
4.3.1	Stacionární vrstva	25
4.3.2	Délka doby sorpce	27
4.3.3	Způsob vzorkování	28
4.3.4	Zahřívání vzorku	28
4.3.5	Míchání vzorku	28
4.4	Využití SPME	28
4.5	Stanovení HCN pomocí SPME	28
5	Validace metody	30
5.1	Linearita	30
5.2	Opakovatelnost	30

5.3	Mez detekce	30
5.4	Mez stanovitelnosti	30
5.5	Statistické parametry pro zpracování naměřených dat	31
5.5.1	Aritmetický průměr	31
5.5.2	Směrodatná odchylka	31
5.5.3	Relativní směrodatná odchylka	31
6	Experimentální část	32
6.1	Použité chemikálie	32
6.2	Přístroje a zařízení	32
6.3	Příprava roztoků.....	33
6.3.1	Příprava 1% vodného roztoku kyseliny borité	33
6.3.2	Příprava roztoku 0,1M dusičnanu stříbrného	33
6.3.3	Příprava pyridinového roztoku kyseliny barbiturové	34
6.3.4	Příprava roztoku kyanovodíku	34
6.3.5	Příprava roztoku dikyanu.....	34
6.3.6	Příprava vzorků	34
6.4	Měření a stanovení.....	34
6.4.1	Stanovení koncentrace zásobního roztoku HCN a EDN.....	34
6.4.2	Fotometrické stanovení kyanovodíku v ošetřených komoditách	34
6.4.3	HS-SPME	35
6.4.4	GC.....	35
7	Výsledky a diskuze.....	36
7.1	Optimalizace extrakčních podmínek	36
7.2	Validace metody	43
7.2.1	Opakovatelnost	43
7.2.2	Linearita.....	44
7.2.3	Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti	46
7.3	Analýza vzorků	46
8	Závěr.....	50
9	Seznam obrázků	52
10	Seznam grafů.....	53
11	Seznam tabulek.....	54
12	Seznam zkratk.....	55
13	Seznam literatury.....	56

1 Úvod

Fumigace patří mezi nejdůležitější opatření v ochraně před skladištními škůdci. Používá se k ošetření především zemědělských produktů a je vhodná také k dezinfekci velkých, členitých a málo přístupných prostorů. Methylbromid byl nejpoužívanějším a nejúčinnějším fumigantem, ale na základě Montrealského protokolu bylo jeho používání jako pesticid zakázané. V širokém užívání proto zůstává pouze fosfin a kyanovodík. Dikyan se jeví jako možná alternativa místo metylbromidu.

Kyanovodík a dikyan se stanovují pomocí instrumentálně-analytických metod. Mezi nejčastěji používané metody se řadí plynová chromatografie. Umožňuje současně kvantitativní i kvalitativní analýzu. Je to vysoce citlivá a selektivní metoda. Její výhodou je rychlost a možnost kombinace s jinými instrumentálními technikami.

Cílem diplomové práce je navrhnout a následně validovat metodu headspace mikroextrakce tuhou fází v kombinaci s plynovou chromatografií, která je vhodná pro stanovení reziduí fumigantů kyanovodíku a dikyanu v ošetřených obilovinách. Experimentální část je věnována optimalizaci této metody pro roztoky kyanovodíku a dikyanu.

2 Fumigace

Fumigace neboli plynování, patří již několik desetiletí k nejdůležitějším opatřením v ochraně před skladištními škůdci především v potravinářském průmyslu. Pro efektivní aplikaci je nutno prostor nebo zboží dokonale utěsnit. Fumigační fólií se nejčastěji vyrábí z polyethylenu. Dále se používají pro výrobu fólií nylon, polyvinylchlorid nebo laminát.^{1,2}

Fumigace se využívá především jako ochrana zemědělských produktů, např. obilovin, luštěnin, kávy, tabáku a také při ochraně zemědělských výrobků, které je nutno chránit proti hmyzu a roztočů. Plynování je také vhodné k dezinfekci velkých, členitých a málo přístupných prostorů např. obilných mlýnů, pivovarů nebo sladoven, plyny pronikají rovněž do členitých podzemních hnízdních systémů škodlivých hlodavců.^{1,2,3}

Tato metoda má celou řadu předností. Plyny zanechávají mnohem méně reziduí než klasické postřikové pesticidy, které mají dlouhodobý vliv na životní prostředí a poměrně rychlý vznik rezistence škůdců. Navíc hubení klasickými postřiky většinou zasáhne dospělou populaci, zatímco larvy uvnitř objektu mohou bez zábran pokračovat ještě nějakou dobu v likvidaci zemědělských produktů. Mezi velké nevýhody patří velká akutní jedovatost plynů pro člověka a teplokrevné živočichy.^{2,4}

2.1 Fumiganty

Fumiganty jsou chemické látky, které za požadované (většinou běžné) teploty a tlaku mohou existovat v plynném stavu v dostatečné koncentraci, která je smrtelná pro škodlivé organismy. Účinek fumigantů je ovlivňován řadou faktorů - teplotou, vlhkostí substrátu, množstvím příměsí a cizích látek v substrátu (prach, nečistoty apod.), hermetičností fumigovaného prostoru aj.⁵

Podle chemického složení dělíme fumiganty do osmi skupin:⁶

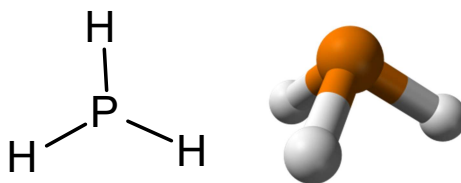
1. siřné sloučeniny (SO₂),
2. fosfidy (fosfín),
3. kyanové sloučeniny (kyanovodík),
4. nitrosloučeniny (akrylonitril),
5. halogenové sloučeniny (methylbromid),
6. kyslíkaté sloučeniny (ethylenoxid),
7. formiáty (methylformiát, ethylformiát),
8. pevné fumiganty (naftalen).

Ideální fumigant musí splňovat několik požadavků. Musí být toxický pro cílového škůdce, mít vysoký difúzní penetrační potenciál, mít nízkou reaktivitu s ošetřovaným produktem, vytvářet neškodné metabolity, jeho použití musí být snadné, musí být snadno detekovatelný, být chemicky nestabilní v atmosféře a nesmí poškozovat ozonovou vrstvu.⁷

Těmto požadavkům vyhovuje jen několik málo preparátů. V širokém užívání proto zůstává v boji proti skladištním škůdcům pouze fosfin, kyanovodík a methylbromid. Poslední z nich byl kvůli poškozování ozónové sféry zakázán na základě Montrealského protokolu. Mimo tyto nejznámější byla k fumigaci v minulosti využívána celá řada plynů jako například plynný chlór, paradichlórbenzen, chlorpikrin, ethylenoxid, ethylenbromid, hexachlorpropen, propylendi-chlorid, sulfurylfluorid atd.^{4,7}

2.2 Fosfin

Fosfin je bezbarvý plyn. Čistá sloučenina je bez zápachu. Nepříjemný zápach popsany jako „rybí“ nebo „česnekový“ je způsoben přítomností substituovaných sloučenin fosfinu a difosfinu (P_2H_4). Práh zápachu je 0,14 ppm.^{8,9}



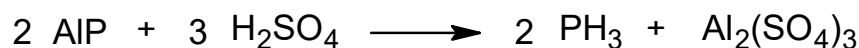
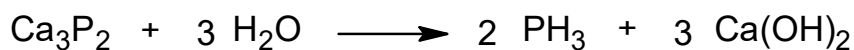
Obrázek 1 – Vzorec a struktura fosfinu¹⁰

Je hořlavý a výbušný, může samovzplanout již při velmi nízkých teplotách. Dodáván je jako zkapalněný stlačený plyn. Je málo rozpustný ve vodě i organických rozpouštědel. Při orálním podávání fosfidu zinečnatého potkanům byla zjištěna LD_{50} 40,5-2,9 mg/kg.^{8,9}

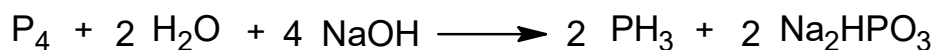
Vdechování fosfinu může způsobit vážné plicní podráždění vedoucí k akutnímu plicnímu edému, kardiovaskulární dysfunkci, gastrointestiálními poruchám, poškození ledvin, excitaci centrální nervové soustavy, kóma i smrt. Kontakt s kapalinou může způsobit omrzliny.^{8,9}

2.2.1 Výroba

Fosfin, CAS 7803-51-2, vzniká rozkladem fosfidů ve vlhkém prostředí nebo reakcí s ředěnými kyselinami:¹¹



Fosfin vzniká i reakcí bílého fosforu s vodou v alkalickém prostředí: ¹²



2.2.2 Využití

Fosfin se používá v polovodičovém průmyslu, jako příměs do elektronických součástek, v chemickém průmyslu jako iniciátor polymerace. Jeho fosfidy, fosfid vápenatý a hlinitý, se používají jako insekticidy nebo rodenticidy. Jeho hlavní využití je ale jako fumigační plyn. Patří k nejvíce užívaným fumigantům při ochraně skladovaných produktů. Při fumigaci obilovin je pak zcela dominantním fumigantem v ČR i v celosvětovém měřítku. Má však i některé vážné nedostatky, např. relativně dlouhou dobu expozice, má vysokou specifickou toxicitu pro savce, koroduje některé kovy, škůdci se díky jeho velkému používání stávají vůči fosfinu rezistentní. Právě díky těmto skutečnostem se hledají další fumiganty s lepšími vlastnostmi. ^{7, 8, 13}

2.3 Kyanovodík

Kyanovodík, HCN, CAS 74-90-8, je velmi slabá, bezbarvá kyselina. Při koncentracích vyšších než 2 g/m³ má čistý kyanovodík charakteristickou vůni po hořkých mandlích. Je vysoce těkavý, a to již za normálních podmínek (b. v. 25°C). ^{14, 15}



Obrázek 2 – Vzorec a struktura kyanovodíku ¹⁶

Plynná fáze tvoří ve směsi se vzduchem výbušnou směs a je lehčí než vzduch. Meze výbušnosti se vzduchem jsou od 5,6 do 40 objemových %. Bod vzplanutí je -17,8°C, teplota vznícení 538 °C. Kapalný kyanovodík má sklon k polymerizaci. Tato reakce se katalyzuje alkalickými látkami a vznikajícím čpavkem z rozkládajícího se kyanovodíku, přičemž může docházet k výbuchu. Je rozpustný ve vodě a dobře se váže na tuky. ¹⁵

Do organismu proniká kyanovodík velmi rychle všemi cestami - sliznicemi, kůží i plícemi. Kyanovodík může velmi lehce pronikat buněčnými membránami. Kyanidový anion má vysokou afinitu k železitým iontům. Po průniku do buňky velmi rychle reaguje s trojmocným železem enzymu cytochromoxidasy dýchacího řetězce v mitochondriích. Je tak zablokovan přenos elektronu na molekulární kyslík, který pak nemůže být využit pro oxidační pochody. Vzhledem k tomu, že tkáň nemohou zpracovávat kyslík, obsahuje

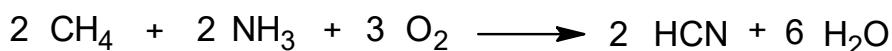
i žilní krev mnoho oxyhemoglobinu a je tudíž světle červená. Barva kůže je proto růžová.¹⁷

Kyanovodík patří k nejrychleji působícím jedům. Nejrychlejší je průběh otravy po inhalaci par kyanovodíku - smrt nastává v průběhu několika sekund. Při požití anorganických kyanidů se kyanovodík uvolňuje působením kyseliny chlorovodíkové v žaludku a první příznaky otravy se objeví po několika sekundách. Smrtnou dávkou kyanovodíku pro člověka je 50 mg, v případě kyanidu draselného 200 mg. Otrava se začíná projevovat nejprve u tkání s největšími nároky na kyslík. Nejcitlivější je nervová tkáň - prvními příznaky při otravě kyanidy jsou únava, bolesti hlavy, hučení v uších a nevolnost. Po inhalaci kyanovodíku se rychle dostavuje závrat, zmatenost, křeče, zvracení, tachykardie, bezvědomí a bleskově dochází ke smrti zástavou dýchání. Smrt nastává jako důsledek nedostatku kyslíku v životně důležitých centrech v prodloužené míše. Nízké koncentrace kyanovodíku (20 – 40 mg/m³) dráždí spojivky a dýchací cesty.¹⁷

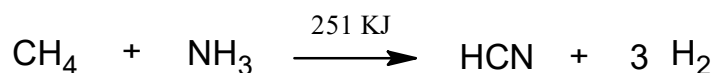
Pro DDD činnost je dodáván přípravek s obchodním názvem BLUEFUME, který vyrábí společnost Lučební závody Draslovka Kolín a.s. (LZ Draslovka) BLUEFUME je stabilizovaný kapalný kyanovodík (min. 97,6%), zcela nasáklý do porézní hmoty, plynotěsně uzavřený v plechovkách. Stabilizace se provádí kyselinou fosforečnou v množství 0,1 % a oxidem siřičitým v množství 0,9 – 1,1 %. Je zařazen do skupiny vysoce toxických látek a extrémně hořlavých ve smyslu platných předpisů o nebezpečných látkách zdraví škodlivých. Při práci s ním musí být dodržena opatření a požadavky vyplývající ze zákona pro zacházení s látkami vysoce toxickými.^{18,19}

2.3.1 Výroba

Kyanovodík se vyrábí dvěma způsoby ze zemního plynu. První způsob výroby kyanovodíku vychází z reakce methanu a amoniaku přibližně ve stejném množství se 75 obj. % vzduchu. Reakce vyžaduje katalyzátor, slitinu platiny a rhodia, a teplotu přibližně 1100 – 1200°C, ale reakce je natolik exotermní, že není nutno dodávat teplo externě. Tato reakce se označuje jako Andrussowa oxidace.^{20,21}



Druhý způsob výroby kyanovodíku, označován jako proces Degussa, dává reakci amoniaku s methanem za přítomnosti vzduchu a použití katalyzátoru slitin platiny, hliníku a ruthenia při teplotě 1200°C. Reakce je endotermní, a proto je nutno teplo soustavě dodávat. Díky této skutečnosti je tento způsob méně využíván.^{20,21}



2.3.2 Využití

Hlavním využitím kyanovodíku je při výrobě organických chemikálií (např. akrylonitril, methylnmethakrylát, adiponitril), které se dále používají pro výrobu syntetických vláken a plastických hmot (např. akrylových pryskyřic). Kyanovodík je výchozím činidlem také pro výrobu kyanidu sodného, kyseliny nitrilotrioctové, chelatačních činidel a řady dalších látek. Kyanovodík se dále využívá při různých průmyslových procesech, např. kalení oceli, barvení a při výrobě výbušnin. Je také účinným deratizačním a insekticidním prostředkem.¹⁹

Významným zdrojem emisí kyanovodíku je metalurgický průmysl. Používá se při těžbě kovů, galvanickém pokovování, při zplyňování uhlí a v hutnictví.²²

HCN s komerčním názvem BLUEFUME je využívám jako fumigační prostředek, který je zaregistrovaný pod číslem CZ-0008969-0000 s komerčním využitím jako biocid. Používá se jako konzervační přípravek proti působení dřevokazných nebo dřevo znetvořujících organismů. Konzervují se dřeva včetně řeziv nebo dřevěných výrobků. Používá se k dezinfekci v prázdných prostorách, především pro hubení členovců. Mezi jeho výhody oproti fosfinu patří zejména skutečnost, že se jedná o látku vyskytující se (byť v minimálních koncentracích) v přírodě, mající značnou penetrační schopnost, dále je velmi reaktivní a tedy snadno odbouratelný a nezanechává nežádoucí rezidua. Je velmi vhodný pro ošetřování velkých objemů skladovaného rostlinného materiálu. Problémem může být extrémní toxicita plynného kyanovodíku pro teplokrevné organismy.^{18, 19, 23}

2.4 Ethandinitril

Ethandinitril, nebo-li dikyan, CAS 460-19-5, EDN, je bezbarvý hořlavý plyn. Je to chemická sloučenina s velmi malým rozdílem teploty varu (-21 °C) a teploty tuhnutí (-28 °C). Vykazuje druhou nejvyšší známou teplotu hoření 4640 °C. Má pronikavý zápach po hořkých mandlích.^{24, 25}



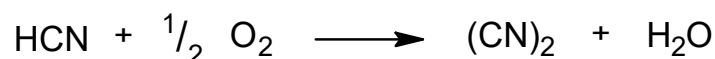
Obrázek 3 – Vzorec a struktura ethandinitrilu²⁶

Dikyan je označován jako lakrimátor, slzotvorná látka. Může být sorbován přes kůži. Dráždí oči, nos a horní cesty dýchací. Jeho dráždivé vlastnosti byly testovány

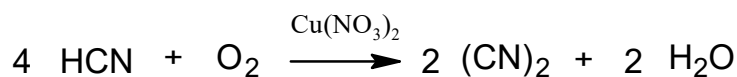
jak u mužů, tak i u žen od 21-65 let. Jeho typický zápach po hořkých mandlích nebyl detekován u koncentrací 50, 100 a 250 ppm. Při koncentracích 8 a 16 ppm došlo k podráždění očí a nosu až po působení 6-8 minut. Po dlouhodobém působení může dojít až ke ztrátě zraku. Dikyan se snadno rozpadá, čímž se získá jedna molekula kyanovodíku a jedna molekula kyanatanu. Na základě toho se předpokládá, že dikyan má srovnatelné toxické účinky jako kyanovodík. Po uvolnění kyanidového iontu v těle způsobuje asfyxii, dušení z nedostatku vzduchu. Příznaky se objevují během několika sekund nebo minut po požití nebo vdechnutí par. Mezi příznaky patří třeshňově červené rty, zrychlené dýchání, zpomalení srdeční frekvence, bolesti hlavy, závratě, křeče. Smrt nastává během několika minut po velké dávce.²⁴

2.4.1 Výroba

Dikyan se vyrábí několika způsoby. První způsob výroby je oxidací kyanovodíku vzduchem s použitím katalyzátoru jako stříbro na nosiči z inertního porézního materiálu, např. křemelina, „Alfrax“, tj. komerční forma oxidu hlinitého a lze použít i silikagel. Maximální výtěžek však byl pouze 22,87% dikyanu, a to při reakční teplotě 500 °C.²⁷



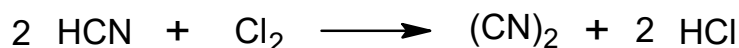
Lepších výtěžků se dosáhne katalytickou oxidací kyanovodíku vzduchem (kyslíkem) v roztoku alespoň 0,01mol/l dusičnanu měďnatém v alifatických etherech jako např. dialkyletery etylenglykol, například dimethylether nebo diethylether, nebo v nitrilech, např. acetonitrilu, které obsahují od 0-20 hmotnostních % vody. Vodu je nutno ze systému odstraňovat např. azeotropickou destilací s benzenem nebo 1-chlorbutanem, nebo použitím dehydratačního činidla, např. oxid fosforečný.²⁸



Oxidací kyanovodíku použitím oxidačního činidla oxidu dusičitého vzniká dikyan a oxid dusnatý, který lze snadno oddělit od produktu a lze ho oxidovat proudem vzduchu a recyklovat. Používá se katalyzátor z vápenných kuliček a sloučenin sodíku, hořčíku a vápníku na nosičích s nízkou povrchovou plochou. Za atmosférického tlaku a při teplotě 200 – 350°C lze dosáhnout velmi vysokého výtěžku dikyanu a nevznikají nežádoucí vedlejší produkty.²⁹



Dikyan vzniká reakcí kyanovodíku a chloru v plynné fázi při dostatečně vysoké teplotě. Při reakci nevznikají žádné nežádoucí polymerní produkty. Pokud je reakční komora prázdná nebo je z křemenné trubice s hladkými stěnami, je nutno udržet reakční teplotu od 600 °C do 700 °C, aby se dosáhlo konverze kyanovodíku na dikyan. Na druhou stranu lze reakci provést už při teplotách okolo 200 °C, a to v případě, kdy je reakční komora naplněna povrchově aktivními látkami, např. aktivním uhlím nebo silikagelem. Obecně platí, že čím větší je povrchová aktivita materiálu, tím nižší je reakční teplota.³⁰



2.4.2 Využití

Díky jeho vysoké teplotě hoření se používá ve směsi s kyslíkem jako svařovací médium. Využití se nachází především pro svařování a řezání nových tepelně odolných kovů. Je považován za slibné raketové palivo ve směsi s oxidačním činidlem, např. ozon nebo fluor. Je používán v organické syntéze pro meziproducty farmaceutického a agrochemického průmyslu. Jako vysoce čistý je používán pro přípravu polymerů ethandinitrilu (parakyan) v nanotechnologiích na polymerní polovodičové vrstvy.^{25, 31}

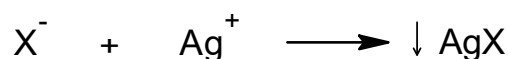
Vzhledem k jeho toxickým vlastnostem a schopnosti efektivního rozkladu v životním prostředí na amoniak a uhličitánový ion se používá ve směsi s kyanovodíkem, popř. s oxidem uhličitým jako fumigační přípravek jako náhrada za methylbromid. Jako fumigant se používá pro ochranu obilovin, včetně rýže, dřeva, ovoce a zeleniny před živočišnými škůdci, plísněmi a dalšími mikroorganismy. Ze stejných důvodů se používá jako sterilizační prostředek pro půdu.^{25, 31}

3 Stanovení vybraných fumigantů

Dle zadání diplomové práce bude věnována pozornost pouze kyanovodíku a dikyanu. Stanovení plynného kyanovodíku se nejčastěji provádí pomocí plynové chromatografie. Dikyan jako plyn se stanovuje též plynovou chromatografií. Po převedení kyanovodíku na kyanidy lze jejich stanovení provést několika způsoby a nejpoužívanější metody v praxi jsou argentometrická titrace a fotometrie. Uvedené metody budou ve stručnosti popsány.

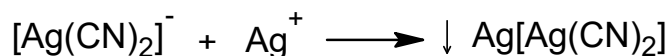
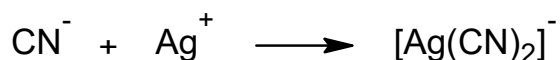
3.1 Argentometrická titrace

Argentometrie tzn. titrace odměrným roztokem AgNO_3 , je nejrozšířenější srážecí odměrnou metodou, jejíž princip vystihuje jednoduchá rovnice:



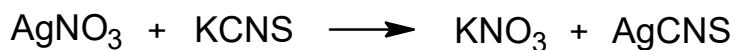
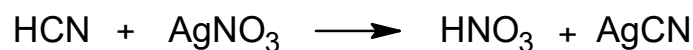
kde X^- jsou nejčastěji halogenidové (Cl^- , Br^- , I^-), kyanidové nebo thiokyanatanové ionty, tvořící vesměs málo rozpustné stříbrné soli. Ve všech případech je odměrným roztokem dusičnan stříbrný v koncentracích 0,05 až 0,1 mol/l. Titrační činidlo se připravuje z tuhého preparátu AgNO_3 . Odměrný roztok se standardizuje pomocí chloridu sodného p.a.. Roztok je nutný skladovat v tmavé láhvi vzhledem k jeho nestálosti.³²

Nejpoužívanější metoda pro stanovení kyanidů je metoda Liebigova, tj. titrace odměrným roztokem dusičnanu stříbrného na indikátor jodid draselný do vzniku trvalého zákalu.³³



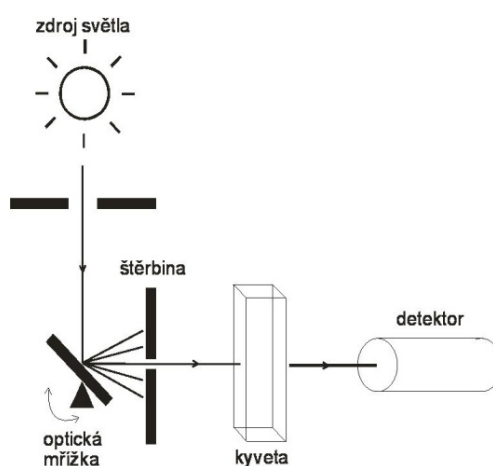
Spotřeba odměrného roztoku odpovídá obsahu kyanidů ve vzorku. Stanovení kyanovodíku lze provést též titrací, avšak je nutné do předlohy přidat hydroxid sodný pro převedení na kyanid sodný.³³

Pro stanovení volného kyanovodíku se využívá reakce kyanovodíku s dusičnanem stříbrným v kyselém prostředí. Přebytek dusičnanu stříbrného se retitruje thiokyanatanem draselným na indikátor $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 16\text{H}_2\text{O}$.³³



3.2 Fotometrické stanovení

Fotometrie patří pod UV-VIS spektrofotometrii, která je založena na absorpci ultrafialového nebo viditelného záření (200-800 nm) molekul ve zředěných roztocích. Principem fotometrie je měření prošlého zářivého toku (světla) ze zdroje měřeným absorbujícím prostředím, který dopadá na detektor. K měření se používají spektrofotometry, které obsahují monochromátor. Čím je vyšší koncentrace vzorku, tím větší je zeslabení původního záření.^{34, 35}



Obrázek 4 – Uspořádání spektrofotometru³⁶

Jako zdroj záření ve viditelné oblasti se nejčastěji používají wolframová a halogenová žárovka, pro ultrafialovou oblast se používá deuteriová lampa.³⁵

Monochromátor vstupující záření rozdělí na řadu monochromatických paprsků, z nichž je vybrána požadovaná vlnová délka. Skládá se ze vstupní štěrbinu pro přiváděný paprsek, disperzního prvku a výstupní štěrbinu pro paprsek vybrané vlnové délky. Jako disperzní prvky se používají hranol nebo mřížky.³⁴

Vzorek je umístěn v kyvetě. Kyveta je z materiálu, který v používané spektrální oblasti neabsorbuje záření, pro viditelnou oblast je ze skla obyčejného, organického (plexiskla) anebo z křemenného skla, pro UV oblast vyhovuje pouze sklo křemenné.³⁵

Jako detektory záření se nejčastěji používají fotonásobiče a diodová pole. Fotonásobič je běžně používaný detektor v ultrafialové s viditelné oblasti. Diodové pole je multikanálový detektor, jehož elementy měří najednou paprsek rozložený disperzním prvkem.³⁴

Při kvalitativní analýze slouží absorpční spektra pouze jako doplněk k identifikaci neznámých látek. Při kvantitativní analýze se měřená absorbance využívá k určení koncentrace sloučenin s chromofory. Obvykle se pracuje s metodou kalibrační křivky.³⁴

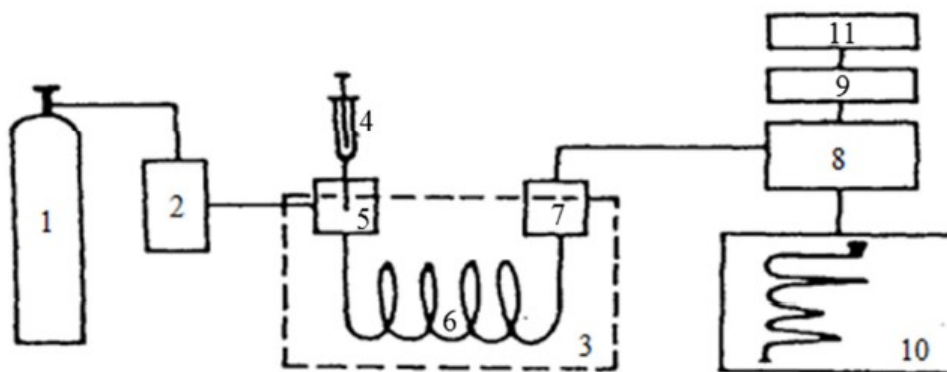
Stanovení kyanovodíku se provádí po oddestilování s vodní parou, kdy je veškerý kyanovodík v roztoku NaOH převeden na kyanid. Kyanidy reagují s chloraminem T na chlorkyan, který dává s pyridinovým roztokem kyseliny barbiturové při pH 4-5 červenofialové zbarvení vhodné pro fotometrii. Měří se absorbance při 580 nm proti slepému vzorku.³⁷

3.3 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je separační metoda, která k separaci plynů a par využívá dvě heterogenní fáze, mobilní a stacionární. Mobilní fáze je zpravidla inertní plyn (dusík, hélium). Stacionární fází je nejčastěji pevná nebo kapalná látka zakotvená na inertním nosiči. V prvním případě dochází k separaci na principu rozdělování analytu mezi kapalnou a plynnou fází, v druhém případě na principu adsorpce. Rozdělené složky jsou následně unášeny kolonou až k detektoru, kde jsou zaznamenány.^{38,39}

Značnou výhodou plynové chromatografie vůči ostatním chromatografickým metodám je použití plynu jako mobilní fáze. Nosný plyn je málo viskózní a je stlačitelný. Difúzní koeficienty složek v plynech jsou mnohem větší než v kapalinách a interakce molekul v plynné fázi jsou ve většině případů podstatně menší než v kapalně fázi.³⁸

Zařízení pro plynovou chromatografii, nebo-li plynový chromatograf, se skládá ze zdroje nosného plynu, dávkovacího zařízení, termostátové separační kolony, detektoru a vyhodnocovacího zařízení. Zdrojem plynné mobilní fáze a dalších pracovních plynů jsou tlakové láhve nebo v poslední době často používané generátory plynů (dusík, vzduch, vodík). Schematické znázornění je uvedeno na obr.^{38,39}



Obrázek 5 – Schematické znázornění GC, 1 – zdroj plynu, 2 – regulace tlaku a průtoku, 3 – termostát, 4 – mikrodávkač, 5 – nástřikové zařízení, 6 – kolona, 7 – detektor, 8 – zesilovač signálu, 9 – integrátor, 10 – zapisovač, 11 – tiskárna (části 9-11 bývají nahrazeny počítačem)³⁹

3.3.1 Nosný plyn

Volbu nosného plynu ovlivňuje více faktorů. Jedním z rozhodujících je typ použitého detektoru. Mezi další faktory patří inertnost, čistota, viskozita, hustota plynu a bezpečnost při práci. Jako nosné plyny se nejčastěji používají dusík, vodík a helium.³⁸

3.3.2 Dávkovací systémy

Úlohou dávkovače je dávkovat do kolony plynný, kapalný nebo tuhý vzorek. Při dávkování je třeba zajistit, aby vzorek v co nejkratším čase vnikl do kolony jako píst, aby se nezměnily tepelné a tlakové podmínky v koloně a aby dávkování bylo reprodukovatelné a po dobu dávkování nedocházelo ke změně složení vzorku.³⁸

U kapilárních kolon se zpravidla vzorek po zplynování v dávkovači rozdělí na dvě části. Hlavní část (např. 99 %) se nosným plynem vymyje do ovzduší a zbytek vzorku se nosným plynem přivede do kapilární kolony.³⁸

3.3.3 Chromatografické kolony

Chromatografické kolony jsou základní součástí plynového chromatografu. Existují dva typy kolon: náplňové a kapilární. Náplňové kolony se v dnešní době používají velmi málo, a to především pro separaci směsi plynů. Kapilární kolony se využívají pro separaci vysokomolekulárních a těkavých látek a všude tam, kde je třeba dosahovat vyšších separačních účinností. Vlastní chromatografická kolona musí být dobře termostatována tak, aby separační teploty byly dobře reprodukovatelné. Běžně se pracuje v režimu teplotního gradientu, kdy se teplota v termostatu mění během separace v závislosti na čase podle předem zvoleného programu.³⁹

3.3.4 Detektory

Po rozdělení látek v chromatografické koloně se jednotlivé složky směsi detekují pomocí detektoru. Od detektoru se vyžaduje rychlá odezva, velká citlivost a stabilita nulového signálu. Jeho odezva by měla být okamžitá a úměrná množství látky s co nejnižší mezí detekce, tj. odlišit slabý signál, který odpovídá malému množství stanovované látky, od šumu detektoru. Univerzální detektor, který by splňoval všechny požadavky, neexistuje.

^{38, 39}

Detektory je možno rozdělit na destrukční a nedestrukční. V nedestrukčních detektorech látka prochází detektorem, aniž by se chemicky změnila. Mezi tyto typy patří tepelně vodivostní detektor, detektor elektronového záchytu, argonový a héliový detektor, infračervený spektrometr a některé další. V destrukčních detektorech se látka při detekci

nevratně změní. Do této skupiny patří plamenový ionizační a termoionizační detektor a hmotnostní spektrometr.³⁸

Tepelně vodivostní detektor (Thermal Conductivity Detector – TCD)

Představuje univerzální detektor se středně velkou citlivostí. Principem je odvádění tepla proudem nosného plynu s vysokou tepelnou vodivostí (He, H₂) z rozžhaveného odporového drátku. Změna teploty způsobí i změnu odporu drátku a tím dojde k porušení rovnováhy ve Wheatstonově můstku, jehož součástí odporový drátek je. Obnovení rovnováhy se dosáhne změnou kompenzačního odporu a tato změna se vynáší v závislosti na čase. Detektor se skládá ze dvou komůrek, z nichž jedna je měrná a druhá srovnávací. Nejvhodnějším nosným plynem pro použití TCD je plyn s co nejvyšší tepelnou vodivostí, tedy vodík nebo helium.^{38,39}

Plamenový ionizační detektor (Flame Ionisation Detector – FID)

FID je nejpoužívanějším detektorem v plynové chromatografii. K ionizaci molekul vymývaných z kolony dochází v plazmě vodíkového plamene, který hoří mezi dvěma elektrodami. Při spalování se vazby organických molekul štěpí za vzniku iontů, radikálů a elektronů, které vedou mezi elektrodami elektrický proud. Velikost vzniklého proudu odpovídá počtu iontů v detektoru. Odezva detektoru je závislá na počtu aktivních uhlíkových atomů, na charakteru vazby mezi uhlíky a na počtu neuhlíkatých atomů, např. inertní uhlík v oxidu uhličitém neposkytuje signál.³⁹

Detektor elektronového záchytu (Electron Capture Detektor – ECD)

ECD detektor je dalším ionizačním detektorem. K ionizaci se zde však využívá záření β , které poskytuje zářič ⁶³Ni nebo ³H. Jeho principem je zachycování elektronů elektronegativními atomy, funkčními skupinami nebo molekulami. Detektor se skládá ze dvou elektrod, z nichž katoda je potažena vrstvou ⁶³Ni a anoda slouží jako sběrná elektroda. V detektoru se účinkem radioaktivního zářiče β ionizuje nosný plyn (dusík) a vznikají tak kationty plynu a pomalé elektrony:^{38,39}



Složky vycházející z kolony, které mají velkou elektronovou afinitu (látky obsahující halogen, aromatické uhlovodíky), zachycují tyto pomalé elektrony a nabíjí se záporně. Pohyblivost těchto iontů je mnohem menší než volných elektronů, což se projeví zpomalením přenosu náboje a poklesem elektrického proudu a jeho velikost se zaznamenává v čase.³⁹

ECD je velmi selektivní zvláště k sloučeninám obsahujícím atomy halogenů, fosforu, síry, olova, kyslíku, k nitrosloučeninám a aromatickým uhlovodíkům.³⁸

Dusíkovo-fosforový detektor (Nitrogen-Phosphorus detektor – NPD)

Detektor NPD se podobá plamenovému ionizačnímu detektoru. Místo plamene však používá kroužek z alkalických chloridů rubidia nebo cesia, který se vyhřívá cívkou a přes který prochází nosný plyn smíchaný s vodíkem. Horký kroužek emituje elektron termionickou emisi, které jsou sbírány na anodě, a představují proud pozadí. Pokud se na detektor dostane látka obsahující dusík nebo fosfor, je spálen na detektoru a zvýší se emise elektronů a následně proud, který se měří.⁴⁰

3.3.5 Stanovení HCN, EDN

Stanovení kyanovodíku pomocí plynové chromatografie je nejpoužívanější a nejjednodušší metoda. Stanovení je přímé bez jakékoli úpravy vzorku. Detekce kyanovodíku je nejjednodušší a nejúčinnější pomocí hmotnostně spektrometrické detekce, avšak hmotnostní spektrometr je nákladově nejdražším detektorem, který se v plynové chromatografii používá. Další používané detektory jsou TCD, ECD, NPD a FID.

Pro stanovení dikyanu platí skoro totéž, co pro kyanovodík. Hmotnostní spektrometrie je opět nejlepší variantou. Avšak pro jiné detektory neplatí to samé. Pro dikyan dávají nejlepší odezvy detektory TCD, FID a NPD.

4 Mikroextrakce tuhou fází

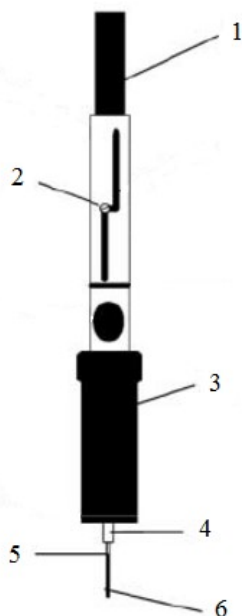
Mikroextrakce tuhou fází (Solid Phase Microextraction - SPME) je jednoduchá a účinná sorpčně-desorpční technika zakoncentrování analyzovaného vzorku (analytu). Tato technika byla vyvinuta v 90. letech skupinou analytiků pod vedením profesora Janusze Pawliszyna. Metoda SPME se rozšířila do laboratoří po celém světě pro její rychlé a účinné použití při izolaci látek, zakoncentrování a stanovení organických sloučenin z přírodních vzorků. SPME se hodí jak pro kvalitativní, tak i kvantitativní analýzu vzorků.^{41, 42, 43}

Podstatou metody SPME je křemenné vlákno pokryté různými typy stacionární fáze, které se od sebe liší různou polaritou i sorpčními vlastnostmi. SPME vlákna mohou být používána opakovaně až cca 100 analýz v závislosti na typu aplikace a péči o vlákno. Při opakovaném použití se vlákno aktivuje zahřátím. Sorpce analytu probíhá na zmíněném vlákne, dokud není dosažena rovnováha. SPME se liší od klasických extrakčních metod tím, že analyt není extrahován ze vzorku v co největší koncentraci, ale jen do dosažení rovnovážného stavu. Z fyzikálně-chemického hlediska je rovnovážný stav u SPME metody závislý na koncentraci analytu ve vzorku a na druhu a tloušťce polymeru, který tvoří povrch křemenného vlákna.^{41, 44}

Správnost a celkovou přesnost výsledků u SPME ovlivňuje celá řada faktorů (výběr vlákna, iontová síla, pH, míchání, velikost a druh molekul sorbované látky, teplota atd.). U SPME se pro její linearitu v širokém koncentračním rozmezí obvykle používá kalibrační metoda. Při správném výběru vhodného typu vlákna lze dosáhnout reprodukovatelných výsledků i při nízkých koncentracích analytů. Její použití má velký význam ve spojení GC-MS a split/splitless nebo pro přímý nástřik na kolonu.^{41, 44}

4.1 Zařízení pro mikroextrakci tuhou fází

SPME zařízení (obr. 6) se skládá z pístu, držáku, ocelové jehly a křemenného vlákna. Křemenné vlákno potažené sorpční vrstvou je připojeno na ocelový píst a umístěno v duté ocelové jehle, která má ochrannou funkci před mechanickým poškozením vlákna. Jehlu s požadovaným vláknem lze jednoduše vyměnit za jinou. Pro rozlišení se používají barevné koncovky.⁴⁴

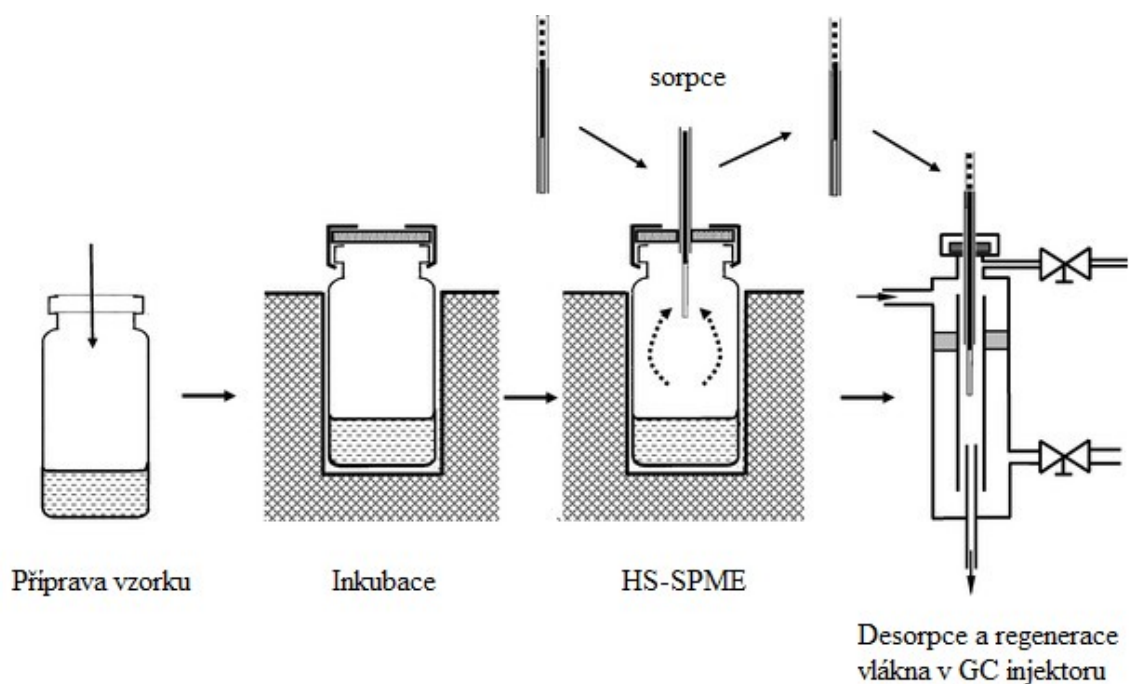


Obrázek 6 – Zařízení pro mikroextrakci tuhou fází, 1 – píst, 2 – zajištění pístu, 3 – tělo držáku, 4 – ochranná jehla, 5 – ocelová tyčinka, 6 – SPME vlákno⁴⁵

4.2 Princip metody HS-SPME

Obr. 7 schématicky ukazuje postup při extrakci a následné desorpci analytu u metody HS-SPME, head-space SPME. Ocelová jehla propíchně septum v zátce zkumavky. Pomocí pístu se vlákno dostane nad hladinu vzorku, kde je koncentrace par zkoumaných látek největší. Analyt je extrahován do vrstvy pokrývající vlákno. Po dosažení sorpční rovnováhy je vlákno opět zasunuto do jehly a spolu s ní je vytaženo z vialky. V této fázi je velmi důležité určit délku extrakce (extrakční čas), ten je různý a závisí na mnoha faktorech (tloušťka sorpční vrstvy, úprava vzorku, poloha vlákna atd.).⁴⁴

Po vytažení jehly ze zkumavky následuje desorpce analytu. Jehla je zavedena do nástřikového prostoru plynového chromatografu, kde je analyt tepelně desorbován a unášen na GC kolonu.⁴⁴



Obrázek 7 – Extrakční a desorpční postup u metody HS-SPME ⁴⁶

4.3 Optimalizace metody

Přesnost a správnost výsledků je ovlivněna celou řadou faktorů, např. polaritou a tloušťkou stacionární vrstvy, způsobem vzorkování, hodnotou pH, iontovou silou roztoku, teplotou vzorku, mícháním apod.

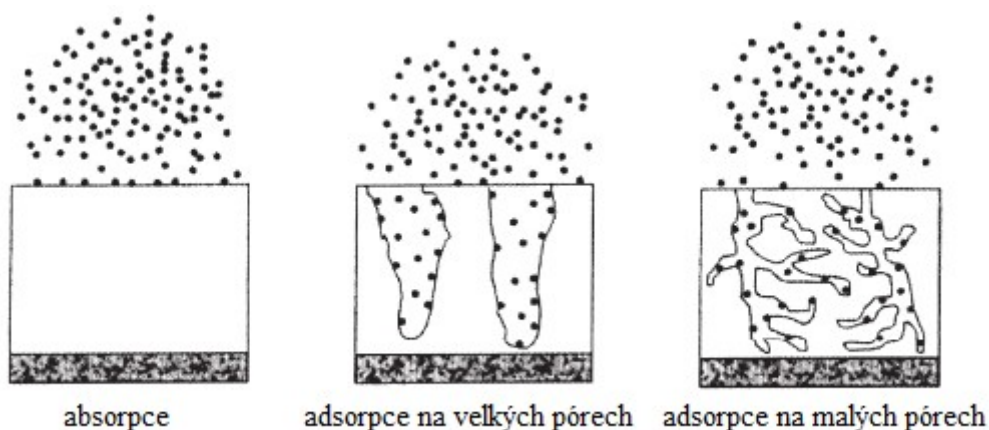
4.3.1 Stacionární vrstva

Výběr vhodné stacionární vrstvy je velmi důležitý pro dosažení dobré selektivity stanovovaného analytu, který hraje klíčovou roli v procesu SPME. Na základě známého pravidla, že podobné se rozpouští v podobném, je třeba vybírat i vlákno. Znamená to, že nepolární vlákna by se měla používat pro extrakci nepolárních analytů a naopak. Přehled komerčně dostupných stacionárních fází je uveden v tabulce 1. ⁴⁷

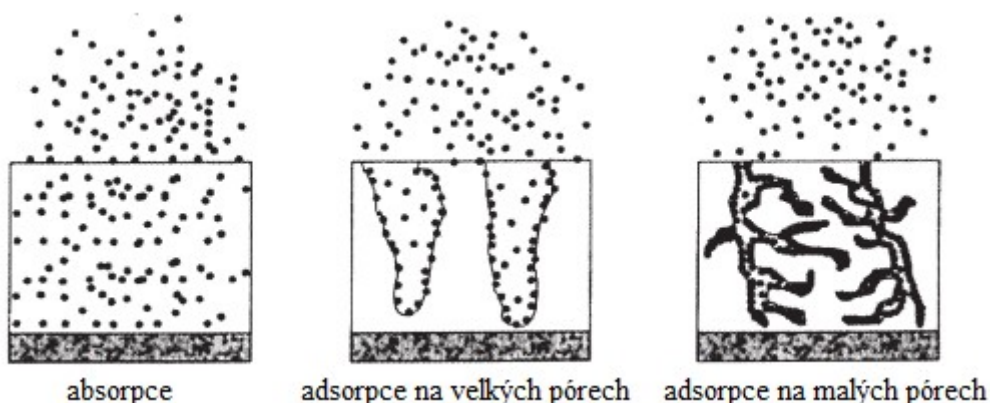
Tabulka 1 - Přehled komerčně dostupných stacionárních fází ⁴⁸

Stacionární vrstva	Tloušťka vrstvy	Doporučené použití	Max. teplota (pro GC)	Aplikace
Polydimethylsiloxan (PDMS)	100 μm	GC-HPLC	280 °C	Těkavé látky, nepolární a těkavé organické sloučeniny,
	30 μm	GC-HPLC	280 °C	polycyklické
	7 μm	GC-HPLC	340 °C	aromatické uhlovodíky
Polyakrylát (PA)	85 μm	GC-HPLC	320 °C	Polární organické sloučeniny; triaziny a fenoly
Polydiethylsiloxan-divinylbenzen (PDMS-DVB)	65 μm	GC	270 °C	Aromatické uhlovodíky a těkavá rozpouštědla;
	60 μm	HPLC	-	analýza vzduchu
Carboxen-polydimethylsiloxan (CAR-PDMS)	75 μm	GC	320 °C	Plyny a nízkomolekulární látky, těkavé organické sloučeniny a uhlovodíky, stopové koncentrace těkavých látek
Carbowax-divinylbenzen (CW-DVB)	65 μm	GC	265 °C	Polární organické sloučeniny; alkoholy
Carbowax-pryskiřice (CW-TRP)	50 μm	HPLC	-	Povrchově aktivní látky

Stacionární fáze lze rozdělit na homogenní čisté polymery – absorbenty a na porézní částice suspendované v polymeru – absorbenty. Mezi vlákna s homogenními polymery se řadí polydimethylsiloxan (PDMS) a polyakrylát (PA). Divinylbenzen (DVB) suspendovaný v PDMS, divinylbenzen suspendovaný v Carbowaxu (CW) a Carboxen patří do skupin vláken s porézními adsorpčními částicemi. Rozdíly v mechanismech jsou znázorněny na obrázcích 8 a 9. ^{48, 49}



Obrázek 8 – Schéma extrakčních mechanismů absorpce a adsorpce – počátek sorpce⁴⁹



Obrázek 9 - Schéma extrakčních mechanismů absorpce a adsorpce – rovnovážný stav⁴⁹

Citlivost metody SPME ovlivňuje tloušťka stacionární fáze vlákna. Silnější vrstva je schopna vyextrahovat více analytu, proto se vlákna se silnější vrstvou používají pro zachycení těkavějších látek. Tenká vlákna zajišťují zrychlenou difúzi a uvolnění výše vroucích látek během tepelné desorpce. Silná vrstva účinněji extrahuje výše vroucí složky ze vzoru, ale desorpce je dlouhotrvající proces. Analyt tak může být přenášen až do další extrakce.^{47, 49}

4.3.2 Délka doby sorpce

Doba sorpce se volí tak, aby bylo dosaženo rovnováhy, tj. co největší extrakce analytu, nejvyšší citlivosti a dobré opakovatelnosti. Optimální doba se zjistí proměřením závislosti výtěžnosti analytu na době sorpce. V některých případech se však ustanovení rovnováhy nedosáhne ani po několika hodinách, a proto lze volit kratší extrakční dobu, kterou je vhodné dodržovat při všech analýzách pro zajištění dobré opakovatelnosti. Extrakce většinou trvá 15-20 minut, ale může být samozřejmě kratší, někdy i v řádech desítek sekund.^{44, 47}

4.3.3 Způsob vzorkování

Existují dva způsoby vzorkování. První způsob je přímá SPME, označovaná zkratkou DI-SPME (Direct Immersing SPME), při které dochází k ponoření vlákna do vzorku. Druhým způsobem je headspace SPME, označovaná zkratkou HS-SPME (Headspace SPME), která využívá extrakci analytů z prostoru nad vzorkem v uzavřené nádobě. DI-SPME se používá především pro látky v kapalném skupenství a u některých tuhých látek. HS-SPME se používá pro extrakci těkavých látek. Ustálení rovnováhy mezi vláknem a analytem v plynném stavu je rychlejší než u DI-SPME, protože molekuly analytu se rychleji pohybují v plynu než v ostatních skupenstvích. Čas, který je potřeba pro vzorkování HS-SPME je většinou relativně krátký, 5-15 min.⁴⁷

4.3.4 Zahřívání vzorku

Zahřívání vzorku obecně zkracuje čas potřebný k dosažení rovnováhy, a tudíž se zkracuje i doba sorpce. U některých vzorků je zahřívání nutné, např. při headspace analýze a analýze málo těkavých látek. V headspace prostoru se zvýší koncentrace analytů, což umožňuje rychlejší a účinnější extrakci.⁴⁷

4.3.5 Míchání vzorku

Míchání vzorku zlepšuje a zkracuje extrakci, zejména u molekul s vyšší molekulovou hmotností. Proměnlivé míchání je nežádoucí, protože způsobuje nižší opakovatelnost stanovení. Je to další faktor, který ovlivňuje reprodukovatelnost.⁴⁹

4.4 Využití SPME

Metoda SPME má řadu aplikačních využití. Používá se zejména v oblasti životního prostředí a stanovení znečišťujících látek, např. PCB, PAH, pesticidy, fenoly, organokovové sloučeniny – Hg, Sn, Pb, ve farmaceutickém průmyslu při stanovení obsahových a účinných látek přítomných v synteticky připravených léčivech i ve fytofarmakách, dále se používá v potravinářství při stanovení vonných a chuťových látek, mastných kyselin, nežádoucích exogenních a endogenních kontaminantů. Rovněž tato metoda našla uplatnění ve forenzní analýze, toxikologii a dalších oborech.⁵⁰

4.5 Stanovení HCN pomocí SPME

Takekawa a kol. použili HS-SPME pro stanovení kyanidů pomocí GC/NPD na carboxen-divinylbenzenovém vlákně. Stanovení kyanidů prokazovali v krvi. Sheely a kol. stanovovali plynný kyanovodík metodou HS-SPME/GC v polních podmínkách. Prokázali, že vlákno carboxen-divinylbenzen má mnohem menší analytickou kapacitu než vlákno potažené carboxen-polydimethylsiloxanem. Pro analýzu použili vlákno CAR/PDMS

o tloušťce 85 μm . Před odběrem vzorků byly vlákna podrobeny zahřívání po dobu 5 minut při teplotě 280 $^{\circ}\text{C}$. Odběr vzorků probíhal v komorách, ve kterých byly vloženy kanystry se vzorky kyanovodíku. Odběr vzorku zahrnoval současnou expozici sedmi vláken po dobu 2 minut. Po dokončení odběru vzorků byla vlákna rychle vytažena a každý ocelový píst byl uzavřen silikonovým septem. Takto izolovaná vlákna byla umístěna do chladiče naplněným suchým ledem a byla přepravena do laboratoře pro analýzu. Od odběru vzorků a analýz uplynulo méně než 12 hodin a vlákna byla tímto způsobem chlazená až do 1 minuty před analýzou. Prokázali, že mezi analýzou takto odebraných a uskladněných vzorků a analýzou vzorků odebraných těsně před analýzou není statisticky rozeznatelný rozdíl. Při použití GC/NPD vykazoval kyanovodík linearitu od koncentrací 1 ppm až do 50 ppm.^{51, 52}

Metoda stanovení reziduí po fumigaci kyanovodíkem a EDN ve vybraných komoditách byla v letech 2015 a 2016 vyvíjena v LZ Draslovka a.s. ve spolupráci s Ústavem analýzy potravin a výživy na Fakultě potravinářské a biochemické technologie VŠCHT Praha pod vedením prof. Ing. Hajšlové, CSc. Jejich výzkum vedl k použití automatizované techniky headspace mikroextrakce tuhou (HS-SPME) fází pro izolaci EDN a HCN v ječmeni. Identifikace a kvantifikace byla provedena pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostně spektrometrickým detektorem s měřením doby letu. Jako stacionární fázi použily carboxen/polydimethylsiloxan. Inkubace vzorků trvala 10 min při 30 $^{\circ}\text{C}$, sorpce trvala 10 minut při teplotě 30 $^{\circ}\text{C}$ a desorpce trvala 2 minuty při teplotě 220 $^{\circ}\text{C}$ v režimu splitless. Na základě výsledků provedenými VŠCHT bylo doporučeno LZ Draslovka pro stanovení reziduí po fumigaci obilovin právě využití HS-SPME techniky.⁵³

5 Validace metody

Validace je proces, jehož cílem je demonstrovat a dokumentovat kvalitu analytické metody ustanovením definovaných kritérií a měřením hodnot těchto kritérií, které jsou definovány v následujících kapitolách. Zjednodušeně řečeno jde o ověření platnosti zvoleného analytického postupu.⁵⁴

5.1 Linearita

Linearita metody je schopnost (v rámci určitého rozsahu) měřit výsledky přímo úměrné koncentraci analytu ve vzorku.⁵⁴

Linearita je tedy chápána jako přímková závislost mezi dvěma náhodnými proměnnými, tj. analytickým signálem a koncentrací analytu. Těsnost vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných charakterizuje hodnota korelačního koeficientu R^2 . Při lineární závislosti nabývá hodnoty +1. Čím více se blíží jedné, tím je závislost obou proměnných těsnější.⁵⁵

5.2 Opakovatelnost

Opakovatelnost vyjadřuje těsnost souhlasu mezi výsledky nezávislých měření stejného analytu provedených stejnou metodou, stejným experimentátorem, na stejném přístroji, na stejném místě, za stejných podmínek. Opakovatelnost je vlastností metody, ne výsledku.⁵⁵

5.3 Mez detekce

Mez detekce (LOD) daného analytického postupu je dána jako nejmenší množství analytu ve vzorku, které může být detekováno. LOD je taková koncentrace látky, která vyvolá odezvu měřicího systému větší než trojnásobek úrovně šumu.⁵⁶

U separačních metod se používá k výpočtu meze detekce velikost hodnoty signálu slepého pokusu a směrnice kalibrační přímky. Z chromatogramu slepého pokusu se určí maximální kolísání základní linie h_{\max} . Mez detekce pak počítáme podle vztahu:⁵⁶

$$LOD = \frac{3 \cdot h_{\max}}{b}$$

Směrnice kalibrační přímky b musí být z koncentrační závislosti $y = b \cdot x$, kde y je výška chromatografického píku a ne plocha, jak je obvyklé.⁵⁶

5.4 Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti metody je nejnižší množství analytu ve vzorku, které může být stanoveno s přijatelnou přesností a správností za uvedených podmínek. Mez stanovitelnosti

je koncentrace látky, která vyvolá odezvu měřicího systému větší než je desetinásobek úrovně šumu. U separačních metod platí stejné podmínky jako pro mez detekce. V této práci byla mez stanovitelnosti určena pomocí následujících vztahů: ⁵⁶

$$LOQ = \frac{10 \cdot h_{\max}}{b}$$

Pro $y = b \cdot x$ platí stejné podmínky jako pro mez detekce. ⁵⁶

5.5 Statistické parametry pro zpracování naměřených dat

5.5.1 Aritmetický průměr

Aritmetický průměr je definován jako součet všech naměřených hodnot vydělených jejich počtem. ⁵⁵

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \cdot (x_1 + x_2 + \dots + x_n) = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i$$

kde n je počet měření x .

5.5.2 Směrodatná odchylka

Charakterizuje rozptýlení jednotlivých hodnot x_i kolem aritmetického průměru.

Uvádí se ve stejných jednotkách, v jakých je vyjádřena veličina x a je definována jako: ⁵⁵

$$s = \sqrt{\frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

5.5.3 Relativní směrodatná odchylka

Relativní směrodatná odchylka udává procentuální rozptýlení od aritmetického průměru, uvádí se v procentech a je definována vztahem: ⁵⁵

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 [\%]$$

6 Experimentální část

6.1 Použité chemikálie

Kyselina boritá H_3BO_3 , CAS 10043-35-3, p.a. 99,8% byla použita od firmy Lachner.

Kapalný roztok kyanovodíku, CAS 74-90-8, byl použit od firmy Lučební závody Draslovka a.s. Kolín pod novým obchodním názvem BLUEFUME s obsahem kyanovodíku 97,6 % a stabilizátory oxidu siřičitého v obsahu 0,9-1,1 % a kyseliny fosforečné v obsahu 0,09-0,1 %.

Od firmy Lučební závody Draslovka a.s. Kolín byl použit i dikyan, CAS 460-19-5, který firma vyrábí. Složení používaného dikyanu je 97,6 hmotnostních % dikyanu a 0,2 hmotnostních % kyanovodíku.

Pro GC analýzy byly použity plyny od firmy Linde Gas a.s. ČR, a to vodík 3.0, hélium 4.6, dusík a vzduch.

Pro argentometrické stanovení byly použity hydroxid sodný, NaOH, CAS 1310-73-2, p.a. 99,5 % od firmy Lachner, dusičnan stříbrný, AgNO_3 , CAS 7761-88-8, od firmy Safina, chroman draselný, K_2CrO_4 , CAS 7789-00-6, p.a. 99,3 % od firmy Lachner, chlorid sodný, NaCl, CAS 7647-14-5, p.a. 99 % od firmy Penta a jodid draselný KI, CAS 7681-11-0, p.a. 99,5% od firmy Penta.

Pro fotometrické stanovení byly použity hydroxid sodný NaOH, CAS 1310-73-2 od firmy Lachner, kyselina barbiturová, $\text{C}_4\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_3$, CAS 67-2-7, p.a. 99% od firmy Sigma Aldrich, pyridin, $\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$, CAS 110-86-1, 99,9% LZ Draslovka, kyselina sírová, H_2SO_4 , CAS 7664-93-9, p.a. 97% od firmy Lachner, chloramin T, $\text{C}_7\text{H}_7\text{ClNNaO}_2\text{S}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, CAS 127-65-1, p.a. 99 % od firmy Sigma Aldrich a dihydrogenfosforečnan sodný, $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CAS 13472-35-0, p.a 99 % od firmy Penta.

Všechny roztoky byly připraveny v deionizované vodě a byly probublány plynným argonem 4.6 od firmy Linde Gas a.s..

Od výrobce Mlýn Havlíčkův brod spol. s.r.o. byly testovány vzorky mouky z 1 kg balení. Zrní pšenice bylo dodáno od soukromého dodavatele a bylo sklizeno v roce 2016.

6.2 Přístroje a zařízení

- Skleněné headspace vialky o objemu 20 ml s víčky se silikonovými septy (CHROMSERVIS s.r.o., CZ)

- Držák pro manuální SPME a vlákno (Supelco, USA) - fáze Carboxen/polydimethylsiloxan 75 μm
- Zařízení pro úpravu deionizované vody Aqua osmotic 03
- Třepačka Sklární Kavalerie Votice, 214-70, Československo
- Block heater STUART SBH200D, teplota do 200 $^{\circ}\text{C}$
- Analytické váhy KERN ACJ/ACS, ACJ-420-4M, s přesností na 4 desetinná místa
- Spektrofotometr DR-4000V UV/VIS, 190-1100 nm od společnosti Hach
- Plynový chromatograf od firmy DANI Instruments, Master GC s NPD detektorem
 - Kapilární kolona RT-QBond 30 m dlouhá, ID 0,53 mm, film 0,2 μm
 - S/SL injektor
 - Focus S/SL liner skleněný se zúžením 4 mm ID, Restek
 - Dusíko-fosforový detektor, NPD (DANI Instruments, Italy)
 - Sběr a zpracování dat na počítači pomocí softwaru Clarity od firmy Dataapex.
- Plynový chromatogram od firmy Shimadzu, Shimadzu GC-17A.
 - Kapilární kolona RT-Q-Bond, 30 m dlouhá+2x10 m trap, ID 0,53 mm, df 20 μm
 - Plamenově-ionizační detektor, FID (Shimadzu)
 - Sběr a zpracování dat na počítači pomocí softwaru Clarity od firmy Dataapex.

6.3 Příprava roztoků

6.3.1 Příprava 1% vodného roztoku kyseliny borité

Zásobní 1% roztok kyseliny borité v deionizované vodě se připraví rozpuštěním 10 g v 1 litru vody probubláné plynným argonem. Vodu je nutné probublát plynným argonem, aby nebyl přítomen kyslík a nedocházelo k rozkladu kyanovodíku. Roztok se po několika použití opět probublá argonem. Vodný roztok kyseliny borité se používá z důvodu stabilizace

6.3.2 Příprava roztoku 0,1M dusičnanu stříbrného

Zásobní roztok 0,1M dusičnanu stříbrného se připraví rozpuštěním 17,1 g AgNO_3 v 1 000 ml neionizované vody. Takto připravený roztok je nutné stanovit na čistou látku. Stanovuje se na chlorid sodný, který se nejprve vyžihá a dá se na určitou dobu do exsikátoru. Naváží se 0,1g (přímo z váženky) NaCl, rozpustí se v 30 ml vody, k roztoku se přidá 1 ml 10% K_2CrO_4 a titruje se AgNO_3 do žlutohnědého zbarvení.³³

6.3.3 Příprava pyridinového roztoku kyseliny barbiturové

Do kádinky o objemu 150 ml se naváží 3 g kyseliny barbiturové a za stálého intenzivního míchání přidá 20 ml demineralizované vody a 15 ml předestilovaného pyridinu. Směs se dále intenzivně míchá (cca 10 minut) do úplného rozpuštění kyseliny barbiturové a vyčerení roztoku. Obsah kádinky se kvantitativně převede 5 ml demineralizované vody do 50 ml odměrné baňky. Do odměrné baňky se přidají 4 ml koncentrované HCl a směs se nechá ještě dalších 10 minut intenzivně míchat. Po uplynutí této doby se vyjme míchadlo a obsah se doplní demineralizovanou vodou po rysku.³⁷

6.3.4 Příprava roztoku kyanovodíku

Kapalný kyanovodík (BLUEFUME) se naváží do 100 ml odměrné baňky a doplní se po rysku připraveným roztokem kyseliny borité. Takto připravený roztok je skladován při 4°C. Přesné stanovení kyanovodíku se provede argentometrickou titrací.

6.3.5 Příprava roztoku dikyanu

Do 250 ml uzavíratelné nádoby s víčkem se septem se předloží 100-150 ml roztoku kyseliny borité. Plynný dikyan je dávkován do roztoku přes septum. Proublání roztoku kyseliny borité dikyanem trvá cca 1 min. Takto připravený roztok je uchováván v lednici. Stanovení dikyanu je po vychlazení provedeno opět argentometrickou titrací.

6.3.6 Příprava vzorků

1 g hrubé mouky nebo zrní se naváží do 20 ml SPME vialky. Vzorek matrice se zváží a vialka se vzduchotěsně uzavře. Do vialky se přes septum přidá 5 ml roztoku kyseliny borité a matrice se tak převrství.

6.4 Měření a stanovení

6.4.1 Stanovení koncentrace zásobního roztoku HCN a EDN

Do titrační baňky se předloží 100 ml destilované vody, 10 ml 5% NaOH a 2 ml 10 % KI. Z injekční stříkačky se předloží dostatečné množství vzorku a titruje se 0,1 M roztokem AgNO₃ do prvního zákalu.³³

6.4.2 Fotometrické stanovení kyanovodíku v ošetřených komoditách

5 g vzorku se předloží do 10 ml 5 % roztoku hydroxidu sodného a roztok se 1 hodinu intenzivně míchá. Následně se pipetuje 1 ml vylouhovaného roztoku do 200 ml odměrné baňky, vzorek se okyselí na methylovanou žlutou do růžového zbarvení. Pak se v rychlém sledu přidají 3 ml roztoku dihydrogenfosforečnanu sodného a za míchání se přikapává roztok chloraminu T do odbarvení methylovanou žlutou a pak se přidá ještě 1 ml navíc. Dále se přidají 3 ml pyridinového roztoku kyseliny barbiturové, baňka

se doplní po rysku vodou a obsah se promíchá. Roztok se nechá vybarvit a následně se roztoky proměří při vlnové délce 580 nm.³⁷

6.4.3 HS-SPME

Vlákno je nutno před každou analýzou tepelně aktivovat. Vzorek je temperován a třepán 10 minut při teplotě 30 °C. Následná sorpce na vlákno trvá 15 minut při teplotě 30°C z headspace prostoru. Při sorpci je hrot vlákna umístěn 5 mm nad hladinou roztoku. Desorpce v injektoru proběhne do 2 minut při 220 °C a vlákno je ponecháno v nástřikovém prostoru během celé analýzy.

6.4.4 GC

Měření bylo prováděno na plynovém chromatografu od firmy DANI Instruments, Master GC. Na tomto plynovém chromatografu byly měřeny veškeré analýzy spojené se stanovením vzorků odebraných metodou SPME. Pro detekci byl použit NPD detektor. Teplota na detektoru byla nastavena na 250 °C. Injektor byl vyhříván na teplotu 220 °C. Dávkování je prováděno v režimu splitless po dobu 2 minut.

Kolona byla vyhřívána na 100 °C po dobu 6 min a následuje teplotní program 50 °C/min do konečné teploty 240 °C, kdy byla kolona na tuto teplotu vyhřívána po dobu 2,20 minut. Celková délka analýzy je 11 minut. Jako nosný plyn bylo použito helium.

Dále byl použit plynový chromatograf od firmy Shimadzu GC-17A vybavený přepínačem na detektory TCD a FID. Na tomto chromatografu byla prováděna pouze doplňující měření analyzovaných roztoků. Pro detekci byl použit FID detektor. Teplota termostatu byla nastavena 100 °C, teplota detektoru na 200 °C a teplota injektoru na 100 °C. Celková doba analýzy je 5 minut. Jako nosný plyn bylo použito helium.

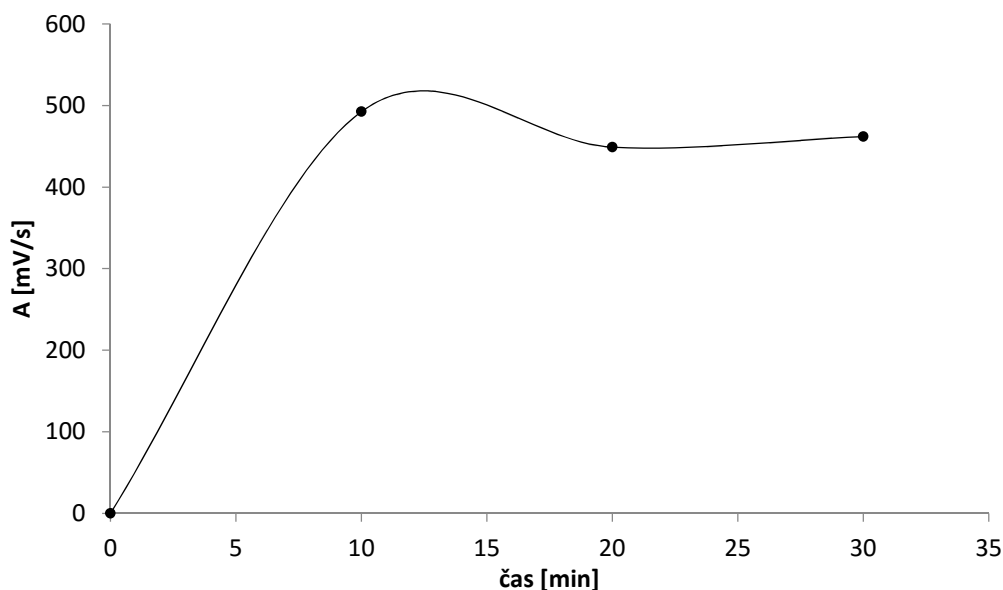
7 Výsledky a diskuze

7.1 Optimalizace extrakčních podmínek

Pro účely této práce byly optimalizovány podmínky HS-SPME extrakce a desorpce s cílem dosáhnout co nevyšší extrakční účinnosti během přijatelné doby. Byly optimalizovány následující parametry: inkubace, doba sorpce a teplota při sorpci.

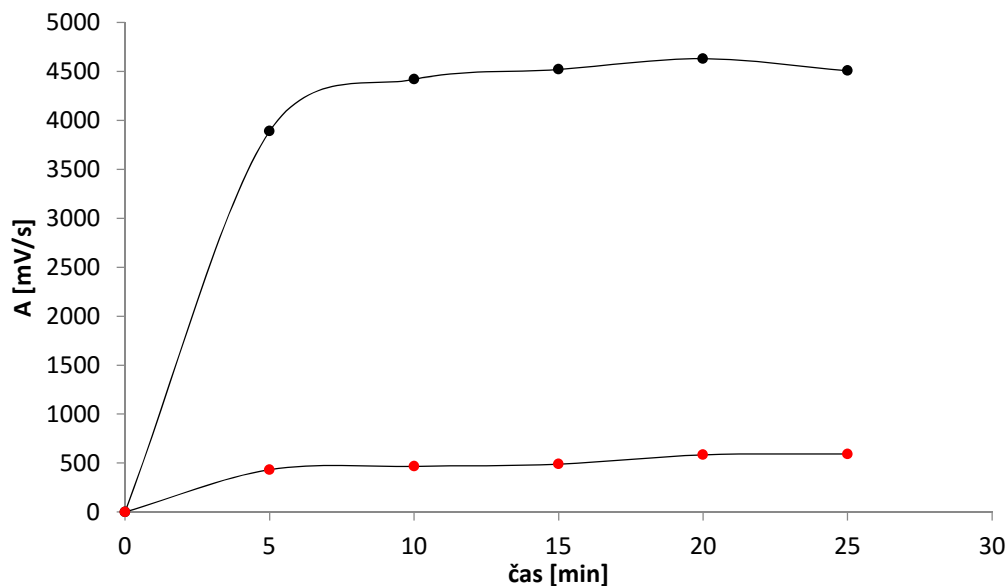
Na základě získaných informací z výše uvedených publikací byly některé parametry použity pro účely této práce.^{51, 52, 53} K testování bylo vybráno vlákno CAR/PDMS 75 μm i s ohledem na skupenství a těkavost analytů. Teplota při inkubaci a sorpci na vlákno byla zvolena na 30 °C, protože po proměření vzorků při 40 °C nebylo dosaženo opakovatelných výsledků. Temperování vzorku bylo podpořeno třepáním. Desorpce na injektoru při GC analýze probíhala při teplotě 220 °C.

Ve snaze určení doby inkubace byla provedena analýza roztoku HCN o koncentraci 3,42 ppm, kdy byly proměřeny 3 roztoky o stejné koncentraci s různou dobou temperování roztoků. Na základě této analýzy byla stanovena doba inkubace 10 minut (viz graf 1).



Graf 1 – Závislost plochy píku kyanovodíku na době inkubace

K určení doby sorpce bylo provedeno 5 analýz pro koncentrace 34,9 ppm a 3,42 ppm standardu HCN. Všechny roztoky byly 10 minut třepány při 30 °C a sorpce na vlákno trvaly 5, 10, 15, 20 a 25 minut. Na základě výsledků (viz graf 2) byla určena optimální doba sorpce 15 minut.

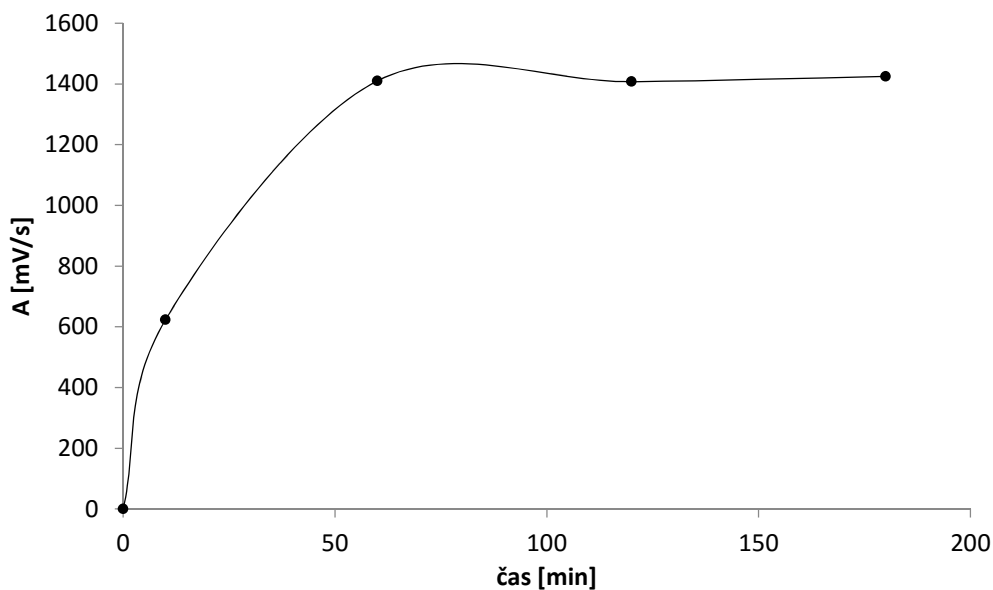


Graf 2 – Závislost plochy píkú na době extrakce pro koncentrace kyanovodíku 34,9 ppm a 3,42 ppm

Další parametr, který byl nutný optimalizovat, byla doba louhování fumigované matrice ve vodném roztoku kyseliny borité. Testování délky louhování bylo provedeno u zrní pšenice, která byla odebrána po 23 hodinách odvětrání. Odběr byl proveden po 10 minutách a následně po 1, 2 a 3 hodinách. Z naměřených ploch píkú byl sestrojen graf 2. Následně byl roztok nechán v termostatu do druhého dne, kdy bylo měření zopakováno. Naměřená hodnota odpovídá hodnotě získané po 3 hodinách louhování. Z naměřených dat byla zvolena doba louhování na 3 hodiny.

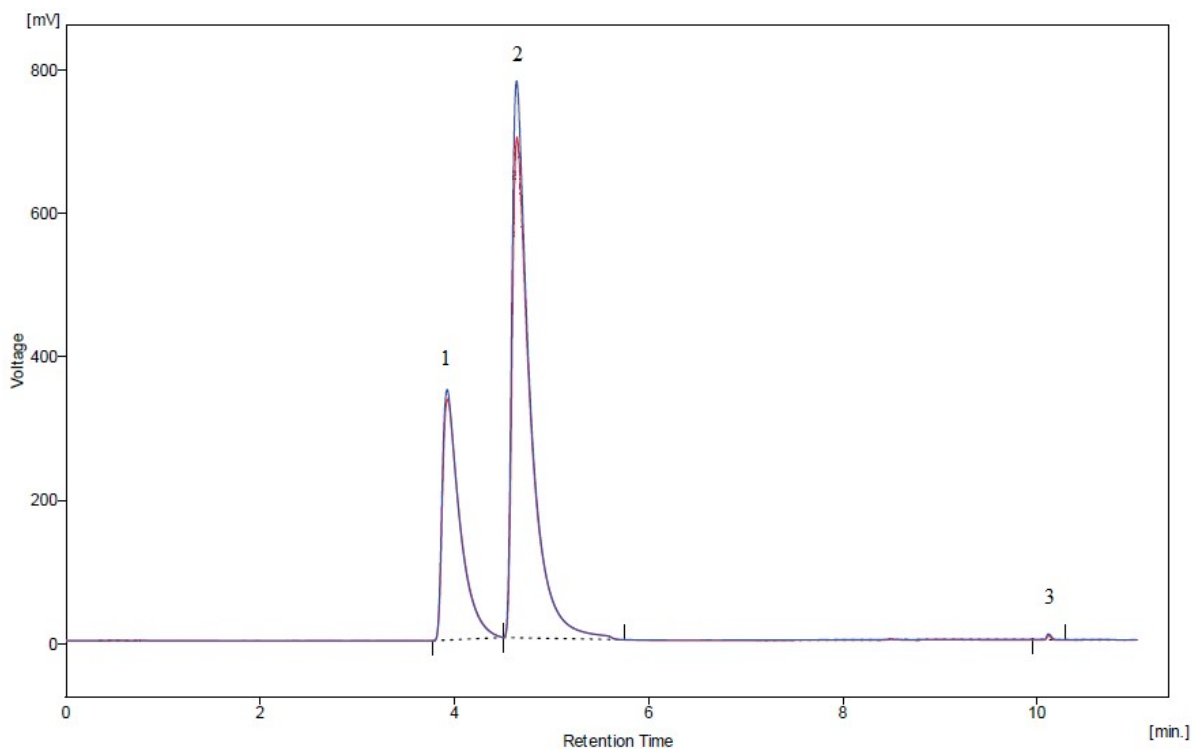
Tabulka 2 – Tabulka závislosti ploch píkú kyanovodíku na době louhování zrní (pšenice)

Doba louhování [min]	Plocha píku [mV/s]
10	623,456
60	1410,153
120	1407,561
180	1424,914
1440 (24h)	1429,079

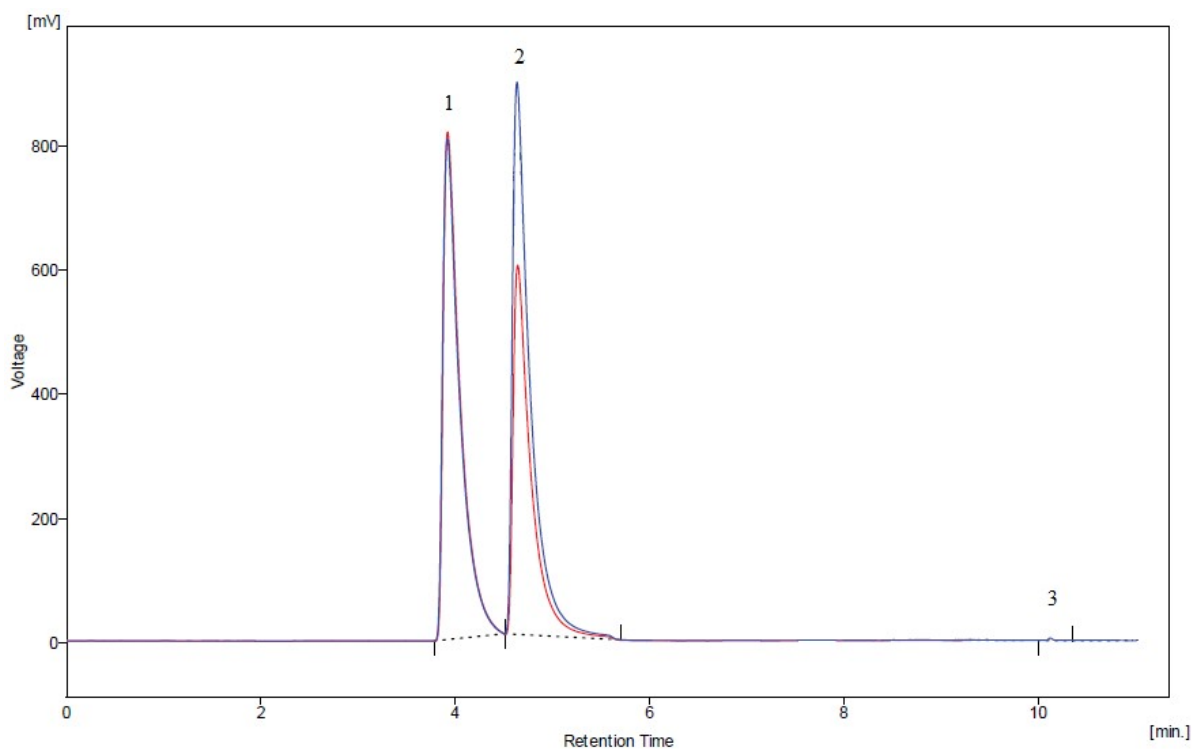


Graf 3 – Grafické znázornění závislosti doby louhování na plochách píků kyanovodíku

Po aplikaci takto optimalizované metody na standard EDN ve vodném roztoku kyseliny borité nastal problém s rozkladem EDN na HCN. Při různých koncentracích standardů EDN byl poměr píků EDN/HCN pokaždé jiný (viz obrázky 10 a 11). K rozkladu může docházet buď v zásobním roztoku standardu EDN vlivem nestability EDN, na povrchu vlákna, nebo vlivem vysoké teploty při desorpci v injektoru.

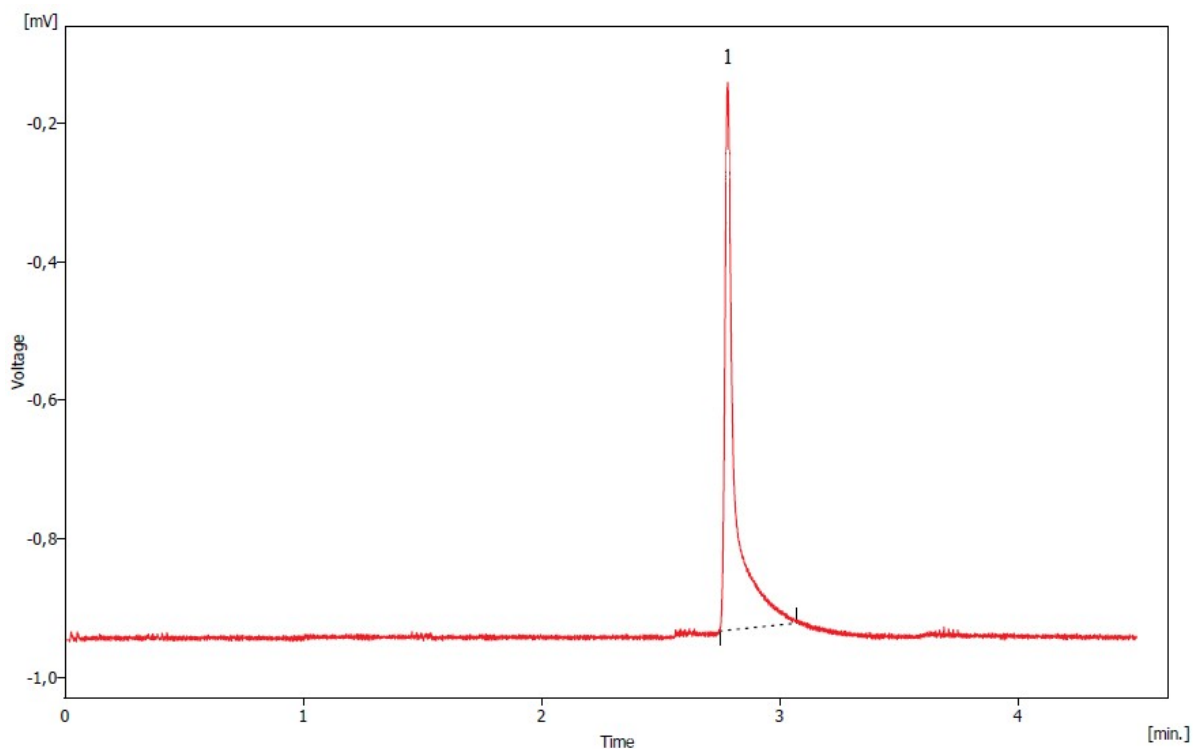


Obrázek 10 – Chromatogram HS-SPME/GC-NPD analýzy EDN ve vodném roztoku kyseliny borité o koncentraci 8,43 ppm, 1 – EDN, 2 – HCN, 3 – neznámý pík

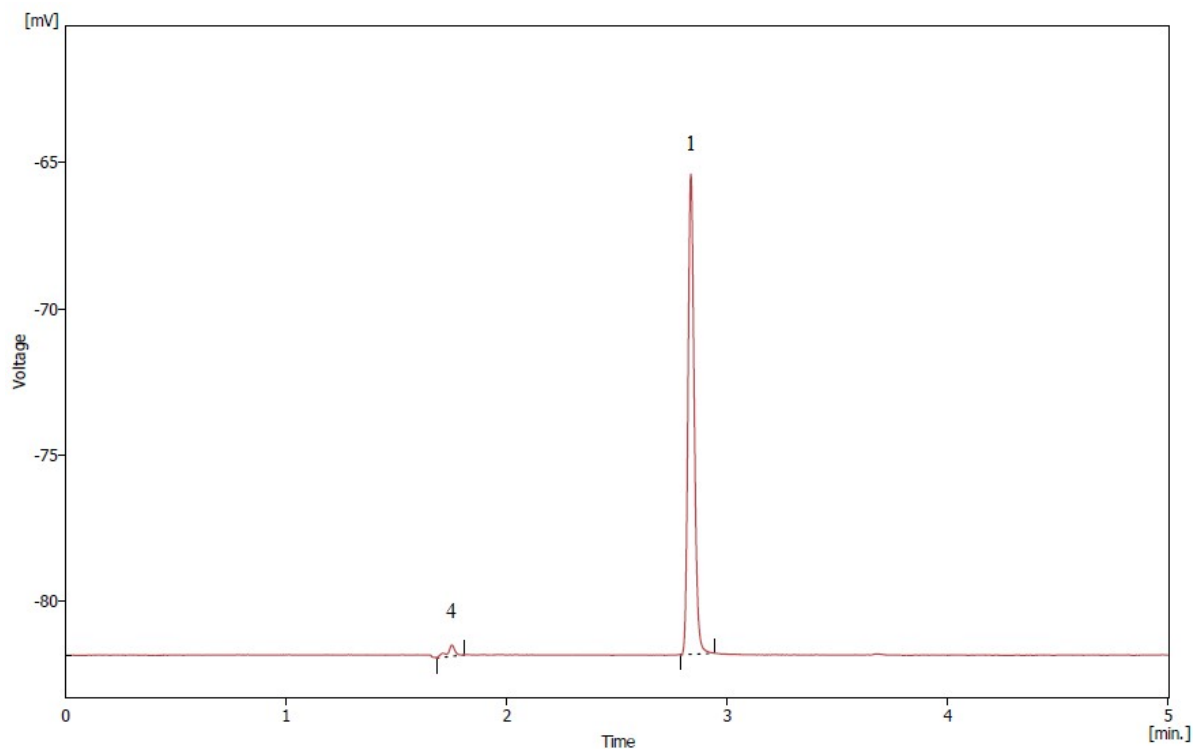


Obrázek 11 – Chromatogram HS-SPME/GC-NPD analýzy EDN ve vodném roztoku kyseliny borité o koncentraci 26,23ppm, 1 – EDN, 2 – HCN, 3 – neznámý pík

Dále byly provedeny srovnávací GC analýzy s použitím FID detektoru za účelem kvantifikovat skutečné množství kyanovodíku v roztoku. Bylo prokázáno, že zásobní roztok o koncentraci 0,2 % ani naředěný roztok o koncentraci 26,23 ppm neobsahují kyanovodík v detekovatelném množství (viz obrázky 12 a 13).



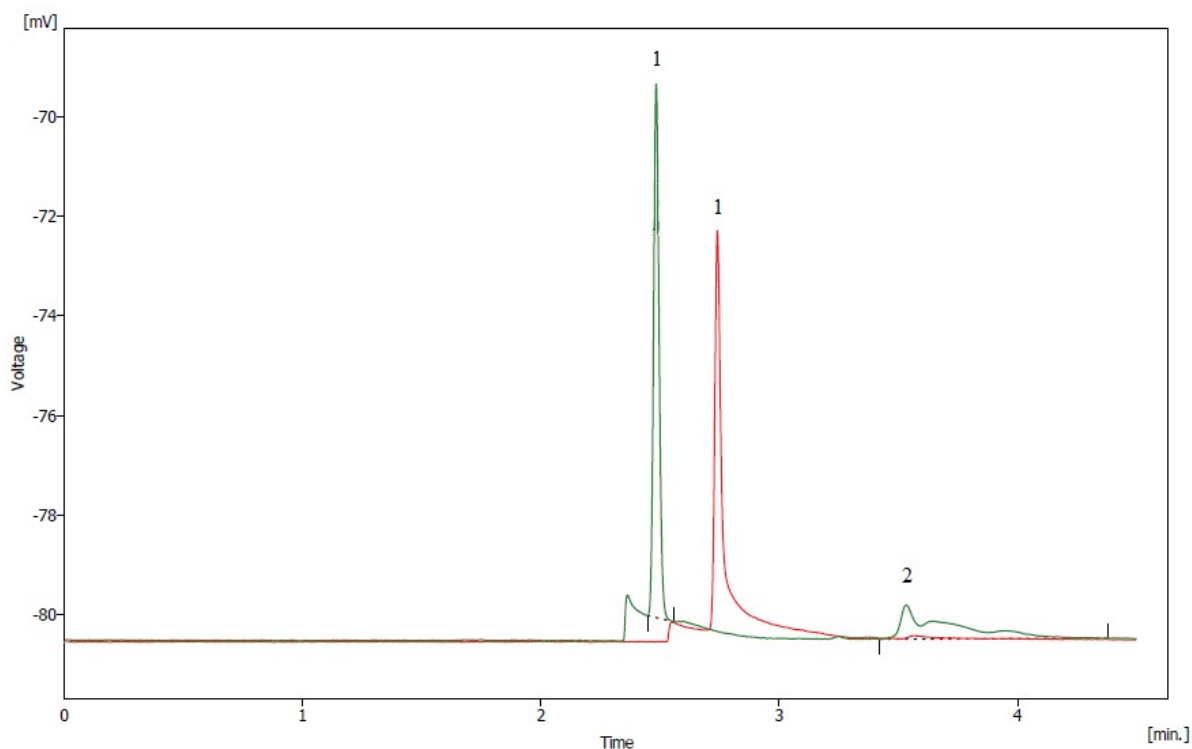
Obrázek 12 – Chromatogram GC-FID analýzy kapalné fáze zásobního roztoku standardu EDN ve vodném roztoku kyseliny borité o koncentraci 0,2 %, 1 - EDN



Obrázek 13 – Chromatogram GC-FID analýzy plynné fáze EDN ve vodném roztoku kyseliny borité o koncentraci 26,43 ppm, 1 – EDN, 4 – neznámý pík

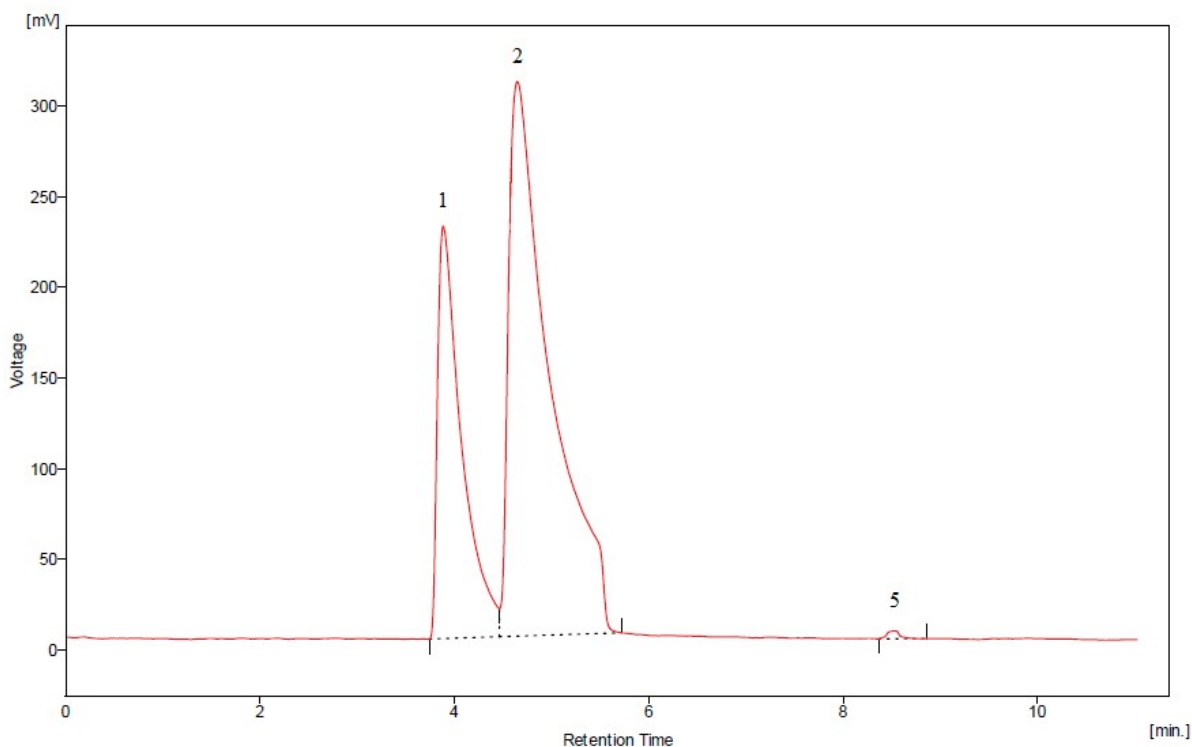
Aby byl jednoznačně prokázán vliv teploty na rozklad EDN, byla provedena GC-FID analýza EDN ve vodném roztoku kyseliny borité o koncentraci 56,66 ppm při různých

teplotách na injektoru. U zeleného chromatogramu byla teplota na injektoru 200 °C a u červeného chromatogramu 100 °C (viz obrázek 14). Při vyšší teplotě na injektoru je patrný nárůst koncentrace kyanovodíku.



Obrázek 14 – Chromatogram GC-FID analýzy plynné fáze EDN ve vodném roztoku kyseliny borité o koncentraci 56,66 ppm, 1 – EDN, 2 – HCN

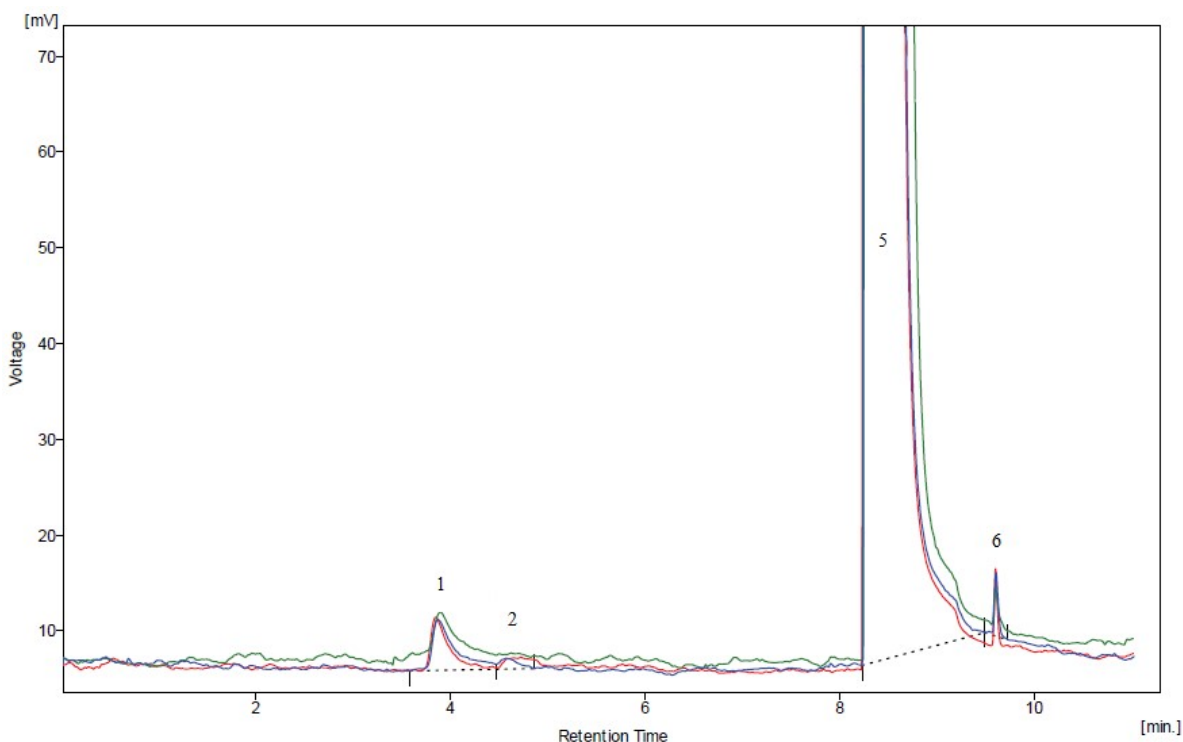
Dále byla také provedena HS-SPME/GC-NPD analýza EDN ve vodném roztoku kyseliny borité při snížené teplotě na injektoru na 100°C. Ačkoliv byl evidentně prokázán vliv zvýšené teploty na rozklad EDN, z chromatogramu (viz obrázek 15) je patrné, že i při nižší teplotě na injektoru dochází k rozkladu EDN, z čehož vyplývá, že v takovém případě není možné zaručit opakovatelnost výsledků. Domnívám se, že naměřený výrazný rozpad EDN na HCN může být způsoben vlivem teploty a delší doby desorpce společně s velkým povrchem SPME vlákna.



Obrázek 15 – Chromatogram HS-SPME/GC-NPD analýzy EDN ve vodném roztoku kyseliny borité o koncentraci 22,24 ppm při teplotě 100 °C na injektoru, 1 – EDN, 2 – HCN, 5 – acetonitril

Aby se vyloučil vliv vody na rozklad EDN, byly provedeny obdobné testy v acetonitrilu. Roztok EDN v acetonitrilu byl proměřen při různých teplotách na injektoru, a to při 200, 150 a 100 °C (viz obrázek 16). Z výsledků vyplývá, že snížení teploty při metodě SPME/GC je sice možné, protože plocha píků zůstává při všech teplotách stejná, tzn., že dojde ke kvantitativní desorpci, ale bohužel i při nižších teplotách dochází k rozkladu EDN na HCN, tak jako je tomu u EDN ve vodných roztocích kyseliny borité.

Z naměřených dat byly stanoveny mez detekce a mez stanovitelnosti. Výpočet LOD vychází z výšky píku (viz kapitola 5.3). Z lineární závislosti výšky píku na koncentraci analytu byla odečtena směrnice přímky, $b_i = 0,074$ a ze záznamu šumu detektoru bylo určeno maximální kolísání základní linie, $h_{\max} = 0,688 \text{ mV}$. Vypočtená mez detekce u roztoku EDN v acetonitrilu je 28 ppm. Obdobným způsobem byla vypočtena mez detekce ve vodných roztocích na hodnotu 0,2 ppm ($b_i = 10,105$, $h_{\max} = 0,0722 \text{ mV}$). Vlastní těkavost acetonitrilu potlačuje rovnovážný obsah stanovovaných složek v plynné fázi, což vede k výraznému snížení citlivosti metody. Vzhledem k očekávaným přísným limitům reziduí EDN a HCN ve fungovaných komoditách je požadována větší citlivost metody (řádově v jednotkách ppm). Z tohoto pohledu je použití acetonitrilu jako rozpouštědla pro stanovení SPME/GC s NPD detektorem nevhodné.



Obrázek 16 – Chromatogram HS-SPME/GC-NPD analýzy roztoku EDN v acetonitrilu o koncentraci 60,84 ppm, 1 – EDN, 2 – HCN, 5 – acetonitril, 6 – neznámý pík

7.2 Validace metody

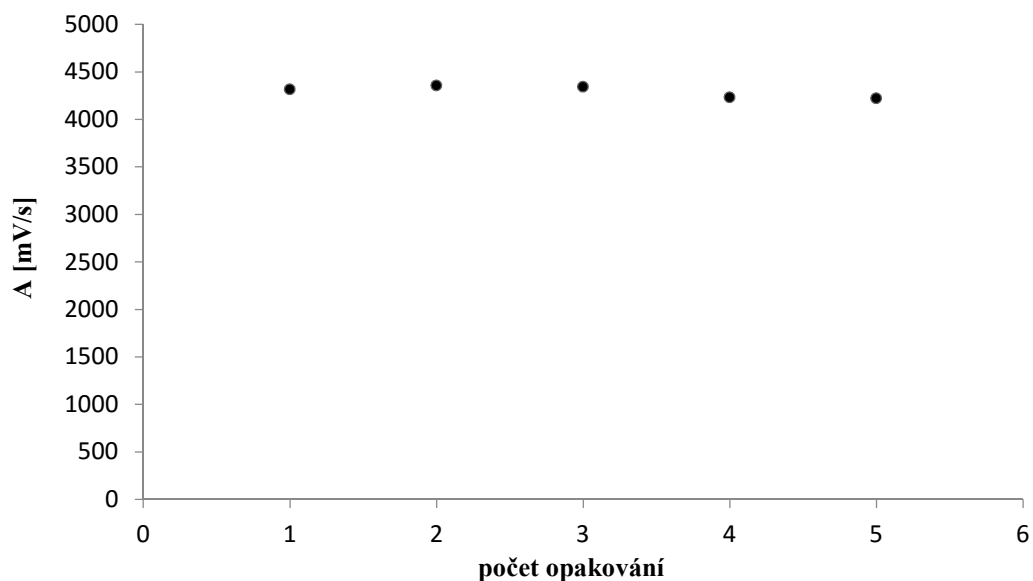
Validace metody byla provedena pouze pro kyanovodík prostřednictvím stanovení linearitu, opakovatelnosti, meze detekce a meze stanovitelnosti.

7.2.1 Opakovatelnost

Opakovatelnost metody byla stanovena na základě 5 měření roztoku kyanovodíku o koncentraci 34,9 ppm. Z naměřených ploch píků byla vypočtena relativní směrodatná odchylka RSD [%]. Naměřené a vypočtené hodnoty jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3 - Opakovatelnost metody pro koncentraci kyanovodíku 34,9 ppm

Vialka	Plocha píku [mV/s]
1	4315,021
2	4354,444
3	4343,444
4	4230,757
5	4221,043
\bar{x} [mV / s]	4292,942
s [mV / s]	56,31495
RSD [%]	1,312



Graf 4 – Grafické znázornění opakovatelnosti metody pro koncentraci kyanovodíku 34,9 ppm

Hodnota RSD by neměla přesáhnout 10 %, což bylo splněno. Relativní směrodatná odchylka vychází 1,312 %, což je velmi dobrý výsledek.

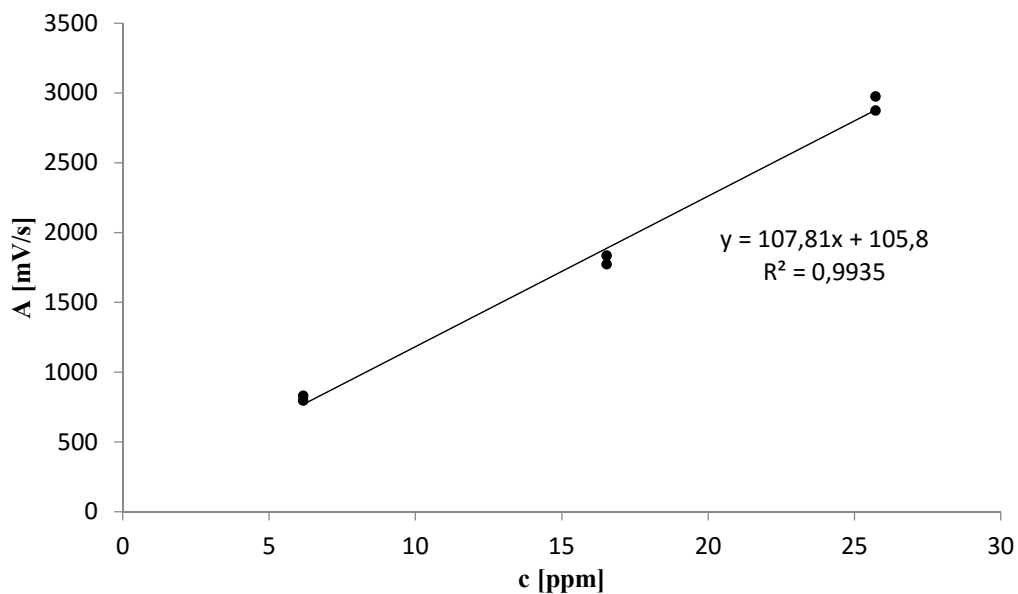
7.2.2 Linearita

Linearita pro NPD detektor byla proměřena na standard HCN, pro který byly připraveny 3 roztoky o různých koncentracích. Postup přípravy vzorků byl popsán v kapitole 7.3.4.

Po analýze standardů byly vyneseny závislosti ploch píků na koncentraci (viz tabulka 4) a byly proloženy spojnicí trendu, čímž byla získána rovnice regrese a korelační koeficient (viz graf 5).

Tabulka 4 - Koncentrace a plochy píků standardů kyanovodíku

Koncentrace HCN [mg/l]	Plocha píku [mV/s]
6,18	828,5374
	794,6836
16,54	1772,776
	1834,600
25,72	2873,834
	2973,975

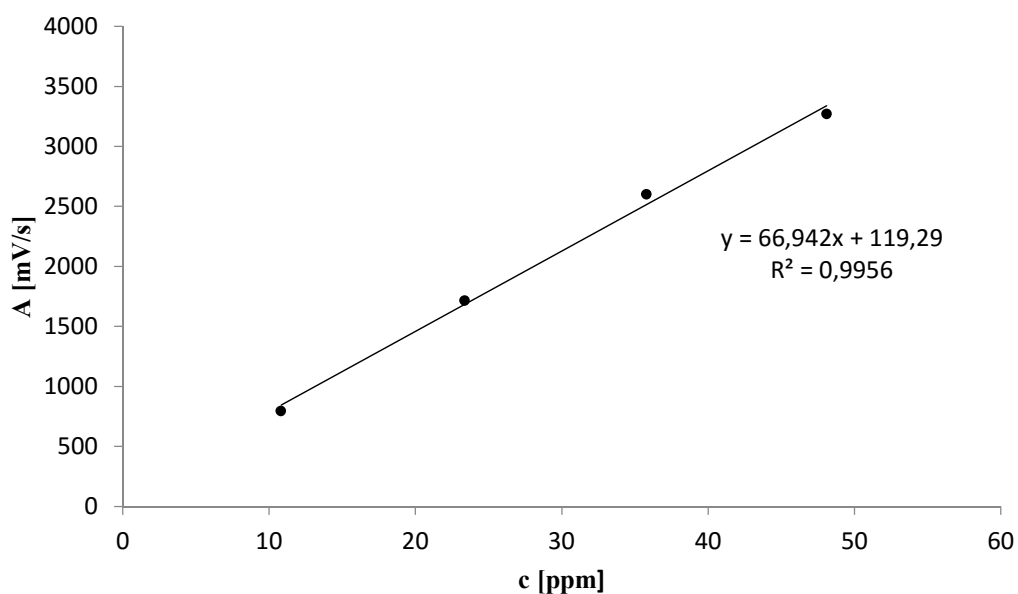


Graf 5 – Lineární závislost plochy píku na koncentraci kyanovodíku

Hodnota korelačního koeficientu 0,9935 je vyhovující, avšak detektor NPD po vypnutí nedává stejnou odezvu a bylo by nutné prověřovat kalibraci každý den. Z tohoto důvodu byla zvolena metoda standardního přídatku (viz tabulka 5 a graf 6).

Tabulka 5 - Koncentrace a plochy píků standardních přídatků kyanovodíku

A [mV/s]	Hmotnost STDP [g]	Koncentrace [ppm]
794,869	-	10,83
1715,384	0,0502	23,37
2600,337	0,0497	35,78
3271,501	0,0493	48,10



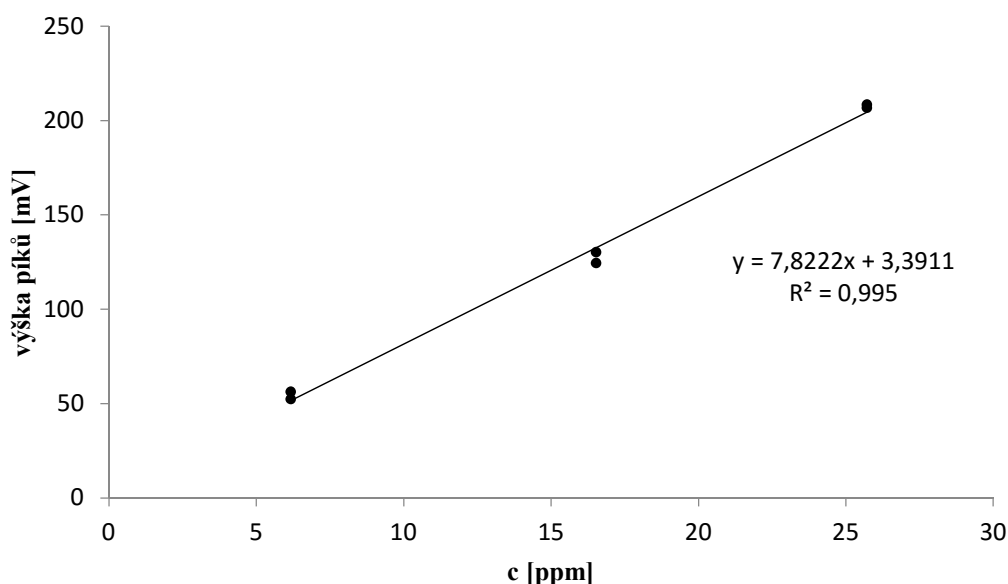
Graf 6 – Lineární závislost standardního přídatku kyanovodíku

7.2.3 Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti

U testovaného standardu kyanovodíku byla zároveň stanovena mez detekce a mez stanovitelnosti. Výpočet LOD a LOQ vychází z výšky píku (viz kapitoly 5.3 a 5.4). Po analýze byl sestrojen graf lineární závislosti výšky píků na koncentraci analytu a byl proložen spojnicí trendu. Ze zjištěné rovnice lineární regrese byla odečtena směrnice kalibrační přímky $b_i = 7,8222$ a ze záznamu šumu detektoru bylo určeno maximální kolísání základní linie, $h_{\max} = 0,377 \text{ mV}$.

Tabulka 6 - Mez detekce a mez stanovitelnosti standardu kyanovodíku

Analyt	LOD [ppm]	LOQ [ppm]
HCN	0,15	0,48



Graf 7 – Lineární závislost výšky píků na koncentraci kyanovodíku

7.3 Analýza vzorků

V současné době není zatím stanovena doba fumigace ani cílová koncentrace fumigantu (BLUEFUME) pro pesticidní použití (registrace BLUEFUME se připravuje). Po vyřešení analytických metod budou podrobně testovány různé způsoby odvětrání (síla vrstvy, průtoky a způsoby provzdušňování atd.) a bude sledován jejich průběh, na základě nichž se ve spolupráci s Ústavem analýzy potravin a výživy (VŠCHT) následně navrhnou přípustné limity reziduí. Pro pesticidní využití se předpokládá, že podle výsledků bude nutné doby expozice a koncentrace snížit tak, aby fumigace byla stále účinná a zároveň zbytkové koncentrace v komoditách po odvětrání byly pro další zpracování obilovin zcela bezpečné.

Pro modelové testy fumigací byla zvolena koncentrace 10 g/m³ po dobu 24 hodin. Takto nastavené parametry vyplývají právě z doporučené metodiky uvedené v registraci BLUEFUME CZ-0008969-0000.²³

Validovaná metoda HS-SPME/GC-NPD byla aplikovaná na vzorky hrubé mouky a zrní (pšenice). Fumigace vzorků proběhla v 10 litrovém těsnícím uzavíratelném plastovém boxu. Do boxu byly vloženy misky se vzorky a následně byl nadávkován kapalným kyanovodíkem (BLUEFUME). Po 24 hodinách byly vzorky vyndány z boxu do digestoří a nechaly se odvětrávat. Vzorky byly odebrány po 4,5 hodinách a 24 hodinách. Odebraný vzorek mouky a zrní se následně nechal louhovat v roztoku kyseliny borité 3 hodiny v uzavřených vialkách.

Cílem bylo aplikovat validovanou metodu na fumigované vzorky pro zjištění koncentrace kyanovodíku v matrici. K určení koncentrace byla použita metoda standardního přídatku. Jako srovnávací metoda pro správnost výsledků byla použita fotometrie.

Koncentrace kyanovodíku ve fumigované a odvětrané matrici byla vypočítána podle následujících vzorců:

$$c_{STDP}[ppm] = \frac{m_{STDP} \cdot c_{\Theta HCN} \cdot 1000000}{m_{\Theta} + m_{STDP}}$$

$$c_{\Theta}[ppm] = \frac{c_{STDP} \cdot A}{A_{STDP} - A}$$

$$c[ppm] = \frac{c_{\Theta} \cdot m_{\Theta}}{m_{matrice}}$$

c_{STDP} ... koncentrace standardního přídatku kyanovodíku [ppm]

m_{STDP} ... hmotnost standardního přídatku kyanovodíku [g]

$c_{\Theta HCN}$... koncentrace roztoku kyanovodíku [%]

m_{Θ} ... hmotnost roztoku [g]

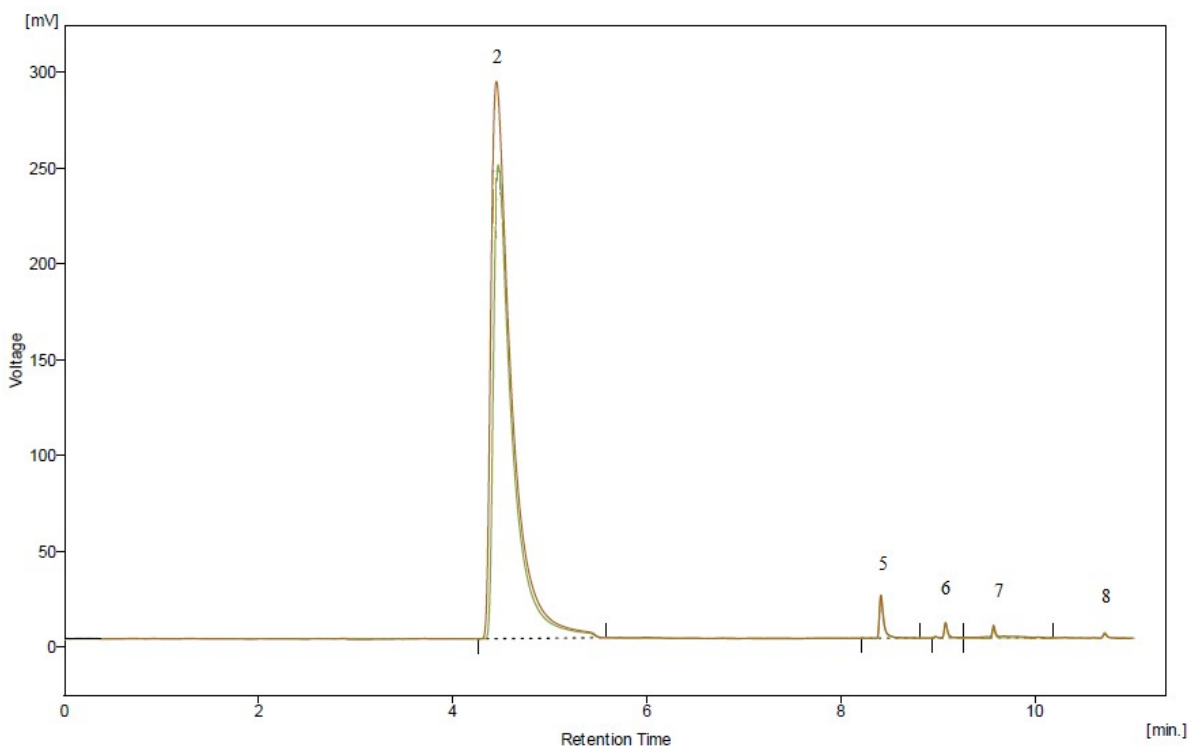
c_{Θ} ... koncentrace kyanovodíku v roztoku [ppm]

c ... celková koncentrace kyanovodíku v původním vzorku [g]

U vzorku mouky po 4,5 hodinách odvětrání byla metodou HS-SPME/GC-NPD pomocí standardního přídatku stanovena koncentrace kyanovodíku 196,48 ppm a fotometricky bylo stanoveno 197,8 ppm (viz tabulka 7 a obrázek 17).

Tabulka 7 – Hodnoty k výpočtu obsahu kyanovodíku ve fumigovaném vzorku mouky odebrané po 4,5 hodinách odvětrání

	Koncentrace roztoku HCN	Hmotnost matrice [g]	Hmotnost roztoku [g]	Hmotnost STDP [g]	A [mV/s]	A _{STDP} [mV/s]
Mouka	0,12%	1,0344	5,4903	0,0498	3313,124	4278,543

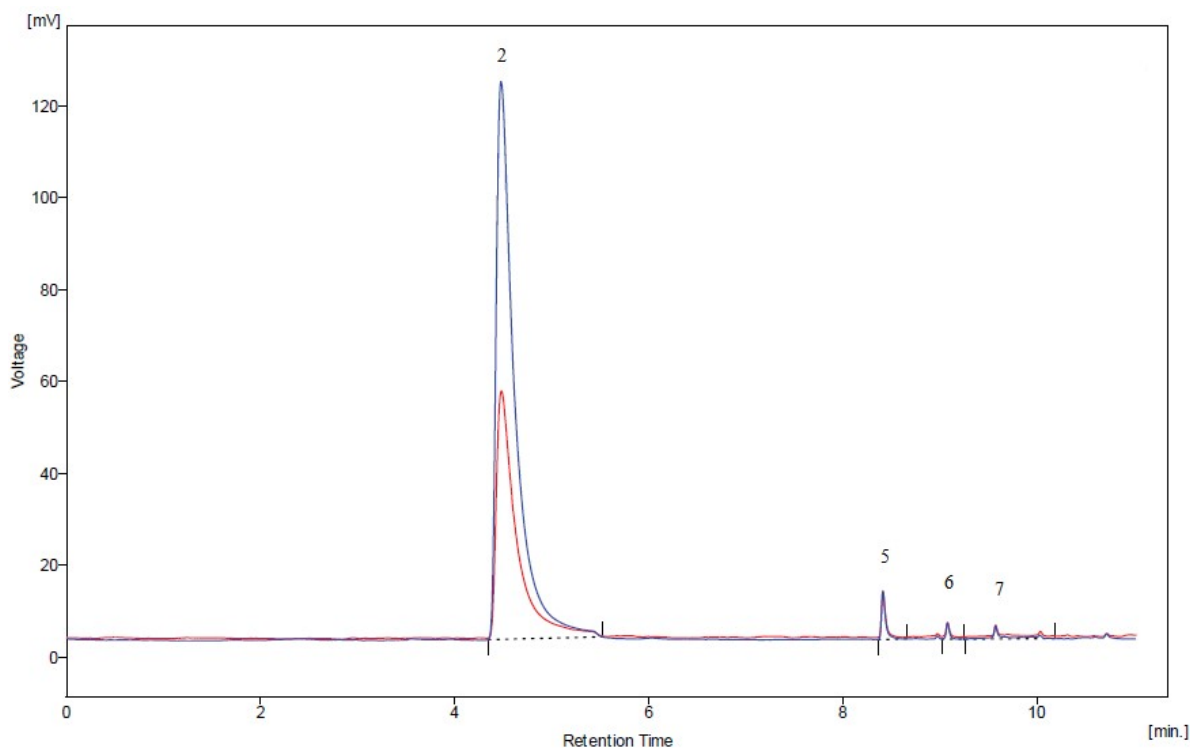


Obrázek 17 – Chromatogram HS-SPME/GC-NPD analýzy vzorku mouky po 4,5 hodinách odvětrání, 2 – HCN, 5 – acetonitril, 6 – neznámý pík, 7 – neznámý pík, 8 – neznámý pík

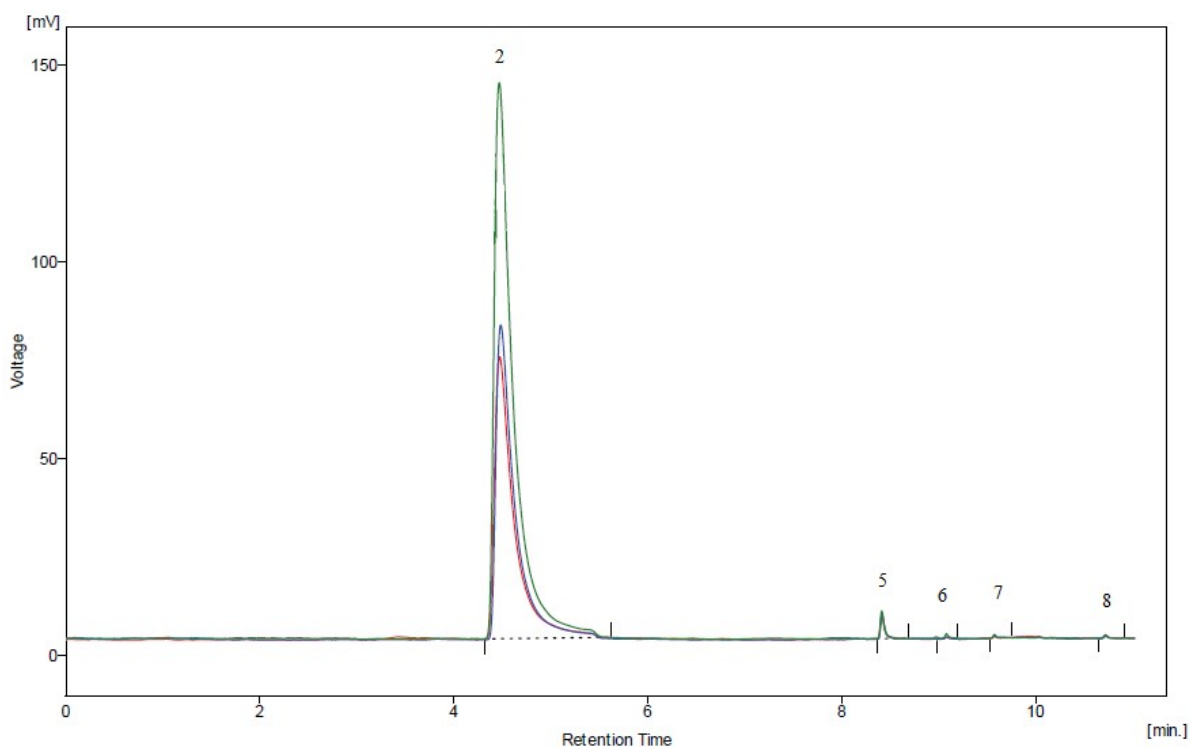
Po 24 hodinách odvětrávání byla stanovena metodou HS-SPME/GC-NPD u vzorku mouky koncentrace kyanovodíku 52,29 ppm a fotometricky bylo stanoveno 56 ppm (viz tabulka 8 a obrázek 18). U vzorku zrní bylo stanoveno HS-SPME/GC-NPD metodou koncentrace kyanovodíku 69,67 ppm a fotometricky bylo stanoveno 69,35 ppm (viz tabulka 8 a obrázek 19).

Tabulka 8 – Hodnoty pro výpočty koncentrací kyanovodíku ve fumigovaných vzorcích mouky a zrní odebraných po 24 hodinách odvětrání

	Koncentrace roztoku HCN	Hmotnost matrice [g]	Hmotnost roztoku [g]	Hmotnost STDP [g]	A [mV/s]	A _{STDP} [mV/s]
Mouka	0,12%	1,0205	4,8312	0,0497	777,76	1638,151
Zrní		1,0045	4,565	0,0497	1056,319	1946,815



Obrázek 18 - Chromatogram HS-SPME/GC-NPD analýzy vzorku mouky po 24 h odvětrání, 2 – HCN, 5 – acetonitril, 6 – neznámý pík, 7 – neznámý pík



Obrázek 19 – Chromatogram HS-SPME/GC-NPD analýzy vzorku zrní po 24 h odvětrání, 2 – HCN, 5 – acetonitril, 6 – neznámý pík, 7 – neznámý pík, 8 – neznámý pík

8 Závěr

Tato diplomová práce se zabývá stanovením reziduí kyanovodíku a dikyanu ve vybraných komoditách. Teoretická část je věnována jejich vlastnostem, výrobě a využití jako fumigačních prostředků. Následující kapitoly podávají informace o jejich stanovení pomocí analytických a instrumentálních metod. Dále je zde zmíněna metoda SPME, která je využita v experimentální části. Na konci teoretické části je zmíněna validace metod.

Cílem práce bylo navrhnout a validovat metodu HS-SPME/GC pro stanovení fumigantů kyanovodíku a dikyanu ve vybraných komoditách.

V experimentální části jsou popsány parametry instrumentálních metod, které byly použity v rámci diplomové práce. Nejprve byl proveden vývoj a následná optimalizace metody HS-SPME/GC-NPD pro roztok kyanovodíku a takto optimalizovaná metoda byla aplikována i na roztok dikyanu.

V rámci provedených prací byla optimalizována navržená SPME/GC-NPD metoda, přizpůsobena instrumentálnímu vybavení laboratoře odboru výzkumu LZ Draslovka a.s. a následně byla provedena její validace (linearita, opakovatelnost, mez detekce a mez stanovitelnosti). Opakovatelnost poskytla uspokojivé výsledky ($RSD < 2 \%$). Metoda je v oblasti měřených hodnot lineární, korelační koeficient u obvyklé kalibrace ani při metodě standardního přídatku neklesl pod 0,99. Mez detekce u HCN byla stanovena 0,15 ppm a mez stanovitelnosti na 0,48 ppm.

Výsledky diplomové práce potvrdily, že doporučená HS-SPME metoda je vhodná pro rychlé a dostatečně přesné stanovení zbytkových množství HCN v obilovinách. Pro EDN je HS-SPME/GC-NPD metoda z důvodů rozkladu při vyšších teplotách, nutných k desorpci v injektoru, nevhodná a musí být tedy zvolena jiná šetrnější technika (např. fotometrie).

Práce významně přispěla i k nalezení vhodných podmínek především pro stabilizaci roztoků EDN. Jako ideální se jeví mírně kyselé prostředí kyseliny borité. Takto stabilizované roztoky EDN ve vodě jsou poměrně stabilní dokonce i při pokojové teplotě. Tyto roztoky byly analyzovány nejprve argentometricky nebo fotometricky a následně byly použity pro testování vyvíjené metody a tvorbu kalibrací. Při analýzách fumigovaných vzorků obilovin byla použita metoda standardního přídatku, která se jeví z důvodů horší opakovatelnosti odezvy na detektoru (NPD) jako vhodnější než obvyklá jednorázová kalibrace.

První výsledky na reálných vzorcích umožnily určit přibližnou dobu nutnou k odvětrání obilovin a předběžně stanovit očekávatelný cílový obsah reziduí HCN a EDN. Po 5 dnech odvětrání bylo dosaženo koncentrace pod 10 ppm. Výsledky stanovené metodou HS-SPME/GC-NPD jsou v dobré shodě s fotometrickým stanovením kyanovodíku.

Do budoucnosti pro vývoj stanovení EDN a HCN metodou HS-SPME by bylo vhodné odzkoušet jiné linery a případné jiné typy vláken. Z pohledu vývoje jiných metod by bylo vhodné se zaměřit na selektivní stanovení EDN vedle HCN, například fotometricky.

9 Seznam obrázků

Obrázek 1 – Vzorec a struktura fosfinu.....	11
Obrázek 2 – Vzorec a struktura kyanovodík	12
Obrázek 3 – Vzorec a struktura ethandinitril.....	14
Obrázek 4 – Uspořádání spektrofotometru.....	18
Obrázek 5 – Schematické znázornění GC	19
Obrázek 6 – Zařízení pro mikroextrakci tuhou fází	24
Obrázek 7 – Extrakční a desorpční postup u metody HS-SPME	25
Obrázek 8 – Schéma extrakčních mechanismů absorpce a adsorpce – počátek sorpce	27
Obrázek 9 - Schéma extrakčních mechanismů absorpce a adsorpce – rovnovážný stav	27
Obrázek 10 – Chromatogram HS-SPME/GC-NPD analýzy EDN ve vodném roztoku kyseliny borité o koncentraci 8,43 ppm	38
Obrázek 11 – Chromatogram HS-SPME/GC-NPD analýzy EDN ve vodném roztoku kyseliny borité o koncentraci 26,23ppm	39
Obrázek 12 – Chromatogram GC-FID analýzy kapalně fáze zásobního roztoku standardu EDN ve vodném roztoku kyseliny borité o koncentraci 0,2 %,	40
Obrázek 13 – Chromatogram GC-FID analýzy plynné fáze EDN ve vodném roztoku kyseliny borité o koncentraci 26,43 ppm	40
Obrázek 14 – Chromatogram GC-FID analýzy plynné fáze EDN ve vodném roztoku kyseliny borité o koncentraci 56,66 ppm	41
Obrázek 15 – Chromatogram HS-SPME/GC-NPD analýzy EDN ve vodném roztoku kyseliny borité o koncentraci 22,24 ppm při teplotě 100 °C na injektoru.....	42
Obrázek 16 – Chromatogram HS-SPME/GC-NPD analýzy roztoku EDN v acetonitrilu o koncentraci 60,84 ppm	43
Obrázek 17 – Chromatogram HS-SPME/GC-NPD analýzy vzorku mouky po 4,5 hodinách odvětrání	48
Obrázek 18 - Chromatogram HS-SPME/GC-NPD analýzy vzorku mouky po 24 h odvětrání	49
Obrázek 19 – Chromatogram HS-SPME/GC-NPD analýzy vzorku zrní po 24 h odvětrání	49

10 Seznam grafů

Graf 1 – Závislost plochy píků kyanovodíku na době inkubace	36
Graf 2 – Závislost plochy píků na době extrakce	37
Graf 3 – Grafické znázornění závislosti doby louhování na ploch píků kyanovodíku.....	38
Graf 4 – Grafické znázornění opakovatelnosti metody	44
Graf 5 – Lineární závislost plochy píku na koncentraci kyanovodíku	45
Graf 6 – Lineární závislost standardního přídatku kyanovodíku.....	45
Graf 7 – Lineární závislost výšky píků na koncentraci kyanovodíku	46

11 Seznam tabulek

Tabulka 1 - Přehled komerčně dostupných stacionárních fází	26
Tabulka 2 – Tabulka závislosti ploch píků kyanovodíku na době louhování zrní	37
Tabulka 3 - Opakovatelnost metody pro koncentraci kyanovodíku 34,9 ppm.....	43
Tabulka 4 - Koncentrace a plochy píků standardů kyanovodíku	44
Tabulka 5 - Koncentrace a plochy píků standardních přídavek kyanovodíku	45
Tabulka 6 - Mez detekce a mez stanovitelnosti standardu kyanovodíku	46

12 Seznam zkratek

LD ₅₀	střední smrtelná dávka
SPME	mikroextrakce tuhou fází
DDD	dezinfekce, dezinfekce, deratizace
UV-VIS	ultrafialová - viditelná oblast
GC	plynová chromatografie
CAS	chemical abstracts service registry number
HCN	kyanovodík
EDN	dikyan
LZ Draslovka	Lučební závody Draslovka
TCD	tepelně-vodivostní detektor
ECD	detektor elektronového záchytu
FID	plamenově-ionizační detektor
NPD	dusíko-fosforový detektor
GC-MS	plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
PDMS	polydimethylsiloxan
PA	polyakrylát
CAR-PDMS	carboxen-polydimethylsiloxan
PDMS-DVB	polydimethylsiloxan-divinylbenzen
CW-DVB	carbowax-divinylbenzen
CW-TRP	carbowax-pryskyřice
HS-SPME	headspace mikroextrakce tuhou fází
DI-SPME	mikroextrakce tuhou fází pomocí přímého vnoření
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
VŠCHT	Vysoká škola chemicko-technologická
ACN	acetonitril
STDP	standartní přídavek

13 Seznam literatury

1. LELIEVELD, H. L. M., HOLAH, J. T., NAPPER, D. Hygiene in Food Processing - Principles and Practice - Pest Control of Stored Food Products: Insects and Mites. 2. Vydání. Elsevier, 2014. s. 514-519. ISBN 978-0-85709-429-2.
2. AULICKÝ, R., STEJSKAL, V. Ochrana skladovaných komodit a bezpečnost potravin. Výzkumný ústav rostlinné výroby, v.v.i. 2011. s. 25. ISBN: 978-80-7427-061-1.
3. Sury.eu – specialista na deratizaci. Fumigace. Dostupné z: <http://www.sury.eu/nase-sluzby/fumigace/>. [cit. 10. 3. 2017].
4. STEJSKAL, V., AULICKÝ, R., PLACHÝ, J. Časopis Desinfekce, desinsekce, deratizace číslo 2/2008. Fumiganty, řízené a modifikované atmosféry a insekticidní aerosoly. s. 58-60.
5. STEJSKAL, V. Ochrana před potravinovými a hygienickými škůdci. 1. vydání. Vyšehrad, Praha 1998. s. 25-90. ISBN 80-7021-236-5.
6. TICHÁ, J. Mikroorganismy a jiní škůdci v mlýnskopekárenském průmyslu a ochrana proti nim. 1. vydání. SNTL, Praha 1988. s. 111-114. ISBN 04-833-88.
7. STEJSKAL, V., ADLER, C. Fumigace a řízené atmosféry. 1. Vydání. Sdružení pracovníků desinfekce, desinsekce, deratizace České republiky. Praha 1997. s. 25-107. ISBN 80-02-01130-9.
8. POHANISH, R. P. Sittig's Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens - Phosphine. 6. vydání. Elsevier, 2012. s. 2147-2150. ISBN 978-1-4377-7869-4.
9. IPCS INCHEM – Phosphine. Dostupné z: <http://www.inchem.org/documents/pims/chemical/pim865.html>. [cit. 10. 3. 2017].
10. Wikipedia. Dostupné z: <https://simple.wikipedia.org/wiki/Phosphine#/media/File:Phosphine-3D-balls.png>. [cit. 10. 3. 2017].
11. Masarykova univerzita. Skripta - Sloučeniny fosforu. Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/1431/jaro2005/C2442/skripta/kapitola0705.html>. [cit. 11. 3. 2017].
12. Periodická tabulka – Fosfor. Dostupné z: <http://www.prvky.com/15.html>. [cit. 11. 3. 2017].

13. AULICKÝ, R., STEJSKAL, V. Efficacy and Limitations of Phosphine “Spot-Fumigation” against Five Coleoptera Species of Stored Product Pests in Wheat in a Grain Store – Short Note. *Plant Protect. Sci.*, 2015. vol. 51. s. 33-38.
14. PATOČKA, J. et al. *Vojenská toxikologie - Kyanovodík a kyanidy*. Praha: GRADA. 2004. s. 89-91. ISBN 80-247-0608-3. Dostupné z: <https://books.google.cz/?hl=cs>. [cit. 13. 3. 2017].
15. IPCS INCHEM - Hydrogen cyanide and cyanides: Human health aspects. Dostupné z: <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad61.htm#5.2>. [cit. 13. 3. 2017].
16. Chemistry-reference.com. Dostupné z: <http://chemistry-reference.com/images/ballstick/74-90-8.png> [cit. 15. 3. 2017].
17. KYSILKA, J. *Biotox.cz - Anorganické jedy*. Dostupné z: http://www.biotox.cz/toxikon/anorgan/ja_4a.php#C [cit. 15. 3. 2017].
18. DOUDA, O., ZOUHAR, M., LIŠKOVÁ, J., VAVŘIČKOVÁ, J., DLOUHÝ, M. *Aplikace plynného kyanovodíku pro ošetřování sadby, osiva a skladovaného rostlinného materiálu za účelem eradikace hád'átka Ditylenchus dipsaci*. Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha v.v.i., Česká zemědělská univerzita v Praze, Lučební závody Draslovka a.s. Kolín. ISBN 978-80-7427-174-8.
19. DLOUHÝ, M., AULICKÝ, J., LIŠOVÁ, J., ŠIMBERA, J., STEJSKAL, V. *Metodika bezpečné aplikace pomocí nové komory a formulace HCN ochrany osiv a rostlinných materiálů proti skladištních brouků a zavíječů*. Výzkumný ústav rostlinné výroby v.v.i. a Lučební závody Draslovka Kolín. 2014.
20. MATAR, S., HATCH, L. F. *Chemistry of Petrochemical Processes - Chemicals Based on Methane*. 2. vydání. Elsevier, 2001. s. 137-138. ISBN 978-0-88415-315-3.
21. BENVENUTO, M. A. *Industrial Chemistry - For Advanced Students - Hydrogen cyanide*. De Gruyter, 2015. s. 37-40. ISBN 978-3-11-035169-9.
22. *Kyanovodík*. Dostupné z: <https://www.irz.cz/repository/latky/kyanovodik.pdf> [cit. 20. 3. 2017].
23. *Vnitropodniková legislativa. Technologický postup plynování prázdných objektů/skladů/ přípravkem BLUEFUME*. Lučební závody Draslovka a.s. Kolín. [cit. 21. 3. 2017]

24. POHANISH, R. P. Sittig's Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens - Cyanogen. 6. vydání. Elsevier, 2012. s. 800-802. ISBN 978-1-4377-7869-4.
25. Masarykova univerzita, Brno, CZ. Způsob výroby ethandinitrilu oxidací kyanovodíku. Vynálezci: PAZDERA, P., HAVEL, J., ZELINKA, K., ŠIMBERA, J. Česká republika. Patentový spis CZ 2011-816 A3. 23. 1. 2013.
26. Wikiwand. Dostupné z: <http://www.wikiwand.com/cs/Dikyan> [cit. 22. 3. 2017].
27. E. I. du Pont de Nemours and Company, US. Manufacture of cyanogen. Vynálezce: MOJÉ, W. Spojené státy americké. Patentový spis US 2712493 A. 5. 7. 1955.
28. Hoechst Aktiengesellschaft, DE. Process for the manufacture of cyanogen. Vynálezci: RIMENSCHNEIDER, W., WEGENER, P. Německo. Patentový spis US 3997653 A. 14. 12. 1976.
29. FIERCE, W. L., SANDER, W. J. A new method for the synthesis of cyanogen. Industrial & engineering chemistry. 1961. vol. 53. s. 985-987.
30. E. I. du Pont de Nemours and Company, US. Manufacture of cyanogen. Vynálezci: LACY, B. S., BOND, H. A., HINEGARDNER, W. S. Spojené státy americké. Patentový spis US 2399361 A. 30. 4. 1946.
31. BROTHERTON, T. K., LYNN, J. W. The synthesis and chemistry of cyanogen. Chemical reviews. 1959. vol. 59. s. 841-883.
32. BARTOŠ, M., ŠRÁMKOVÁ, J., STANĚK, V., RENGGER, F., KALOUS, J. Analytická chemie I. - skripta. Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice. 2004. s. 144-149.
33. Vnitropodniková legislativa – Argentometrické stanovení celkového HCN. Lučební závody Draslovka Kolín a.s. [cit. 28. 3. 2017].
34. KLOUDA, P. Moderní analytické metody. Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava. 2003. s. 61-80. ISBN 80-86369-07-2.
35. BARTUŠEK, M., PAZOUREK, J. Základy metod analytické chemie – skripta. Brno, 2002. s. 70-76. Dostupné z: http://www.sci.muni.cz/~analchem/files/pdf/bartusek_skripta.pdf [cit. 30. 3. 2017].
36. Wikipedia. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Spektrofotometrie> [cit. 30. 3. 2017].
37. Vnitropodniková legislativa – Fotometrické stanovení CN. Lučební závody Draslovka Kolín a.s. [cit. 30. 3. 2017].

38. CHURÁČEK, J. Analytická separace látek. Státní nakladatelství technické literatury. 1. vydání. 1990. s. 384. ISBN 80-03-00569-8. Dostupné z: http://www.chesapeake.cz/chemie/download/skripta/vs/analyticka_separace_latek.pdf [cit. 5. 4. 2017].
39. PRAUS, P., VONTOROVÁ, J. Analytická chemie II. Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava. 2015. s. 100-105. ISBN 978-80-248-3734-5. Dostupné z: http://katedry.fmfi.vsb.cz/617/Analyticka_chemie_II.pdf [cit. 5. 4. 2017].
40. Plynová chromatografie s dusíkovo-fosforovým detektorem (GC-NPD). Air products. Dostupné z: [cit. 6. 4. 2017].
41. PROCHÁZKOVÁ, D. Mikroextrakce na tuhou fázi a stanovení obsahu analytů. Chem.listy 96, 827-852 (2002).
42. ARTHUR, C. L., PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. Anal. Chem. 62, 2145-2148 (1990).
43. YANG, X., PEPPARD, T. Solid-Phase Microextraction for Flavor Analysis. J. Agric. Food Chem. 42. 1994. s. 1925-1930.
44. Sigma Aldrich. 2017. <https://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4547.pdf> [cit. 9. 4. 2017].
45. POUSTKAJ, J. Izolační a separační metody – Mikroextrakce tuhou fází. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. Dostupné z: https://web.vscht.cz/~poustkaj/ISM%20Cz-10%20SPME_1008%20rev%20022015.pdf [cit. 10. 4. 2017].
46. PRAGST, F. Application of solid-phase microextraction in analytical toxicology. Analytical and Bioanalytical Chemistry. vol. 388 (7). 2007. s. 1393-1414.
47. Metody analýz potravin – Vzorkování metodou SPME (Solid phase microextraction). Dostupné z: <https://is.mendelu.cz/eknihovna/opory/index.pl?cast=52969> [cit. 11. 4. 2017].
48. PEÑALVER, A., POCURULL, E., BORRULL, F., MARCÉ, R. M. Trends in solid-phase microextraction for determining organic pollutants in environmental samples. Elsevier - Trends in analytical chemistry. Vol. 18 (8). 1999. s. 557-568.
49. PROCHÁZKOVÁ, D. Mikroextrakce na tuhou fázi a stanovení obsahu analytů. Sigma Aldrich, s.r.o. Chemické listy 96. 2002. s. 827-852.

50. Teorie SPME. Dostupné z: https://fvhe.vfu.cz/informace-o-fakulte/sekce-ustavy/uvozp/teorie_spme.pdf [cit. 14. 4. 2017].
51. TAKEKAWA, K., OYA, M., KIDO, A., SUZUKI, O. Analysis of Cyanide in blood by headspace Solid-phase microextraction (SPME) and capillary Gas chromatography. *Chromatographia*. Vol. 48 (3/4). 1998. s. 209-214.
52. SMITH, P. A., SHEELY, M. V., KLUCHINSKY, T. Jr. Solid phase microextraction with analysis by gas chromatography to determine short term hydrogen cyanide concentration in a field setting. *J. Sep. Sci.* Vol. 25. 2002. s. 917-921.
53. Vnitropodnikový materiály. Metoda stanovení EDN/HCN pomocí HS-SPME/GC-MS, VŠCHT Praha. Lučební závody Draslovka a.s. Kolín. [cit. 7. 5. 2017]
54. BAREK, J., a kol. Nomenklatura a terminologie - Metrologická terminologie v chemii. *Chemické listy* 94 (7). 2000. s. 439–444. ISSN 1213-7103.
55. Validace analytických metod. [cit. 8. 5. 2017]. Dostupné z: <http://www.hplc.cz/Validace/index.htm>.
56. Návod k praktickým úlohám – pokročilé praktikum z analytické chemie. Katedra analytické chemie, Univerzita Karlova. 2016. [cit. 8. 5. 2017]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/navody.pdf>.