

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO - TECHNOLOGICKÁ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2009

Dana JIRKOVSKÁ

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO - TECHNOLOGICKÁ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

**STANOVENÍ NITROLÁTEK, CHLORFENOLŮ
A CHLOBENZOOVÝCH KYSELIN VE VODĚ**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

AUTOR PRÁCE: Dana Jirkovská

VEDOUCÍ PRÁCE: Doc. Ing. Karel Komárek, CSc.

2009

UNIVERSITY OF PARDUBICE
FACULTY OF CHEMICAL TECHNOLOGY
DEPARTMENT OF ANALYTICAL CHEMISTRY

**DETERMINATION OF NITROCOMPOUNDS,
CHLOROPHENOLS AND CHLORBENZOIC ACIDS
IN WATER**

BACHELOR THESIS

AUTHOR: Dana Jirkovská

SUPERVISOR: Doc. Ing. Karel Komárek, CSc.

2009

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra analytické chemie
Akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Dana JIRKOVSKÁ**
Studijní program: **B2802 Chemie a technická chemie**
Studijní obor: **Chemie a technická chemie**

Název tématu: **Stanovení nitrolátek, chlorfenolů a chlorbenzoových kyselin ve vodě**

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


- 1) Provedte literární rešerši na zadané téma.
- 2) Zaměřte se zejména na extrakci středně polárních a silně polárních organických látek z vody.
- 3) Zhodnoťte používané metody.

Rozsah grafických prací:
Rozsah pracovní zprávy:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**
Seznam odborné literatury:


Podle pokynů vedoucího práce.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. Ing. Karel Komárek, CSc.**
Katedra analytické chemie
Konzultant bakalářské práce: **Ing. Petra Knittlová**
Katedra analytické chemie

Datum zadání bakalářské práce: **23. února 2009**
Termín odevzdání bakalářské práce: **26. června 2009**


prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.
děkan

L.S.


prof. Ing. Karel Vytřas, DrSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2009

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 15.6.2009

Dana Jirkovská

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucímu své bakalářské práce doc. Ing. Karlu Komárkovi CSc. a Ing. Petře Knittlové za pomoc a poskytnutí cenných rad v průběhu vypracování. Také děkuji svým rodičům a přátelům za psychickou podporu během dosavadního studia.

Souhrn

Tato bakalářská práce se zabývá aplikací vybraných extrakčních technik pro stanovení chlorfenolů, nitrofenolů a chlorbenzoových kyselin ve vodné matrici. V úvodní části jsou stručně zmíněny jednotlivé extrakční techniky z hlediska jejich principů. Vstup do diskutované problematiky je uveden výčtem základních charakteristických vlastností stanovovaných látek včetně jejich výroby a výskytu v životním prostředí. Hlavní část práce je věnována využití jednotlivých extrakčních technik za konkrétních podmínek stanovení a s konkrétními chemikáliemi. Kde to bylo názorné, je uveden i přesný postup stanovení a také možnost optimalizace celého procesu. Závěr práce je věnován zhodnocení využitých technik a jejich porovnání mezi sebou.

Klíčová slova: chlorfenoly, nitrosloučeniny, chlorbenzoové kyseliny, extrakční techniky

Summary

This bachelor's work deals with the application of various extraction techniques for the determination of chlorophenols, nitrocompounds and chlorbenzoic acids in water matrix. In exordium, there are briefly mentioned individual extraction techniques in term of their principles. The introduction to discussed problems is presented by enumeration of basic characteristic properties of determinated substances including their production and occurence in the environment. The main part of the essay is devoted to usage of individual extraction techniques in concrete conditions of determination and with particular chemicals. Where descriptive, there is listed the exact process of determination and possibility of optimalization of whole process. The conclusion is focused on evaluation of used techniques and their comparison.

Key words: chlorophenols, nitrocompounds, chlorbenzoic acids,
extraction techniques

Obsah

1	Úvod	11
2	Teoretická část	12
2.1	Významné sloučeniny a extrakční techniky	12
2.1.1	Chlorofenoly	12
2.1.2	Chlorbenzoové kyseliny	12
2.1.3	Nitrosloučeniny	13
2.1.4	Extrakce	14
2.2	Analýza chlorfenolů	18
2.2.1	Metoda SPME – MD	18
2.2.2	Metoda DLLME – GC- ECD	20
2.2.3	Mikroextrakce s rozpouštědlem ze vzorku ve vodné lázni (SME).....	22
2.2.4	Mikroextrakce kapalina – kapalina – kapalina (LLLME).....	23
2.2.5	Superkritická fluidní extrakce	24
2.3	Analýza chlorbenzoových kyselin.....	26
2.3.1	Separace 4-chlorbenzoové kyseliny coby metabolitu léku.....	26
2.3.2	Metoda separace s využitím extrakce následované krystalizací v technologické praxi	26
2.3.3	Extrakce kapalnou fází	27
2.3.4	Iontovyměnná SPE extrakce.....	27
2.4	Analýza nitrosloučenin	29
2.4.1	Detekce výbušnin ve vodné matrici metodou SPME a SDME	29
2.4.2	Mikroextrakce tuhou fází se speciálním vláknem	30
2.4.3	Extrakce tuhou fází spojená on-line s SFC.....	32
2.4.4	Extrakce magnetickou tuhou fází	32
2.5	Porovnání extrakčních technik	33
3	Závěr	35
4	Seznam zkratk	36
5	Použitá literatura.....	38
6	Seznam tabulek.....	40
7	Seznam grafů	41
8	Seznam obrázků.....	42
9	Seznam příloh	43
	Příloha A.....	44
	Příloha B	45
	Příloha C	46

1 Úvod

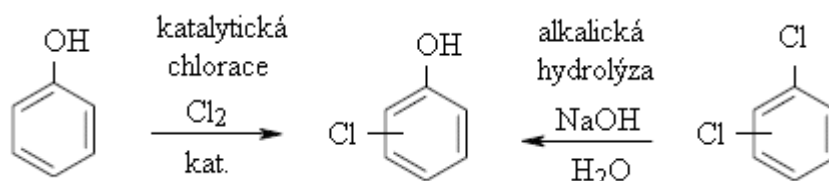
Voda představuje pro člověka jeden z nejcennějších statků – život bez ní by nebyl reálný. Zvyšující se produkce barviv, umělých hmot a stále se rozvíjející průmysl s sebou nesou i stinnou stránku věci – znečištění zdrojů podzemních vod a povrchových toků. S tím souvisí nutnost vodu efektivně analyzovat. V mé práci se věnuji stanovení chlorfenolů, nitrosloučenin a chlorbenzoových kyselin ve vodě. Možností analýzy je několik, já se zaměřila pouze na extrakci, která je doplněna další vhodnou metodou, nejčastěji GC nebo HPLC. Z hlediska fyzikální chemie chápeme proces extrakce jako přechod složky fázovým rozhraním mezi dvěma vzájemně nemísitelnými kapalinami. Variant extrakce je několik, stručně je o jednotlivých typech psáno níže a v závěru práce jsou tyto varianty porovnány co do výhod a nevýhod jejich použití.

2 Teoretická část

2.1 Významné sloučeniny a extrakční techniky

2.1.1 Chlorfenoly

Chlorfenoly jsou v průmyslu široce využívány coby polotovary pro výrobu barviv, umělých hmot a farmaceutických substancí. Běžně je lze indikovat v odpadních vodách celulózek a papíren ¹, v průmyslových exhalacích a dále tvoří součást reziduí pesticidních, herbicidních a fungicidních přípravků. V životním prostředí vznikají krom toho i spalováním komunálního odpadu nebo tlením dřeva houbami. Chlorfenoly jsou také prekurzory vzniku polychlorovaných dibenzodioxinů a dibenzofuranů. Za normálních podmínek jsou to krystalické látky, mající bod varu nad 200 °C. Jedná se o slabé kyseliny, jejichž K_A obecně vzrůstá s počtem chlorovaných substituentů. S roztoucím počtem atomů chloru se snižuje rozpustnost chlorfenolů ve vodě. Z toxikologického hlediska mají charakteristicky pronikavý a štiplavý zápach, jsou nehořlavé, při vyšších teplotách se rozkládají na CO, CO₂ a HCl. Silně dráždí sliznice, oči a vstřebávají se kůží. Jsou fytotoxické, emryotoxické a imunotoxické. Mutagenní a karcinogenní účinky nebyly prokázány. Průmyslová syntéza chlorfenolů je založena především na dvou základních postupech, tj.:

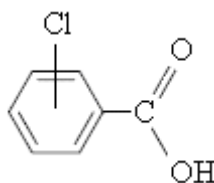


Obrázek 1. Průmyslová výroba chlorovaných fenolů ²

Jelikož ve vodě podléhají chlorfenoly oxidaci (závisející na pH, slunečním svitu a teplotě), je třeba odebrané vzorky vody, v nichž se mají stanovit, uchovávat v lahvích z tmavého skla při teplotě do 4°C ³.

2.1.2 Chlorbenzoové kyseliny

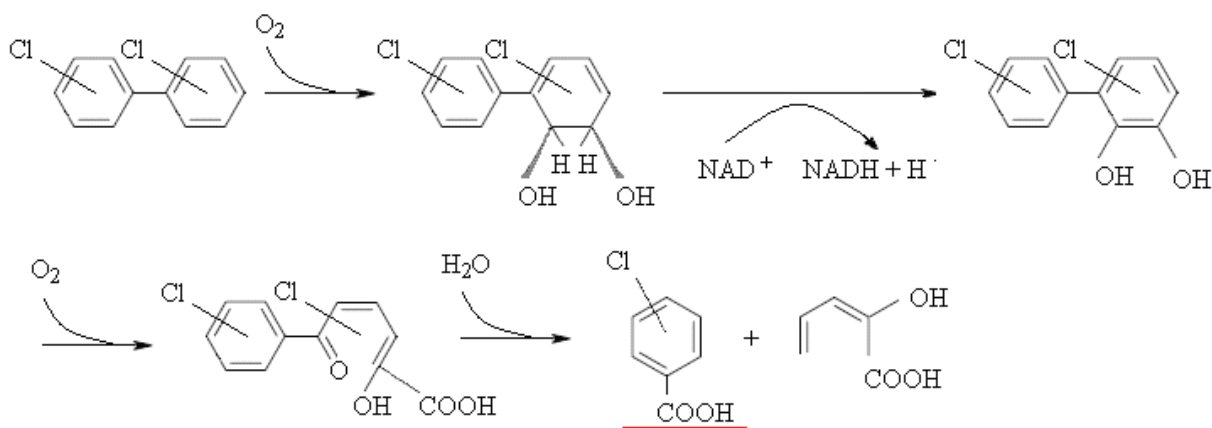
Chlorbenzoovou kyselinu chápeme jako funkční derivát kyseliny benzoové, kde je jeden atom vodíku nahrazen atomem chloru – viz. následující obrázek:



Obrázek 2. Struktura chlorbenzoové kyseliny

Tyto sloučeniny jsou silnějšími kyselinami než samotná kys. benzoová, jelikož se zde uplatňuje $-I$ efekt chloru⁴. Obecně platí, že čím blíže je vázán atom chloru ke karboxylové skupině, tím je kyselina silnější. S rostoucím počtem atomů halogenu acidita také vzrůstá. Většinou se jedná o krystalické látky, jejichž teplota tuhnutí se mění v závislosti na poloze a počtu chloru v molekule. Chlorbenzoové kyseliny se využívají jako suroviny při výrobě herbicidů, barviv a jako kovervant u lepidel a nátěrových hmot⁵. Do životního prostředí (a tedy i do vody) se dostávají nejčastěji ze tří zdrojů: jako složka herbicidů, jako produkty degradace herbicidů a jako majoritní metabolit biodegradace PCB (viz. schéma biodegradace)⁶. Při kontaktu s kůží může dojít k poleptání, stejně tak je nebezpečný zásah do očí či vdechování výparů (spalováním se mimojiné uvolňuje HCl). Není prokázáno, že by dlouhodobá a opakovaná expozice narušovala somatický stav⁷.

Schéma biodegradace PCB:



Obrázek 3. Biodegradace PCB

2.1.3 Nitrosloučeniny

Nitrosloučeninou chápeme takovou chemickou sloučeninu, která má ve své struktuře zabudovanou jednu či více nitro skupin. Jedná se o polární kapaliny mírně rozpustné ve vodě, které jsou bezbarvé nebo slabě žluté. Výroba se provádí nitrací

organické látky nitrační směsí ($\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4$) – podle žádaného produktu se podmínky výroby liší, vždy je ale třeba odvádět teplo, neb se jedná o exotermní reakci ⁸. Nevhodné zacházení s nitrosloučeninami případně přítomnost nečistot mohou mít za následek silný exotermický rozklad ⁹. Toho se využívá při výrobě výbušnin. Zřetelné explozivní vlastnosti mají pouze ty aromatické nitrosloučeniny, které mají na benzenovém jádru tři nitroskupiny. Ze sloučenin se dvěma nitroskupinami je to pouze dinitrobenzen. Nitrosloučeniny patří mezi toxické látky, jejichž účinky jsou dány strukturou. Příkladem lze uvést účinky expozice nitrobenzenem – ten napadá zejména nervovou soustavu a játra. Otrava může nastat vdechováním par či proniknutím pokožkou a projeví se nevolností, bolením hlavy, bušením srdce, křečemi a zejména modrým zabarvením rtů a tváří ¹⁰. V přírodě se nitrosloučeniny vyskytují jen velmi vzácně. Například aromatický 2-nitrofenol je součástí feromonu klíšťat, 3-nitropropionová kyselina je přítomna v houbách a některých rostlinách a nitropentadien tvoří obranou látku v termitech ¹¹.

2.1.4 Extrakce

Jedná se o separační proces, při kterém jsou v kontaktu dvě vzájemně nemísitelné fáze. Látky se rozdělují mezi tyto fáze na základě různé rozpustnosti (rozdílných rozdělovacích koeficientů) v použitých rozpouštědlech. Čím větší je rozdíl mezi rozdělovacími koeficienty látek, tím dokonalejší je jejich oddělení. Tento koeficient lze vypočítat z následujícího vztahu:

$$K_D = \frac{c_0}{c_{aq}},$$

kde c_0 představuje koncentraci analytu v organické fázi a c_{aq} koncentraci analytu ve vodné fázi. Cílem extrakce je selektivní oddělení analytu od ostatních složek nebo oddělení rušících látek od analytu. Podle zúčastněných fází klasifikujeme extrakci následovně:

- Plyn – kapalina (GLE, gas – liquid extraction, headspace metoda)
- Kapalina – kapalina (LLE, liquid – liquid extraction)
- Tuhá fáze – kapalina (SLE, solid – liquid extraction)

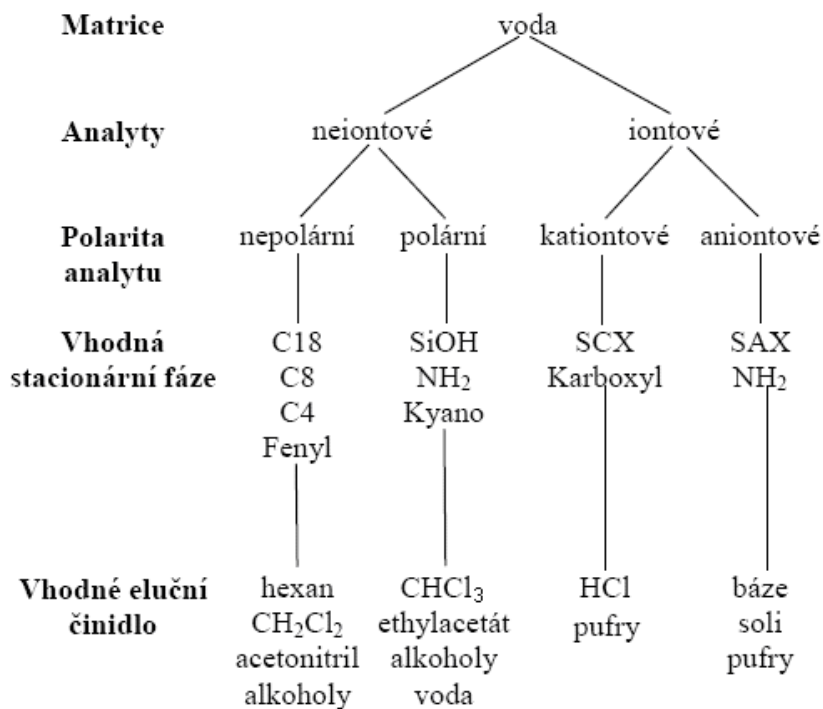
Extrakce kapalnou fází (liquid phase extraction – LPE)

Extrakce kapalinou je jednou z nejstarších postupů. Principem je distribuce analytů a interferentů mezi dvě navzájem nemísitelné fáze, a to v tomto případě mezi tuhý vzorek

a organické rozpouštědlo. Důležitým faktorem je výběr vhodného organického rozpouštědla, na kterém závisí extrakce jednotlivých složek vzorku.

Extrakce tuhou fází (solid phase extraction - SPE)

Principem SPE je selektivní zadržování skupiny látek, nejčastěji organických molekul, na tuhé fázi, která je umístěna ve formě sloupce nebo membrány v krátké kolonce – tzv. cartridge. Kolony obsahují sorbenty nejčastěji na bázi chemicky modifikovaného silikagelu. Samotné provedené SPE se skládá z pěti kroků : předúprava (kondicionování) kolonky, dávkování vzorku, promývání, sušení a vymývání (eluce)¹². Výběrem vhodného sorbentu lze extrahovat široké spektrum látek – viz obrázek 4.



Obrázek 4.: Výběr sorbentu pro SPE

On-line SPE

V tomto případě je proces SPE přímo spojen s analytickou metodou, nejčastěji s HPLC

Mikroextrakce tuhou fází (solid phase microextraction - SPME)

SPME představuje modifikaci extrakce pevnou fází. Sorbent je nanesen na krátkém úseku povrchu křemenné tyčinky ve formě tenkého filmu. Po ukončení sorbce následuje analytický stupeň, kterým je GC nebo HPLC¹³. Pro zvýšení extrakční účinnosti (zejména

u polárních látek) se do vodné fáze přidává vhodná sůl např. NaCl, čímž dojde ke snížení rozpustnosti analytů ve vodné fázi a zvýšení iontové síly roztoku. Podle povahy vrstvy jsou složky vzorku na vláknech buď absorbovány (vrstva kapalné stacionární fáze, např. polydimethylsiloxan), nebo adsorbovány (vrstva pevné stacionární fáze, např. polyakrylát). Přehled nejčastěji užívaných vláken je v tabulce 1:

Tabulka 1: Vlákná pro SPME

Stacionární fáze	Tloušťka vrstvy [μm]	Doporučeno pro analýzu
PDMS	100, 30, 7	Těkavé látky nepolární, středně těkavé látky slabě polární až nepolární
PDMS-DVB	65, 60*	Polární těkavé látky
PA	85	Polární, středně těkavé látky
CAR - PDMS	85	Stopové koncentrace těkavých látek
CW - DVB	70, 65	Polární látky
CW - TPR	50*	Povrchově aktivní látky
DVB – CAR - PDMS	50/30	Těkavé a středně těkavé látky C3 - C20

*pouze pro HPLC

Mikroextrakce kapalnou fází (liquid phase microextraction - LPME)

Tato metoda je založena na pasivní distribuci analytů mezi organickou fází a vodnou fází v měřítku mikrolitrů (kolem 10 μ). Volba vhodného typu extrakčního činidla je klíčovým rozhodnutím pro efektivní průběh předkoncentrace. Doposud bylo vyvinuto několik různých funkčních způsobů LPME– např. „sloupcová“ mikroextrakce, kontinuální mikroextrakce (CFME) nebo mikroextrakce rozpouštědlem po kapkách. Poslední zmíněný způsob s sebou přináší chybu v provedení – nestabilitu kapky. Nový způsob, který by tuto chybu odstranil a zároveň zvýšil přesnost a citlivost, je ve fázi vývinu.

Superkritická fluidní extrakce (supercritical fluid extraction – SFE)

Jedná se o metodu využívající k extrakci analytů z matrice oxid uhličitý v nadkritickém stavu (teplota >31°C a tlak >73 atm). V tomto stavu má CO₂ vlastnosti kapaliny i plynu a to poskytuje ideální podmínky pro rychlé extrakce s maximální výtěžností. Regulací tlaku a teploty lze měnit hustotu nadkritické kapaliny a tím dosahovat vlastností organických rozpouštědel v rozsahu od chloroformu přes dichlormetan po hexan. Protože je CO₂ nepolární, přidává se při extrakci polárních látek k nadkritické kapalině

polární rozpouštědlo (tzv. modifikátor)¹⁴. Fotografie zařízení používaného pro SFE je na následujícím obrázku¹⁵:



Obrázek 5.: Zařízení pro SFE

Tlaková extrakce rozpouštědlem (pressurized solvent extraction - PSE)

Technika je známá také pod názvem accelerated solvent extraction (ASE). Je to moderní technika pro extrakci analytů z tuhých, polotuhých nebo i kapalných vzorků organickým rozpouštědlem. Extrakce probíhá při zvýšené teplotě (lepší rozpustnost analytů v rozpouštědle) a tlaku (udržuje rozpouštědlo při vysoké teplotě v kapalném stavu), čímž se snižuje extrakční čas i náklady a výrazně se zvyšuje extrakční účinnost¹⁶.

Dynamická extrakce vzorků na tuhé fázi (solid phase dynamic extraction – SPDE)

Princip metody SPDE je obdobný jako SPME s tím rozdílem, že sorbent je nanesen na vnitřní povrch jehly připojené k plynotěsné stříkačce. Je to vhodné pro analýzu plyných a kapalných vzorků¹⁶.

Extrakce magnetickou tuhou fází (magnetic solid phase extraction - MSPE)

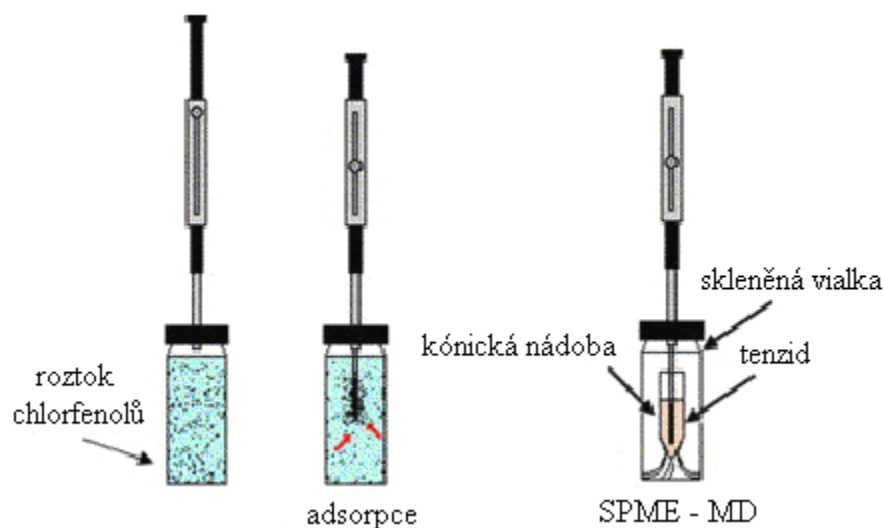
Principem extrakce magnetickou tuhou fází je adsorpce cílové sloučeniny nebo buňky na magnetické částice a následné oddělení částic s naadsorbovanými analyty pomocí vnějšího magnetického pole ze systému. Rozlišujeme separaci pozitivní, v jejímž případě jsou magneticky separovány a izolovány přímo žádané sloučeniny nebo buňky, a negativní, kdy se naopak ze systému odstraňují nežádoucí složky. Pro separace v magnetickém poli je potřebné základní vybavení, tedy vhodně zvolený

magnetický sorbent nebo nosič s imobilizovanými afinitními ligandy a vhodný magnetický separátor. Nejpoužívanějšími materiály pro přípravu magnetických sorbentů a nosičů jsou práškové oxidy železa jako magnetit (oxid železnato-železitý, Fe_3O_4) nebo maghemit (γ -železitý oxid, γ - Fe_2O_3)¹⁷.

2.2 Analýza chlorfenolů

2.2.1 Metoda SPME – MD

Aktuální standardní metody analýzy chlorfenolů ve vodě jsou založené na extrakci typu kapalina – kapalina (LLE) následovanou plynovou chromatografií (GC). LLE vyžaduje ale rozsáhlé čistící procedury, které jsou časově náročné a je k nim potřeba drahých a zdraví škodlivých organických rozpouštědel. Navíc analýza chlorfenolů GC vyžaduje derivatizaci z těchto sloučenin. Protože je snaha vyhnout se těmto nevýhodám, zvyšuje se tendence měnit LLE za extrakce v mikroměřítku, např. mikroextrakce na jedné kapce, disperzní kapalinová mikroextrakce aj., ale i za extrakci na tuhé fázi (SPE). Ačkoliv je tato technika méně zdlouhavá než LLE, je zde potřeba také toxických rozpouštědel, a to pro analytickou desorbci. Na řadu přichází mikroextrakce tuhou fází (SPME). Tato metoda je výkonná, rychlá a hlavní výhoda spočívá v tom, že se zde neuplatňují žádná toxická rozpouštědla. SPME lze užít nejen pro GC, ale také pro vysokotlakou účinnou kapalinovou chromatografii (HPLC). Ovšem i zde je jistá nevýhoda – nevhodně vedená desorbce může mít za následek široké chromatografické píky. Nad tím, aby se dosáhlo co největší účinnosti a zlepšila se poloha píků na chromatografu, se zabýval C. Mahugo Santana a kol.¹⁸. Metoda je označována jako mikroextrakce tuhou fází s micelární desorbci (SPME – MD) a vědci dospěli ke zjištění, že použitím neionogenního tenzidu dekaoxyethylenlauryletheru místo běžného rozpouštědla se znatelně sníží cena analýzy (neboť tenzidy jsou levnější než organická rozpouštědla), zlepší se reprodukce výsledků, chromatogramy a především zmizí obava z toxicity použitých chemikálií. Schéma SPME s micelární desorbci je na obrázku 6:



Obrázek 6.: Schéma SPME s micelární desorpčí

Výsledné porovnání metod pro tuto studii je v následující tabulce 2:

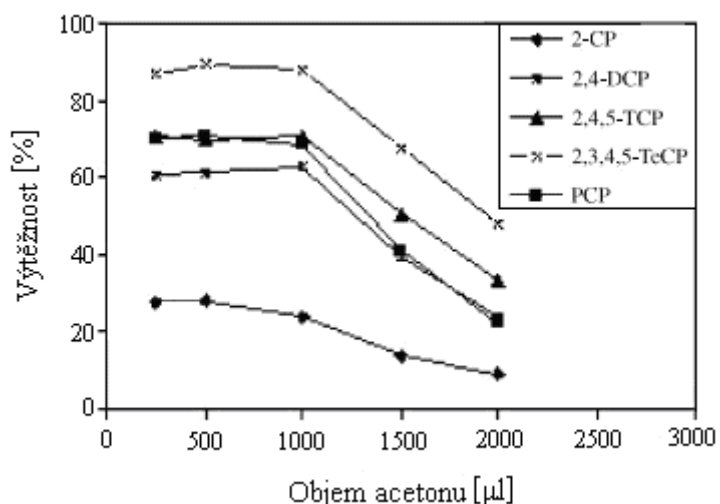
Tabulka 2: Porovnání extrakčních technik při studii SPME – MD

Extrakční technika	Doba extrakce	Rozpouštědlo	Cena a náročnost	Toxicita	Charakteristika
LLE	až 24 h	organické (≈150 ml)	nízká cena, snadné	ano	velké objemy rozpouštědla a vzorku (≈ 1 l)
SPE	20 – 30 min	organické (≈5 ml)	relativně nízká cena, relativně snadné	ano	malé objemy rozpouštědla a vzorku (≈5–100 ml)
SPME	až 60 min	organické (50 μl)	relativně nízká cena, relativně snadné	ano	malý objem vzorku (4 ml)
SPME - MD	40 – 60 min	roztok tenzidu (50 μl)	relativně nízká cena, relativně snadné	ne	malý objem tenzidu v desorpčním kroku

Efektivita procesu se může velmi lišit v závislosti na vhodné době extrakce, teplotě, přidané soli a na pH.

2.2.2 Metoda DLLME – GC- ECD

Další z možností analýzy chlorfenolů je využití paralelní disperzní mikroextrakce typu kapalina – kapalina následované plynovou chromatografií s detekcí pomocí detektoru elektronového záchytu. Tuto metodu ověřovali vědci z Íránu, jmenovitě Fattahi a kol¹. Extrakce byla provedena následujícím způsobem: bylo odebráno 5 ml vzorku z vodného roztoku obsahujícího 200 $\mu\text{g.l}^{-1}$ monochlorfenolů, 100 $\mu\text{g.l}^{-1}$ dichlorfenolů, 4 $\mu\text{g.l}^{-1}$ trichlorfenolů, 2 $\mu\text{g.l}^{-1}$ tetrachlorfenolů a pentachlorfenolů a 1 $\mu\text{g.l}^{-1}$ 2,4,6-tribromfenolu coby vnitřního standardu. Vzorek byl umístěn do speciální 10 ml skleněné zkumavky s kónickým dnem a šroubovacím závitem. Dále bylo ke vzorku přidáno 0,5 ml uhličitanu draselného a pomocí 500 μl injekční stříkačky bylo rychle vstříknuto 500 μl acetonu (přídavek acetonu ovlivňuje polaritu chlorfenolů¹) obsahujícího navíc 10 μl monochlorbenzenu (extrakční rozpouštědlo) a 50 μl anhydridu kyseliny octové (derivatizační činidlo). Po vstříknutí této vodné směsi utvořily rozptýlené kapičky monochlorbenzenu kalný roztok. V následujícím kroku byly chlorfenoly derivatizovány anhydridem kyseliny octové a během několika sekund extrahovány do jemných kapiček monochlorbenzenu. Po dvouminutovém odstředování při 5 000 ot.min^{-1} kapičky sedimentovaly na dno kónické nádoby. Objem sedimentu byl stanoven aproximačně na $5.0 \pm 0.2 \mu\text{l}$. Přesně 0.50 μl sedimentu bylo odebráno použitím 1.00- μl microstříkačky (nulový mrtvý objem) a vstříknuto do GC. Tato studie prokázala, že metoda je rychlá, reprodukovatelná a jednoduše technicky proveditelná pro zakoncentrování chlorfenolů ve vzorcích vody studniční, říční a vody z vodovodní sítě. Výsledky analýzy v porovnání s dalšími metodami jsou uvedeny v tabulce 3. Na optimalizaci metody lze pohlížet z různých hledisek – studuje se efekt druhu a objemu extrakčního činidla, rozpouštědla, derivatizačního činidla, efekt množství K_2CO_3 , doba extrakce a další. Pro ilustraci je uveden graf závislosti objemu acetonu na výtěžnosti různých druhů chlorfenolů získaných metodou DLLME



Graf 1.: Křivky výtěžností jednotlivých typů chlorfenolů pro různé objemy acetonu

Velmi podobnou studii provedli titěž vědci o několik měsíců později¹⁹, ale tentokrát se zaměřili na kombinaci SPE s DLLME – GC – ECD. Vlastní provedení se od předchozího liší pouze předúpravou vzorku, přednostním provedením SPE za využití acetonu a vody o pH 2,5 a jinými poměry reagensů. Opět se jako vzorová matrice využívá voda studniční, říční a voda z vodovodní sítě. Hlavní závěry, ke kterým došly, je získání velmi vysokého koeficientu obohacení (cca 20,000) a také možnost využít tuto metodu pro komplexní matrice (například pro vysoce fyziologické roztoky). Pro optimalizaci metody byly sledovány tyto podmínky: efekt rychlostního toku roztoku vzorku, rezistenčního objemu, vliv pH vzorku, účinek solí a vliv různých typů rozpouštědel a jejich objemů. Podle výsledků uvedených v následující tabulce 3 je patrné, že metoda je vhodná pro prekoncentraci chlorfenolů z vodných vzorků.

Tabulka 3: Porovnání extrakčních technik při studii DLLME-GC-ECD a SPE - DLLME-GC-ECD¹⁹

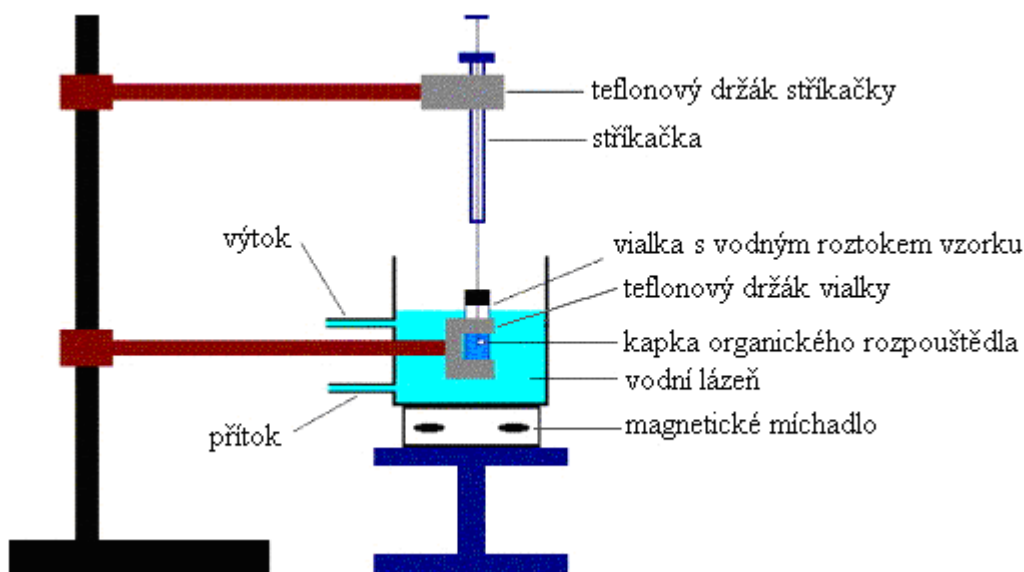
Extrakční technika	LOD* [$\mu\text{g l}^{-1}$]	RSD* [%]	Doba extrakce [min]	Objem vzorku [ml]
SPE – GC - ECD	0,003 – 0,110	<10	17	100
SPME – GC - MS	0,002 – 0,061	1,1 – 16,2	60	20
LPME – GC - MS	0,012 – 0,026	5,9 – 13,9	30	5
DLLME – GC - ECD	0,01 – 1,00	0,6 – 4,7	několik minut	5
SPE – DLLME – GC – ECD	0,0005 – 0,1	1,1 – 6,4	<10	100

* LOD: detekční limit

RSD: relativní směrodatná odchylka

2.2.3 Mikroextrakce s rozpouštědlem ze vzorku ve vodné lázni (SME)

Tato technika je obdobou klasické mikroextrakce tuhou fází. Extrahované látky jsou distribuovány mezi vodnou fází a mikropapénku organického rozpouštědla umístěnou přímo ve špičce jehly mikrostříkačky, která je ponořena do míchaného vodného roztoku vzorku. Po určité době, kdy je dostatečné množství extrahovaného analytu přeneseno do organického extrahovadla, je mikropapénka vtažena zpět do stříkačky a následně je část nebo všechno organické rozpouštědlo nastříknuto do chromatografického systému. Důležitým rysem SME je spojení dvou kroků (extrakce a dávkování analytu do GC) v mikrostříkačce, což umožňuje využít stříkačku jako miniaturní prostředek pro extrakci stejně dobře, jako dávkovací zařízení pro GC. Z toho vyplývá hlavní výhoda, tedy že SME vyžaduje pouze běžná laboratorní vybavení, jak je patrné i z obrázku 7. Krom toho se jedná o levnou techniku. Úspěšně byla využita pro analýzu několika chlorfenolů, konkrétně 2-CP, 4-CP, 2,4-DCP a 2,4,6-TCP při studii vedené H. Bagherim²⁰. V otázce optimalizace byl řešen nejprve výběr rozpouštědla. Jako nejvhodnější se jeví butylacetát a důvodem je jeho vysoká polarita. Navíc oproti dalším zkoumaným (toluen, cyklohexan a oktanol) je manipulace s kapkou butylacetátu lepší dokonce pro velmi rychlé míchání vzorku. A právě rychlost míchání (tedy počet otáček míchadla za minutu) byl také řešen a z testovaných 250, 380 a 600 ot.min⁻¹ byla jako nejlepší vybrána poslední varianta. Svůj vliv na efektivitu procesu má i doba extrakce, teplota a přítomnost solí ve vodném vzorku. Detekční limit v jednotkách ppb nám potvrzuje, že se jedná o metodu přesnou. Pro zajímavost byla tato technika využita i pro analýzu kokainu v moči.

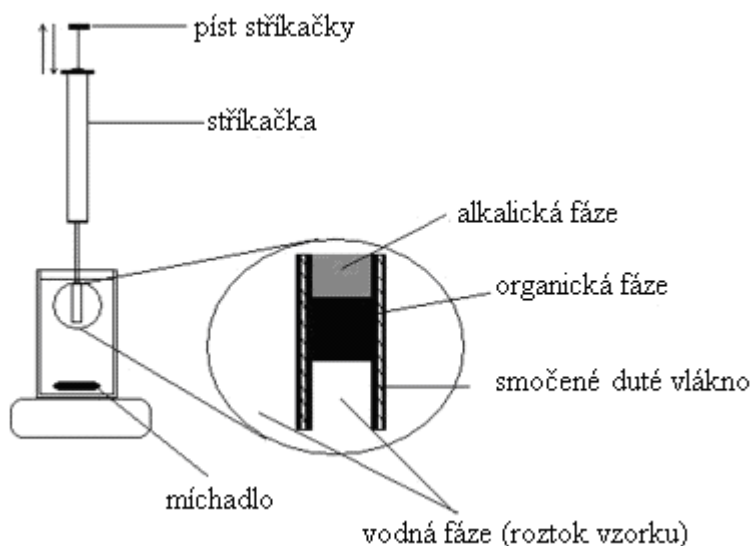


Obrázek 7.: Schéma aparatury pro SME

2.2.4 Mikroextrakce kapalina – kapalina – kapalina (LLLME)

Tato technika byla úspěšně aplikovaná Che-Yi Linem and Shang-Da Huangem ²¹ pro rozборы vody z vodovodní sítě a z vodních nádrží. Jako koncovou techniku zvolili vysotlakou účinnou kapalinovou chromatografií. Proces extrakce proběhl následovně: 14 ml vodného roztoku ($0,1 \text{ mol.l}^{-1} \text{ HCl}$) obsahujícího veškeré analyty (příkladem 2-CP, 2,4-DCP a další) v koncentracích 100 ng.ml^{-1} pro každého byl umístěn společně s míchadlem do hnědých vialek. Do vialek byl předem vpraven 1 g NaCl a roztok byl následně míchán po dobu 2 min při 1200 ot.min^{-1} . Po míchání se poklepem o stěnu nádoby odstranily bublinky. Do mikrostríkačky bylo vtaženo $12,5 \text{ } \mu\text{l}$ roztoku $0,2 \text{ mol.l}^{-1} \text{ NaOH}$, $3 \text{ } \mu\text{l}$ organického rozpouštědla, $3 \text{ } \mu\text{l}$ deionizované vody a přibližně $7 \text{ } \mu\text{l}$ vzduchu v uvedeném pořadí. Špička jehly byla vsunuta do dutého vlákna, které bylo smočeno stejným organickým rozpouštědlem díky vzlínivosti póry vlákna. Vzduch ze stríkačky byl natlačen do dutého vlákna, aby se odstranil nadbytek organického rozpouštědla. Následně byla nastříknuta voda proto, aby oddělila organickou fázi ze vzduchu a spláchla vnitřek vlákna. Dále bylo vlákno ponořeno do deionizované vody se vzorkem. Organické rozpouštědlo a $7,5 \text{ } \mu\text{l}$ NaOH ze stríkačky bylo nastříknuto do vlákna, stejně tak přibližně $5 \text{ } \mu\text{l}$ deionizované vody a vlákno se ponoří opět do roztoku vzorku. Mikrostríkačka byla spojena s čerpadlem stríkačky naprogramovaným tak, aby nastříkovalo od 5 do $12 \text{ } \mu\text{l}$ roztoku ve stríkačce nejvyšší rychlostí. To, jak jsou fáze v mikrostríkačce uspořádané, je patrné z obrázku 8. Magnetické míchadlo bylo nastaveno

na 500 ot.min⁻¹. Po extrakci trvající 40 minut bylo čerpadlo i míchadlo zastaveno, veškerá fáze byla vtažena zpět do stříkačky, vlákno se odpojilo a tato fáze byla nastříknuta do HPLC pro separaci složek a jejich analýzu. Nakonec byla jehla stříkačky vyčištěna. Zajímají – li nás optimální podmínky toho procesu, musíme dále studovat výběr vhodného rozpouštědla, dobu extrakce, objem použitého rozpouštědla, vliv přídavku soli a další faktory.



Obrázek 8.: Provedení LLLME

2.2.5 Superkritická fluidní extrakce

Superkritické fluidní extrakce využil F. J. Santos a kol²² při separaci chlorfenolů ze vzorku kontaminované půdy. Jako standardní chemikálie bylo použito 17 chlorfenolů a z nich byl připraven zásobní roztok v metylalkoholu (modifikátor) o koncentraci 500 mg.l⁻¹ jednotlivých CP. Extrakce byla uskutečněna s CO₂ o čistotě 99,995%. Všechny extrakce byly provedeny v 3ml extrakční cele z nerezavějící oceli, která byla předem naplněna vrstvou bezvodého síranu sodného a na tom byla vrstva vzorku půdy. Zbývající prostor cely byl vyplněn bezvodým síranem sodným. SFE byla vedena při tlaku 350 atm a teplotě extrakční cely 90 °C. Množství metylalkoholu v modifikátoru bylo 2,5%, rychlost toku CO₂ 1 ml.min⁻¹, doba statické extrakce 10 min, doba dynamické extrakce 30 min. Eluce byla trojnásobná. Desorbce byla provedena vymýváním 5 ml acetonitrilu. Výtěžnost všech sloučenin byla vyšší než 80% pro sorbent Hypersil a mezi 47,2 a 99,3% pro sorbent z upravených skleněných korálek. Optimalizace byla zaměřena na tlak, teplotu a množství modifikátoru - pro chlorfenoly je ideální kombinace 450 atm., 100 °C a 10% metylalkoholu. Koncovou technikou byla LC – ECD. SFE se jeví jako velmi vhodná

metoda pro stanovení CP v půdě, jelikož se tím sníží celkový čas analýzy z 2 dnů (při využití Soxhletova extatraktoru) na pouhých 1,5 h. Limity detekce jednotlivých CP jsou uvedeny v následující tabulce:

Tabulka 4: Detekční limity pro chlorfenoly analyzované metodou SFE

Sloučenina	Limit detekce [ng·g ⁻¹]
2 – chlorfenol	3
3 - chlorfenol	3
4 - chlorfenol	6
2,3 - dichlorfenol	6
2,4 - dichlorfenol	9
2,5 - dichlorfenol	6
2,6 - dichlorfenol	3
3,4 - dichlorfenol	6
3,5 - dichlorfenol	9
2,3,6 - trichlorfenol	9
2,4,6 - trichlorfenol	10
2,3,4 - trichlorfenol	29
2,3,5 - trichlorfenol	31
2,4,5 - trichlorfenol	15
2,3,4,6 - tetrachlorfenol	92
2,3,5,6 - tetrachlorfenol	62
Pentachlorfenol	150

Krom výše uvedených způsobů analýzy chlorfenolů je možné provádět také extrakci magnetickou tuhou fází. Nejpoužívanějšími materiály pro přípravu magnetických sorbentů a nosičů jsou práškové oxidy železa jako magnetit nebo maghemit a dále oxid chromičitý CrO₂, ferity a nikl. Mimo jiné lze v některých případech použít tzv. magnetické kapaliny (ferrofluids nebo magnetic fluids), jde o suspenze velmi jemných pevných magnetických částic o průměru cca 2-20 nm ve vhodné nemagnetické kapalině¹⁷.

2.3 Analýza chlorbenzoových kyselin

2.3.1 Separace 4-chlorbenzoové kyseliny coby metabolitu léku

Léky se v posledních desítkách let staly jedním z nových tříd environmentálních imisí, které byly objeveny v odpadních vodách z průmyslu, v recipientu, v pitné a podzemní vodě. Zdrojem těchto sloučenin v životním prostředí jsou domácnosti, nemocnice či průmyslové jednotky. Léky jsou metabolizovány v organismech a ty je vylučují v jejich původní formě nebo jako metabolity. Příkladem takového metabolitu je i kyselina 4-chlorbenzoová, která má svůj původ v léku s názvem Bezafibrate. Prvním krokem při úpravě vzorku pro analýzu je přefiltrování vhodného objemu odpadní vody (často 500 ml) přes filtr se skleněnými vlákny. Děje se tak proto, aby se odstranily rozptýlené částice, které by mohly snížit účinnost extrakce. pH vzorku je udržováno v rozmezí 2-3. Po extrakci (z možných technik se využívá zejména SPE a SPME) do malého objemu rozpouštědla následuje derivatizace – použitelná činidla jsou součástí obrázku v příloze A. Pro vymytí vláken byl volen metylalkohol, aceton nebo octan etylnatý podle toho, o které léky se jednalo (často jsou metabolity stejné pro více druhů léků). Koncovou technikou byla GC-MS²³

2.3.2 Metoda separace s využitím extrakce následované krystalizací v technologické praxi

Vědci z univerzity Shiraz v Íranu v čele s A. Lashanizadeganem²⁴ vyšetřovali účinnost nové krystalizační techniky pro separaci o- a p- chlorbenzoové kyseliny ze směsi. Jelikož chlorbenzoové kyseliny mohou vznikat oxidací směsí chlortoluenů, konečný produkt bude obsahovat izomerní směs o- a p- kyseliny. Tato směs není oddělitelná běžnými technikami, proto je nasnadě využití extrakce. Tato technika využívá nejen jejich rozdíly mezi disociačními konstantami a distribučními koeficienty, ale také rozdíly mezi jejich chemickými afinitami k tvorbě komplexů. Jako rozpouštědlo byl zvolen methylalkohol a jako extrakční činidlo piperazin. To reaguje přednostně s o- kyselinou (díky větší kyselosti). Vzniklý produkt - komplex o-chlorbenzoan-piperazin je těžko rozpustný v roztoku a sráží se dále tak dlouho, než se ustaví chemická rovnováha. Pak následuje krystalizace p- chlorbenzoové kyseliny, čímž od sebe ony dva izomery účinně odstraníme. Na tomto principu může být tedy založena separace p-chlorbenzoové kyseliny z vodné matrice.

2.3.3 Extrakce kapalnou fází

S. I. Niftaliev a kol²⁵ se zabývali stanovením kyselin 4-chlorbenzoové a 2,4-dichlorbenzoové ve vodném vzorku s využitím hydrofilních rozpouštědel butylalkoholu, octanu etylnatého a acetonu. K vodnému roztoku kyselin o koncentraci $0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (obsahujících vysolovací činidlo síran litný) bylo přidáno testované organické rozpouštědlo. Extrakce probíhala 10-15 minut s téměř úplnou výtěžností kyseliny chlorbenzoové. Po oddělení fází (5 minut) byl extrakt kvantitativně převeden do titrační baňky a byla provedena titrace odměrným roztokem KOH s potenciometrickým a také konduktometrickým určením bodu ekvivalence. Porovnáním distribučních koeficientů jednotlivých extrahovadel (viz tabulka 5) se jako nejvhodnější jeví butylalkohol a použitelný je i octan etylnatý. Ten neobsahuje téměř žádné množství vody, což napomáhá k extrakci CBA, jež jsou ve vodě málo rozpustné. Opakem je aceton, který vodu obsahuje ve větším množství a tedy je pro tento proces nevhodný. Dále se ukázalo, že efektivita extrakce je vyšší, je-li snížena teplota. Na druhou stranu ale nízké teploty dělají proces časově náročným. Jako optimální se jeví $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Dále lze proces optimalizovat vhodným množstvím síranu litného a úpravou pH vodného roztoku kyselin.

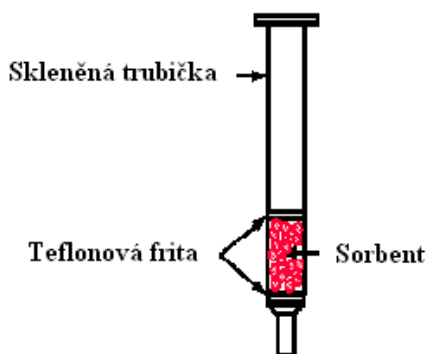
Tabulka 5: Distribuční koeficienty pro dané typy extrahovadel

extrahovadlo	4-CBA	2,4-DCBA
	K_D	K_D
<i>n</i> -Butylalkohol	420 ± 9	900 ± 11
Izobutylalkohol	470 ± 9	495 ± 8
<i>terc</i> -Butylalkohol	205 ± 4	185 ± 7
Aceton	82 ± 3	120 ± 5
Octan etylnatý	315 ± 6	220 ± 7

2.3.4 Iontovměnná SPE

Krom klasické extrakce kapalnou fází nebo tuhou fází je možné pro prekoncentraci chlorbenzoových kyselin využít i iontovýměnnou extrakci. Pro SPE lze použít nepolární sorbenty jako silikagel s navázaným C_{18} , polymerní pryskyřice jako styrendivinybenzen a nebo uhlíkový grafit. Tyto sorbenty nejsou specifické a dovolují tak extrahovat širokou škálu organických látek. Chceme-li tedy extrahovat pouze CBA, je třeba vzorek upravit

okyselením na požadované pH. Při anion-výměnné extrakci je náplň tvořena polymerním materiálem (převážně SDVB) nebo je založena na mikroporézním silikagelu, na něhož je vázán kvarterní amoniový iont. V. Desauziers a kol²⁶ se zaměřili na použití polymerních sorbentů. Jeden z cílů jejich studie bylo kontrolovat vliv iontové síly vzorku na zadržení organických kyselin zakoncentrovaných na pryskyřici. Zkoumaly se dva typy náplně – sulfonovaný styrendivinybenzen a polymerní pryskyřice s kvartérním aminovým iontem. Zásobní roztok obsahující testované kyseliny (mimo jiné i kyselinu 4-CBA o čistotě 98%) byl rozpuštěn v methylnalkoholu. Extrakce byla vedena tak, že elektromagnetické čerpadlo vhánělo vzorek na začátek prekoncentrační kolony a ten prosakoval skrz náplň. Jako koncová technika byla zvolena HPLC. Kolona byla skleněná (0,9 × 20cm) a veškeré spoje byly z teflonu – viz obrázek 9.



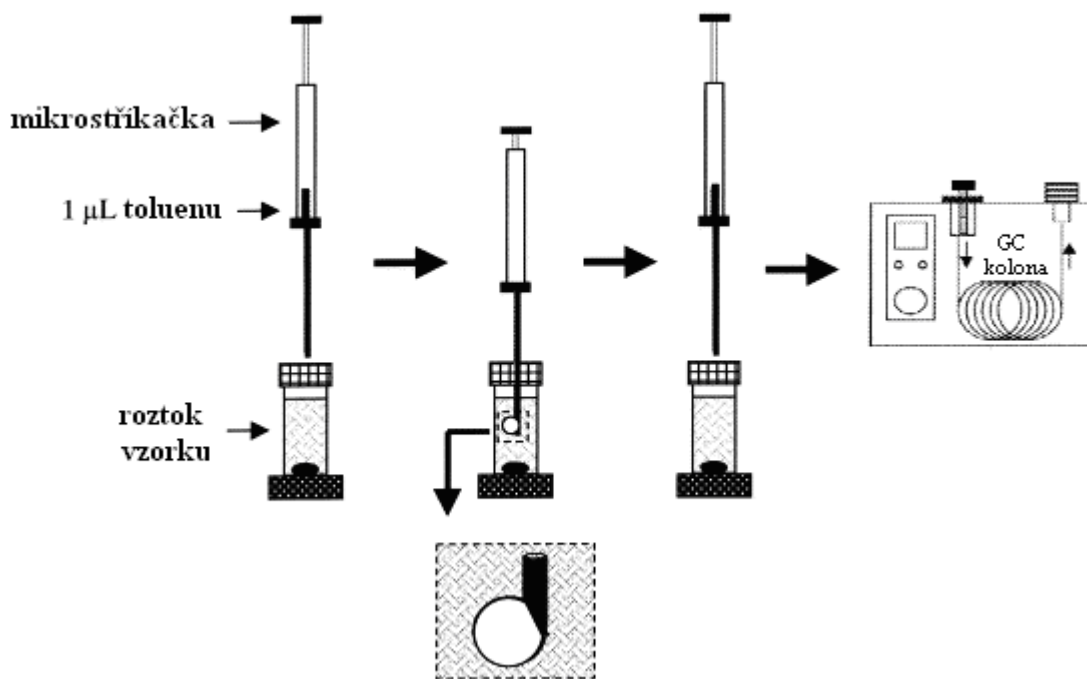
Obrázek 9.: Kolona pro iontovýměnnou SPE²⁷

Jednotlivé fáze procesu²⁷ jsou názorně ukázány v příloze B. Zprvu je třeba vybrat vhodnou kolonu co do použitého materiálu a provést kondicionaci kolonky (přípravu sorbentu). To bylo u této studie provedeno následujícím způsobem: na skleněné fritě byla zvážena suchá pryskyřice, vymyta vodou a methanolem, následně vodou a 1M HCl. Pak byla pryskyřice suspendovaná ve vodě vpravena do kolony a pomalu sedimentovala, čímž se vytvořila stejnorodá vrstva částic. Nad vrstvu byla umístěna zátka ze skelné vaty (pečlivě vypraná v acetonu, metylalkoholu a vodě). Následovalo promytí vodou, aby si náplň „sedla“. Pak se čerpadlem nadávkoval do kolonky vzorek a mobilní fáze. MF se liší dle použitých sorbentů. Optimalizace byla sledována z hlediska objemu použitého vzorku, typu sorbentů a rychlosti toku. Závěrem lze říci, že tento způsob extrakce je využitelný i ve stopové analýze, ale teprve tehdy, předchází-li vlastní extrakci ještě předčištění vzorku. Je totiž možné, že na sorbentu ulpí i nečistoty.

2.4 Analýza nitrosloučenin

2.4.1 Detekce výbušnin ve vodné matrici metodou SPME a SDME

Analýza výbušnin ve stopové úrovni je velmi důležitá nejen z hlediska monitorování životního prostředí (explozivní produkty se dostávají do ovzduší, půdy a vody), ale i pro účely policie a soudů. Například plastická trhavina semtex (obsahující 1,3-dinitro-2,2-bis(nitratometyl)propan) je detekovatelná díky značkovací přísadě 2,3-dimetyl-2,3-dinitrobutanu i několik měsíců po explozi. Vhodnou metodou pro detekci je dle Ashok Kumar a kol.²⁸ SPME. Při jejich výzkumné práci byly analyzovány mimo jiné i tyto sloučeniny: 2-NT, 3-NT, 4-NT, 2,4-DNT, 2,4,6-TNT, NB a 1,3-DNB. Extrakce byla provedena klasickým způsobem – tedy do vialky byl umístěn roztok vzorku obsahující navíc i NaCl o koncentraci 25% pro zvýšení účinnosti extrakce, vialka byla opatřena pryžovým septem. Jehlou extrakčního zařízení, ve které jsou umístěna vlákna s carbowaxem a divinylbenzen o tloušťce vrstvy 65 μm , se propíchl septum a vlákna byla vsunuta do roztoku. Extrakce trvala 30 min. a probíhala při teplotě 35 °C. Po vtažení vlákna zpět do jehly a nadávkování obsahu do HPLC systému proběhla desorbce (činidlem byl methanol a voda v poměru 1:1, doba 2 minuty). Výsledkem toho procesu bylo odseparování jednotlivých sloučenin a jejich stanovení v úrovních ppb. Optimalizace se sledovala z hlediska volby vlákna, teploty extrakce, doby extrakce, přídavku soli a způsobu desorbce (dynamicky či staticky). Stejnou metodu (tedy SPME) porovnávali E. Psillakis a N. Kalogerakis²⁹ s mikroextrakcí na jedné kapce (SDME). Pro toto srovnání byly použity krom jiných i 1,3-DNB, 2,4-DNT, 2,6-DNT, 3-NT a 4-NT. Množství 5 ml odpovídajícího roztoku obsahující krom analytu (v množství 100 $\mu\text{g.l}^{-1}$) i podíl NaCl, bylo nalito do 7ml vialky z čírého skla. Přidání soli k vodnému roztoku vzorku před vlastním provedením extrakce zvyšuje účinek operace. Vysoké koncentrace soli ovšem ničí vlákno, zkracují jeho dobu životnosti a mohou způsobit i nepřesnosti v měření. V případech, kdy je vysoká koncentrace soli nutná a nevyhnutelná, je třeba vlákno velmi rychle opláchnout mezi extrakcí a nadávkováním do dalšího zařízení (např. GC). Magnetické míchadlo bylo nastaveno na konstantní rychlost 400 ot.min^{-1} . SPME byla provedena na vlákně PDMS-DVB o tloušťce 65 μm . Jako extrakční činidlo byl použit acetonitril a dále 2,3-DNT jako vnitřní standard. Doba extrakce trvala 5 minut. Pro SDME byl vzorek upraven stejně, pouze byla extrakce provedena na mikrokapence toluenu (1 μl), jak je patrné z následujícího obrázku:



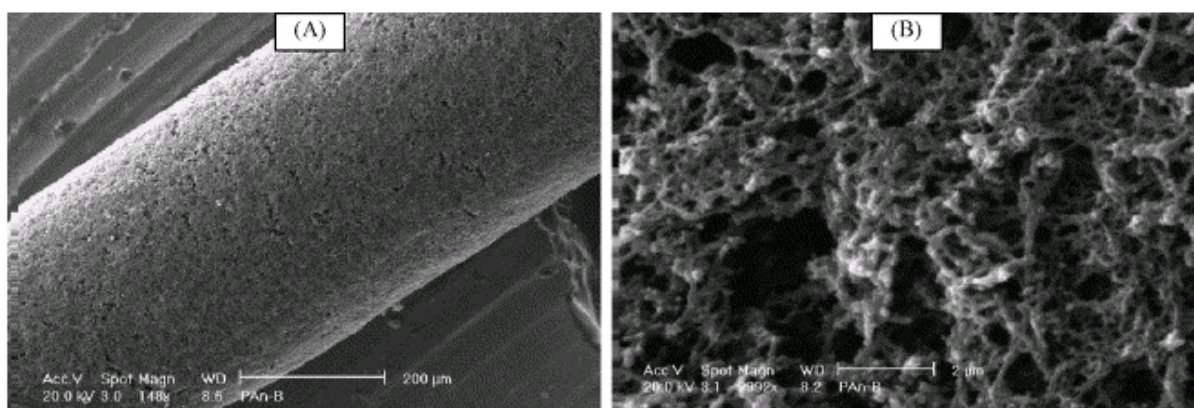
Obrázek 10.: Schématické znázornění SDME

Toluen byl vybrán jako extrakční činidlo z mnoha jiných proto, že je selektivní pro tuto konkrétní operaci a během procesu nebyla zjištěna ztráta rozpouštědla. Obecně se rozpouštědlo volí podle jeho selektivity, efektivity při extrakci, rozpouštění kapky, podle toxicity a dalších parametrů. Aby mohli být tyto dvě metody kvalitně porovnány, opakoval se proces extrakce pětkrát za sebou při stejných podmínkách a výsledky byly brány jako aritmetický průměr daných měření. Koncovou technikou byla GC. Autoři se shodli na tom, že obě techniky jsou rychlé a vhodné pro stanovení nitroaromatických výbušnin ve vodných vzorcích. SPME vyžaduje jednoúčelové a drahé zařízení, navíc použitá vlákna mají omezenou životnost a jsou také drahá. Na druhou stranu SDME vyžaduje propracovanější manuální zručnost, která ovlivní linearitu a preciznost provedení.

2.4.2 Mikroextrakce tuhou fází se speciálním vláknem

Pro separaci nitrosloučenin lze využít LLE a SPE, ovšem tyto metody vyžadují drahá a zdraví škodlivá rozpouštědla a jsou časově náročné. Vhodnější alternativou je SPME, ačkoliv i ta má svá úskalí (viz kapitola 2.2.1). Jedním z nich je křehkost křemenných vláken, která si vyžaduje opatrnost při manipulaci. Aby se tomu předešlo, použije se kovové vlákno s polyanilinem. S touto myšlenkou přišli Wua a Pawliszyn³⁰, když separovali aminy a fenoly z vodné matrice. Zda bude tato technika s vlákny pokrytými polyanilinem účinná i pro nitrobenzen, ověřovali Xiang Li a Jianmin Chen³¹

o několik let později. Polyanilin je nanášen na ocelový drát elektrochemicky v takovém množství, aby tloušťka vrstvičky byla v rozmezí 100-200 μm . Vstupními chemikáliemi byl p-dinitrobenzen, m-dinitrobenzen, o-dinitrobenzen a nitrobenzen. Jednotlivé sloučeniny byly zředěny methylalkoholem tak, aby koncentrace byla: pro p-DNB 1,5 mg.l^{-1} , o-DNB 4,5 mg.l^{-1} , m-DNB 7 mg.l^{-1} a pro nitrobenzen 20 mg.l^{-1} . Extrakce byla uskutečněna v 15 ml neprůhledných vialkách opatřených silikonovým septem, kam bylo vpraveno 10 ml připraveného roztoku obsahujícího jednotlivé sloučeniny ve výše uvedeném množství. Intenzita míchání byla nastavena na 60-70% maximální kapacity magnetického pole a během celého procesu zůstala konstantní. Po homogenizaci roztoku ve vialce byla jehla SPME zařízení vpíchnuta skrz septum, vlákno bylo ponořeno do roztoku po vhodnou dobu a po extrakci bylo zase vtaženo zpět do jehly. Jehla byla vytažena z vialky a obsah byl ihned nadávkován do chromatografického systému – konkrétně GC – ECD. Samotná extrakce probíhala po dobu 40 minut při 45 °C a desorbce po dobu 3 min při teplotě 250 °C. Při optimalizaci byla zkoumána doba extrakce, iontová síla roztoku, teplota vzorku a teplota pro desorbci. Metoda se jeví jako jednoduchá, precizní, šetrná k životnímu prostředí a také efektivní. To je způsobeno technikou nanášení polyanilinu, jehož povrch má zdrsňenou pórovitou strukturu, která je pro extrakci výhodná. Dokazuje to i následující obrázek.



Obrázek 11.: Snímek povrchu vlákna s naneseným polyanilinem při zvětšení 150 000 (A) a 10 000 (B)

Na separaci nitroaromatických sloučenin metodou SPME se zaměřil i S. Jönsson a kol³². Ti analyzovali 16 sloučenin – příkladem NB, 3-NB, 2,6-DNT a další. Standardní roztok obsahující 200 mg.l^{-1} každé sloučeniny byl připraven v acetonitrilu. Pro studium byla použita vlákna PDMS 7 μm a 100 μm , polyakrylát 85 μm a PDMS – DVB 65 μm . Z hlediska optimálních podmínek se studovaly tyto parametry: výběr vlákna, režim vzorkování, doba desorpce, iontová síla roztoku a třepání. Koncovou technikou byla

GC-MS, ale lze využít i GC-ECD nebo GC-FID. Technika je citlivá a vhodná pro analýzu nitrolátek, neboť poskytuje výsledky v koncentracích až ng.l^{-1} .

2.4.3 Extrakce tuhou fází spojená on-line s SFC

Španělští vědci E. Pocerull a kol.³³ zaměřili svou pozornost na stanovení fenolů a nitrofenolů z vodné matrice metodou SPE kombinovanou on-line se superkritickou fluidní chromatografií. Díky jedinečným vlastnostem nadkritických tekutin (nižší viskozita umožní provést analýzu 3krát až 10krát rychleji než HPLC), je o tuto koncovou techniku stále větší zájem. Nejpoužívanější nadkritickou tekutinou je CO_2 . Pro experiment byly využity následující sloučeniny: fenol, 2-NP, 4-NP, 2,4-DNP a 2-M-4,6-DNP. Ke standardnímu roztoku obsahujícímu 2000 mg.l^{-1} každé sloučeniny byl přilít methylalkohol (v poměru 50:50 s vodou) coby modifikátor a roztok byl uložen v chladničce. Jako extrakční činidlo byl zvolen tetrabutylamoniumbromid. Do procesu vstupuje také helium (o čistotě 99.999 %) používané k vysoušení. Při chromatografickém stanovení byl využit CO_2 jako mobilní fáze a methylalkohol jako modifikátor. Celková analýza při rychlosti průtoku 2 ml.min^{-1} trvala 9 minut. Výstupní tlak byl udržovaný na $15 \cdot 10^5 \text{ Pa}$ a teplota termostatu byla nastavena na $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Schéma vybavení a jednotlivé kroky procesu jsou uvedeny v příloze C. Z hlediska optimalizace metody se studoval vliv chromatografických podmínek – konkrétně teplota termostatu, tlak, rychlost toku a přidané množství methylalkoholu do MF. Také byly testovány různé analytické kolony – se silikagelem, C_{18} a diolová. Tyto kolony byly testovány při různých experimentálních podmínkách, ovšem výsledky nebyly dobré, jelikož tvar křivek na chromatogramu byl na vrcholu zdeformovaný. Některé sloučeniny tak nebyly analyzovány ani při sériovém zapojení více kolon. Zkoušelo se tedy přidávat do MF kyselinu octovou nebo triflorooctovou, ale opět bez pozitivního výsledku. Tak se přešlo ke zkoušení různých typů sorbentů jmenovitě C_{18} , PLRS-S a ENVI Chrom P. Jako ideální sorbent nevykazující deformaci peaků se jeví PLRS-S. Po nalezení optimálních podmínek bylo efektivně odděleno a analyzováno 5 fenolických sloučenin za méně než 6 minut. Úroveň detekované koncentrace je pro vodu z vodovodního řádu $0,2$ až $1 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ a pro říční vodu 2 až $6 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$.

2.4.4 Extrakce magnetickou tuhou fází

Analýzou dusíkatých látek se zabývala ve své diplomové práci P. Knittlová³⁴. Nejprve bylo naváženo $0,5\text{g}$ anilínu, nitrobenzenu, m-dinitrobenzenu a p-chlornitro-

benzenu do 50 ml odměrné baňky a doplněno methanolem po rysku. Převedením 0,1ml takto připraveného roztoku do 100 ml odměrné baňky a doplněním vodou po rysku se získal modelový vzorek. Pro vlastní proces extrakce bylo 10 ml tohoto vzorku odpipetováno do zkumavky s kónickým dnem a šroubovacím uzávěrem, k tomu bylo přidáno 0,2 ml suspenze magnetického sorbentu (aktivní uhlí HS1 nebo aktivní uhlí Silcarbon). Touto suspenzí bylo třepáno při 2400 ot.min⁻¹ po zvolenou dobu na třepačce typu Vortex. Následně byl magnetický sorbent odseparován za použití permanentního magnetu a vodná fáze odlita. Do zkumavky se sorbentem bylo přidáno zvolené množství elučního rozpouštědla a tato suspenze byla opět míchána na stejném míchadle typu Vortex po zvolenou dobu při stejných otáčkách. Magnetický sorbent byl opět odseparován pomocí magnetu a extrakt odlit pro následnou analýzu. Optimalizace byla zaměřena na tyto parametry: doba styku modelového vzorku s magneticky modifikovaným aktivním uhlím, doba styku elučního činidla rozpuštěného s aktivním uhlím se zadrženými látkami, množství rozpouštědla pro eluci a také počet opakovaných elucí. Zjistilo se, že optimálním provedením procesu je 7 minutová doba sorpce, 2,5 minutová doba eluce, 3 ml přídavek elučního činidla a konečně trojnásobné opakování elucí.

2.5 Porovnání extrakčních technik

Všechno na světě má krom výhod i nějaká úskalí a extrakční techniky nejsou výjimkou. Nyní budou použité techniky stručně charakterizovány (některá porovnání jsou již v textu uvedena). Pro extrakci LLE je třeba velkých objemů toxických rozpouštědel, což ale na druhou stranu umožňují extrakci širokého spektra látek. Jedná se o jednoduchou techniku, jednu z prvních. Kvůli toxicitě rozpouštědel se nahrazuje SPE, která také umožňuje extrahovat širokou škálu analytů, neboť máme na výběr z mnoha sorbentů a jejich modifikací. U SPE je snadné skladování a transport vzorků zakoncentrovaných na kolonkách (skladování až 8 měsíců při -20 °C nebo 3 - 4 měsíce při 4 °C). Nevýhodou i přes zvětšující se sortiment je nenalezení vhodné kolony pro izolaci specifických látek¹³. U on-line SPE je výhodou přímé dávkování vzorků do chromatografického zařízení, čímž se obsluha vyhne přímému kontaktu s materiálem, jenž může být toxický. Alternativou k této metodě je SPME, která je rychlá, relativně jednoduchá, univerzální pro mnoho látek a nevyžaduje ani drahá toxická rozpouštědla, ani složité aparatury. Volbou vhodného extrakčního vlákna (s ohledem na analyzované složky) lze dosáhnout dostatečně reprodukovatelných výsledků. SPME urychluje analytický postup,

neboť vzorkování a úprava vzorku jsou v jednom kroku. Je použitelná pro kvalitativní a kvantitativní analýzy, je možná automatizace procesu a neustále roste počet jejích aplikací³⁵. Detekční limit je nízký, při použití GC řádově až ppt. Dále lze využít SFE, jež je šetrná k životnímu prostředí, časově nenáročná, využívá malých objemů rozpouštědel a má mnoho aplikací. Nevýhodou ovšem je drahý extraktor a využití pouze pro pevné nebo polopevné vzorky. Nadkritickou tekutinou bývá nejčastěji CO₂ díky nízkému kritickému tlaku a teplotě, rozumné ceně, nízké toxicitě, inertnosti a také díky dostupnosti na trhu¹⁴. SDME je rychlá, jednoduchá, ekonomicky vhodná, snadno automatizovaná technika, kterou je možno spojit s dalšími analytickými metodami³⁶. LPME představuje techniku vhodnou pro nepolární analyty. Výhodou je malý objem použitých rozpouštědel a vysoká prekoncentrace, nevýhodou je nižší výtěžnost a riziko vzniku emulzí³⁷. PSE má oproti klasickým metodám výhodu v tom, že je daleko rychlejší, využívá menších objemů rozpouštědla a často poskytuje lepší reprodukovatelnost výsledků. Výtěžnost je srovnatelná s LLE³⁷. MSPE je jednoduchá a reprodukovatelná metoda, která je vhodnou alternativou ke standardním SPE a LLE. Kvůli magnetické povaze adsorbentů a selektivitě magnetických separací může být metoda použita pro zakoncentrování analytů ve vzorcích s rozptýlenými částicemi a v tom je také spatřována hlavní výhoda. Tato technika našla své uplatnění v biotechnologiích, biochemii, analytické chemii, chemii životního prostředí a jinde.

Jak je z tohoto výčtu patrné, nelze objektivně posoudit, která technika je úplně ta nejlepší a které se raději vyhnout. Záleží to na matici vzorku, na chemické podstatě analytu, na tom, zda požadujeme vysoký výtěžek nebo raději rychlé provedení jen s orientačními hodnotami. Současným trendem je samosřejmě využití moderních technik, jako jsou SFE, extrakce s využitím ultrazvuku nebo extrakce podporovaná mikrovlnným ohřevem. Tím ale nejsou klasické metody opovrženy, stále nacházejí svá specifická uplatnění v technické praxi.

3 Závěr

Byla provedena literární rešerše na zadané téma. Dá se říci, že zájem chemiků se v oblasti extrakce upíná v posledních letech spíše k moderním technikám, jelikož s sebou nesou vylepšení dosavadních technik a urychlují dobu analýzy. Často se tím sníží provozní náklady, byť investice do moderních přístrojů je značně vysoká. Koncová technika je volena dle metodiky extrakce, nejčastěji HPLC nebo GC s různými detektory (příkladem FID, ECD, MS). Protože monitorování analytů v životním prostředí je nadmíru důležitým dějem, dá se očekávat, že v tomto směru se budou ubírat další výzkumy a budou se vymýšlet nové a nové modifikace stávajících extrakčních technik, případně modifikace složení použitých vláken. Povolené množství analytů ve vodě se řídí technickými normami ČSN spadajícími do kategorie 75 - vodní hospodářství. Vypracováním této práce jsem byla seznámena s problematikou stanovení chlorfenolů, nitrolátek a chlorbenzoových kyselin ve vodě po předchozím použití extrakčních technik. Rozšířilo mi to obzor v oblasti analýzy organických látek ve vodě a poskytlo mi to cenné informace pro další studium.

4 Seznam zkratek

ASE	Tlaková extrakce rozpouštědlem
Atm	Atmosféra, jednotka tlaku ($1 \text{ atm} = 101,325 \cdot 10^3 \text{ Pa}$)
CAR	Carboxen
CWB	Carbowax
CBA	Kyselina chlorbenzoová
CFME	Kontinuální mikroextrakce
CP	Chlorfenyl-
CO	Oxid uhelnatý
CO ₂	Oxid uhličitý
K _D	Distribuční koeficient
DCP	Dichlorfenyl-
DLLME	Paralelní disperzní mikroextrakce typu kapalina – kapalina
DNB	Dinitrobenzen (o, m, p)
DNT	Dinitrotoluen (o, m, p)
ENVI	Chrom P – vysoce sesítený styren – divinylbenzen
GC – FID	Plamenový ionizační detektor
GC	Plynová chromatografie
GC –ECD	Plynová chromatografie s detekcí elektronového záchytu
GLE	Extrakce typu plyn – kapalina
h	hodina
HCl	Kyselina chlorovodíková
HNO ₃	Kyselina dusičná
HPLC	Vysokotlaká účinná kapalinová chromatografie
HS1	Označení typu aktivního uhlí
H ₂ SO ₄	Kyselina sírová
K _A	Konstanta acidity
KOH	Hydroxid draselný
LLE	Extrakce typu kapalina - kapalina
LLLME	Mikroextrakce kapalina – kapalina – kapalina
LPE	Extrakce kapalnou fází
LPME	Mikroextrakce kapalnou fází
M	Metyl-

MASE	Extrakce podporovaná mikrovlnným ohřevem
MF	Mobilní fáze
MS	Hmotnostní spektrofotometr
MSPE	Extrakce magnetickou tuhou ází
NaCl	Chlorid sodný
NaOH	Hydroxid sodný
NT	Nitrobenzen
Ot.min ⁻¹	Otáčky za minutu
PA	Polyakrylát
PCB	Polychlorované bifenyly
PDMS	Polydimetylsiloxan
PLRS-S	Polymer z laboratoře Shropshire
ppb	Parts per bilion
ppm	Parts per milion
ppt	Parts per trilion
PSE	Tlaková extrakce rozpouštědlem
SDME	Mikroextrakce na jedné kapce
SDVB	Styrendivinylbenzen
SFC	Superkritická fluidní chromatografie
SLE	Extrakce typu tuhá látka - kapalina
SPDE	Dynamická extrakce vzorků na tuhé fázi
SPE	Extrakce tuhou fází
SPME – MD	Mikroextrakce tuhou fází s micelární desorpcí
SPME	Mikroextrakce tuhou fází
TBA	Tetrabutylamonium bromid
TCP	Trichlorfenol (různé polohy chloru)
TeCP	Tetrachlorfenol
TNT	Trinitrotoluen (různé polohy nitroskupiny)

5 Použitá literatura

- 1 Fattahi N., Assadi Y., Hosseini M. R. M. a Jahromi E. Z. *J. Chromatogr. A*, 2007, **1157**, 23-29
- 2 Vlková L. a Círka V. *Chem. Listy*, 2005, **99**, 125-130
- 3 Popl M. a Fährnich J. *Analytická chemie životního prostředí*, Praha 1999
- 4 www.zbio.gnotobio.cz/2005/organicka_chemie/druhy_semestr/karboxkys.doc
- 5 <http://chemicalland21.com/specialtychem/finechem/4CHLOROBENZOIC-%20ACID.htm>
- 6 Totevová S., Prouza M., Brenner V. a Demnerová K. *Chem. Listy*, 1997, **91**, 858 - 866
- 7 http://sciencelab.com/xMSDS-2_Amino_5:chlorbenzoic_acid-9922882
- 8 www.britannica.com/EBchecked/topic/416134/nitro-compound
- 9 www.chemistrydaily.com/chemistry/Nitro_compound
- 10 http://pxd.czechian.net/urbanski.php?id=ch1d_3
- 11 www.answers.com/topic/nitro_compound
- 12 <http://ach.upol.cz/ulohy/extrakce.pdf>
- 13 www.natur.cuni.cz/~pcoufal/extrakce.pdf
- 14 www.labicom.cz/default.aspx?section=70
- 15 www.chemistry.adelaide.edu.au/external/soc-rel/content/sfe.htm
- 16 www.labicom.cz/default.aspx?server=1&article=504§ion=95
- 17 Šafaříková M. a Šafařík I. *Chem. Listy*, 1995, **89**, 280
- 18 Santana C. M., Padrón M. E. T., Ferrera Z. S. a Rodríguez J. J. S. *J. Chromatogr. A*, 2007, **1140**, 13-20
- 19 Fattahi N., Samadi S., Assadi Y. a Hosseini M. R. M. *J. Chromatogr. A*, 2007, **1169**, 63-69
- 20 Bagheri H., Saber A. a Mousavi S. R. *J. Chromatogr. A*, 2004, **1046**, 27-33
- 21 Lin Ch. a Huang S. *J. Chromatogr. A*, 2008, **1193**, 79-84
- 22 Santos F. J., Jáuregui O., Pinto F. J. a Galceran M. T. *J. Chromatogr. A*, 1998, **823**, 249-258
- 23 Kostopoulou M. a Nikolaou A. *TrAC*, 2008, **27**, 1023-1035
- 24 Lashanizadegan A., Newsham D. M. T. a Tavare N. S. *Chem. Eng. Sci.*, 2001, **56**, 2335-2346

- 25 Niftaliev S. I., Korenman Ya. I., Konstantinova N. A. a Sysoev V. V.
J. Anal. Chem., **59**, 2004, 319–322
- 26 Desauziers₁ V., Boucharat₁ C. a Le Cloirec P. *Analisis*, 1998, **26**, 294-300
- 27 www.lf1.cuni.cz/Data/files/Toxikologie/Správná%20příprava%20vzorku-VM.ppt
- 28 Kaur V., Gaurav, Kumar A., Malik A. K. a P.K. Rai, *J. Hazard. Mater.*, 2007, **147**,
691-697
- 29 Psillakis E. a Kalogerakis N. *J. Chromatogr. A*, 2001, **938**, 113-120
- 30 Wu J.C. a Pawliszyn J. *J. Chromatogr. A*, 2001, **909**, 37
- 31 Li X., Chen J. a Du L. *J. Chromatogr. A*, 2007, **1140**, 21-28
- 32 Jönsson S., Gustavsson L. a B. van Bavel. *J. Chromatogr. A*, **1164**, 2007, 65-73
- 33 Pocerull E., Marcé R. M., Borrull F., Bernal J. L., Toribio L. a Serna M. L. *J. Chromatogr. A*, 1996, **755**, 67-74
- 34 Knittlová P., *Extrakce chlorovaných a nitrovaných organických látek z vody magnetickou tuhou fází – diplomová práce*, 2008, D 18917
- 35 www.primat.cz/upcefcht/predmety/analyzatoxickychlatekq8127/mikroextrakcena-tuhou-fazi-spme-m20810/
- 36 www.primat.cz/upce-fcht/predmety/analyza-toxickych-latek-q8127/mikroextrakce-jednou-kapkou-m20807/
- 37 http://web.vscht.cz/poustkaj/ISM_LE_ASE_MASE_0907.pdf

6 Seznam tabulek

Tabulka 1	Vlákna pro SPME
Tabulka 2	Porovnání extrakčních technik při studii SPME – MD
Tabulka 3	Porovnání extrakčních technik při studii DLLME – GC – ECD a SPE – GC – ECD
Tabulka 4	Detekční limity pro chlorfenoly analyzované metodou SFE
Tabulka 5	Distribuční koeficienty pro dané typy extrahovadel

7 Seznam grafů

Graf 1 Křivky výtěžnosti jednotlivých typů chlorfenolů pro různé objemy acetonu

8 Seznam obrázků

- Obrázek 1 Průmyslová výroba chlorovaných fenolů
- Obrázek 2 Struktura chlorbenzoové kyseliny
- Obrázek 3 Biodegradace PCB
- Obrázek 4 Výběr sorbentu pro SPE
- Obrázek 5 Zařízení pro SFE
- Obrázek 6 Schéma SPME s micelární desorpcí
- Obrázek 7 Schéma aparatury pro SME
- Obrázek 8 Provedení LLLME
- Obrázek 9 Kolona pro iontovýměnnou SPE
- Obrázek 10 Schématické znázornění SPME
- Obrázek 11 Struktura polyanilinového vlákna při zvětšení 150 000(A) a 100 000(B)

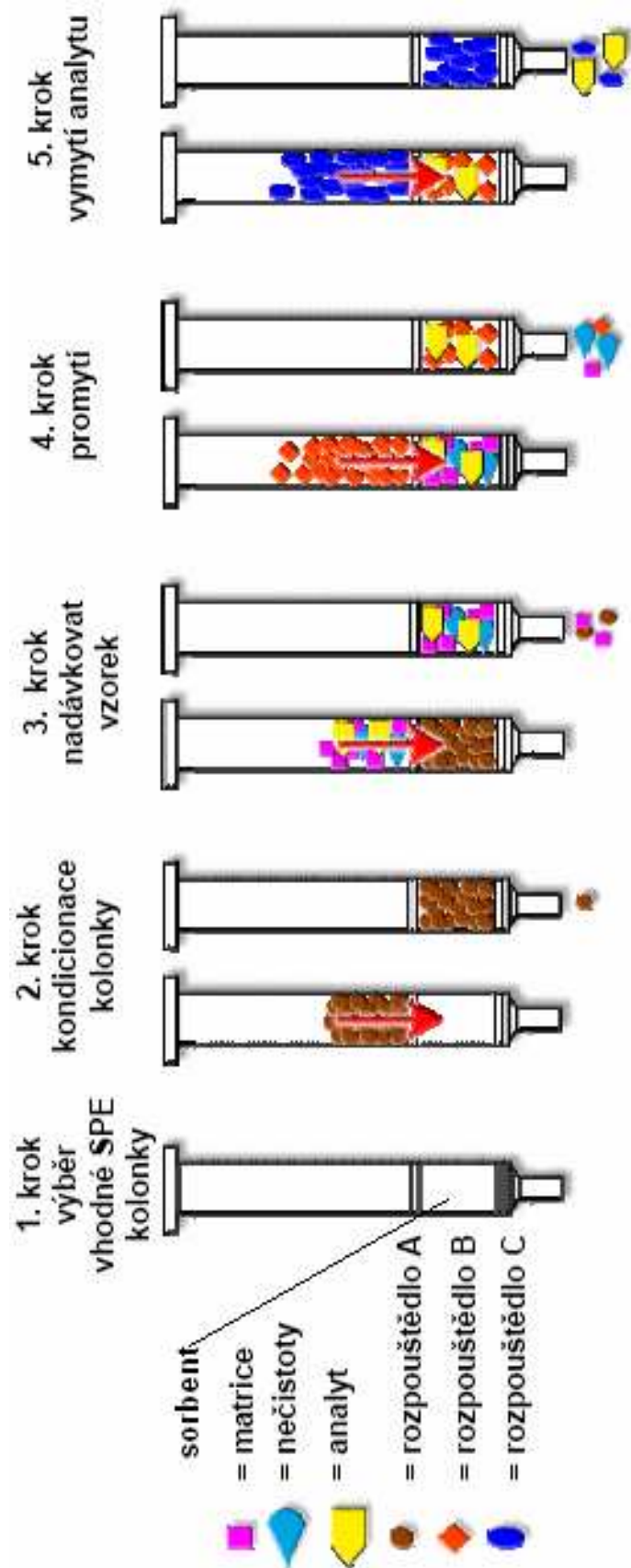
9 Seznam příloh

- Příloha A Seznam léků a běžně používaná derivatizační činidla
- Příloha B Fáze procesu iontovýmenné SFE
- Příloha C Schéma SFE procesu včetně tabulky s jednotlivými kroky operace

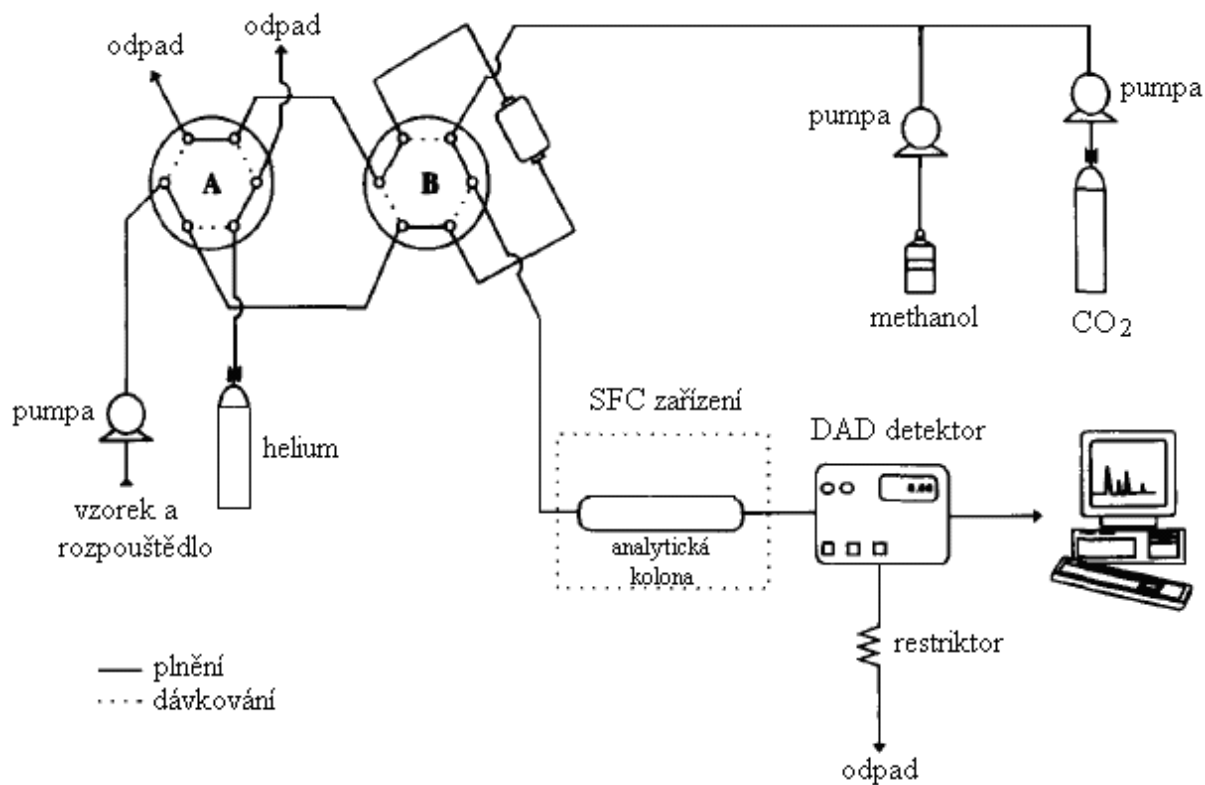
Příloha A



Příloha B



Příloha C



Krok	Děj	Ventil A	Ventil B
1	Promytí vláken 10 ml methanolu	dávkování	plnění
2	Úprava předsloupce 10 ml ethanolu	plnění	plnění
3	Promytí vláken 10 ml voda - TBA	dávkování	plnění
4	Aktivace předsloupce 10 ml voda - TBA	plnění	plnění
5	Vzorkování na vlákno – 10 ml	dávkování	plnění
6	Zakoncentrování vzorku a sušení vláken heliem	plnění	plnění
7	Sušení předkolony heliem	dávkování	plnění
8	Analytická desorbce	plnění	dávkování