

ZÁPADOČESKÁ UNIVERZITA V PLZNI

FAKULTA PEDAGOGICKÁ

KATEDRA CHEMIE

**Určení přítomnosti halogenovaných látek ve
vybraných vzorcích životního prostředí metodou
plynové chromatografie**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Marek Feistinger

Přírodovědná studia, obor Chemie se zaměřením na vzdělávání

Vedoucí práce: Ing. Jan Hrdlička, Ph.D.

Plzeň, 2016

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně
s použitím uvedené literatury a zdrojů informací.

V Plzni, 20. Června 2016:

.....

vlastnoruční podpis

PODĚKOVÁNÍ

Tímto bych chtěl poděkovat panu Ing. Janu Hrdličkovi, Ph.D. za trpělivost vynaloženou při zpracování této práce, při mé práci v laboratoři a ochotu, se kterou mi vždy poradil, když bylo třeba.

Obsah

ÚVOD	8
1 TEORETICKÁ ČÁST	9
1.1. Separální metody	9
1.1.1. Separace.....	9
1.2. Chromatografie	10
1.2.1. Princip	10
1.2.2. Historie	10
1.3. Základy plynové chromatografie z teoretického hlediska	11
1.3.1. Kolony v plynové chromatografii	15
1.4. Detektory v plynové chromatografii	15
1.4.1. Plamenoionizační detektor (FID)	15
1.4.2. Detektor elektronového záchyty (ECD)	16
1.4.3. Tepelně vodivostní detektor (TCD)	17
1.4.4. Hmotnostní detektor	18
1.5. Zhodnocení.....	18
2. PRAKTICKÁ ČÁST	19
2.1. Zvolení zkoumané látky	19
2.2. Vlastnosti standardu	19
2.3. Stanovení rozpustnosti a volba rozpouštědla	20
2.4. Volba rozpouštědla založená na chromatografickém měření	24
2.4.1. Specifikace přístroje	24
2.4.2. Testování rozpouštědel plynovým chromatografem	28
2.5. Tvorba standardů.....	31
2.6. Extrakce.....	31
2.6.1. Závislost extrakce na počtu protřepávání	31
2.6.2. Závislost účinnosti extrakce na objemu rozpouštědla	34

2.6.3. Dolní hranice extrakce.....	36
3. ZÁVĚR	39
4. Resumé.....	40
5. Seznam použité literatury	41
5.1. Knižní publikace	41
6. Seznam převzatých obrázků	43
7. Přílohy.....	44
8. Použité chemikálie a chemické nádoby.....	46
8.1. Chemikálie	46
8.2. Chemické nádoby.....	46

ÚVOD

Halogenované uhlovodíky jsou častými polutanty životního prostředí. V této práci se zabývám stanovením některých halogenovaných látek metodou plynové chromatografie. Z této skupiny byly zvoleny pesticidy a zkoumaným prostředím pak voda. Cílem bylo otestovat metody extrakce a následné kvalitativní analýzy vybraných látek k monitorování jejich výskytu v životním prostředí. Tato práce je pilotní studií, na kterou by mohla navazovat další zkoumání v oblasti kvantitativní analýzy halogenovaných látek.

Jednu z nejdůležitějších metod stanovování stopových množství analytů v moderní době představuje chromatografie. Námi stanovované analyty patří mezi těkavé látky, pro něž je vhodnou metodou analýzy chromatografie plynová. Tato metoda se dnes často používá pro analýzy životního prostředí, kontrolu kvality potravin i pro výstupní kontroly.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Separační metody

1.1.1. Separace

Účelem separace je oddělit od sebe dvě a více složek ve směsi na základě fyzikálních, fyzikálně chemických a chemických vlastností těchto složek. Při separaci mohou probíhat mezi složkami i chemické reakce, které mohou usnadnit nebo znemožnit přechod mezi fázemi. Využívají se zde i rozpouštědla, jež váží separovanou složku. Zde můžeme narazit na pojem sorpce, neboli proces pronikání částic z jedné fáze do druhé bez vytvoření mezifáze. Pokud se částice navazují jen na povrch druhé fáze, mluvíme zde o adsorpci a pokud proniká do fáze, nazýváme tento děj absorpce. V případě, že mezi sorbentem a sorbátem dochází k chemické reakci, mluvíme zde o chemisorpci.^{[1] [2] [3]}

1.1.1.1. *Extrakce*

Extrakce je typem separace, jejíž podstatou je převedení složky do námi zvolené fáze (extrakčního činidla), nemísitelné s původní fází, v které je obsažena složka. Tento děj se rozděluje na tři kroky.

1. transport analytu (složky) z fáze jemu vlastní k mezifází
2. transport přes mezifází
3. transport do fáze extrakčního činidla

Značnou roli zde hraje polarita analytu. Analyt jednodušeji přechází do činidla s podobnou polaritou jako je jeho vlastní.

Při extrakci se často využívá možnosti provedení, při kterém mimo separace analytu dochází i k zvýšení jeho koncentrace. K této situaci dojde, když k relativně velkému množství extrahované směsi přidáme malé množství extrakčního činidla.^{[1] [2]}

[3]

1.2. Chromatografie

1.2.1. Princip

Chromatografie je proces založený na proudění mobilní fáze, která unáší analyty, přes fázi stacionární. Pro rozdělení analytů lze využít různá uspořádání stacionární fáze. Ta může být rozmístěna v ploše nebo se jako stacionární fáze používají kolony naplněné pevnou látkou, případně může být vnitřní povrch kolony potažen vrstvou kapaliny. Analyty unášené mobilní fází jsou zadržovány silami o různé velikosti a díky tomu jsou jednotlivé analyty zadržovány různou dobu v koloně. Tím dochází k separaci analytů od sebe. Chromatogram je pak vyjádření rychlosti postupování analytu kolonou a jeho množství. ^{[4] [5]}

1.2.2. Historie

První záznam o chromatografii poprvé spatřil světlo světa roku 1903, kdy ji ruský botanik Michail Semjonovič Cvět poprvé provedl. Jednalo se o kapalinovou chromatografii, jejíž pomocí hodlal separovat jednotlivé druhy chlorofylů z biologického materiálu. Jako stacionární fázi použil uhličitan vápenatý natlačený ve skelných nálevkách. Jako mobilní fázi použil sirouhlík, který po nasycení uhličitanu vzorkem, proháněl pod tlakem skrz nálevky. Po separaci složek chlorofylu do jednotlivých barevných vrstev stacionární fázi vytlačil, jednotlivé barevné vrstvy oddělil a extrahoval do rozpouštědla.

V první polovině 20. století se začala používat v průmyslu plynová chromatografie, kdy se přes dřevěné uhlí filtrovaly a přečistovaly plyny a regenerovala rozpouštědla. Poté se uhlí začalo využívat začátkem 40. let jako stacionární fáze při analýze esterů a uhlovodíků. Roku 1941 navrhli R.L.M. Synge a A. Martin používání kolon potažených vysoko vroucími kapalinami, za tento počín také dostali roku 1952 Nobelovu cenu za chemii za vynález tzv. „částicové chromatografie“. V této době začala být poptávka po účinnější separaci a separaci složitějších směsí. Jednou z možností bylo používat delší kolony a tuto variantu umožnilo využití plynné mobilní fáze. Martin a Synge objevili, že v plynu je difúze rychlejší oproti kapalině. A proto použití plynové mobilní fáze vedlo k zefektivnění chromatografie.

Účinnost chromatografické kolony, je udán počtem teoretických pater kolony. Čím větší je počet teoretických pater, tím méně se rozmývá plocha separované látky při průchodu kolonou a tím lépe jsou jednotlivé analyty odděleny. Počet teoretických pater je, jak zjistili Martin a Synge, úměrný její délce. Například kolona o délce 120 cm má počet teoretických pater v rozmezí 700 a 1200. Zatímco tatáž kolona dlouhá 365 cm dosáhne až na počet 2000 pater. Mimo jiné se tito dva vědci zabývali i vlivem teploty na účinnost separace. Řadou experimentů došli k závěru, že zvýšení teploty je do určité míry úměrné účinnosti separace. Bylo zjištěno, že ve stejné koloně a při testování shodného analytu při teplotě 65°C měla kolona účinnost 365 teoretických pater, avšak po zahřátí na 100°C se její efektivita zvýšila na 720 teoretických pater. Při jednom z dalších z experimentů zkoumali, zda parciální tlak jednotlivých plynných složek zanedbatelný. Jejich experimenty prokázaly, že může být zanedbán, avšak v praktickém využití ho zanedbat nemůžeme. Touto úvahou o parciálních tlacích se již dříve zabýval W. Henry a z jeho úvahy se dá odvodit vztah pro rozpuštění dvou plynných látek v kapalině. Protože pokud je tlak n -té složky v koloně vyšší dochází k jejímu rychlejšímu prostupu kolonou a tudíž k rozmývání její zóny v chromatogramu.^{[6] [7] [8]}

1.3. Základy plynové chromatografie z teoretického hlediska

Základem je průchod mobilní fáze skrze fázi stacionární umístěné v koloně jak jsem již zmínil v předchozí části. Mobilní fázi se při plynové chromatografii, pro kterou se používá mezinárodní zkratka GC (*Gas Chromatography*), je nosný plyn. V praxi se používají inertní plyny, které nemohou ve velké míře reagovat s analytem. Příkladem je dusík, využívaný v přístroji, na kterém jsem prováděl měření, ale také se využívá argonu, hélia, vodíku, nebo také ve vzácných případech oxidu uhličitého. Mimo typu mobilní fáze můžeme chromatografii dělit i podle její stacionární fáze. Dělíme ji na GSC (*Gas-Solid Chromatography*), kde stacionární fáze je tvořena tuhou látkou která adsorbuje analyty. A na GLC (*Gas-Liquid Chromatography*), kde se analyt rovnovážně dělí mezi kapalnou nepohyblivou fázi a plynou pohyblivou fázi podle rozpustnosti a těkavosti. Pohyb mobilní fáze je zde způsoben vstupem plynu pod tlakem.

Kvalitativním faktorem určujícím složení analytu je retenční čas značený t_R .

Retenční čas analytu můžeme vyjádřit vztahem:

$$t_R = \frac{L}{u}$$

Kde L znázorňuje délku kolony v cm a u průměrnou lineární rychlost analytu v koloně měřenou v $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$

Součástí retenčního času je takzvaný mrtvý čas t_M . Mrtvý čas odpovídá době za kterou projde pohyblivá fáze kolonou nebo-li první zachycené látky na detektoru. Pro měření mrtvého času se do kolony často pouští plyn, který rychle projde kolonou a není zadržován stacionární fází. Takovýto plyn nazýváme značkovač (marker). Značkovač musí rovněž být rozeznán detektorem a zachycena jeho přítomnost. Jako příklad nám může posloužit methan, který se k těmto účelům často používá.

Mrtvý čas analytu můžeme vyjádřit vztahem:

$$t_M = \frac{L}{u}$$

Kde L znázorňuje délku kolony v cm a u lineární rychlost analytu v koloně měřenou v $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$

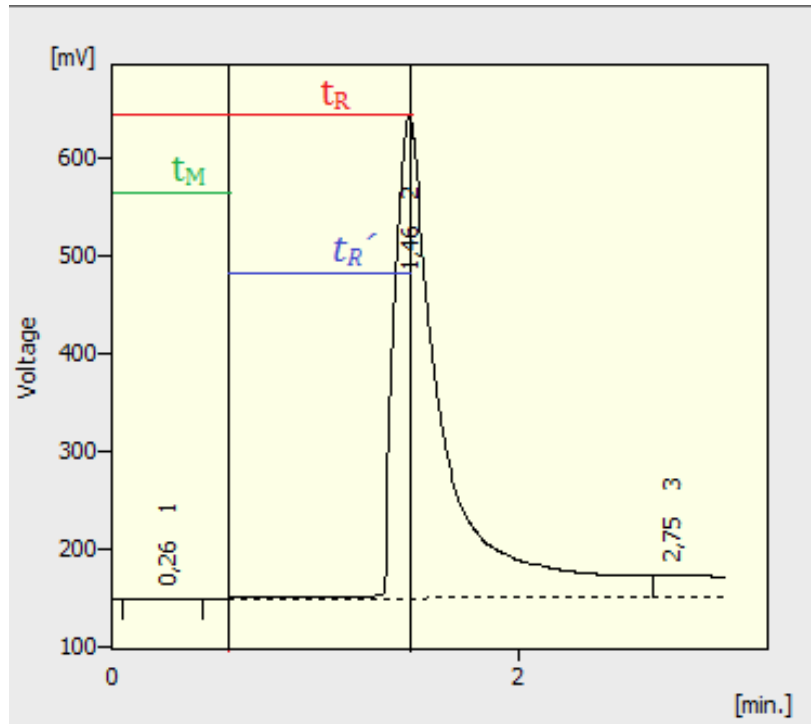
Rozdílem obou dříve zmíněných časů dostaneme nejčastěji používaný redukovaný retenční čas značený t_R' . Odpovídá době, za kterou analyt začne být detekován a dosáhne svého maxima.

Redukovaný retenční čas analytu můžeme vyjádřit vztahem:

$$t_R' = t_R - t_M$$

Kde t_R je retenční čas a t_M mrtvý čas kolony.

Podílem redukovaného retenčního času časem mrtvým dostaneme jednu velice důležitou veličinu a tou je retenční faktor značený k . Tato veličina poměr objemu analytu v mobilní fázi a fázi stacionární.



Obrázek č. 1: **Znázornění veličin.**

Pro retenční faktor platí tyto vztahy:

$$k = \frac{t_{R'}}{t_M}$$

$$k = q \frac{V_s}{V_m}$$

Kde q je rozdělovací faktor, V_s odpovídá objemu analytu ve stacionární fázi a V_m odpovídá objemu analytu v mobilní fázi.

Další důležitou veličinou je distribuční konstanta separované látky. Čím je konstanta separované látky vyšší, tím více se zachytává v stacionární fázi a tím se prodlužuje retenční čas. Značíme jí K_D a můžeme ji vyjádřit vztahem:

$$K_D = \frac{c_s}{c_m}$$

Kde c_s odpovídá koncentraci separované látky v stacionární fázi a c_m koncentraci separované látky v mobilní fázi.

Veličinami, které umožňují porovnávat kolonu s jinou kolonou při použití stejného analytu, nebo při porovnávání průchodu jednoho analytu kolonou za pozměněných podmínek jsou účinnost a selektivita. Účinnost se vyjadřuje počtem teoretických pater, jak bylo již zmíněno v předchozích kapitolách. Počet teoretických pater značíme n . Můžeme jej vyjádřit vztahy:

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

Kde L je délka kolony a H je výškový ekvivalent odpovídající jednomu teoretickému patru. Prakticky jej lze pro daný analyt stanovit výpočtem z parametrů píku příslušného analytu na chromatogramu.

$$n = 5,0545 \left(\frac{t_R}{Y_{1/2}} \right)^2$$

$Y_{1/2}$ zde znázorňuje šířku píku v polovině jeho výšky a t_R je retenční čas.

Selektivitu, nebo-li separační faktor α můžeme popsat jako schopnost rozdělit od sebe dva . Rozdělení analytů od sebe je pak indikováno dostatečným rozdělením jejich píků v chromatogramu. Můžeme ji vyjádřit vztahem:

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{K_{D,2}}{K_{D,1}}$$

Ve kterém porovnáваме distribuční konstantu nebo retenční faktor daných analytů. Tuto veličinu v plynové chromatografii ovlivňujeme jen pomocí stacionární fáze, protože mobilní fázi tvoří inertní plyn. Při ovlivnění stacionární fáze můžeme narazit na dva způsoby průchodu plynu kolonou. Mluvíme zde o koloně jednodimenzionální, což je kolona, ve které rozdělovací faktor analytu zůstává v celé koloně souměrný. Tento typ kolon má v celém objemu stejnou teplotu i tlak. U kolon vícedimenzionálních se rozdělovací faktor během průchodu analytu kolonou mění. Příkladem vícedimenzionálních podmínek je kolona s nastavitelným teplotním programem, který mění teplotu v závislosti na čase. ^{[1][6]}

1.3.1. Kolony v plynové chromatografii

Za dobu používání plynové chromatografie se jako stacionární fáze využili desítky druhů látek. Různé typy látek se používají v náplňových kolonách, ať se jedná o kapaliny či pevné látky. Může se však jednat i o tenko vrstevně nanesenou vysoko vroucí kapalinu. Druhým typem kolony je kolona kapilární, ve které je stacionární fáze nanášena přímo na upraveném povrchu uvnitř křemenné kapiláry.

Náplňové kolony mají obecně větší průměr (2-5 mm) než-li kolony kapilární (0,2-0,7 mm). Mají však razantně menší délku (0,5-4 m) oproti kapilárním (10-100 m). Náplňové kolony jsou vyráběné ze skla nebo oceli. Kapilární kolony bývají vyrobeny z křemene, jehož vnitřní strana je upravena tak aby na ni mohla být zakotvena stacionární fáze. Upravuje se leptáním nebo tavením, při kterém disociují silanolové skupiny a zakotví se stacionární fáze.

Stacionárních fází se používá nepřeberné množství. Patří sem carbowaxy, ucony, polyestery, silikonové stacionární fáze a další. Proto před zahájením analýzy musíme vybrat správnou stacionární fázi. I zde platí pravidlo „podobné v podobném“ a vybírá se stacionární fáze vlastnostmi podobná analytu. V současné době se nejčastěji používají křemenné kolony modifikované polysiloxany. Podle substituentů navázaných na polysiloxany můžeme zvolit polaritu stacionární fáze. Podle polarit analytů volíme, zda použít kolonu polární, či nepolární. Příkladem polární fáze lze uvést akrylonitril nebo polyethylenglykol, díky kterým se mohou analyzovat polární a těžké látky (př. alkoholy). Jako příklad vysoce nepolární fáze je skaval (C₃₀) a uhlovodíkové řetězce s počtem uhlíků 4-18. ^{[5][6][9][10]}

1.4. Detektory v plynové chromatografii

Jako detektor označujeme zařízení, které zachycuje analyt a převádí jeho množství na elektrický signál a tento signál odesílá do sběrnice dat. Je umístěn na konci kolony, kde zachycuje jednotlivé separované analyty. ^[1]

1.4.1. Plamenoionizační detektor (FID)

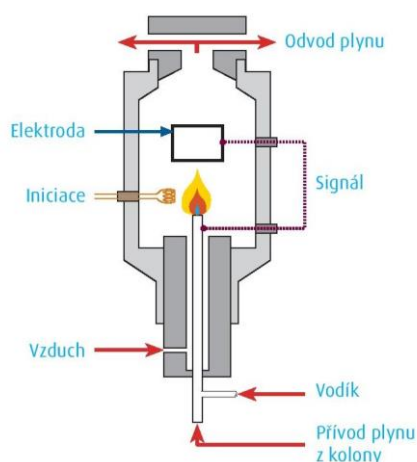
Používá se v plynové chromatografii od roku 1958 a stal se zde nejrozšířenějším detektorem pro svoje široké využití. Je vhodný pro analýzu uhlovodíků, a proto se

používá v mnoha oblastech. Příkladem je petrochemie, kde se testují kvality paliv. Potravinářství kde se testuje nezávadnost obalů a destilátů a mnoho dalších oborů.

Principem tohoto detektoru je měření toku elektrického proudu mezi elektrodami, který je způsoben nabitými částicemi v nosném plynu. Ty vznikají při spalování analytu v kyslíko-vodíkovém plamenu. Vzniklý elektrický proud má vyšší hodnotu než by byla naměřena při průchodu jen nosného plynu a vodíku. Rozdíl mezi těmito proudy se zaznamenává, protože právě tento rozdíl je úměrný ionizaci vzorku a ta závisí na jeho složení

Při použití vodíkového plamene je detektor zaměřen na ionizaci uhlíků, avšak při použití tepelného alkalického zdroje se můžeme zaměřit na organické sloučeniny obsahující fosfor, nebo dusík.

Výhodou tohoto detektoru je jeho univerzálnost, možnost modifikace a napojení na další detektory a také to že je samočisticí. Veškeré nečistoty se „vypálí“. [1] [5] [11]

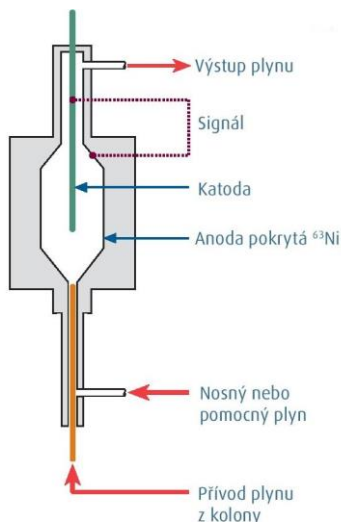


Obrázek č. 2: **Schéma plameno-ionizačního detektoru.**

1.4.2. Detektor elektronového záchytu (ECD)

Využívá se v plynové chromatografii od roku 1960. V tomto detektoru dochází k ionizaci molekul analytu pomocí beta zářiče jako je tritium nebo ^{63}Ni . Rychlé betačástice naráží do molekul analytu a tím ho ionizují. Vznikají pomalé volné elektrony, které vytvářejí měřitelný proud. Pokud analyt obsahuje elektronegativnější substituenty, jako jsou halogeny, dusík nebo fosfor, které mají vysokou elektronovou afinitu. Když jsou elektrony pohlceny, sníží se tak měřený proud. Při srovnání proudu

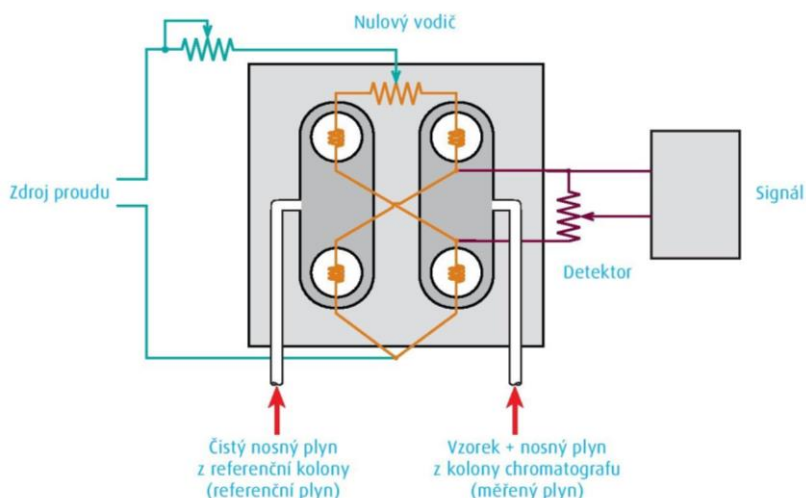
vytvořeného při průchodu čistého nosného plynu a proudu vytvořeného analytem můžeme přímo úměrně vypočíst množství stanovené látky v analytu. ^{[1] [12]}



Obrázek č. 3: Schéma detektoru elektronového záchytu.

1.4.3. Tepelně vodivostní detektor (TCD)

Jedná se o univerzální detektor vhodný pro analýzu plynů. Oproti ostatním detektorům je tento nedestrukční. Pouze se ve dvou oddělených komůrkách (jednou naplněnou nosným plynem a druhou naplněnou plynem s analytem) střídavě zahřívá obsah žhavicím vláknem. Pokud je tepelná vodivost v měřeném plynu větší než v plynu nosném, teplota vlákna se sníží a jeli tomu naopak tak zvýší. Změna teplot vyvolá měřitelnou změnu proudu, která je přímo úměrná koncentraci stanovené látky. ^{[1] [13]}



Obrázek č. 4: Schéma tepelně vodivostního detektoru.

1.4.4. Hmotnostní detektor

Hmotnostní detektor reaguje na změnu hmotnosti analytu neseného mobilní fází přes detektor. Tuto změnu zaznamenává a vynáší jako pík. Ve většině případů se jedná o hmotnostní spektrometr, který je schopný v každém bodě chromatogramu vyjádřit hmotnostní spektrum přítomné pátky. ^[1]

1.5. Zhodnocení

Když mluvíme o halogenovaných látkách v životním prostředí, zpravidla je řeč o halogenovaných uhlovodících. Halogenované uhlovodíky vznikají substitucí jednoho nebo více atomů vodíku a jeho nahrazením halogenem. Halogeny jsou prvky sedmé skupiny. Patří sem fluor, chlor, brom, jod a astat. Při halogenaci se nejčastěji setkáme s látkami substituovanými atomy fluoru a chloru. Právě uhlovodíky halogenované fluorem a chlorem se nejčastěji využívají v mnoha oblastech organické chemie, ať už v oblasti povrchových úprav - polytetrafluorethylen (teflon), nebo v oblasti chlazení dichlordifluormethat (a další freony), nebo v oblasti cíleně toxických látek, jako jsou pesticidy. V neposlední řadě se užívá i substituentů v podobě bromu a to jako zpomalovačů hoření.

Právě problematika pesticidů v životním prostředí je v Plzni aktuální. V okolí se často využívají a dříve čističky odpadních vod nedokázaly dostatečně zbavit pitnou vodu jejich přítomnosti. V médiích proběhla aféra o znečištění pitné vody v Plzni a to byl podnět k vypracování práce, která by dokázala odhalit halogenované pesticidy ve vzorcích vody.

Pro možnost analýzy vody musela být nejdřív analyzovaná látka vyextrahována. A pro účinnou extrakci je nutno zvolit správné rozpouštědlo. Abych odhadl vhodné rozpouštědlo vyhledával jsem isiknowledge.com články s touto tematikou a našel jsem článek Development of a Multiresidue Method for Pesticide Analysis in Drinking Water by Solid Phase Extraction and Determination by Gas and Liquid Chromatography with Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry od autoritorského kolektivu F. F. Donato, M. L. Martins, J. S. Munaretto, O. D. Prestes, M. B. Adaime, R. Zanella, který publikoval článek v časopise JOURNAL OF THE BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY článek o extrakci herbicidů z vodního prostředí pomocí dichlor methanu. Na základě této studie jsem dále volil nepolární rozpouštědla namísto polárních. ^[14]

2. PRAKTICKÁ ČÁST

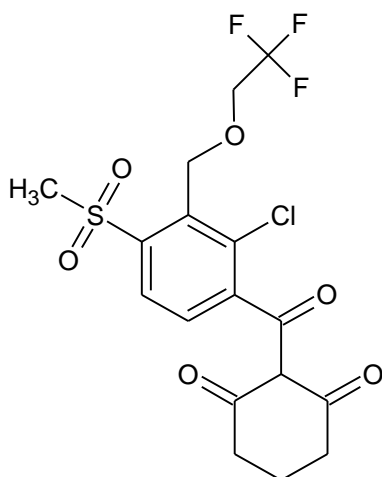
2.1. Zvolení zkoumané látky

Jak už jsem zmínil výše, jako zkoumaná skupina látek byly vybrány pesticidy. Kontaktoval jsem tudíž lokální zemědělce s otázkou jaké pesticidy používají. Z dlouhého seznamu dostupných pesticidů tak byly vybrány dva, které se pravidelně lokálně využívají. Těmito přípravky jsou herbicidy Laudis a Husar active od výrobce Bayer spol. s r.o.. Z obchodního katalogu pro rok 2015 byly zjištěny účinné složky obou přípravků. U přípravku Husar active používaného k ošetření obilnin se jednalo o 3 složky a u přípravku Laudis používaného k ošetření kukuřice a máku 2. Právě počet aktivních složek vedl k výběru pesticidu následně použitého jako standard a analyt.^[15]

2.2. Vlastnosti standardu

Jelikož nebyl k dispozici standard čisté látky, uchýlil jsem se ke zvolení náhradního standardu v podobě herbicidu Laudis. Jedná se kapalnou látku hnědavé barvy a nepolární povahy. Má dvě aktivní složky:

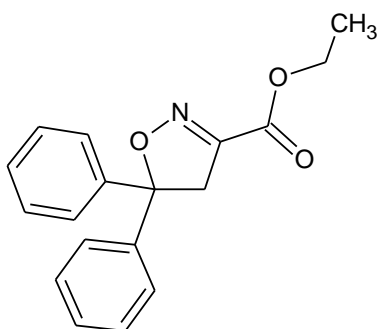
- 1) Tembotrion - dle značení IUPAC se jedná o 2-[2-chloro-4-methylsulfonyl-3-(2,2,2-trifluoroethoxymethyl)benzoyl]cyclohexan-1,3-dion, sumárním vzorcem $C_{17}H_{16}ClF_3O_6S$ a strukturním vzorcem uvedeným na obrázku č. 5.



Obrázek č. 5: **Strukturní vzorec Tembotrin.**

Je zastoupena 4,71% a to činí 44 g/l. Dle zjištěných poznatků je tato látka nejlépe rozpustná v dimethyl sulfoxidu a dichlor methanu a to tak že se rozpouští více jak 600 mg/l při 20°C. [16]

- 2) Isoxadifen-ethyl - značení IUPAC se jedná o 5,5-difenyl-4H-1,2-oxazol-3-karboxyát, sumárním vzorcem $C_{18}H_{17}NO_3$ a sturkturním vzorcem uvedeným na obrázku č. 6. [16]



Obrázek č. 6: **Sumární vzorec Isoxadifen-ethyl.**

2.3. Stanovení rozpustnosti a volba rozpouštědla

Jedním z prvních pokusů v této práci bylo zjistit, zda lze námi zvolený standard rozpustit v destilované vodě. Proto jsem si do tří zkumavek odpipetoval 10 ml destilované vody a na analytických vahách si odvážil 10, 100 a 1000 mg herbicidu. Po přidání bylo zjevné okamžité zakalení roztoku, jak je možno vidět na obrázku č. 7.



Obrázek č. 7: **Destilovaná voda s přidavkem (pořadí zleva) 10, 100 a 1000 mg herbicidu Laudis.**

Dalším krokem bylo zvolit rozpouštědlo, kterým se bude herbicid extrahovat. Rozpouštědla schopná efektivně rozpustit námi zkoumanou složku herbicidu ovšem byla buď drahá, nebo pro náš účel nevhodná. Buď proto, že se jedná o halogenované uhlovodíky, které by mohly svým intenzivním signálem v ECD zastínit námi hledaný analyt, nebo jsou mísitelná s vodou. Z nepolárních rozpouštědel byly v první fázi k dispozici benzen, diethylether, ethyl acetát (ethyl ester kyseliny octové), chloroform a toluen.

Abychom zjistili, jaké rozpouštědlo lépe extrahuje námi zkoumanou, rozhodli jsme se extrahovat vzorek různými rozpouštědly a analyzovat je spektrometrem.

Při tomto pokusu jsem do 5 dělicích nálevek odpipetoval 10 ml destilované vody, na analytických vahách do každé navážil 10 mg přípravku Laudis. Poté jsem odpipetoval 10 ml rozpouštědla, do každé z dělicích nálevek jiné z výše uvedených. Dělicí nálevky jsem zazátkoval a každou protřepával 1 minutu. Ethyl acetát, ether a chloroform vytvořily téměř okamžitě lehkou emulzi, zato benzen a toluen vytvořili hustou a charakteristickou emulzi.



Obrázek č. 8: Rozdělování vodní a organické fáze u (řazeno zleva) etheru, ethyl acetátu, benzenu a toluenu.

Poté je nechal odstát do dalšího dne. Poté jsem oddělil ustálené vodní a organické fáze do zkumavek. Tyto fáze jsem prověřil na spektrometru Hitachi Model U-2010 (obr. č. 9) pracujícím v UV a VIS spektru.



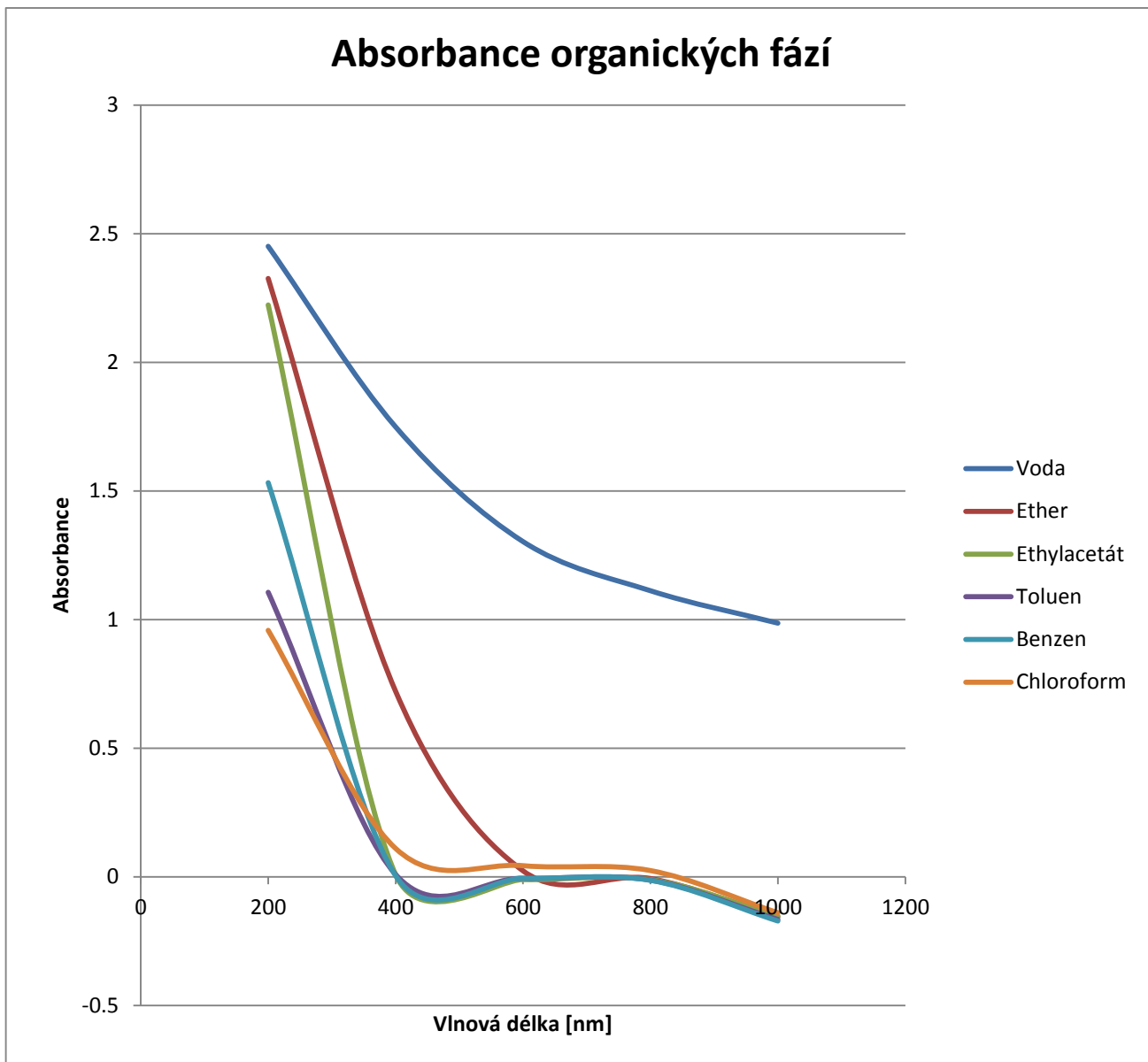
Obrázek č. 9: **Spektrometr Hitachi Model U-2010.**

Měření spektrometrem probíhalo tak, že do jednotlivých křemenných kyvet se odlila měřená fáze a vloží se do podavače (obr. č. 10). Pro srovnání spekter byla vložena kyveta sloužící jako standard a obsahující destilovanou vodu. Po analyzování jedné fáze se otočí podavač na další fázi a opět se analyzuje. Tímto způsobem jsem analyzoval všech 10 fází.



Obrázek č. 10: **Podavač na kyvety.**

Výsledek měření byl bohužel nepřesvědčivý. Zkoumaná látka nevytvořila v žádném z rozpouštědel dostatečný pík ne spektru a na základě kterého bychom mohli vybrat vhodné rozpouštědlo. To bylo zřejmě způsobeno kombinací dvou faktorů – spektrum nemá výrazný pík a zároveň jsou použity nízké koncentrace. (obr. č. 11).



Obrázek č. 11: Graf absorbance organických fází po extrakci rozpouštědly.

Proto jsme v další fázi přikročili k testování různých organických fází metodou GC. K dříve použitému etheru, ethyl-acetátu, toluenu, chloroformu a benzenu jsme se rozhodli přidat hexan, jakožto účinné rozpouštědlo a nepolární extrakční činidlo.

2.4. Volba rozpouštědla založená na chromatografickém měření

2.4.1. Specifikace přístroje

Měření probíhala na chromatografu DANI Mater GC Fast Gas Chromatograph od firmy DANI Instruments SpA (obr. č. 12)

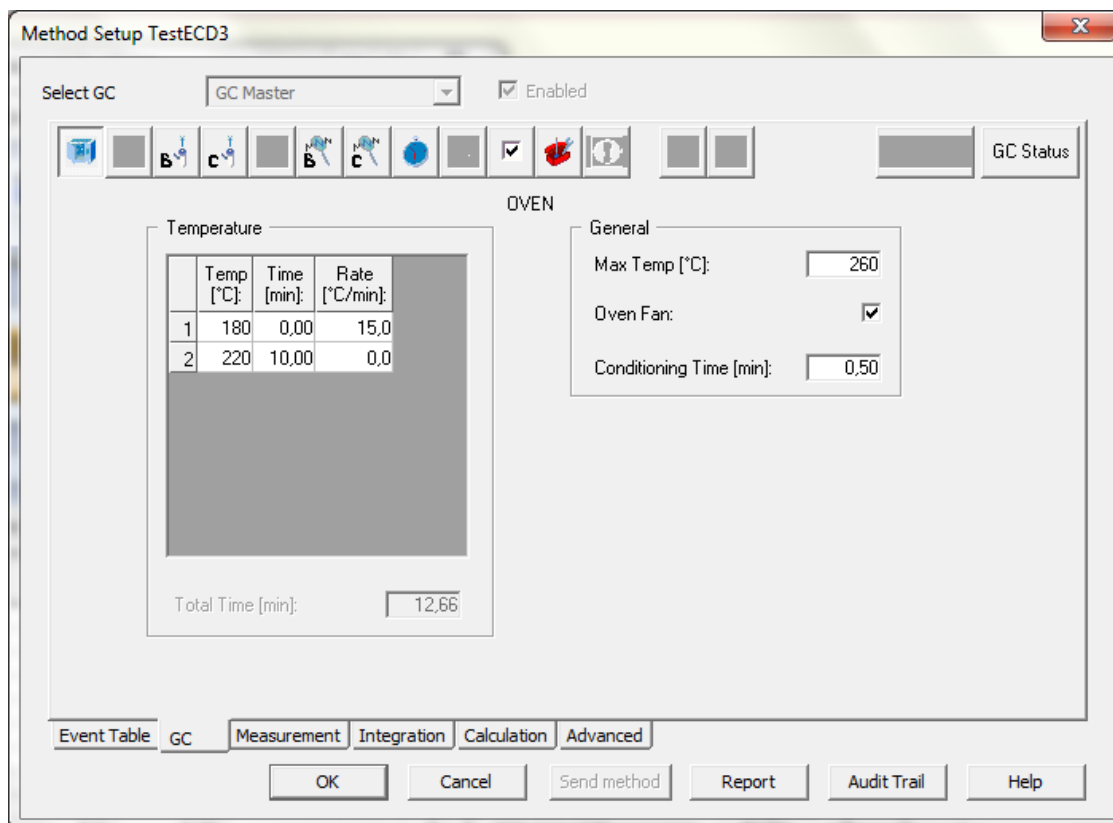


Obrázek č. 12: **Chromatograf DANI Master.**

Chromatograf má možnost instalace 3 samostatných injektorů a detektorů a pec umožňuje instalaci několika kapilárních kolon. V tomto chromatografu jsou umístěny 2 injektory, 2 kolony (polární a nepolární) a 2 detektory (univerzální FID a ECD). Pro naše stanovení byla používána nepolární kolona (použita křemenná kolona Restek RXI-35 Sil MS o délce 30 m, průměru 0,25 mm a tloušťce stacionární fáze 0,25 μm) s detekcí pomocí ECD. Maximální přípustná teplota injektoru a detektoru byla 450 °C, avšak temperovaná pec má pracovní teplotu od 5 °C nad teplotou místnosti do 500 °C. Teplotní omezení je dáno především použitými kolonami, je nutné udržet maximální teplotu v peci na takové úrovni, aby nedošlo k jejich degradaci. Jako nosný plyn byl využit dusík o čistotě doporučené pro ECD.

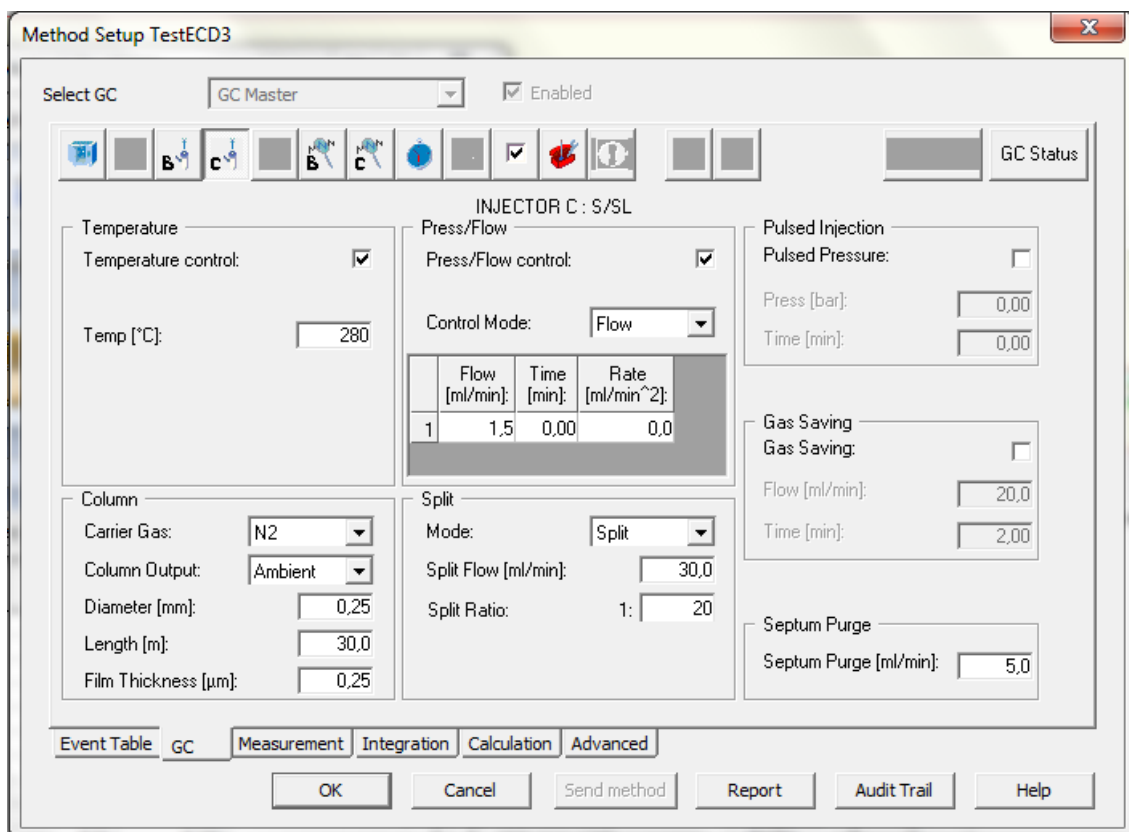
K testování byla využita metoda TestECD3 od Ing. Jana Hrdličky Ph.D., který byl zároveň vedoucí mé bakalářské práce. Původní metoda využívána k testování funkce ECD byla upravena mírnými změnami teploty injektoru a detektoru. Vznikla tak metoda s následujícími parametry:

Při startu měření byla teplota kolony na 180°C a postupně se zvyšovala rychlostí 15°C/min až na hodnotu 220°C při které probíhalo měření dalších 10 minut. Celkový čas analýzy tak byl 12 minut a 40 sekund (obr. 13)



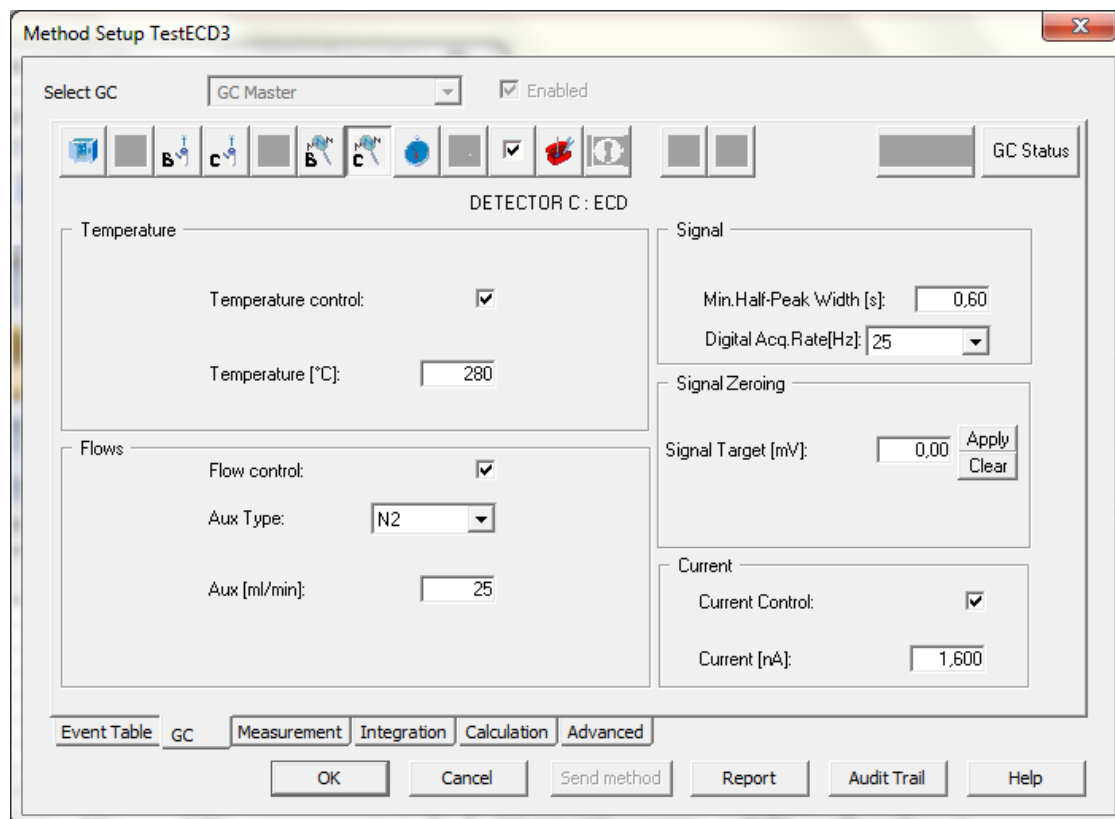
Obrázek č. 13: **Parametry metody.**

Injektor – Teplota injektoru byla zvolena 280 °C, průtok nosného plynu 1,5 ml/min a split 30 ml/min. Také byl využit oplach septa, s průtokem plynu 5 ml/min Všechny parametry viz obrázek č. 14.



Obrázek č. 14: Parametry injektoru.

Detektor – Teplota detektoru byla nastavena na teplotu 280°C. V nastavení byl zadán i pomocný plyn a jeho přísun na 25 ml/min. Další parametry viz obrázek č. 15.

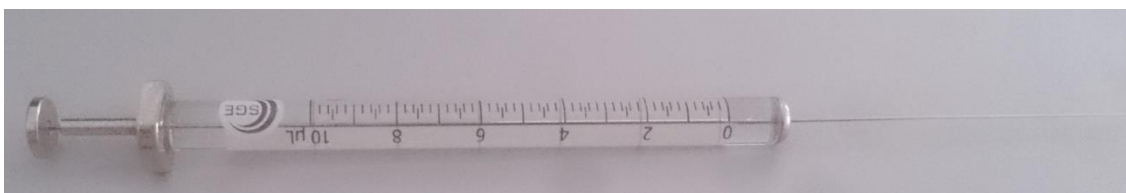


Obrázek č. 15: Zadaná specifika v detektoru.

2.4.2. Testování rozpouštědel plynovým chromatografem

Pro zjištění nejúčinnějšího rozpouštědla jsem opakoval pokus s protřepáváním vodné fáze s herbicidem a rozpouštědlem. Tentokrát se všemi šesti druhy rozpouštědel. Opět s 10 ml destilované vody, 10 mg přípravku a 10 ml rozpouštědla v dělicích nálevkách. Vytřepávání trvalo jednu minutu a v tomto případě jsem nechal oddělovat fáze 4 dni. Po oddělení fází jsem přestoupil na měření na chromatografu.

Po startu přístroje a jeho vytemperování se na monitoru objevilo oznámení „ready“ a spustil se odpočet půl minutového intervalu, ve kterém se program ujistí, že jsou veškeré hodnoty stabilní, nežli umožní spuštění měření. Pokud tomu tak je objeví se ikona „start“. Před vlastním nástřikem byla použita stříkačka vícenásobně propláchnuta měřeným roztokem.

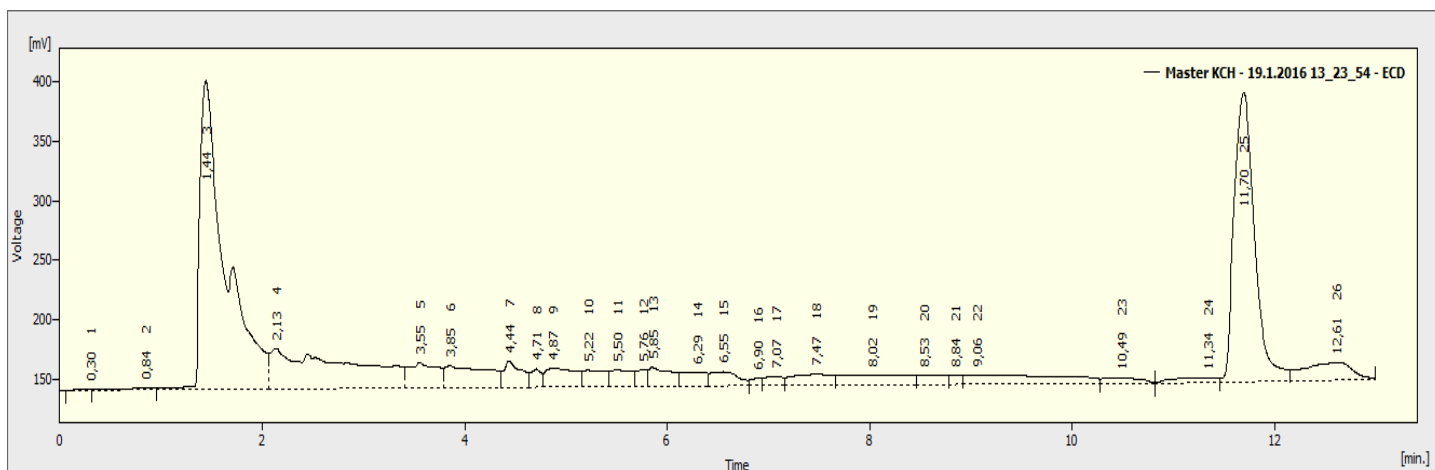


Obrázek č. 16: Skleněná injekční stříkačka s ocelovým hrotem a stupnicí do 10µl.

Při každém stanovení bylo stříkačkou odměřeno 1,75 µl vzorku a vstříknuto do injektoru. Aby bylo možno vstříknout vzorek do injektoru je nutno probodnout gumové septum a vnořit hrot stříkačky přibližně do 2/3 jeho délky. V okamžiku nástřiku vzorku pak bylo zmáčknuto tlačítko start na přístroji a měření bylo zahájeno.

Tímto způsobem jsem provedl sadu měření, u každé organické fáze se jednalo o dvě měření, aby bylo zabráněno chybě. Pokud tato dvě měření neměla shodný výsledek, následovalo další měření, dokud nebylo dosaženo shody získaných chromatogramů.

Ze získaných chromatogramů (obr. č. 18) jasně vyplynulo, že nejúčinnější rozpouštědlo z testovaných extrakčních činidel je ethyl acetát (obr. č. 17). Pík extrahované látky v retenčním čase 11,677 min měl největší plochu a výšku oproti ostatním rozpouštědlům.

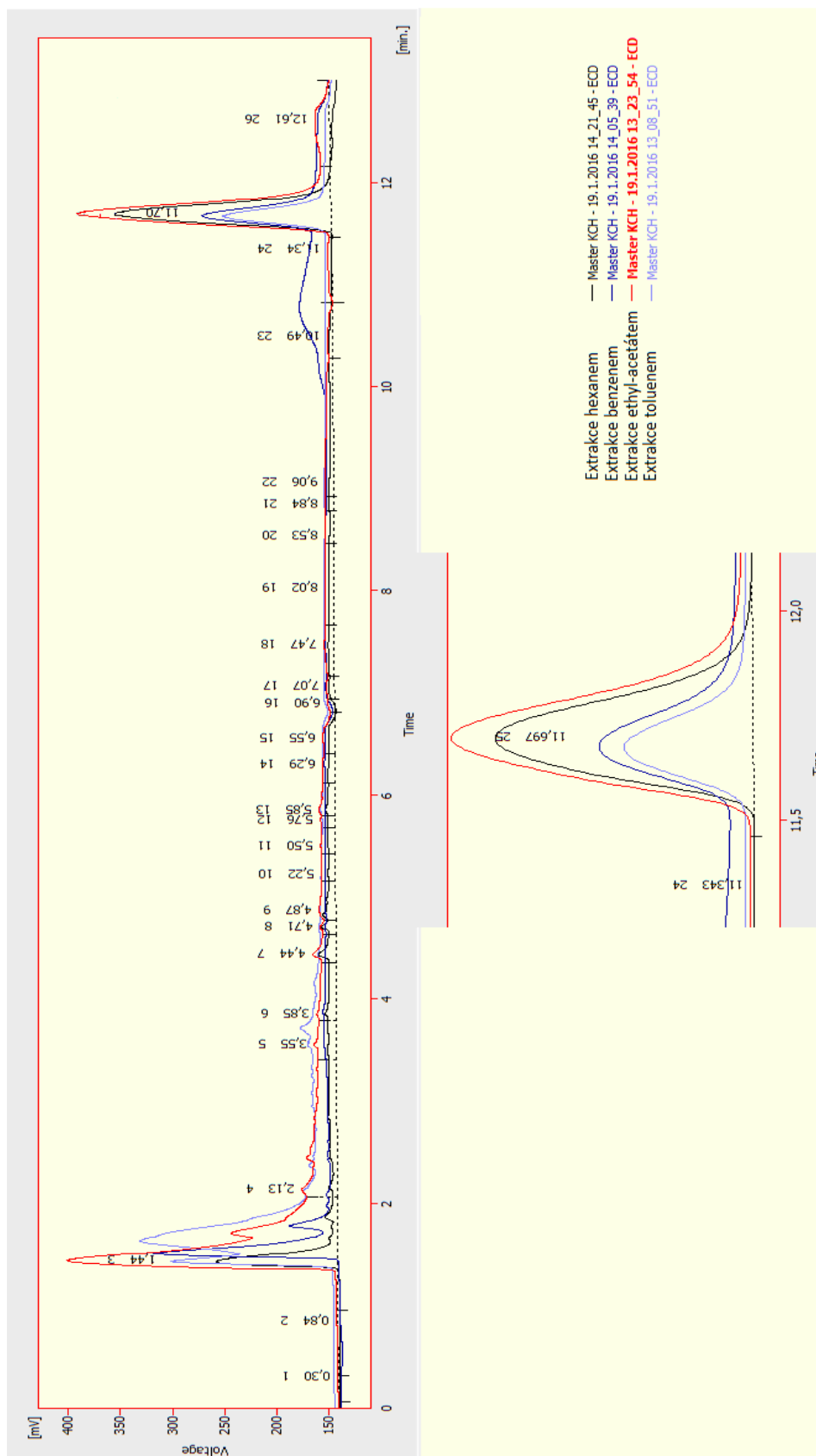


Obrázek č. 17: **Chromatogram ethyl acetátu s analytem v retenčním čase 11,677 min.**

V souhrnu chromatogramů rozpouštědel na obrázku č. 18 není uveden chloroform a ether. Ukázalo se, že chloroform poskytuje natolik silný signál, že výrazně ovlivňuje vlastní stanovení a proto je pro náš účel nevhodný. Chromatogram čistého chloroformu je k nahlédnutí v příloze č. 1. U etheru se vyskytl problém s jeho těkavostí. Jeho organická fáze po extrakci byla příliš těkává a v průběhu zpracování se tak měnil objem fáze a tím i koncentrace. Z tohoto důvodu jsme toto rozpouštědlo dále netestovali.

Tabulka č. 1: **Plochy a výšky píku v retenčním čase 11,677 min.**

Rozpouštědlo	plocha píku [mV.s]	výška píku [mV]
hexan	3073,684	214,096
benzen	2166,699	123,321
ethyl acetát	3426,334	243,595
toluen	1625,166	104,507



Obrázek č. 18: Souhrn chromatogramů s rozpouštědly v obsahujícími analyt s přiblížením na oblast analytu s retenčním časem 11,677 min.

2.5. Tvorba standardů

Pro další stanovení byly z testovaného herbicidu vytvořeny standardy. Koncentrace standardů jsou uvedeny pro navážku herbicidu Laudis, protože nebyla k dispozici čistá účinná látka jako standard. Standardy byly připraveny podle následujícího schématu: Do odměrné baňky na 500 ml bylo odváženo 0,500 g přípravku Laudis a doplněno destilovanou vodou po rysku. Tudíž je koncentrace tohoto vodného roztoku 1 g/l.

1. Do odměrné baňky na 500 ml bylo odváženo 0,050 g přípravku Laudis a doplněno destilovanou vodou po rysku. Tudíž je koncentrace tohoto vodného roztoku 0,1 g/l.
2. Do odměrné baňky na 500 ml bylo odpipetováno 5 ml přípravku zásobního roztoku č. 2 a doplněno destilovanou vodou po rysku. Tudíž je koncentrace tohoto vodného roztoku 1 mg/l.
3. Do odměrné baňky na 50 ml bylo odváženo 0,050 g přípravku Laudis a doplněno ethyl acetátem po rysku. Tudíž je koncentrace tohoto ethyl acetátového roztoku 10 g/l.

2.6. Extrakce

2.6.1. Závislost extrakce na počtu protřepávání

Jednou z možností jak zefektivnit extrakci ji provést několikanásobně. Na základě tohoto faktu byl navržen pokus, ve kterém se:

- Odpipetovalo do 100 ml dělicí nálevky 50 ml standardu č. 3 spolu s 30 ml ethyl acetátu. Protřepávání trvalo 1 min. Nechalo se ustavit rovnováhu mezi vodnou a organickou fází a jímala se organická fáze do zkumavky.
- Odpipetovalo do 100 ml dělicí nálevky 50 ml standardu č. 3 spolu s 15 ml ethyl-acetátu. Protřepávání trvalo 1 min. Nechalo se ustavit rovnováhu mezi vodnou a organickou fází a jímala se organická fáze do zkumavky a vodnou fází do kádinky. Tento postup se opakoval se stejným objemem rozpouštědla a vodnou fází uschovanou v kádince. Organickou fází jsme jímali do téže zkumavky.

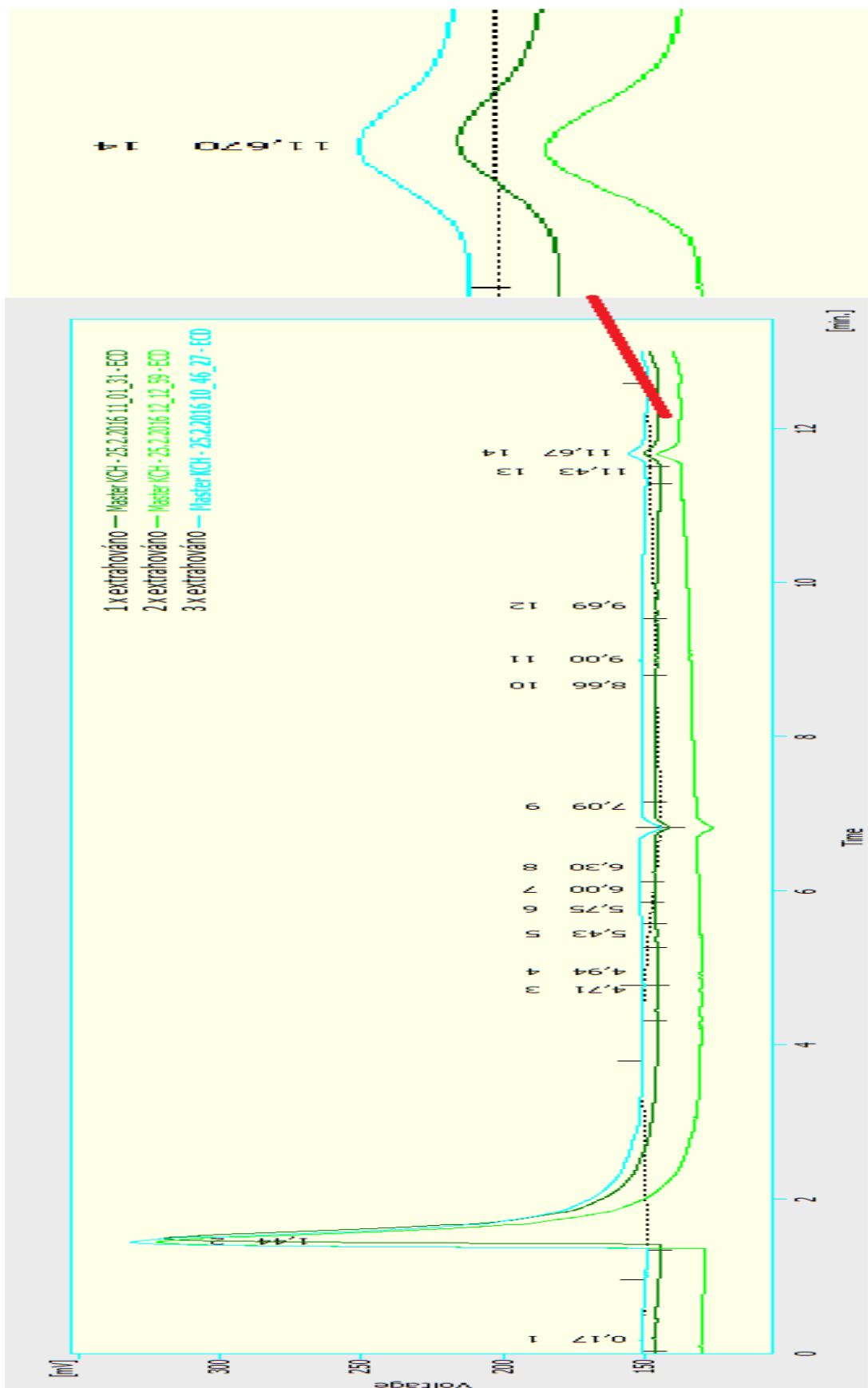
- Odpipetovalo do 100 ml dělicí nálevky 50 ml standardu č. 3 spolu s 10 ml ethyl acetátu. Protřepávání trvalo 1 min. Poté se dvakrát opakoval postup z předešlého bodu.

Účelem tohoto pokusu bylo zjistit, zda několika fázová extrakce dosáhne výrazně vyššího výtěžku, než-li extrakce jednorázová. Získané organické fáze byly analyzovány na plynovém chromatografu. Výsledkem měření byly tři chromatogramy, jak lze vyčíst z tabulky č. 2 a vidět na obrázku č. 19 (jednotlivé chromatogramy lze nalézt v příloze č. 2).

Pokud budou chromatogramy posuzovány subjektivně, nejsou zde na první pohled přítomné žádné významné rozdíly pro různý počet extrakcí. Při pohledu do tabulky lze rozdíly nalézt, ale neposkytují žádný vyhodnotitelný trend a vzhledem k nízkým hodnotám signálu je i malé kolísání relativně významnou změnou. Ze zjištěných dat nelze učinit jednoznačný závěr, ale vliv počtu extrakcí na zvětšení signálu je pravděpodobně nevýznamný.

Tabulka č. 2: **Počet extrakcí a odpovídající plocha píku v retenčním čase 11,677 min.**

Počet extrakcí	Plocha píku [mV.s]	Výška píku [mV]
1	62,186	5,453
2	439,147	9,888
3	125,572	7,456



Obrázek č. 19: Chromatogram s uvedeným počtem extrakcí a přiblížením píku herbicidu v retenčním čase 11,677.

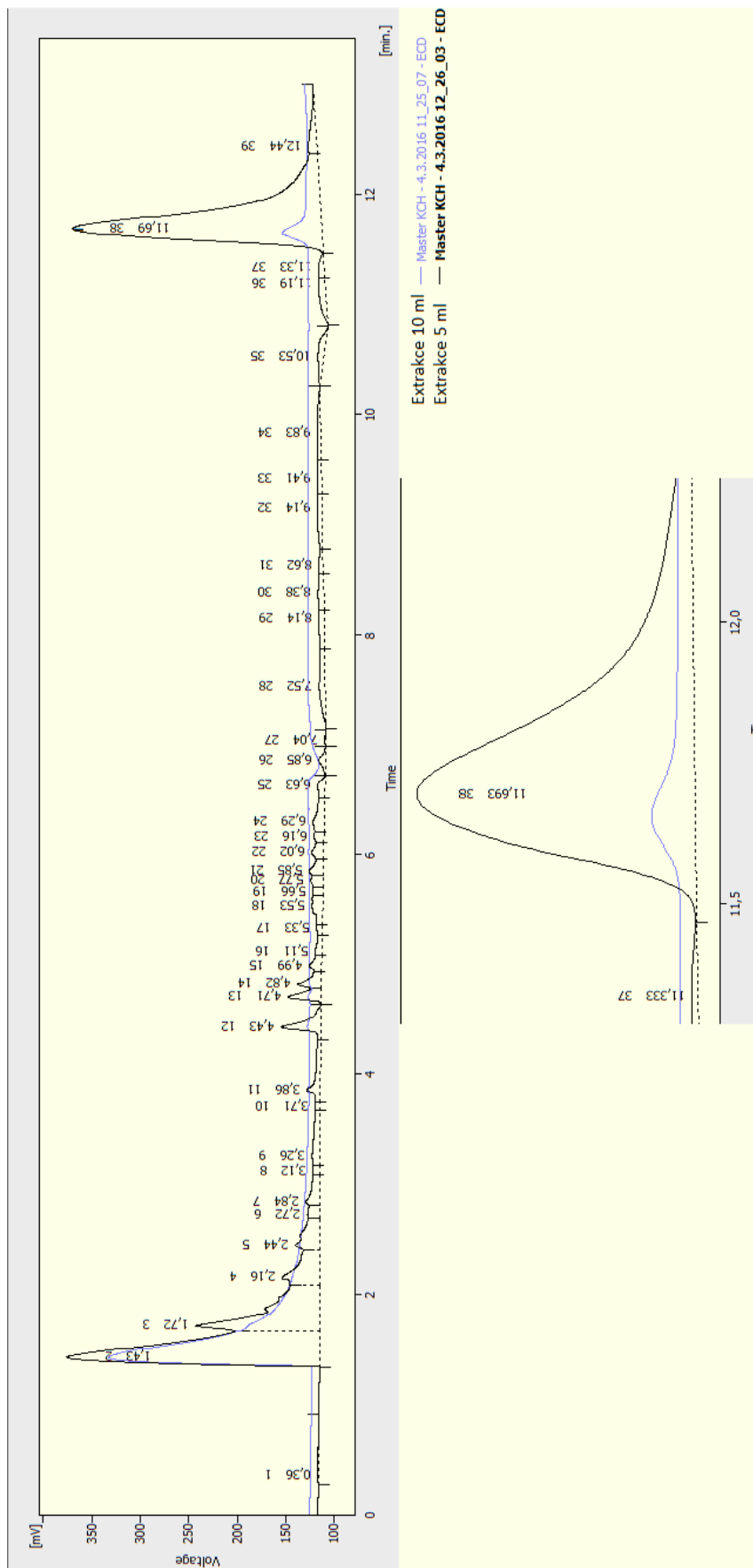
2.6.2. Závislost účinnosti extrakce na objemu rozpouštědla

Jednou z dalších možností jak zefektivnit extrakci je zredukovat objem rozpouštědla do kterého se látka extrahuje. Pro potvrzení této v mnohých případech osvědčené metody byl navržen experiment, který by tento předpoklad potvrdil, nebo vyvrátil. Proto bylo zvoleno protřepávání třemi různými objemy. Bylo odpipetováno 50 ml standardu č. 3 do třech dělicích nálevek. K vodným roztokům bylo následně připipetováno 10 a 5 ml ethyl acetátu. Poté proběhla stejná procedura jako u předešlých extrakcí, po níž následovalo měření na chromatografu. ^[17]

Plocha píku pře extrakci 5 ml ethyl acetátu byla 15x větší, než-li plocha píku při extrakci 10 ml. Plochy a výšky píku jsou uvedeny v tabulce č. 3 a srovnání obou extrakcí na obrázku č. 20.

Tabulka č. 3: **Srovnání extrakcí.**

číslo měření	Množství [ml]	plocha píku [mV.s]	výška píku [mV]
4.3.2016 11-25-07	10	306,948	26,95
4.3.2016 12-26-03	5	4679,401	257,14



Obrázek č. 20: Chromatogram se srovnáním obou extrakcí.

2.6.3. Dolní hranice extrakce

Aby metoda extrakce a zjištění halogenovaného uhlovodíku byla kompletní, bylo nutno zjistit jaké nejmenší množství analytu je schopna ve vzorku bezpečně odhalit. K zjištění minimální změřitelné koncentrace byly vytvořeny roztoky ethyl acetátu se vzorkem o koncentracích 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 50 a 100 mg/l.

Těchto koncentrací jsem dosáhl ředěním standardu č. 4. Postup ředění je uveden v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4: **Příprava vzorků.**

koncentrace [mg/l]	ředění
100	původní standard
50	25 ml z roztoku s c=100 mg/l standardu dolité na rysku v 50 ml odměrné baňce
20	10 ml z roztoku s c=50 mg/l a 25 ml ethyl-acetátu
10	25 ml z roztoku s c=20 mg/l standardu dolité na rysku v 50 ml odměrné baňce
5	25 ml z roztoku s c=10 mg/l standardu dolité na rysku v 50 ml odměrné baňce
2	10 ml z roztoku s c=5 mg/l a 25 ml ethyl-acetátu
1	25 ml z roztoku s c=2 mg/l standardu dolité na rysku v 50 ml odměrné baňce
0,5	25 ml z roztoku s c=1 mg/l standardu dolité na rysku v 50 ml odměrné baňce

V průběhu tohoto pokusu nastala komplikace. U koncentrací 20 a 2 mg/l se objevovaly abnormality. Abnormality byly způsobeny použitím jiného ethyl acetátu než doposud, z důvodu nedostatku dřívější šarže. Abnormality nezasahovali do oblasti výskytu píku, a proto nebylo potřeba provádět ředění a měření s novou šarží. Chromatogram s původní a novou šarží ethyl acetátu naleznete v příloze č. 3.

Výsledkem měření byla suma chromatogramů (obr. č. 21), ze kterých bylo možno odhadnout jaká minimální koncentrace je pomocí této metody zjištělná. Z tabulky (tabulka č. 5) získaných dat s uvedenou výškou a plochou jednotlivých píků při retenčním čase 11,677 vyplývá, že první pík můžeme zaznamenat na koncentraci 1 mg/l, avšak tento pík má tak malou výšku a plochu, že bez znalosti retenčního času zkoumané látky tento pík nezaznamenáme. První opravdu znatelný pík se objevil až při koncentraci 5 mg/l.

Tabulka č. 5: **Suma naměřených hodnot při měření spodní hranice zjistitelnosti**

číslo měření	koncentrace [mg/l]	plocha píku [mV.s]	výška píku [mV]
24.03.2016 10-14-59	0,5	nezaznamenán	nezaznamenán
24.03.2016 10-30-26	1	27,791	0,624
24.03.2016 11-00-10	2	71,796	1,185
24.03.2016 11-29-46	5	65,455	3,507
24.03.2016 11-44-39	10	175,32	5,542
24.03.2016 12-15-08	20	101,402	4,546
24.03.2016 12-45-02	50	217,298	14,464
24.03.2016 12-59-44	100	527,706	43,129

3. ZÁVĚR

Výsledkem mé práce je metoda extrakce, analýzy a prokázání halogenovaných pesticidů ve vzorcích vody. V této metodě bylo vybráno rozpouštědlo ethyl acetát a minimálním stanovitelným množstvím bylo 5 mg/l. Prokázalo se, že zde lze uplatnit přímá úměra mezi množstvím rozpouštědla použitého při extrakci a efektivitou extrakce.

Tato metoda by mohla být vhodná pro testování obsahu pesticidů ve vodě. Na danou práci je možné navázat dalším výzkumem, který by se zaměřil na optimalizaci vlastní metody chromatografického stanovení a případně i na vylepšení parametrů extrakce tak, aby byla výrazně snížena mez detekce. Také je pak možné provést validaci dané metody s využitím přesně definovaného standardu a metodu připravit k rutinnímu použití.

4. Resumé

This project will be resolving presence of halogenated substances in selected samples from the environment. Subjected to the tests halogenated hydrocarbons and as a sample was chosen herbicide, commonly used in local farming/agriculture. The Herbicide was extracted from watery environment and analysed by gas chromatograph. The pesticide was successfully extracted and proven by ethyl acetate. By this method we have achieved minimal demonstrable amount counting 5mg/l of herbicide.

5. Seznam použité literatury

5.1. Knižní publikace

- 1) Štulík K. a kol.: Analytické separační metody. Karolinum, Praha 2004.
- 2) Holzbecher Z. a kol.: Analytická chemie. SNTL., Praha 1968.
- 3) Opekar F. a kol.: Základní analytická chemie : pro studenty, pro něž analytická chemie není hlavním studijním oborem. Karolinu, Praha 2002.
- 4) Kubíček V., Lázníčková A.: Základy fyzikální chemie – Vybrané kapitoly pro posluchače Farmaceutické fakulty. Karolinum, Praha 2014.
- 5) Sýkora D., Zachař P.: Plynová chromatografie. <http://old.vscht.cz/anl/lach2/GC.pdf>, cit. 2016 – 6
- 6) Volka K. a kol.: Analytická chemie II. VŠCHT, Praha 1997.
- 7) Švec F.: Co dnes hýbe kapalinovou chromatografií?. In: *Chem. Listy* **2009**, 103, s. 266-270.
- 8) James A. T. a Martin A. J. P.: Gas-liquid partition Chromatography: the Separation and Micro-estimation of Volatile Fatty Acids from Formic Acid to Dodecanoic Acid. In: *National Institute for Medical Research*, London **1952**, 50, s. 679-690.
- 9) Churaráček J.: Analýza organických látek : sborník přednášek z kurz. 2Theta, Český Těšín 1999.
- 10) Sobotníková J., Bosáková Z., Čabala R., Coufal P., Pacáková V., Štulík K.: HISTORIE, SOUČASNOST A PERSPEKTIVY ANALYTICKÝCH SEPARAČNÍCH METOD NA KATEDŘE ANALYTICKÉ CHEMIE PŘÍRODOVĚDECKÉ FAKULTY UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE. In: *Chem. Listy*. **2010**, 104, s. 1226-1231.
- 11) The Linde Group, http://www.linde-gas.cz/internet.lg.lg.cze/cs/images/PlamenoizolacniDetektor_INNA_22_4_2_00979_15731.pdf, staženo 10.6.2016.
- 12) The Linde Group, http://www.linde-gas.cz/internet.lg.lg.cze/cs/images/Detektor_4_6_200979_15732.pdf, staženo 10.6.2016.

- 13) The Linde Group, http://www.linde-gas.cz/internet.lg.lg.cze/cs/images/TVD_4_6_200979_15733.pdf, staženo 10.6.2016.
- 14) Donato F. F., Martins M. L., Munaretto J. S., Prestes O. D., Adaime M. B., Zanella R.: Development of a Multiresidue Method for Pesticide Analysis in Drinking Water by Solid Phase Extraction and Determination by Gas and Liquid Chromatography with Triple Quadrupole Tandem Mass Spectrometry. In: *JOURNAL OF THE BRAZILIAN CHEMICAL SOCIETY*. **2015**, 10, strana 2077-2087.
- 15) Bayer s.r.o.: Přípravky na ochranu rostlin, odrůdy a prostředky pro DDD činnost. Z vlastního nákladu, Praha 2014.
- 16) The PubChem Project, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, staženo 22.10.2015.
- 17) Davídek J. a kol.: Laboratorní příručka analýzy potravin. SNTL, Praha 1977.

6. Seznam převzatých obrázků

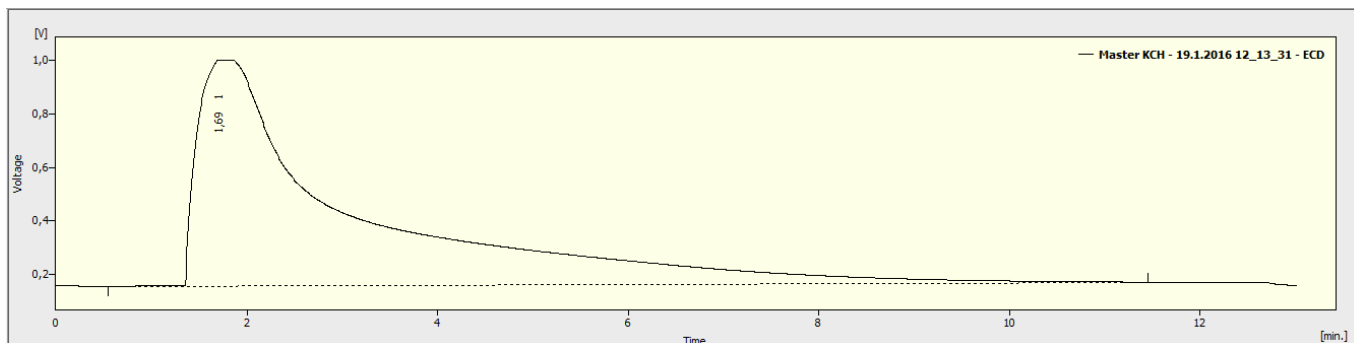
Obrázek č. 2 - The Linde Group, http://www.linde-gas.cz/internet.lg.lg.cze/cs/images/PlamenoizolacniDetektor_INNA_22_4_200979_15731.pdf, staženo 10.6.2016.

Obrázek č. 3 - The Linde Group, http://www.linde-gas.cz/internet.lg.lg.cze/cs/images/Detektor_4_6_200979_15732.pdf, staženo 10.6.2016.

Obrázek č. 4 - The Linde Group, http://www.linde-gas.cz/internet.lg.lg.cze/cs/images/TVD_4_6_200979_15733.pdf, staženo 10.6.2016.

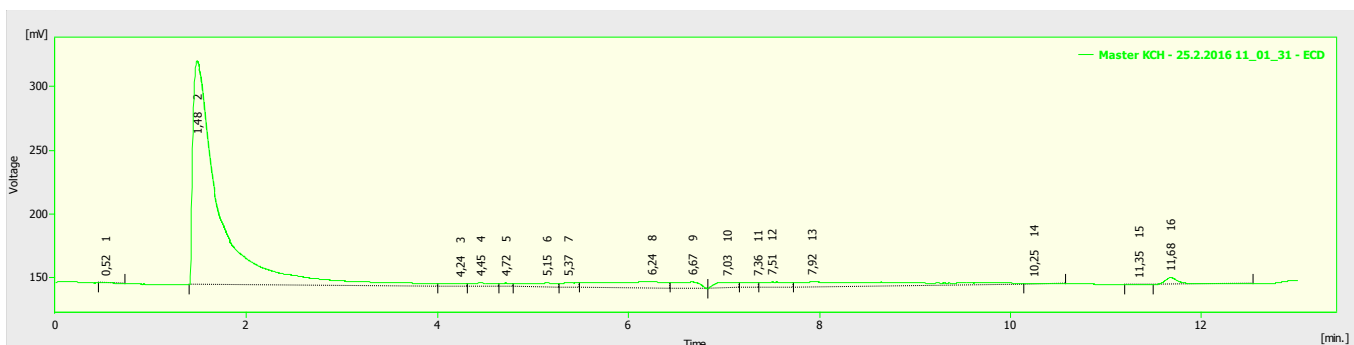
7. Přílohy

Příloha č. 1:

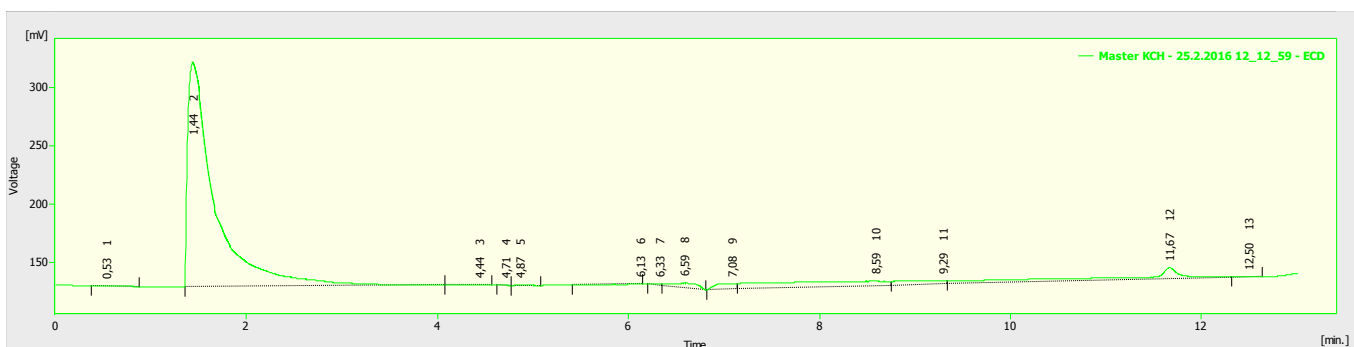


Obrázek č. 1: Chromatogram čistého chloroformu.

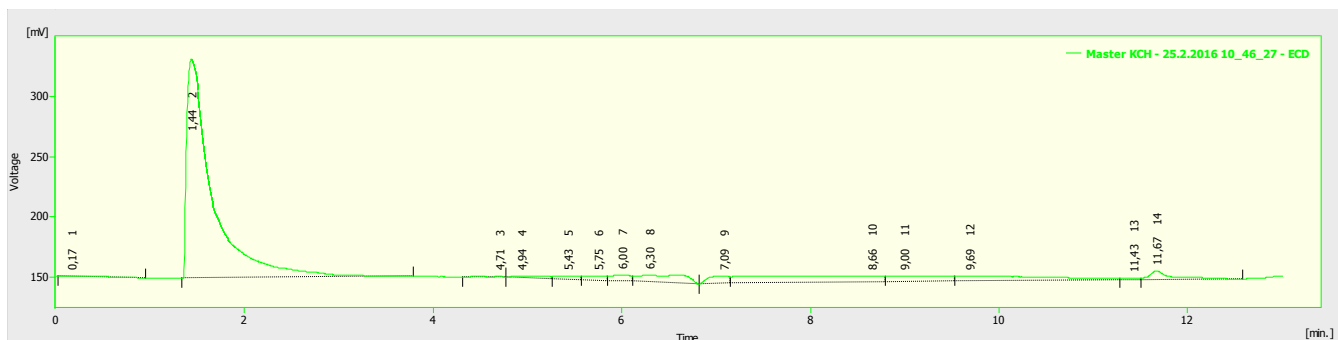
Příloha č. 2:



Obrázek č. 1: Chromatogram při jedné extrakci.

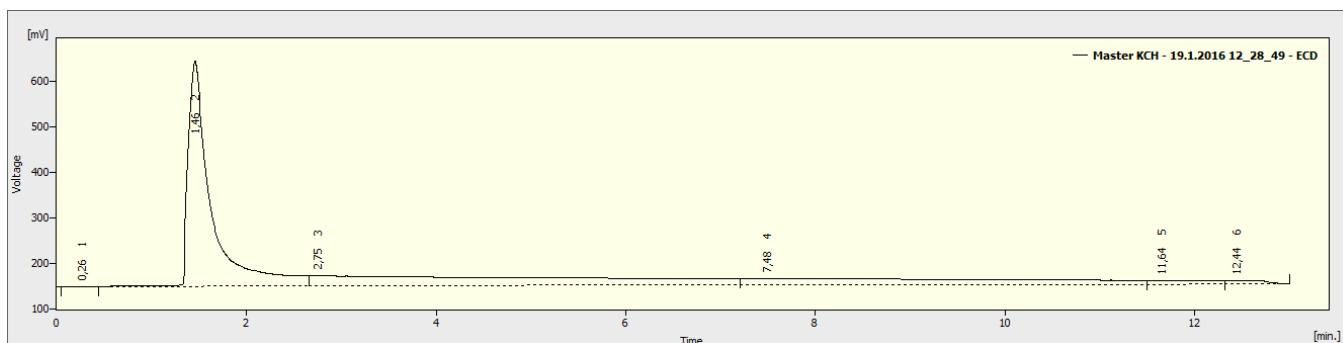


Obrázek č. 2: Chromatogram při dvou extrakcích.

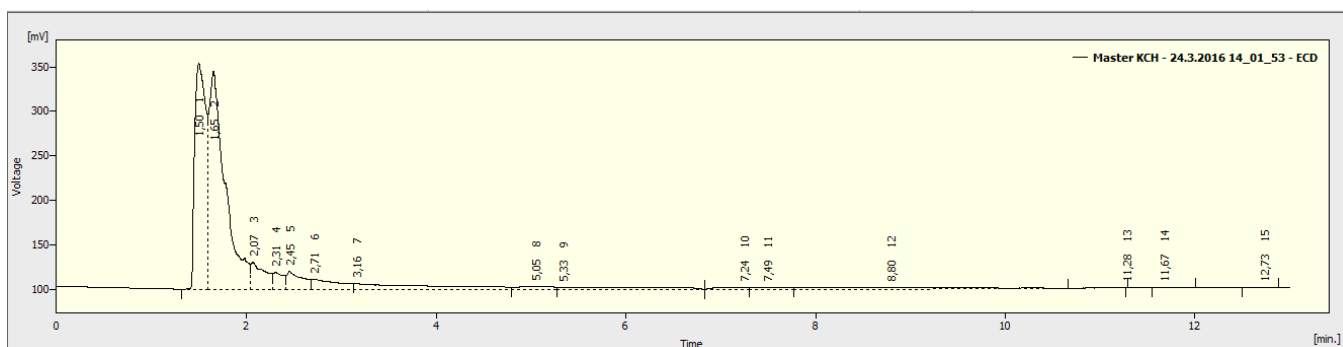


Obrázek č. 3: Chromatogram při třech extrakcích.

Příloha č. 3:



Obrázek č. 1: Původní ethyl acetát s číslem šarže 31018 1001.



Obrázek č. 2: Ethyl acetát z nově láhve s číslem šarže 17822812.

8. Použité chemikálie a chemické nádobí.

8.1. Chemikálie

- Diethylether p.a. Indexové číslo: 603-022-00-4
Číslo šarže: 1404020413
- Chloroform, čistý, stabilizovaný 1% etylalkoholu CAS: 67-66-3
Číslo šarže: 21507
- Benzen p.a. CAS: 71-43-2
Číslo šarže: 210906
- Toluén, čistý CAS:108-88-3
Číslo šarže: 1401060109
- Hexan, čistý Číslo šarže: 31361 1003
- Ethylester kyseliny octové (Ethyl acetát) p.a. Číslo šarže: 31018 1001
- Ethylester kyseliny octové Indexové číslo: 607-022-00-5
Číslo šarže: 1708220812
- Destilovaná voda
- Dusík ECD T50

8.2. Chemické nádobí

4x dělicí nálevka 100ml	5x zábrusový špunt
1x dělicí nálevka 200ml	5x železný kruh
1x pipeta 1 ml	1x stojan
5x pipeta 10 ml	1x stříčka
1x pipeta 5 ml	15x zkumavka
1x pipeta 10 ml dělená	10x odměrná baňka 50ml
5x kádinka 100 ml	1x odměrná baňka 250 ml
10x gumový špunt	2x odpadní láhev