

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE



ŠTÚDIUM STANOVENIA BTEX MIKROEXTRAKCIOU V SYSTÉME
LAB-IN-SYRINGE V SPOJENÍ S PLYNOVOU CHROMATOGRAFIOU

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce: M.Sc. Burkhard Horstkotte, Ph.D.

Konzultant diplomovej práce: PharmDr. Ivana Horstkotte Šrámková, Ph.D.

Hradec Králové 2023

Bc. Andrea Kohániová

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány.“

V Hradci Králové 15.05.2023

Andrea Kohániová

Pod'akovanie

Veľmi rada by som sa na tomto mieste chcela poďakovať vedúcemu diplomovej práce M.Sc. Burkhardovi Horstkotte, Ph.d. za jeho vedenie, podporu, pomoc počas vypracovanie práce a nadobudnuté nové vedomosti. Ďalej by som sa chcela poďakovať konzultantke PharmDr. Ivane Horstkotte Šrámkovej, Ph.D. za rady a pripomienky, ktoré mi poskytla pri spisovaní tejto práce. Veľká vďaka patrí aj mojej rodine a priateľom za ich podporu počas celej doby štúdia.

Abstrakt

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra analytické chemie

Kandidát: Bc. Andrea Kohániová

Školiteľ: M.Sc. Burkhard Horstkotte, Ph.D.

Konzultant: PharmDr. Ivana Horstkotte Šrámková, Ph.D.

Názov: Štúdium stanovenia BTEX mikroextrakciou v systéme
Lab-in-syringe v spojení s plynovou chromatografiou

Benzén, toluén, etylbenzén a izoméry xylénov sú jednými z hlavných kontaminantov detekovaných vo vzorkách vody zo životného prostredia. Svetová zdravotnícka organizácia považuje tieto látky za toxické pre ľudí, a preto ich monitorovanie je mimoriadne dôležité. Možnosť stanovenia BTEX mikroextrakciou do jednej kvapky rozpúšťadla bola skúmaná v systéme Lab-in-syringe v spojení s plynovou chromatografiou a plameňovo ionizačným detektorom. Boli hodnotené parametre ako objem kvapky, čas extrakcie, typ a použitie soľného roztoku a parametre separácie chromatografickej metódy. Záujmom tejto práce bolo automatizovanie celého procesu, a to prostredníctvom prvkov tlačených na 3D tlačiarňi.

Abstract

Charles university

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Analytical Chemistry

Candidate: Bc. Andrea Kohániová

Supervisor: M.Sc. Burkhard Horstkotte, Ph.D.

Co-supervisor: PharmDr. Ivana Horstkotte Šrámková, Ph.D.

Title: Study of BTEX determination by microextraction in the Lab-in-syringe system coupled with gas chromatography

Benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes are one of the major contaminants in the environmental water samples. Because these compounds are considered to be toxic to humans by World Health Organisation, their determination is critically important. The determination of BTEX using gas chromatography with flame ionisation detection combined with direct single drop microextraction using Lab-in-Syringe system was studied. The effective parameters such as microdroplet volume, extraction time, type and use of salt solution and chromatographic parameters were evaluated. The purpose of this work was automation of the entire process using 3D elements in the system.

Obsah

Zoznam skratiek.....	3
1 Úvod.....	5
2 Cieľ práce.....	7
3 Teoretická časť.....	8
3.1 Analyty.....	8
3.1.1 Benzén.....	8
3.1.2 Toluén.....	9
3.1.3 Etylbenzén.....	10
3.1.4 Xylény.....	11
3.1.5 Metódy stanovenia BTEX.....	13
3.2 Prietokové techniky.....	17
3.2.1 Staršie prietokové techniky.....	17
3.2.2 Novšie prietokové techniky.....	18
3.2.3 Lab-in-syringe.....	20
3.2.3.1 Extrakcia v systéme Lab-in-syringe.....	21
3.2.3.2 Extrakcia do jednej kvapky rozpúšťadla.....	21
3.3 Plynová chromatografia.....	23
3.3.1 Inštrumentácia.....	23
3.3.1.1 Injektor.....	23
3.3.1.2 Stacionárna fáza.....	24
3.3.1.3 Mobilná fáza.....	25
3.3.1.4 Detektor.....	25
3.3.2 Plynová chromatografia s plameňovo-ionizačným detektorom.....	25
4 Experimentálna časť.....	27
4.1 Použité chemikálie.....	27
4.2 Použité laboratórne pomôcky.....	27
4.3 Príprava roztokov.....	27
4.3.1 Príprava zásobných roztokov.....	27
4.3.2 Príprava pracovných roztokov.....	28

4.3.3	Príprava soľných roztokov.....	28
4.3.4	Príprava štandardov	29
4.4	Popis Lab-in-syringe systému	30
4.5	Spojenie LIS-GC a 3D tlačené prvky v systéme	31
4.6	Postup extrakcie v systéme LIS.....	33
4.7	Chromatografický systém.....	34
5	Výsledky	35
5.1	Optimalizácia plynovej chromatografie	35
5.1.1	Optimalizácia T0	36
5.1.2	Optimalizácia T1 a T2	38
5.1.3	Výsledný program	40
5.2	Optimalizácia extrakcie.....	42
5.2.1	Objem aspirovaného extrakčného rozpúšťadla a vody	42
5.2.2	Využitie soľného roztoku	42
5.3	Spojenie LIS a GC.....	44
5.3.1	Soľný roztok	44
5.3.2	Objem extrakčného rozpúšťadla	44
5.3.3	Čas extrakcie	44
6	Diskusia	47
7	Záver	50
8	Zdroje.....	52
	Zoznam obrázkov	60
	Zoznam tabuliek	61
	Zoznam grafov	62
	Príloha A	63

Zoznam skratiek

AA	vzduchom asistovaná (z angl. air assisted)
BID	detektor ionizácie dielektrickým bariérovým výbojom (z angl. barrier discharge ionization detector)
CSDF	kontinuálna prietoková mikroextrakcia (z angl. continous sample drop flow)
DI-SDME	priama mikroextrakcia do jednej kvapky rozpúšťadla (z angl. direct single-drop microextraction)
DLLME	disperzná mikroextrakcia kvapalina-kvapalina (z angl. dispersive liquid-liquid microextraction)
DTZ	ditizón
FIA	prietoková injekčná analýza (z angl. flow injection analysis)
FID	plameňovo-ionizačný detektor (z angl. flame ionization detector)
GC	plynová chromatografia (z angl. gas chromatography)
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (z angl. high performance liquid chromatography)
HS	z angl. headspace
IUPAC	Medzinárodná únia čistej a aplikovanej chémie (z angl. International union of pure and applied chemistry)
LIS	z angl. Lab-in-syringe
LLME	mikroextrakcia z kvapaliny do kvapaliny (z angl. liquid-liquid microextraction)
LPME	mikroextrakcia kvapalnou fázou (z angl. liquid phase microextraction)
ME	mikroextrakcia
MS	hmotnostná spektrometria (z angl. mass spectrometry)
MSPE	magnetická extrakcia na tuhú fázu (z angl. magnetic solid phase extraction)
PID	fotoionizačný detektor (z angl. photoionization detector)
SCOT	kapilárna kolóna so zmočeným nosičom (z angl. support coated open tubular)
SDME	mikroextrakcia do jednej kvapky rozpúšťadla (z angl. single-drop microextraction)

SIA	sekvenčný injekčná analýza (z angl. sequential injection analysis)
SPE	extrakcia na tuhú fázu (z angl. solid phase extraction)
SPME	mikroextrakcia na tuhú fázu (z angl. solid phase microextraction)
PID	fotoionizačný detektor (z angl. photoionization detector)
PLOT	kapilárna kolóna s poréznou vrstvou adsorbentu (z angl. porous layer open tubular)
UA	ultrazvukom asistovaná (z angl. ultrasound-assisted)
VA	vortexom asistovaná (z angl. vortex-assisted)
WCOT	kapilárna kolóna zmočená kvapalnou fázou (z angl. wall coated open tubular)

1 Úvod

BTEX ako skupina látok zahrňujúcich benzén, toluén, etylbenzén a izoméry xylénov, sa nachádzajú v ropných derivátoch, sú široko využívané v chemickom, kozmetickom, ale aj vo farmaceutickom priemysle. V dôsledku rozvoja priemyslu a nárastu ľudskej populácie dochádza vo väčšej miere k znečisťovaniu životného prostredia aj týmito látkami. Koncentrácia v prostredí súvisí s ľudskou činnosťou, a preto ich vo zvýšenej miere nachádzame práve v miestach spracovania ropy a v priemyselných oblastiach. Do pôdy, ovzdušia, povrchovej a podzemnej vody sa dostávajú v dôsledku priemyselnej výroby, ale aj ľudskou činnosťou nesúvisiacou s priemyslom, napr. z cigaretového dymu. Rizikovosť týchto látok pre prostredie ako aj jeho negatívny vplyv na ľudské zdravie nezostalo nepovšimnuté ani zo strany štátnych autorít. Limity expozície či už na pracovisku alebo v prostredí sa upravujú neustále spôsobom, aby reflektovali aktuálnu situáciu a vedecké poznatky v oblasti, tzn. potvrdenie karcinogénneho alebo iného účinku na ľudský organizmus pre niektorú z látok, ktoré doposiaľ neboli regulované a pod. Monitorovanie týchto monoaromatických uhl'ovodíkov, ale aj iných polutantov, z hľadiska analýzy je náročná pre často veľmi nízke detekčné limity, ktoré musí byť schopná analytická metóda dokázať stanoviť, aby bolo možná jej aplikácia v oblasti environmentálnych vzoriek. Tu je priestor pre zdokonaľovanie a vývoj nových metód, ktoré sú dostatočne citlivé a selektívne.

Obmedzené zdroje viedli ku vzniku konceptu udržateľného rozvoja, nevynímajúc ani odvetvie chémie. Veľké množstvo organických rozpúšťadiel je potrebné pri syntézach, purifikáciach, extrakciách a mnohých ďalších procesoch. Redukcia používania toxických rozpúšťadiel a ich náhrada za menej toxické vo výrobe a výskume sa stala jednou zo zásad zelenej chémie.

Vo väčšine prípadov analytických stanovení je nutná úprava vzorky, a to z rozličných dôvodov ku ktorým patrí zakoncentrovanie, odstránenie interferencií alebo prečistenie kvôli ochrane inštrumentácie. Pomerne často je tento krok nutne vykonávať manuálne čo predlžuje dobu analýzy. Vývoj nových prístupov a postupov pri predanalytickej úprave, ktorá je zdĺhavá, náročná a prináša so sebou riziko vzniku chýb, je práve aj z tohto dôvodu aktuálny. Rozvoj v prietokových technikách umožnil nielen procesy miniaturizovať, a tak výrazne znížiť, množstvo použitej vzorky, spotreby činidiel, ale aj automatizovať a online spojiť s chromatografickým systémom.

Automatizáciou procesov je možné zabezpečiť vyššiu priepustnosť vzoriek a vyhovieť tak požiadavkám na spracovanie čoraz väčšieho množstva vzoriek. Zároveň je aj prostredníctvom automatizovaného postupu minimalizovaný kontakt pracovníkov s potenciálne toxickými vzorkami životného prostredia. Automatizácia je výhodná z hľadiska reprodukovateľnosti výsledkov a efektívnosti.

2 Cieľ práce

Cieľom predloženej diplomovej práce bolo zistiť vhodnosť použitia automatizovaného systému Lab-in-syringe pre mikroextrakciu do jednej kvapky rozpúšťadla v spojení s plynovou chromatografiou za použitia dichlórmétanu ako extrakčného rozpúšťadla a prchavých organických látok – benzénu, toluénu, etylbenzénu a izomérov xylénu ako analytov. Práca má charakter štúdia uskutočniteľnosti, pričom v záujme bolo sledovať a optimalizovať jednotlivé podmienky extrakcie a plynovej chromatografie za použitia plameňovo-ionizačného detektora a automatizovanie tejto analýzy.

3 Teoretická časť

3.1 Analyty

Prchavé monoaromatické uhľovodíky benzén, toluén, etylbenzén a xylény, tiež známe pod skratkou BTEX, sú jednou skupinou z možných kontaminantov životného prostredia. Tieto uhľovodíky sú zložkou fosílnych palív, ropných produktov, často využívané ako rozpúšťadlá v chemickom priemysle. Rastúca populácia, rozvoj priemyslu aj ľudská aktivita prispieva k znečisteniu nielen vodných zdrojov v dôsledku rôznych nehôd v procese výroby, prepravy a nesprávnej likvidácie práve týmito látkami. Prítomnosť BTEX v životnom prostredí predstavuje značné zdravotné riziko [1]. Vplyvy na zdravie ľudskej populácie pri krátkodobej aj dlhodobej expozícii, využitie, ako aj samotné fyzikálno-chemické vlastnosti jednotlivých látok sú uvedené v nasledujúcich podkapitolách.

3.1.1 Benzén

Benzén je bezfarebná až svetložltá kvapalina so zápachom podobným benzínu. Niektoré zo základných fyzikálno-chemických vlastností sa nachádzajú v Tabuľke 1.

Tabuľka 1 Vybrané fyzikálno-chemické vlastnosti benzénu [2]

Benzén	
Molekulová hmotnosť	78,11 g/mol
Bod varu	80,00 °C
Rozpustnosť vo vode (pri 25 °C)	0,18 g/100 ml
Hustota (pri 20 °C)	0,8756 g/cm ³
Tlak par (pri 25 °C)	94,8 mmHg

Dnes sa používa najmä pri syntéze iných organických chemikálií. Pridáva sa do benzínu na zlepšenie oktánového čísla pričom v niektorých krajinách benzín obsahuje vysokú koncentráciu benzénu (až 30%). Európska únia v roku 2000 znížila maximálny povolený obsah benzénu v benzíne z 5% na 1%. Jeho chemický vzorec je uvedený na Obrázku 1.



Obrázok 1 Vzorec benzénu [2]

Bežná populácia môže byť vystavená benzénu vdychovaním okolitého vzduchu, dermálnym kontaktom, prípadne požitím kontaminovaného jedla a pitnej vody. Pri vdychovaní vyšších hladín sú častými príznakmi ospalosť, závraty, rýchly a nepravidelný tep srdca. Požitie benzénu vyvoláva zvracanie, kŕče, negatívne vplyva na frekvenciu tepu srdca, výnimočne spôsobí až smrť. Expozícia trvajúca viac ako rok poškodzuje kostnú dreň, čo vedie ku zvýšenej krvácavosti, anémií i ovplyvneniu funkcie imunitného systému. U žien môže vyvolávať nepravidelnosť menštruačného cyklu a zmenšenie vaječníkov. Benzén je potvrdený karcinogén, spôsobuje leukémiu, ktorá je vo väčšine prípadov akútneho typu. U exponovaných pracovníkov bola hlásená zvýšená frekvencia zlomov chromatíd a izochromatíd v kultivovaných lymfocytoch a významný nárast chromozomálnych aberácií lymfocytov v periférnej krvi [2].

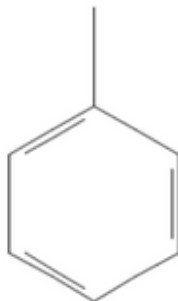
3.1.2 Toluén

Toluén je číra, bezfarebná kvapalina s výrazným charakteristickým nasladlým zápachom. Vybrané fyzikálno-chemické vlastnosti sú uvedené v Tabuľke 2.

Tabuľka 2 Vybrané fyzikálno-chemické vlastnosti toluénu [3]

Toluén	
Molekulová hmotnosť	92,14 g/mol
Bod varu	110,6 °C
Rozpustnosť vo vode	0,18 g/100 ml
Hustota (pri 20 °C)	0,8623 g/cm ³
Tlak pary (pri 25 °C)	28,4 mmHg

Pridáva sa do benzínu pre zlepšenie oktánového čísla, pri výrobe farieb, riedidiel, lakov, náterov, lepidiel a je dobrým rozpúšťadlom. Použitie má aj pri syntéze organických látok ako benzoylchloridu a ďalších [3]. Vzorec toluénu je znázornený na Obrázku 2.



Obrázok 2 Vzorec toluénu [3]

Toluén sa vyskytuje vo vzduchu, v pôde a vo vode v miestach výroby alebo jeho používania. Z povrchových vôd sa ľahko odparí do ovzdušia alebo ho rozložia mikroorganizmy. V prípade krátkodobého kontaktu s toluénom jeho vdýchnutím alebo dermálnym kontaktom či už priamo s toluénom alebo prípravkami obsahujúcimi toluén dochádza k podráždeniu respiračného systému, pokožky a očí. Pri dlhodobej expozícii môže mať nepriaznivý vplyv na centrálny nervový systém, najmä ak sa jedná o vysoké koncentrácie a môže viesť k trvalej strate vlasov, zraku a ku kognitívnym poruchám. Značne rizikový je pre tehotné ženy, resp. pre vývoj plodu. Ďalšie účinky zahŕňajú problémy s obličkami, pečeňou a nepriaznivý efekt na imunitu [4].

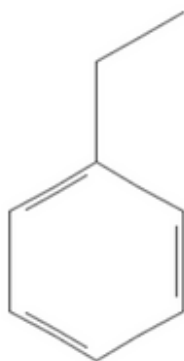
3.1.3 Etylbenzén

Etylbenzén je bezfarebná, horľavá kvapalina so zápachom podobným benzínu. Základné fyzikálno-chemické parametre sú uvedené v Tabuľke 3.

Tabuľka 3 Vybrané fyzikálno-chemické vlastnosti etylbenzénu [5]

Etylbenzén	
Molekulová hmotnosť	106,16 g/mol
Bod varu	136 °C
Rozpustnosť vo vode (pri 25 °C)	169 mg/l
Hustota (pri 20 °C)	0,8756 g/cm ³
Tlak pary (pri 25 °C)	94,8 mmHg

Vďaka jeho antidetonačným vlastnostiam je zložkou motorových a leteckých palív. Obsah etylbenzénu v benzíne sa pohybuje v rozmedzí asi od 1 – 2,7%. Je tiež prítomný v komerčne miešaných xylénoch (do 25%), používa sa ako rozpúšťadlo vo farbách, lakoch, lepidlách na koberce, ale je možné ho nájsť aj v tabakových výrobkoch a insekticídoch. Používa sa pri výrobe styrénu, syntetických polymérov, acetónfenónu a ďalších chemikálií. Chemický vzorec etylbenzénu je uvedený na Obrázku 3.



Obrázok 3 Vzorec etylbenzénu [5]

Vystavenie etylbenzénom v bežnej populácii je možné prostredníctvom kontaktu s benzínom a ďalšími vyššie uvedenými produktmi. Najčastejšie dochádza k vdýchnutiu etylbenzénu, ale môže dôjsť aj ku kontaktu s kontaminovanou vodou alebo pôdou. Pri krátkodobej expozícii dochádza k podráždeniu očí, nosu a hrdla, vo vyšších koncentráciách spôsobuje závraty. Dlhodobá expozícia môže spôsobovať pľuzgiere. Nie je považovaný za ľudský karcinogén [5].

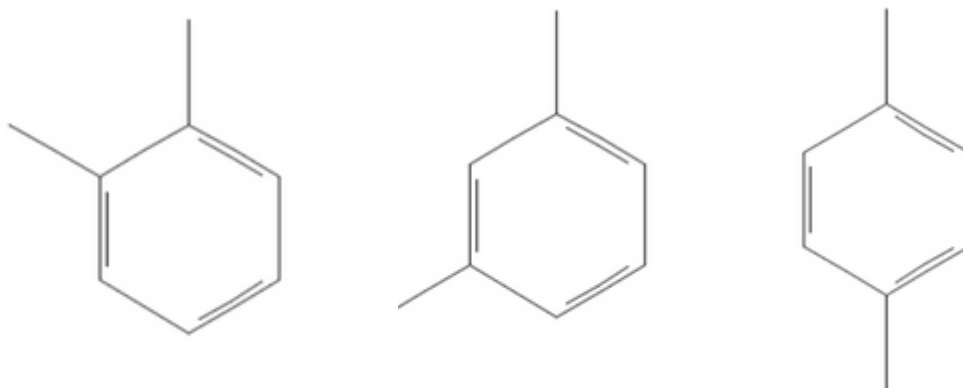
3.1.4 Xylény

Xylény sú prítomné v životnom prostredí ako zmes orto-, meta- a para-izomérov. Prirodzene sa vyskytujú v ropnom a uhoľnom dechte. Xylény sú bezfarebné kvapaliny s charakteristickým sladkým zápachom. Niektoré z fyzikálno-chemických charakteristík sú uvedené v Tabuľke 4.

Tabuľka 4 Vybrané fyzikálno-chemické vlastnosti xylénov [7-9]

	o-xylén	m-xylén	p-xylén
Molekulová hmotnosť	106,16 g/mol	106,16 g/mol	106,16 g/mol
Bod varu	144 °C	139 °C	138 °C
Rozpustnosť vo vode (pri 25 °C)	180 mg/l	160 mg/l	165 mg/l
Hustota (pri 20 °C)	0,8801 g/cm ³	0,8698 g/cm ³	0,86104 g/cm ³
Tlak pary (pri 25 °C)	6,65 mmHg	8,29 mmHg	8,84 mmHg

Zmes xylénov sa využíva pri syntéze etylbenzénu, v priemyselnej výrobe farieb a náterov ako rozpúšťadlo a primiešavajú sa do benzínu [6]. Chemické vzorce izomérov xylénu je možné vidieť na Obrázku 4.



Obrázok 4 Vzorce izomérov xylénu (zľava o-xylén, m-xylén, p-xylén)
upravené a prevzaté z [7-9]

V prípade, že sa xylény dostanú do pôdy alebo povrchovej vody, predpokladá sa ich vyparenie a rozpad v atmosfére za okolností, že polčas rozpadu je v rozmedzí 8 až 14 hodín. V podzemnej vode dochádza k biodegradácii značne pomalšie, a to až do 287 dní v závislosti od podmienok. Pri akútnych otravách sú popísané dráždivé účinky na oči, pokožku, sliznice, zhoršené dýchanie, bolesti hlavy a závrate [10]. Chronická expozícia xylénmi je sprevádzaná symptómami ako bolesti hlavy, únava, nekoordinovanosť, boli hlásené aj nežiadúce účinky na obličky, kardiovaskulárny a respiračný systém [6].

3.1.5 Metódy stanovenia BTEX

Možnosti monitorovania BTEX v environmentálnych vzorkách vôd, ktoré sú validované a schválené viacerými federálnymi agentúrami a organizáciami, uvádzajú ako najviac využívanú metódu plynovú chromatografiu (GC). Metóda GC v spojení s plameňovo-ionizačným detektorom (FID) a fotoionizačným detektorom (PID) poskytuje detekčné limity v rozsahu nízkych ppb, v prípade využitia hmotnostného spektrometra (MS) v rozsahu až ppt. Okrem toho pre benzén je možné aj stanovenie vysokoúčinnou kvapalinovou chromatografiou (HPLC) v spojení s UV detektorom a spektrofotometrické stanovenie. Pre toluén a etylbenzén je možná detekcia aj pomocou fluorescenčnej spektroskopie. Xylény je možné stanoviť, okrem GC v spojení s FID, PID a MS, aj v spojení s detektorom elektrónového záchytu. Úprava vzorky purge and trap je najčastejšou úpravou vzorky, v prípade xylénov je uvádzaná extrakcia do organických rozpúšťadiel a extrakcia na tuhú fázu [11-14].

Moderné trendy v analytickej chémii však upriamujú svoju pozornosť na zjednodušenie a miniaturizáciu prípravy vzoriek. Klasické extrakčné postupy z kvapaliny do kvapaliny sú náročné časovo a využívajú organické rozpúšťadla vo veľkom množstve. Je snaha tieto ekonomicky nákladné, ekologicky a časovo náročné postupy smerovať k miniaturizovaným verziám – mikroextrakcia v kvapalnej fáze (LPME) a mikroextrakcia na pevnej fáze (SPME) [15].

Prehľad pokroku v možnostiach stanovenia BTEX v environmentálnych vzorkách vôd je uvedený v Tabuľke 5. Na vypracovanie časti tabuľky boli využívané databázy PubMed a ScienceDirect v režime pokročilého vyhľadávania, tak aby sa články venovali stanoveniu vo vzorkách vody, bol analyzovaný benzén, toluén, etylbenzén a aspoň jeden zo xylénov. Zároveň články boli limitované časovým obdobím kedy boli publikované, tzn. v posledných 10 rokoch (od roku 2013). Hodnoty LOD boli premenené na rovnaké jednotky pre lepšie porovnanie. Matrica uvedená v tabuľke sa vzťahuje na zrealizovanie validovanej metódy na reálne vzorky, pričom hodnoty LOD sú uvedené na základe validácie. Všetky články využívali ako separačnú techniku plynovú chromatografiu, preto je v tabuľke uvedený len typ detekčnej techniky.

Tabuľka 5 Metódy stanovenia BTEX vo vzorkách vody

Matrica	Úprava vzorky	Detekcia	LOD [µg/l]	Zdroj
voda z vodovodu	AA-DLLME	FID	6,0–9,0	[16]
	UA-DLLME		20,0–30,0	
	VA-DLLME		2,0–5,6	
voda z vodovodu, voda z rieky	Lab-in-syringe DLLME	FID	1,7–2,4	[17]
	Narrow-bore tube DLLME		1,5–2,2	
voda z rieky	CSDf-ME	FID	1,4–2,4	[15]
voda z rieky/jazera, sneh	LIS-HS	FID	1,1–2,6	[18]
studňová/odpadová voda, voda z vodovodu	SPE-DLLME	FID	0,5–1,1	[19]
pitná/dažďová/studňová/ poľnohospodárska voda	M-SPE	FID	0,15–0,60	[20]
studňová voda	SPME	FID	0,15–0,42	[21]
čistá/morská voda, voda z vodovodu,	HS	FID	0,15–2,00	[22]
voda z rieky	SPME	FID	0,03–0,1	[23]
odpadová voda	HS-SPME	FID	0,12–0,41	[24]
studňová/odpadová/pitná voda, voda z rieky	SPME	FID	0,0001–0,5	[25]
voda z vodovodu, voda z rieky, odpadová voda	HS-LPME	FID	0,06–0,25	[26]
studňová/povrchová voda	HS-SDME	FID	0,05–0,90	[27]
studňová voda, vody z rieky, voda z vodovodu	LPME	FID	0,04–0,09	[28]
odpadová voda	HS	PID	0,13–0,48	[29]
pitná voda kontaminovaná benzínom a naftou	HS	BID	0,159–1,845	[30]

voda z rieky	HS	PID-FID	0,11–0,51	[31]
voda z rieky, studňová voda	HS-SPME	FID	0,01–0,06	[32]
pitná voda, odpadová voda z priemyselnej oblasti, voda z rieky	MSPE	MS	0,3–3	[33]
voda z rieky	SPE	MS	0,010–0,036	[34]
voda z rieky, voda z jazera	HS-SPME	MS	0,0001–0,0013	[35]

Vysvetlivky skratiek použitých v tabuľke: AA (vzduchom asistovaná), BID (detektor ionizácie dielektrickým bariérovým výbojom), CSDF (kontinuálna prietoková mikroextrakcia), DLLME (disperzná mikroextrakcia kvapalina-kvapalina), FID (fotoionizačný detektor), GC (plynová chromatografia), HS (headspace), LIS (Lab-in-syringe), LPME (mikroextrakcia kvapalina-kvapalina), ME (mikroextrakcia) PID (fotoionizačný detektor), SDME (extrakcia do jednej kvapky rozpúšťadla), SPE (extrakcia na tuhú fázu), MS (hmotnostná spektrometria), MSPE (magnetická extrakcia na tuhú fázu), UA (ultrazvukom asistovaná), VA (vortex-assisted)

Na základe tabuľky môžeme povedať, že v posledných desiatich rokoch je analýza zameraná na plynovú chromatografiu prevažne s FID detektorom. Autori článkov sa sústreďujú na úpravu vzorky, využívajú extrakcie na tuhú fázu aj extrakčné postupy z kvapaliny do kvapaliny. Ako už bolo uvedené, klasické extrakčné postupy sú v posledných rokoch nahrádzane tými, ktoré sú šetrnejšie z hľadiska spotreby organických rozpúšťadiel a tvorby odpadu, a teda k životnému prostrediu a ochrane zdravia ľudí. Takisto sú menej náročné na proces. Dôvodom prečo je venovaná pozornosť analýze polutantov vo vode je, že sa v dôsledku činnosti človeka stalo sledovanie vodných zdrojov globálnou výzvou. Jedným z dôvodov je aj obava z poklesu zdrojov pitnej vody. Efektívna a citlivá detekcia je mimoriadne dôležitým faktorom ako zabezpečiť monitorovanie týchto zdrojov.

Extrakcia na tuhú fázu je široko používanou technikou, pretože okrem izolácie analytu zabezpečí aj zakoncentrovanie a prečistenie vzorky, a tak sme schopní zachytiť stopové množstvá často toxických látok v zložitejších matriciach [33]. SPME vyžaduje malý objem adsorbentu a práve ten je objektom záujmu z hľadiska vývoja nových a účinnejších materiálov s vysokou plochou povrchu. V súčasnosti sú okrem klasických sorbentov sú dostupné porézne materiály, uhlíkové materiály, polyméry s molekulárnou potlačou, ďalej aj biosorbenty a nanomateriály [33, 35].

Pre LPME boli vyvinuté rôzne prístupy, vrátane DLLME a SDME. Hlavná nevýhoda, resp. najviac problematická pri SDME je nestabilita kvapky, ďalej relatívne časová náročnosť a obmedzené možnosti miešania. DLLME na druhej strane využíva ako disperzné rozpúšťadlo prevažne toxické organické rozpúšťadlá, ktoré by sa mali používať v čo najmenšej miere [16]. Výhody LPME by sa dali zovšeobecniť na malú expozíciu organickými rozpúšťadlami oproti klasickej extrakcii z kvapaliny do kvapaliny. Vďaka vysokému pomeru objemu vzorky k extrakčnej fáze je tiež možné získať vysoký faktor obohatenia [17].

3.2 Prietokové techniky

Prietokové techniky sú nástrojom pre automatizáciu laboratórnych úkonov za účelom zvýšenia priepustnosti vzoriek, opakovateľnosti postupu, spoľahlivosti pre kinetické reakcie, miniaturizácie systému a s miniaturizáciou spojené zníženie spotreby činidiel. Spoločným princípom je prenášanie a spracovanie vzorky v toku prúdiacej kvapaliny za použitia čerpadiel, ventilov a ďalších prvkov v uzavretom systéme. Je možná rôzna klasifikácia prietokových techník v dôsledku ich vývoja v priebehu času. Jednou z možností je rozdelenie do 4 kategórií, podľa IUPAC, ktorá rozdeľuje prietokové techniky na kontinuálnu prietokovú analýzu, segmentovanú prietokovú analýzu, prietokovú injekčnú analýzu (FIA) a sekvenčnú injekčnú analýzu (SIA) [36].

3.2.1 Staršie prietokové techniky

Koncept laboratórnych meraní v prietoku bol prelomovým momentom. V systéme kontinuálnej prietokovej analýzy sa nosný prúd, privádzaný zväčša peristaltickým čerpadlom, pohybuje konštantnou prietokovou rýchlosťou v smere dopredu. Definovaný objem vzorky sa spojí s prúdom činidla smerujúcim do reakčnej cievky, pričom počas tohto pohybu prebiehajú chemické reakcie. Po ukončení reakcie vzorka prichádza do detektora. Vytvorenie tohto typu analýzy umožnilo prvú unikátnu mechanizáciu jednotlivých operácií potrebných na výkon celého postupu ako je dvojfázová separácia a kombinovanie prúdu vzorky s činidlami [37-39]. Kontinuálna prietoková analýza našla uplatnenie v klinickej a environmentálnej analýze najmä pri turbidimetrických a spektrofotometrických stanoveniach, a to práve pre jednoduchosť konštrukcie, nenáročnosť na prevádzku a vysokú vzorkovaciu frekvenciu. Nevýhodou kontinuálnej prietokovej analýzy je vytvorenie veľkého množstva odpadu, pretože pri nej dochádza k vysokej spotrebe činidiel vzhľadom na to, že čerpanie prebieha v rýchlosti niekoľkých mililitrov za minútu [37].

V snahe minimalizovať disperziu vzorky a zlepšiť podmienky miešania sa zaviedlo segmentovanie prúdu vzduchovými bublinami a dalo za vznik segmentovanej prietokovej analýzy. Na rozdiel od kontinuálnej prietokovej analýzy bolo vytvorené turbulentné prúdenie, ktoré zabezpečilo homogénne premiešanie a zároveň potlačenie disperzie vzorky [40].

Obmedzené možnosti prvých konceptov prietokových techník rozšírili J. Ružička a E.H. Hansen, ktorí začali ďalšiu éru analytických meraní, nazývaných prietoková

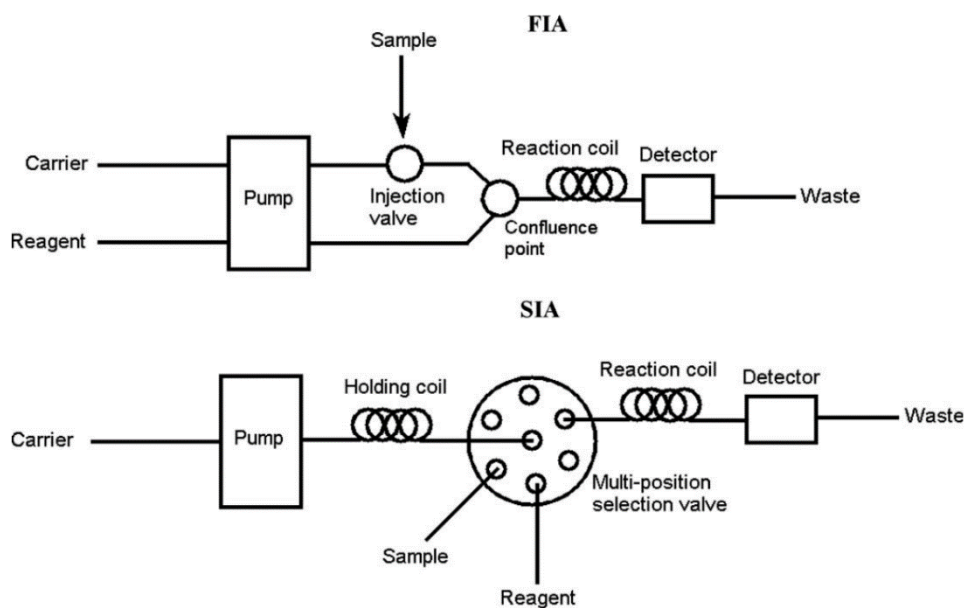
injekčná analýza [41]. V prietokovej injekčnej analýze sa presný objem vzorky nadávkuje do konštantne sa pohybujúceho prúdu nosného činidla za pomoci peristaltickej pumpy. Činidlá môžu byť pridané v rôznych bodoch sútoku. Vďaka procesu disperzie sa v reakčnej zóne postupne vzorka s činidlom rozptýli do nosiča a vytvorí sa detekovateľný produkt. Produkt je následne nesený do priestoru detektora za podmienok laminárneho prúdenia. Celý proces je možné vykonať rýchlo v sekundách až v desiatkach sekúnd s vysokým stupňom presnosti [42, 43].

Hlavným rozdielom medzi segmentovanou injekčnou analýzou a prietokovou injekčnou analýzou je eliminácia segmentácie nosného prúdu pomocou vzduchovej bubliny, transport do detektora a regulovaný objem vstrekovania vzorky. Súčasne dochádza k zaznamenaniu ostro zakončených píkovo namiesto rovnovážneho signálu s hodnotou plató [39]. Vývoj FIA rozšíril možnosti použitia, a to najmä vďaka reprodukovateľnému miešaniu a časovaniu, ktoré zabezpečilo procesy v nerovnovážnych podmienkach, vrátane extrakcií [40]. Je možná odlišná konštrukcia FIA a koncepcia zahŕňa odlišné moduly spracovania vzoriek, integráciu meracích systémov a počítačového zariadenia na prevádzkovanie systému [39].

3.2.2 Novšie prietokové techniky

Ďalší pokrok vo vývoji prietokových techník bolo zavedenie modelu sekvenčnej injekčnej analýzy (SIA) J. Růžičkom a G.D.Marshallom [44]. Základom sekvenčnej injekčnej analýzy je vstrekovanie vzorky s činidlom do počítačom riadeného obojsmerného diskontinuálneho toku nosnej kvapaliny. Je umožnené vykonať sekvenčné vstrekovanie a určité operácie s oneskorením. Dávkovanie je postupné pomocou viacpolohového ventilu do nosného prúdu, ktorý je poháňaný injekčným čerpadlom umiestneným pred ventilom. SIA je výsledkom dvoch procesov, fyzikálneho charakteru – disperzia zón vzorky a činidla, a chemického – tvorba chemických látok vo fázovom rozhraní zón. Aby odozva systému bola adekvátna musí byť maximalizovaná radiálna disperzia a optimalizovaná axiálna disperzia, ktorá je určujúca práve pre prienik vzorky reagenčnými zónami a maximalizovanú rýchlosť chemických reakcií. Optimalizácia procesu zahŕňa síce správne zvolenie postupnosti vzoriek a reagencií, ich objemy, prietoky, geometriu dráh toku na základe reakčných sekvencií a kompatibility, ale vďaka presnému a flexibilnému ovládaniu je možné zabezpečiť reprodukovateľnú tvorbu koncentračných gradientov a prispôbenie objemu vzorky a disperzie [39, 45]. Vytvorenie koncentračného gradientu a prekrytie zóny vzorky a činidla vytvára produkt.

Za pomoci softvéru je možné jednoducho upraviť konfiguráciu tak, aby spĺňala požiadavky rôznych detekčných chemií. Porovnanie inštrumentácie je znázornené na Obrázku 5.



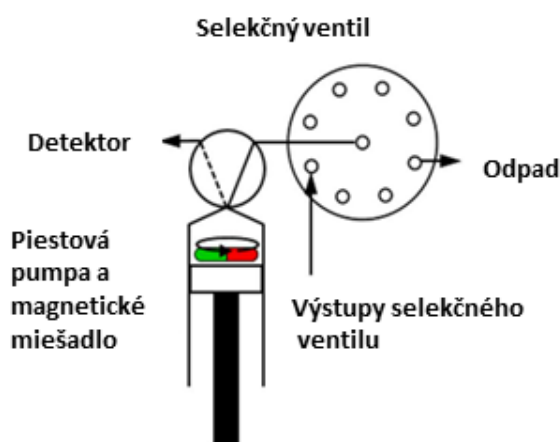
Obrázok 5 Zjednodušená schéma prietokovej a sekvenčnej injekčnej analýzy [41]
carrier (nosič), confluence point (zmiešavaci bod), detector (detektor), holding coil (miešacia cievka), injection valve (injekčný ventil), multi-position selection valve (viaccestný selekčný ventil), pump (pumpa), reaction coil (reakčná cievka), reagent (reagencia), sample (vzorka), waste (odpad)

Nevýhodou je nespojitosť a následkom obrátenia toku je menšia priepustnosť vzoriek v porovnaní s kontinuálnym prietokom vo FIA systéme [43]. Viackrokové reakcie a homogénne miešanie v prípadoch, kedy sa mení viskozita alebo je nutné použitie veľmi rozličných objemov roztokov, je realizovateľné v menšej miere [46].

Výhody oproti FIA však prevyšujú nevýhody. SIA pracuje s presnejšími injekčnými čerpadlami, nie sú potrebné pre každé činidlo ďalšie prietokové kanály, spotreby vzorky a činidiel sú oveľa nižšie. Ekonomické hospodárenie s reagentami a zníženie tvorby odpadu tak zvýhodňuje SIA aj z ekologického hľadiska [41]. Ďalšou prednosťou je umožnenie jej spojenia so separačnými technikami. Rozširovanie v ďalších oblastiach a zdokonaľovanie extrakčných postupov viedlo k novým prístupom, kde sa základom stala práve SIA. Zmena konceptu selekčného ventilu položilo základy pre Lab-on-valve, zmena injekčnej striekačky zase Lab-in-syringe [36].

3.2.3 Lab-in-syringe

Lab-in-syringe technika odvodená zo sekvenčnej injekčnej analýzy využíva striekačku ako veľkostne prispôsobiteľnú reakčnú nádobu s možnosťou prenášať aj obsahovať kvapaliny, plyny aj suspenzie sorbentov. Striekačka je využívaná ako zmiešavacia, reakčná a extrakčná komora v systéme SIA. Výhodou je reprodukovateľné spracovanie vzoriek s objemom niekoľkých mililitrov. Vytvára sa kompaktný systém v ktorom je umožnené pridávanie ďalších činidiel, homogénne miešanie, separácia plynu a kvapaliny, prispôsobenie tlaku a čistenie systému. Na rozdiel od klasickej SIA, kde je homogénne miešanie zabezpečené disperziou vzorky, miešanie vo vnútri striekačky je možné za pomoci magnetického miešadla. Zároveň je tým umožnené v akejkol'vek fáze postupu zaradiť krok miešania a efektívnejším sa tak stáva aj čistenie medzi jednotlivými analýzami. Pre LIS systém nie je problematické používanie roztokov v odlišných objemoch roztokov ani zmena viskozity [46]. Obrázok 6 je zjednodušeným náčrtom ukazujúcim jednoduché zostavenie LIS systému s piestovou pumpou, magnetickým miešadlom vo vnútri, selekčným ventilom a pozíciami pre vzorku, vzduch, ďalšie reagenty a detektorom.

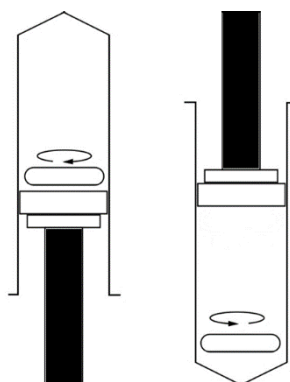


Obrázok 6 Schéma Lab-in-syringe
prevzaté a upravené z [46]

LIS systém je možné využiť pri zakoncentrovaní, čistení a eliminácii interferencií a extrakčných postupov nielen samostatne, ale aj v spojení s chromatografickými technikami poskytujúc tak výhodu stanovenia analytov pri nízkych koncentráciách. Predovšetkým je výhodná pri predanalytickej úprave založených na mikroextrakcii v kvapalnej fáze [47]. Nevýhodou je veľký mŕtvy objem striekačky, a nie tak účinné chladenie a zahrievanie roztoku ako pri prevedení v hadičkách. Niektoré klasické typy

extrakcie nie je možné v tomto systéme uskutočniť, ako aj integrovanie ďalších prvkov (napr. elektród), nie je vždy realizovateľné [46].

V systéme LIS je možné homogenizáciu vzorky uskutočniť pomocou magnetického miešadla vo vnútri striekačky. Vďaka tomu sa predchádza nežiaducim efektom súvisiacim s viskozitou vzorky a množstvom plynu. Boli vyvinuté aj metódy, kedy bola striekačka v tzv. „upside-down“ pozícií. Oproti klasickému usporiadaniu je prívod kvapalín do striekačky v prípade „upside-down“ orientácií umiestnený v spodnej časti ako je uvedené graficky na Obrázku 7. V tejto pozícií je vzduch nad kvapalinou a je umožnené úplne vyprázdnenie [46].



Obrázok 7 Orientácia upright (vľavo) a upside-down (vpravo)
prevzaté a upravené z [46]

3.2.3.1 Extrakcia v systéme Lab-in-syringe

Lab-in-syringe je vhodná pre automatizáciu extrakčných postupov. Boli popísané extrakcie na tuhú fázu aj extrakcie z kvapaliny do kvapaliny s využitím striekačky. Častejšie využívaným typom extrakcie v systéme LIS je však extrakcia z kvapaliny do kvapaliny, resp. jej mikroextrakčné varianty. Mikroextrakcia z kvapaliny do kvapaliny je založená na prechode medzi nemiešateľnými kvapalinami a extrakčným činidlom [47, 48]. Používané sú najmä nasledovné metódy, konkrétne disperzná mikroextrakcia z kvapaliny do kvapaliny, extrakcia s využitím teploty zákalu micelárnych roztokov a extrakcia do jednej kvapky rozpúšťadla [46].

3.2.3.2 Extrakcia do jednej kvapky rozpúšťadla

V princípe je SDME založená na vystavení mikrokvapky nemiešateľného extrakčného rozpúšťadla vodnému roztoku vzorky. Pre stanovenia analytov sa používajú dva prístupy, a to priama (DI-SDME) a headspace mikroextrakcia do jednej kvapky rozpúšťadla (HS-SDME) [49]. Pri prístupe DI-SDME je kvapka extraktantu zavádzaná priamo do roztoku vodnej vzorky. Kvapka extrakčného rozpúšťadla v mikrolitrových

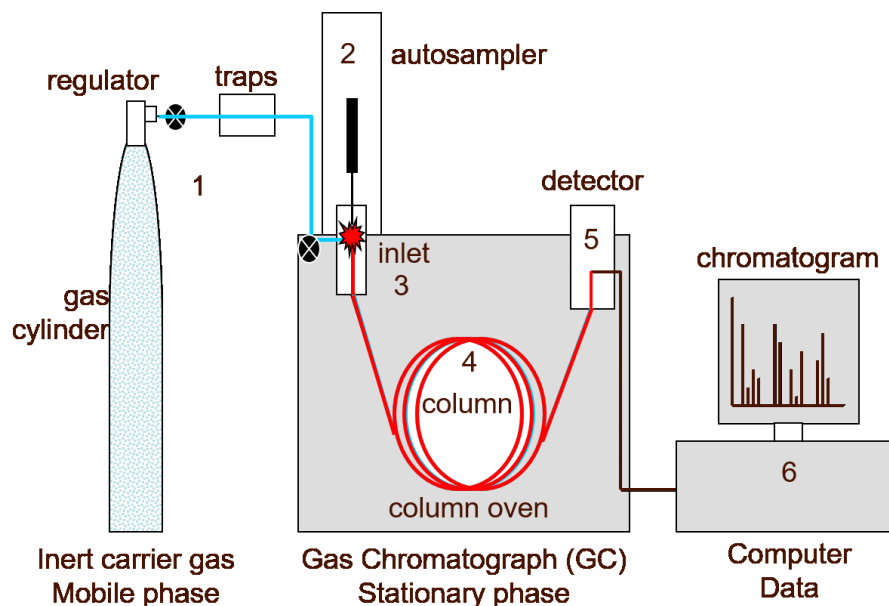
objemoch sa vytvorí na špičke ihly mikrostriekačky vo vzorke. Po extrakcii sa stiahne do ihly mikrostriekačky a prenesie k ďalšej analýze. Výhodou je minimalizácia extrakčného činidla, vysoké obohacovacie faktory a možnosť spojenia s vysokoúčinnou kvapalinovou a plynovou chromatografiou. V porovnaní s ostatnými technikami existuje niekoľko nevýhod. Tými sú najmä problémy so stabilitou kvapky a časovo náročnejšia extrakcia, ktorá sa dá však pomerne jednoducho vyriešiť miešaním vzorky. S tým je spojené, ale riziko, že dôjde k odtrhnutiu kvapky [50-52]. Pri použití HS-SDME je kvapka organického rozpúšťadla alebo vodného roztoku umiestnená na špičke ihly mikrostriekačky, ktorá je umiestnená nad vzorkou tak, aby sa extrahovali a prekoncentrovali prchavé analyty [53].

3.3 Plynová chromatografia

Plynová chromatografia je jednou z najbežnejšie používaných separačných techník založených na rozdielnej distribúcií látok medzi mobilnou a stacionárnou fázou, pričom tieto dve fázy sú vzájomne nemiešateľné. Mobilnou fázou je v prípade plynovej chromatografie plyn, ktorý unáša analyt na pevne upevnenú stacionárnu fázou [54]. Jednotlivé zlúčeniny sú separované na základe rozdielov v ich štruktúre a prchavosti z čoho vyplývajú aj požiadavky, resp. vlastnosti analytov vhodných pre analýzu pomocou GC. Základnou podmienkou je, aby molekuly boli v plynnom stave do teploty 400 °C, neboli reaktívne a zároveň pri týchto teplotách nepodliehali degradácií. Látky neprchavé je možné analyzovať po ich predchádzajúcej derivatizácii [55].

3.3.1 Inštrumentácia

Chromatografický systém znázornený aj na Obrázku 8, pozostáva z týchto základných častí: regulátora prívodu plynu a prietoku (1), autosamplera (2) inletu (3) slúžiaceho k dávkovaniu a splynieniu kvapalných vzoriek, kolóny (4), detektora (5), záznamového zariadenia (6).



Obrázok 8 Schéma plynového chromatografu [56]

3.3.1.1 Injektor

Nástrek vzorky je kritickým bodom pre dosiahnutie výsledku v podobe vysokých a úzkych pík v chromatograme na konci analýzy. Univerzálny injektor alebo prístup pre zavedenie vzorky do kolóny, ktorý by bol vyhovujúci pre rôzne kolóny, vzorky a požiadavky na automatizáciu nebol vyvinutý. Kapilárne kolóny využívajú injektory,

ktoré zabraňujú preťaženiu kolóny [56]. Existuje niekoľko typov možnosti nástreku vzorky na kolónu, najbežnejším je však split/splitless. Pri použití režimu split teda za použitia deliča vzorky, do kapilárnej kolóny vstupuje len časť vzorky. V splitless režime, tzn. v režime dávkovania bez delenia vzorky do kolóny vstupuje vzorka tak, že sa rozpúšťadlo kondenzuje, vytvára bariéru a tá zachytáva skoncentrované analyzované látky. Po uplynutí času pre zakoncentrovanie látok sa teplota, ktorá bola do tohto momentu udržiavaná asi 20-25 °C pod bodom varu rozpúšťadla zvýši a začne sa separácia. V prípade ľahko prechavých látok je možný nástrek na kolónu bez ich predošlého zahrievania [54].

3.3.1.2 Stacionárna fáza

V kolóne, kde je umiestnená stacionárna fáza prebieha separácia zložiek. Výber kolóny, resp. stacionárnej fázy ovplyvňuje separáciu v zmysle množstva vzorky s ktorou je možné pracovať, počtu analytov, účinnosti separácie, dĺžky separácie a určuje selektivitu. Používané kolóny v GC rozlišujeme na náplňové a kapilárne.

Náplňové kolóny sú obvykle v dĺžke 2-6 m s vnútorným priemerom 2-4 mm. Vyrobené sú zo skla, nehrdzavejúcej ocele, medi alebo hliníka. Priemer častíc v pevnom nosiči vo vnútri je v rozsahu od 37-44 μm do 250-354 μm . Delenie zložiek môže prebiehať na vrstve kvapalnej stacionárnej fázy alebo na tuhej stacionárnej fáze [54].

Kapilárne kolóny využívajú ako nosiče stacionárnej fázy svoje vnútorné steny, ktorých vnútorný priemer sa nachádza v rozmedzí 1-0,6 mm s hrúbkou od 0,25 do 5 μm a v dĺžke 16 až 60 m. Použitie menších priemerov kolón vedie k vyššej účinnosti separácie, ale nižšej kapacite, pričom užšie kolóny nemôžu byť dlhé pretože výsledkom by bol predĺžený čas separácie. Môžeme povedať, že ak rastie vnútorný priemer a hrúbka stacionárnej fázy, tak účinnosť separácie sa znižuje. Pružnosť a ochranu pred poškodením krehkého materiálu zabezpečuje polyimidová vrstva. Rozlišujeme tri typy kapilárnych kolón:

- WCOT (Wall coated open tubular) – vnútorná stena kapiláry je tvorená kvapalnou stacionárnou fázou
- SCOT (Support coated open tubular) – vrstva nosiča so zakotvenou kvapalinou na vnútornej stene
- PLOT (Porous layer open tubular) – na vnútornej stene je umiestnený adsorbent vo forme tenkej vrstvy pórovitého materiálu

Vzhľadom k tomu, že separácia zložiek závisí na teplote je kolóna umiestnená v termostate, v ktorom je presne regulovaná teplota, ktorá sa uskutočňuje pri konštantnej teplote alebo pri programovane zvyšujúcej sa teplote [55].

3.3.1.3 Mobilná fáza

GC využíva ako mobilnú fázu inertný plyn. Najbežnejšie používanými sú hélium, vodík, dusík a argón. Výber nosného plynu závisí na používanom detektore, zohľadňuje sa aj hustota, viskozita, účinnosť a cena. Prietoková rýchlosť je daná používanou stacionárnou fázou. Pre kapilárne kolóny sú typické prietokové rýchlosti v rozmedzí 1–25 ml/min, pre náplňové kolóny rýchlosť v rozmedzí 25-150 ml/min [54].

3.3.1.4 Detektor

Detektor sa nachádza za kolónou a zlúčeniny po tom čo eluujú z kolóny s ním interagujú, a to na základe fyzikálnych alebo chemických vlastností. Detektor vysielá signál, ktorý je zaznamenávaný v čase. Základnými požiadavkami na používaný detektor je rýchla a lineárna odozva na zmeny zloženia eluátu, stabilná základná línia a citlivosť. Jedným z prvých a stále používaným v GC je tepelne vodivostný detektor, používa sa aj detektor elektrónového záchytu, dusíko-fosforový detektor. Ďalšími používanými detektormi a súčasne samostatnými prístrojmi sú infračervený spektrofotometer s Fourierovou transformáciou a hmotnostný spektrometer [54]. Často používaným detektorom je plameňovo-ionizačný detektor, ktorého princíp bude opísaný v nasledujúcej časti nakoľko je používaný v experimentálnej časti tejto práce.

3.3.2 Plynová chromatografia s plameňovo-ionizačným detektorom

Princíp FID spočíva v tom, že na prúd plameňa zloženého z vodíka a kyslíka, zvyčajne dodávaného ako zmes vzduchu, ktorý je umiestnený na špičke dýzy a kolektor, je privedené napätie. Prietok vzduchu je asi desaťkrát väčší ako prietok vodíka, model detektora sa však môže líšiť a presné hodnoty pre dosiahnutie optimálnej citlivosti detektora je možné dohľadať u výrobcu. Organické zlúčeniny v nosnom plyne prichádzajúce z kolóny a sú spaľované v plameni. Pohyb iónov vytvorených v plameni smerujúcich ku kolektoru vytvárajú malý prúd, ktorý sa zapisuje ako signál [57].

FID reaguje na väčšinu atómov uhlíka s výnimkou formaldehydu, kyseliny mravčej a tých, ktoré sa nachádzajú v karbonylových a karboxylových skupinách. Vďaka tomu je takmer univerzálnym detektorom. FID síce nedokáže detegovať plyny ako H₂O a CO₂,

ale práve preto je vhodný pre analýzu atmosférických a vodných vzoriek prostredia. FID neinteraguje ani s oxidmi dusíka a zlúčeninami síry [54, 57].

Signál detektora je nasledovne spracovaný a zaznamenaný pík generuje väčší signál, ak je prítomné väčšie množstvo zlúčeniny vo vzorke. Pre uhľovodíky tak platí, že odozva je úmerná počtu uhlíkov v molekule. Výsledkom je záznam na ktorom je viditeľný signál pozadia, ktorý je výsledkom krvácania kolóny a stopových hladín nečistôt [57].

4 Experimentálna časť

4.1 Použité chemikálie

Pri príprave roztokov boli použité tieto chemikálie:

- Benzén, p.a. (Penta Chemicals, Chrudim, Česká republika)
- Chlórbenzén, purum, (Lachema, Brno, Československá republika)
- Čistená voda (Merck Millipore, Burlington, Massachusetts)
- Dichlórmetán, p.a., stabilizovaný amylénom (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- Etylbenzén, bezvodý, 99,8% (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika)
- Chlorid sodný (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- Chloroform, p.a., stabilizovaný etanolom (Penta Chemicals, Chrudim, Česká republika)
- Methanol, HPLC grade, 99,9% (Sigma Aldrich, Praha, Česká republika)
- Síran horečnatý bezvodý, čistý (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika)
- Síran sodný, bezvodý (Fluka AG, Buchs, Švajčiarsko)
- Toluén, p.a (Penta Chemicals, Chrudim, Česká republika) .
- Xylén, zmes izomérov, p.a. (Lachema, Brno, Česká republika)

4.2 Použité laboratórne pomôcky

Pri príprave roztokov boli použité analytické váhy KERN ABS N (Balingen, Nemecko), manuálne automatické pipety (Sartorius AG, Nemecko), vialky a bežne používané laboratórne sklo.

4.3 Príprava roztokov

4.3.1 Príprava zásobných roztokov

Zásobný roztok benzénu, toluénu, etylbenzénu, chlórbenzénu, dichlórmetánu, chloroformu, zmesi xylénov bol pripravený ich rozpustením v metanole v 25,00 ml odmernej banke. Tabuľka 6 uvádza koncentrácie koncentrácie pripravených zásobných roztokov. Zásobné roztoky boli následne uchovávané v chladničke.

Tabuľka 6 Zloženie zásobného roztoku

Zlúčenina	Skratka	Koncentrácia [mol/l]
Benzén	B	0,15
Toluén	T	0,13
Etylbenzén	E	0,11
Xylény	Xs (o-x, m-x, p-x)	0,19
Chlórbenzén	Cl-B	0,09
Dichlórmetán	DCM	0,16
Chloroform	CLF	0,12

4.3.2 Príprava pracovných roztokov

Pracovné roztoky boli pripravené zo zásobných roztokov napipetovaním požadovaného objemu zo zásobného roztoku a doplnením rozpúšťadla do 10,00 ml odmernej banky ako uvádza Tabuľka 7.

Tabuľka 7 Zloženie pracovných roztokov

Názov	Zloženie
Roztok A	10 μ l B, T, E, Xs, DCM a 5 μ l CLF v metanole
Roztok B	10 μ l B, T, E, Xs, v dichlórmetáne
Roztok C1	10 μ l T, E, Cl-B, Xs a 10 μ l B v dichlórmetáne
Roztok C2	10 μ l T, E, Cl-B, Xs a 50 μ l B v dichlórmetáne

4.3.3 Príprava sol'ných roztokov

Pre optimalizáciu extrakčných podmienok boli pripravené sol'né roztoky, ktorých koncentrácia a zloženie sú uvedené v Tabuľke 8. Roztoky boli pripravené navážením presného množstva látok a následne rozpustené a doplnené vodou do 50,00 ml odmernej banky.

Tabuľka 8 Koncentrácie soľných roztokov

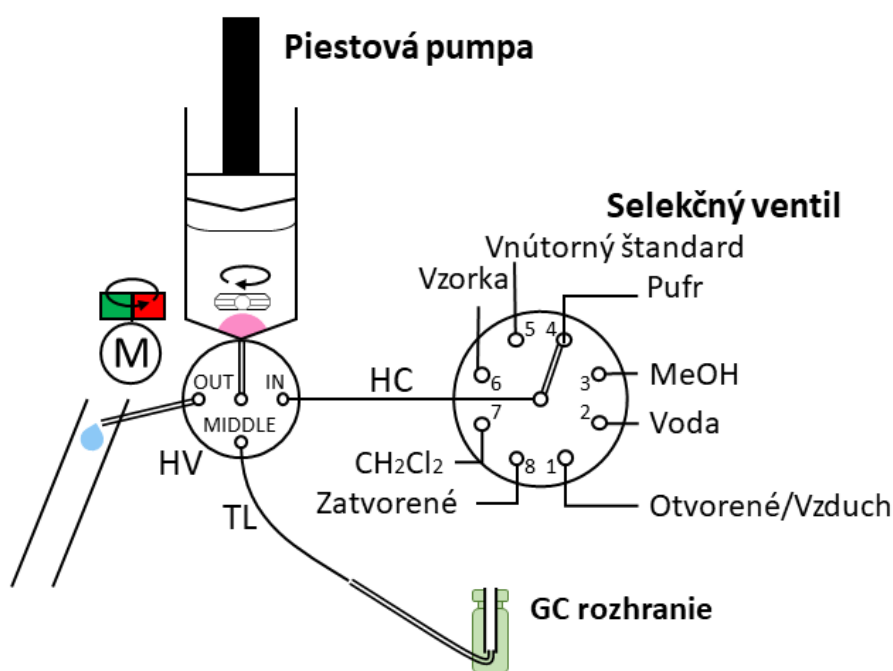
Zloženie	Koncentrácia [mol/l]
Na ₂ SO ₄	1,65
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,78
MgSO ₄	2
NaCl	1

4.3.4 Príprava štandardov

K priblíženiu reálnym environmentálnym vzorikám vody kontaminovaných BTEX boli pripravné roztoky s označením štandard 1 a štandard 2. Do 10,00 ml metanolu boli rozpustené zásobné roztoky benzénu, toluénu, etylbenzénu, chlórbenzénu, izomérov xylénu. Následne bol pripravený roztok s označením štandard 1 o výslednej koncentrácii 0,6 ppm B, 0,7 ppm T, 0,6 ppm E, 2 ppm chlorbenzénu a 1 ppm xylénov a štandard 2, ktorá obsahovala dvojnásobnú koncentráciu benzénu.

4.4 Popis Lab-in-syringe systému

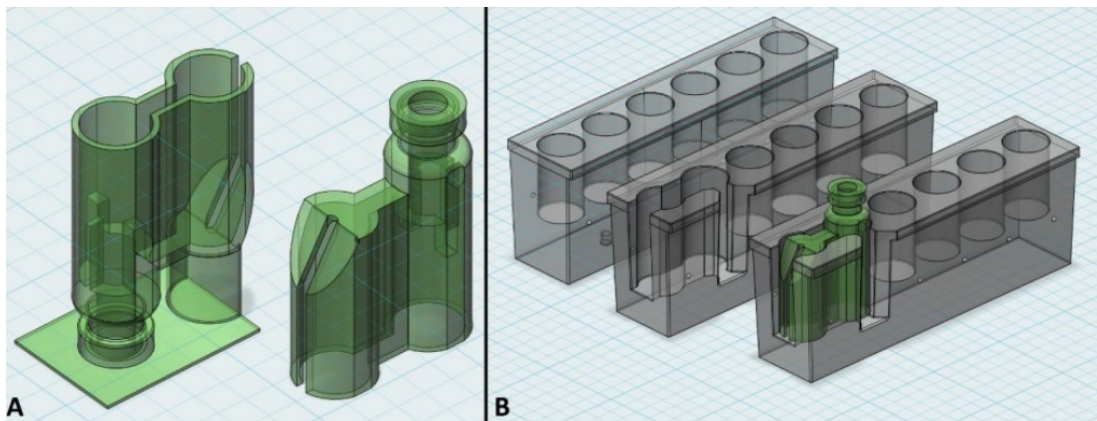
Lab-in-syringe systém (Obrázok 9), bol použitý pre automatizáciu mikroextrakcie do jednej kvapky rozpúšťadla v tejto diplomovej práci. Extrakcia prebiehala v piestovej pumpe v pozícii „upside-down“ a sklenenou striekačkou spojenou s 3-cestným hlavným ventilom (HV). Pred piestovou pumpou bol umiestnený motor s neodýmovými magnetmi a vo vnútri striekačky magnetické miešadlo z dôvodu umožnenia miešania roztoku vo vnútri striekačky. Port označený IN viedol k 8-cestnému selekčnému ventilu, port MIDDLE ku GC-rozhraniu a port OUT slúžil k odvádzaniu odpadu. Pozícia 1 na selekčnom ventilu bola otvorená pre možnosť aspirácie vzduchu, naopak pozícia 8 bola uzatvorená, a to za účelom možnosti vytvorenia pozitívneho alebo negatívneho tlaku vo vnútri. Ďalšie výstupy selekčného ventilu slúžili k aspirácii dichlórmétanu (7), vzorky (6), vnútorného štandardu (5), solného roztoku (4), metanolu (3), vody (2). Prístrojové vybavenie systému bolo riadené softwarom Cocosoft (Univerzita Baleárskych ostrovov, Španielsko).



Obrázok 9 Schéma použitého Lab-in-syringe

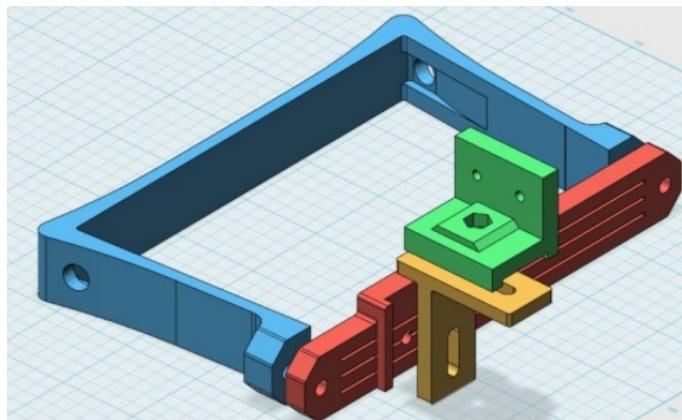
4.5 Spojenie LIS-GC a 3D tlačené prvky v systéme

Stereolitografická 3D tlačiareň Photon S (Anycubic, Shenzhen, Čína) bola použitá na výrobu rozhrania, resp. plášťu slúžiaceho na uchytenie zostavy sklenenej a ocelevej kapiláry a vialky pričom dôraz bol kladený na jej výšku, ktorá je o niečo vyššia ako klasická komerčne dostupná 1,5 ml vialka, ale zároveň kompatibilná s používaným autoinjektorom. Taktiež bol vyrobený upravený zásobník autosampleru so šiestimi pozíciami za použitia Delta Q tlačiarne (Trilab, Hradec Králové, Česká republika). Obe prvky sú na Obrázku 10.



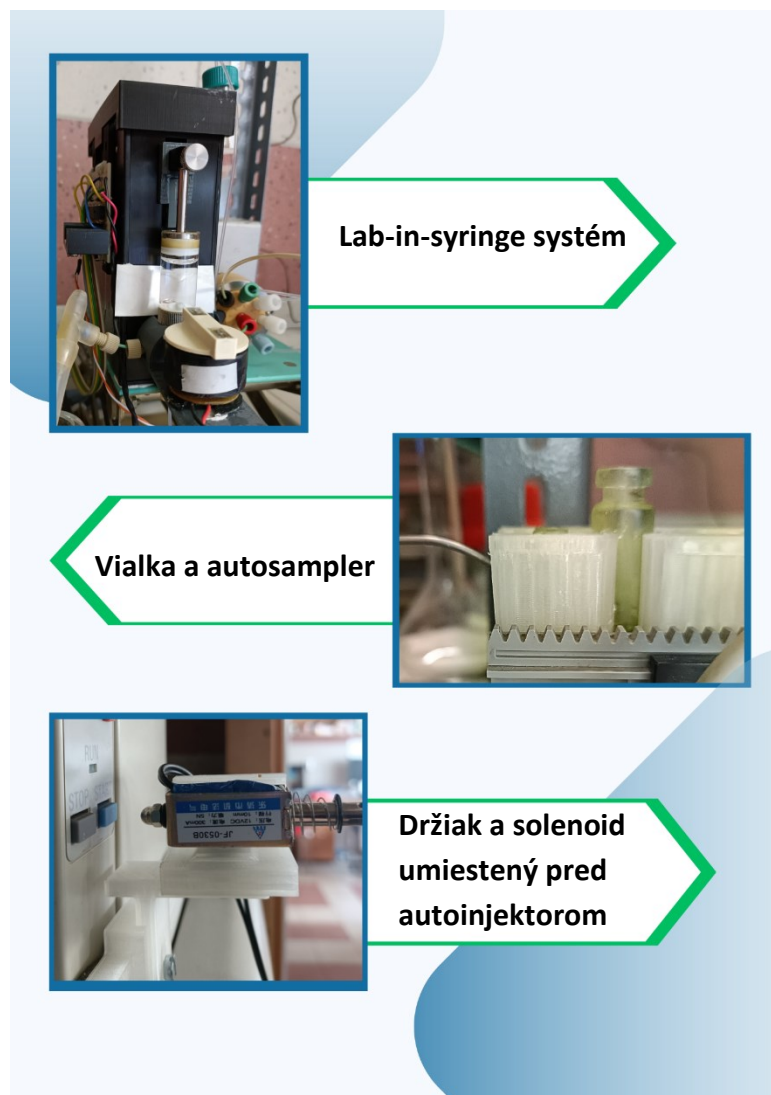
Obrázok 10 A vialka, B autosampler

Vďaka držiaku tiež vyrobeného pomocou 3D tlačiarne je možné automatizované spustenie GC analýzy. Držiak (Obrázok 11) na ktorom bol umiestnený solenoid pred tlačidlo START autoinjektora slúžil k spusteniu GC. Solenoid bol umiestnený vo vzdialenosti, ktorá zodpovedala maximálne možnej vytvorenej energii a rýchlosť motora bola taká, aby na začiatku bola aktivácia zariadenia čo najrýchlejšia.



Obrázok 11 Držiak

Tieto prvky zabezpečujú automatizované spojenie extrakcie do jednej kvapky rozpúšťadla so separáciou, a tak samotnú extrakciu v systéme. Umožnená je teda analýza od momentu spustenia extrakcie až po ukončenie detekciou v plynovom chromatografii bez nutnosti zásahu obsluhy. Fotografie vyššie uvedených prvkov umožňujúcich prepojenie extrakcie a plynového chromatografu sú zobrazené na Obrázku 12.



Obrázok 12 3D tlačené prvky v reálnom zobrazení

Magnetické miešadlo tvaru kríža, ktoré bolo upravené do kónického tvaru bolo použité pre zabezpečenie homogénneho miešania v sklenenej striekačke. Miešadlo je schopné pohybu vďaka externým magnetom a motorom kontrolovaným pomocou relé.

4.6 Postup extrakcie v systéme LIS

Postup extrakcie začínal krokom „Clean Syringe“, ktorý zahŕňal aspiráciu metanolu, vzduchu a vypustenie do odpadu, a to v jednom opakovaní. V ďalšom kroku sa postup opakoval, ale premývanie metanolom bolo nahradené vodou, pričom tento krok bol opakovaný dvakrát. Ďalej pokračovala aspirácia roztokov a pred samotnou extrakciou zmena pozície ventilu do uzatvorenej pozície a aktiváciou miešania a extrakciou v trvaní 14 minút pri neustálom miešaní (Tabuľka 9).

Tabuľka 9 Aspirácia roztokov pred extrakciou a extrakcia

Krok	Časť/Port	Rýchlosť
Aspirácia soľného roztoku	Selekčný ventil, port 4	10000 µl/min
Aspirácia vnútorného štandardu	Selekčný ventil, port 5	10000 µl/min
Aspirácia vzorky	Selekčný ventil, port 6	25000 µl/min
Deaktivácia miešania	Piestová puma, deaktivácia relé	—
Aspirácia extrakčného rozpúšťadla	Selekčný ventil, port 7	6000 µl/min
Aspirácia vody	Selekčný ventil, port 2	6000 µl/min
Zmena polohy do uzatvorenej pozície	Selekčný ventil, port 8	—
Miešanie a extrakcia	Piestová pumpa, aktivácia relé	—

Po ukončení extrakcie nasledovalo pomocou pozície hlavného ventilu UP k prenosu do GC vialky a vypustenie vody do odpadu a zvyšku roztoku do odpadu, reaspirácii kvapky extraktantu a prenosu k analýze do vialky. V závere metódy, pred začatím ďalšej extrakcie, bolo k premytiu celého systému definovaných niekoľko rutinných krokov. Predefinované kroky zahrňujú pokyny „Empty GC vial“, „Clean Syringe“, „Fill GC vial“ a „Clean Channel“. Celý program pre metódu extrakcie v systéme Lab-in-syringe vytvorený v programe CocoSoft je uvedený v Prílohe A.

4.7 Chromatografický systém

K stanoveniu cieľových analytov bol použitý plynový chromatograf GC-17A (Shimadzu, Scientific Instrument, Maryland, USA) s plameňovo-ionizačným detektorom. Súčasťou tohto prístroja je aj autosampler AOC-20i od rovnakého výrobcu. Na Obrázku 13 je zobrazený plynový chromatograf a čiastočne autoinjektor. K zberu a vyhodnocovaniu nameraných dát bol použitý ClarityLite software (DataApex, Praha, Česká republika). Použitá bola kolóna AT-624 (30 m x 0,32 mm) so stacionárnou fázou zloženou z 6% kyanopropylfenylu a 94% metylpolysiloxánu. Pri analýze bolo hélium (Linde Gas a.s, Praha, Česká republika) využité ako nosný plyn, syntetický vzduch (Linde Gas a.s, Praha, Česká republika) a vodík (Linde Gas a.s, Praha, Česká republika) slúžili ako podporný plyn.



Obrázok 13 Plynový chromatograf

5 Výsledky

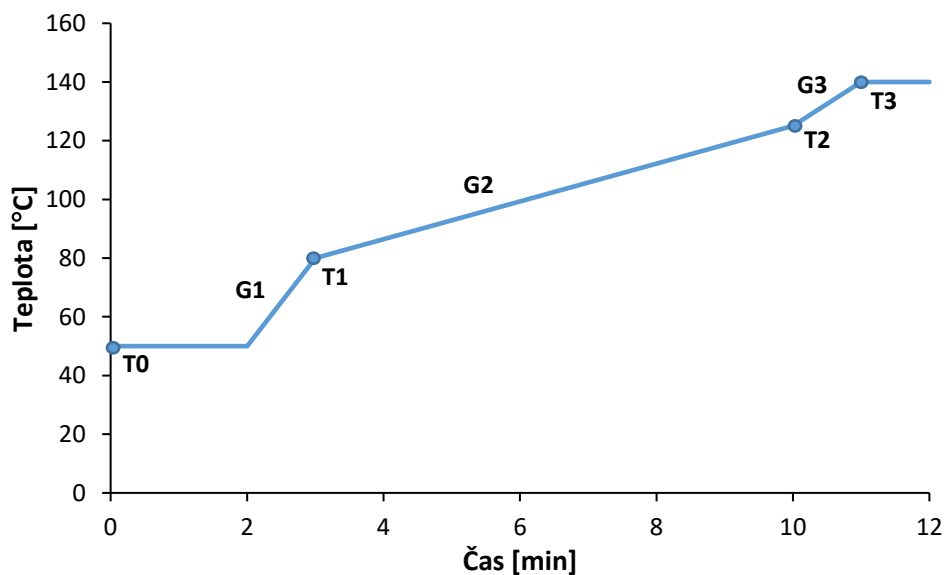
Táto práca nadväzuje na predchádzajúcu prácu na katedre autormi Horstkotte et. al. [18] a práve z tohto dôvodu nie všetky parametre plynovej chromatografie boli optimalizované. Ako extrakčné rozpúšťadlo v tejto práci bol použitý dichlórmetán a boli študované optimálne separačné a extrakčné podmienky pre použitie dichlórmetánu.

5.1 Optimalizácia plynovej chromatografie

Pri všetkých separáciách boli použité tieto parametre:

- teplota injektora 220 °C
- dávkovaný objem 1 μ l
- lineárna rýchlosť 320 cm/s,
- prietok 26ml/min,
- teplota detektora 300 °C
- split 1:5 (ak nie je uvedené inak).

Ako premývací roztok medzi jednotlivými nástrekmi v plynovej chromatografii bol používaný metanol. Programy teplotného gradientu uvádzané v časti Výsledky boli označované skratkami, ktoré sú zobrazené na Grafe 1.



Graf 1 Teplotný gradient

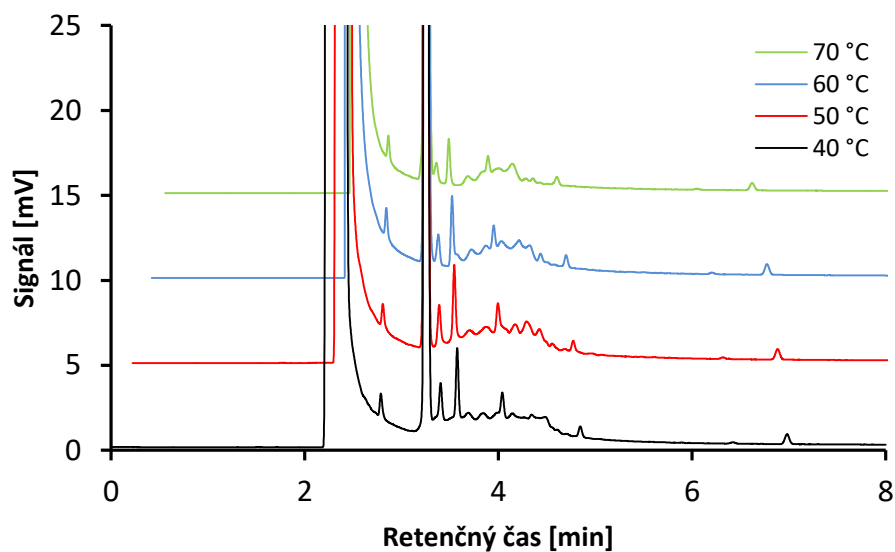
5.1.1 Optimalizácia T0

Prvé experimenty sa sústredili na počiatočnú teplotu kolóny. Na začiatku boli testované tri teploty. Prvá teplota bola určená na 40 °C čo zodpovedá 40 °C pod bodom varu benzénu. Pokračovali sme s ďalšími teplotami, konkrétne 50, 60 a 70 °C za podmienok opakovania každej teploty dvakrát. Teplota bola udržiavaná po dobu 1 minúty. Celý program uvádza Tabuľka 10.

Tabuľka 10 Program 1

Program 1	
T0	40 – 70 °C
t0	1 min
G1	33 °C/min
T1	90 °C
G2	2 °C/min
T2	105 °C
G3	16 °C/min
T3	130 °C
Split ratio	1:100

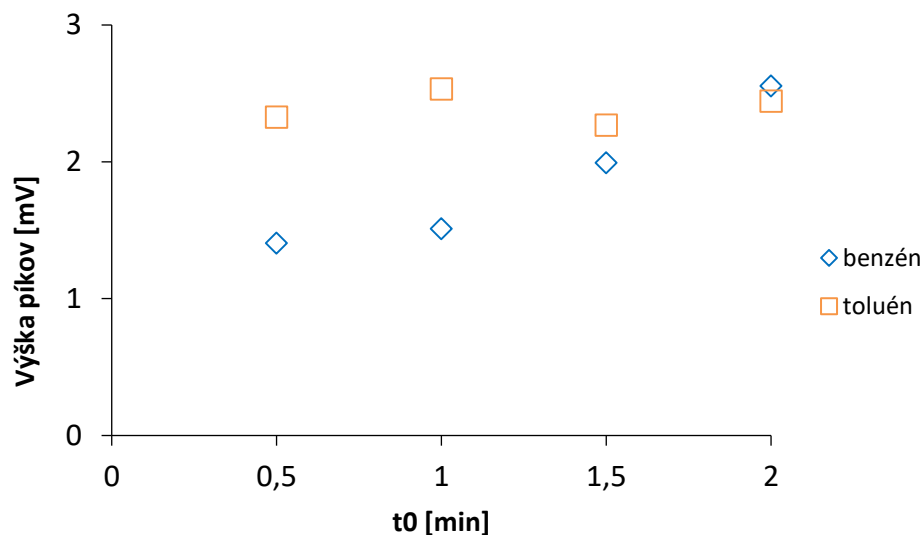
Do vialky bolo napipetované v pomere 1:1 dichlórmetán a roztok B a bolo pridaných 20 µl benzínu, ktorý bol pripravený rovnakým spôsobom ako zásobný roztok. Benzín bol pridaný ako potenciálna zložka analyzovanej reálnej vzorky, pretože benzín, resp. jeho zložky majú bod varu v rozmedzí 35 – 200 °C. Výsledný chromatogram z tejto analýzy, pri ktorom boli sledované analyty benzén a toluén je uvedený na Grafe 2. Pre lepšie znázornenie boli os x a os y posunuté podľa základnej línie chromatogramu, kde bola T0 40 °C. X-ová os chromatogramu 50 °C bola posunutá pre každú nameranú hodnotu o 0,2 minúty, a pre ďalšie teploty T0 trojnásobne. Odozva detektoru meraného v mV bola pre jednotlivé chromatografické línie odlišných T0 zväčšená o 5 mV.



Graf 2 Chromatografický záznam benzénu toluénu a benzínu

Ako je možné pozorovať na Grafe 2 sa píky pre dichlórmetán líšia v retenčných časoch len o 0,2 minúty pre každý krok zvýšenej teploty, takže v zázname sa zdá, že sa prekrývajú. Benzínu zodpovedajú vrcholy píkov medzi 3,4 a 4,5 minútou čo zodpovedá zlúčeninám podobne eluujúcim ako benzén. Benzén eluoval s väčším oneskorením vzhľadom k dichlórmetánu pri nižších teplotách. Z tohto dôvodu boli zvolené pri ďalších experimentoch nižšie teploty T_0 .

Nakoľko je záznam za prítomnosti benzínu v analyzovanej zmesi nie úplne vhodný k tomu, aby jeho používanie bolo súčasťou optimalizácie pokračovali sme bez používania benzínu. Za podmienok uvedených v Tabuľke 10 bol zisťovaný čas pri ktorom sa má udržiavať počiatočná teplota nakoľko bola snaha zlepšiť separáciu analytov s kratším retenčným časom. Boli sledované časy 0,5 min, 1,0 min, 1,5 min a 2 min za použitia roztoku B. Za najvhodnejší čas pri ktorom mala byť udržiavaná počiatočná teplota programu bol zvolený čas 2 minúty, pretože výška pík bola pri tomto čase najvyššia (Graf 3).



Graf 3 Výšky píkova benzénu a toluénu v závislosti na t₀

5.1.2 Optimalizácia T1 a T2

Nasledovali experimenty, kde boli využité roztoky s označením C1 a C2. Rozdiel v zložení medzi roztokmi bol ten, že v roztoku C2 bola koncentrácia benzénu päťkrát vyššia a tým sme mohli jednoznačne potvrdiť, prítomnosť benzénu a správne určiť retenčný čas. Boli optimalizované teploty T1 a T2, merania prebiehali v opakovaníach, pre každý roztok jedenkrát. Ako teploty T1 boli zvolené teploty v rozmedzí od 80 do 100 °C s rozstupmi 5 °C. Program podľa ktorého analýza prebiehala je uvedený v Tabuľke 11.

Tabuľka 11 Program 2

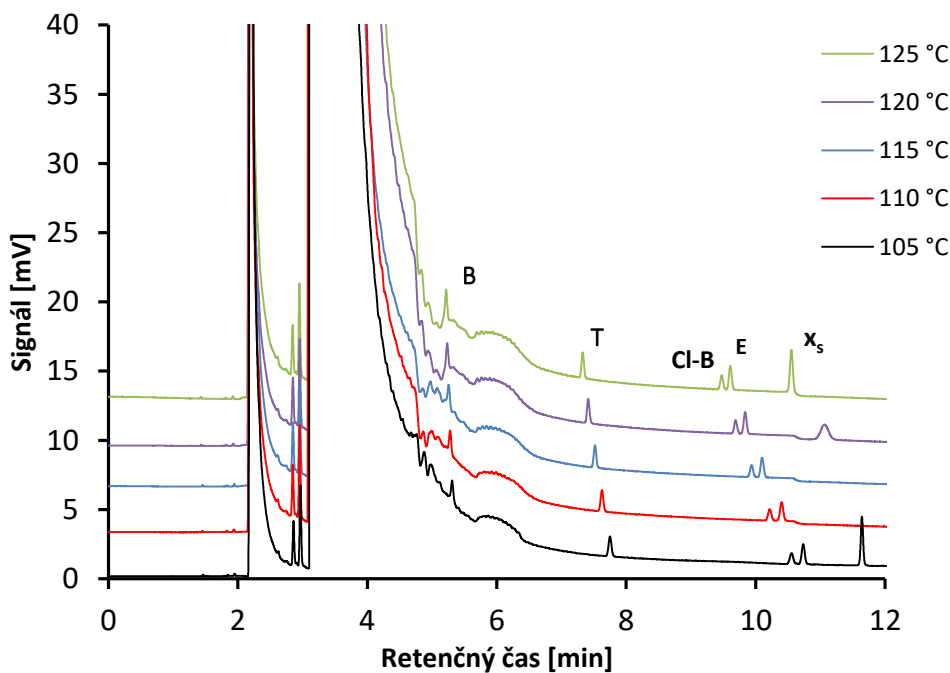
Program 2	
T0	45 °C
t0	2 min
G1	30 °C/min
T1	80-100 °C
G2	2 /3,3/ 2,7/ 1,3 0,7 °C/min
T2	105 °C
G3	16 °C/min
T3	130 °C

Na základe porovnania parametrov výšky píkov a plôch pod píkmí bola vyhodnotená ako najoptimálnejšia T1 80 °C. Zároveň aj retenčné časy pri tejto teplote boli najkratšie so zachovaním rozlíšenia. V ďalšom kroku nasledovalo štúdium zmeny teplotných gradientov a teploty označenej T2. Nastavenia sú uvedené v nasledujúcej tabuľke (Tabuľka 12).

Tabuľka 12 Program 3

Program 3	
T1	80 °C
G2	3,4/ 4,1/ 4,70/5,4/ 6,1 °C/min
T2	105 - 125 °C
G3	16 °C/min
T3	140 °C

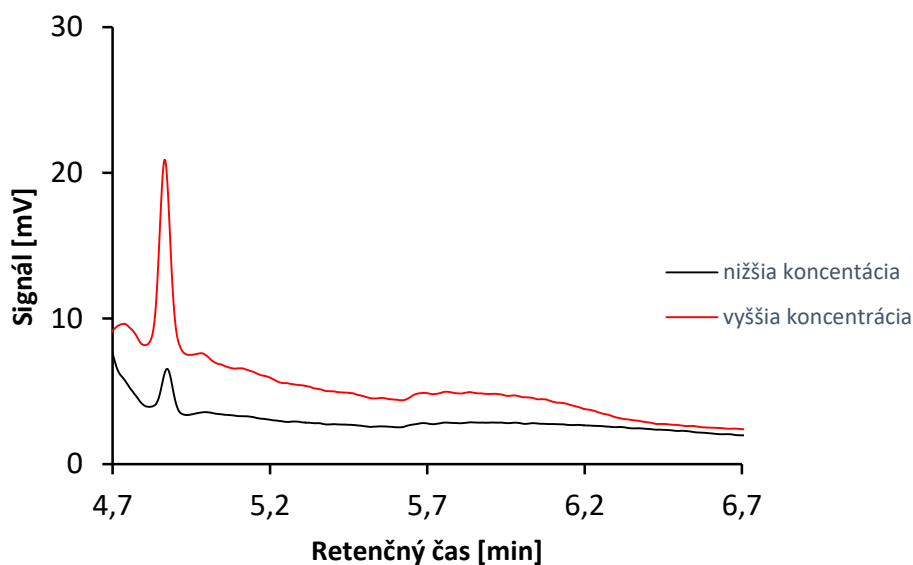
Výsledné chromatografické záznamy z meraní s roztokom pri nižšej koncentrácii benzénu sú zobrazené na Grafe 3. Na základe výsledkov meraní bola za najoptimálnejšiu zvolená teplota 125 °C na základe výšky píkov aj z hľadiska dĺžky analýzy. Xylény pri teplote 110 a 115 °C chýbajú z neznámeho dôvodu. Signál pre chromatografické záznamy pri teplotách 110 až 125 °C boli posunuté o 3 mV.



Graf 4 Chromatografické záznamy (optimalizácia T2)

5.1.3 Výsledný program

Pred ukončením optimalizačného procesu plynovej chromatografie bola taktiež opätovne premeraná počiatková teplota, a to konkrétne 40, 45, 50 a 60 °C. Na Grafe 4 je znázornený pík zodpovedajúci benzénu pri počiatkovej teplote 50 °C s použitím roztokov s označením C1 a C2.



Graf 5 Benzén vo vyššej a nižšej koncentrácii

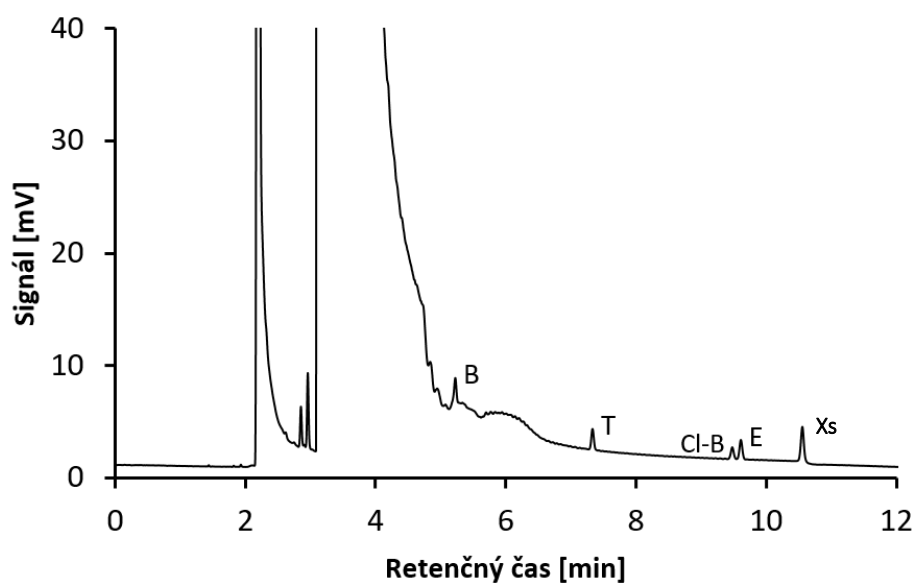
Výsledný program je uvedený v Tabuľka 13. Dosiahli sme nižšie retenčné časy pre jednotlivé analyty, teda skrátenie doby analýzy. Pôvodná metóda v programe ClarityLite bola nastavená na dĺžku 14 minút, konečná verzia metódy 12 minút.

Tabuľka 13 Výsledný program GC analýzy

Výsledný program	
Teplota injektora	220 °C
Dávkovaný objem	1 µl
lineárna rýchlosť	320 cm/s
T0	50 °C
t0	2 min
G1	30 °C/min
T1	80 °C
G2	6,1 °C/min
T2	125 °C
G3	16 °C/min

T3	140 °C
t3	1 min
Teplota detektora	300 °C
Split ratio	1:5

Charakteristický chromatogram za použitia výsledného programu a roztoku C1 je možné vidieť na Grafe 5. Počiatočnou teplotou (T0) 50 °C a udržaním tejto teploty počas dvoch minút sa podarilo dosiahnuť lepšiu separáciu medzi píkmi benzénu a dichlórmetánu. Jedinou nevýhodou, tak ako pri predchádzajúcich teplotných programov je, že izoméry xylénu ko-eluovali.



Graf 6 Chromatogram za výsledných podmienok

5.2 Optimalizácia extrakcie

Extrakcia bola optimalizovaná najprv v offline režime. Výstupy selekčného ventilu slúžiace k aspirácií boli využívané tak ako boli popísané v kapitole 4.4, s tým rozdielom, že namiesto vzorky a vnútorného štandardu bola aspirovaná voda. Do dichlórmetanu bolo pridaných pár kvapiek 5 mM roztoku ditizónu o koncentráciá (DTZ) kvôli lepšej vizualizácii priebehu extrakcie vo vnútri striekačky a pozície v GC vialke. Testované a optimalizované boli rôzne parametre – objem extrakčného rozpúšťadla, objem aspirovanej vody, pozícia extraktu v GC vialke, využitie soľného roztoku a čas extrakcie. Objemy boli zároveň zvolené tak, aby nepresiahli objem 4700, resp. 4800 μl , ktorý je možný aspirovať do injekčnej striekačky.

5.2.1 Objem aspirovaného extrakčného rozpúšťadla a vody

Za podmienok aspirovania 300 μl soľného roztoku a 3000 μl vzorky bol testovaný najvhodnejší objem extrakčného rozpúšťadla, teda objem kvapky a objem vody. Vizualne bola porovnávaná veľkosť a kompaktnosť kvapky. Cieľom bolo použiť čo najmenší objem extrakčného rozpúšťadla. Boli vyhotovované aj fotografie po 5, 10 a 15 minútach extrakcie. Rozličné objemy vody, teda 60, 80, 100, 120 a 140 μl boli testované v niekoľkých opakovaníach. Ako ideálny objem aspirovanej vody bol určený objem 100 μl . Pri vyšších objemoch dochádzalo k fragmentácií kvapky. Ako už bolo spomínané cieľom bolo použiť čo najmenšie množstvo extrakčného rozpúšťadla, preto boli prvotne aspirované objemy 60, 70 a 80 μl . Pri týchto objemoch sa už na začiatku extrakcie nevytvorila jedna homogénna kvapka a dochádzalo k jej rozdeleniu. Záverom bolo, že tieto objemy sú nevyhovujúce, nakoľko kvapky boli nestabilné a extrakčný postup nebol opakovateľný a dochádzalo k tomu, že bolo potrebné opakovať postup z dôvodu straty kvapky z priestoru striekačky. V ďalších experimentoch bolo preto nutné použiť vyšší objem extrakčného rozpúšťadla ako bolo pôvodné zamýšľané.

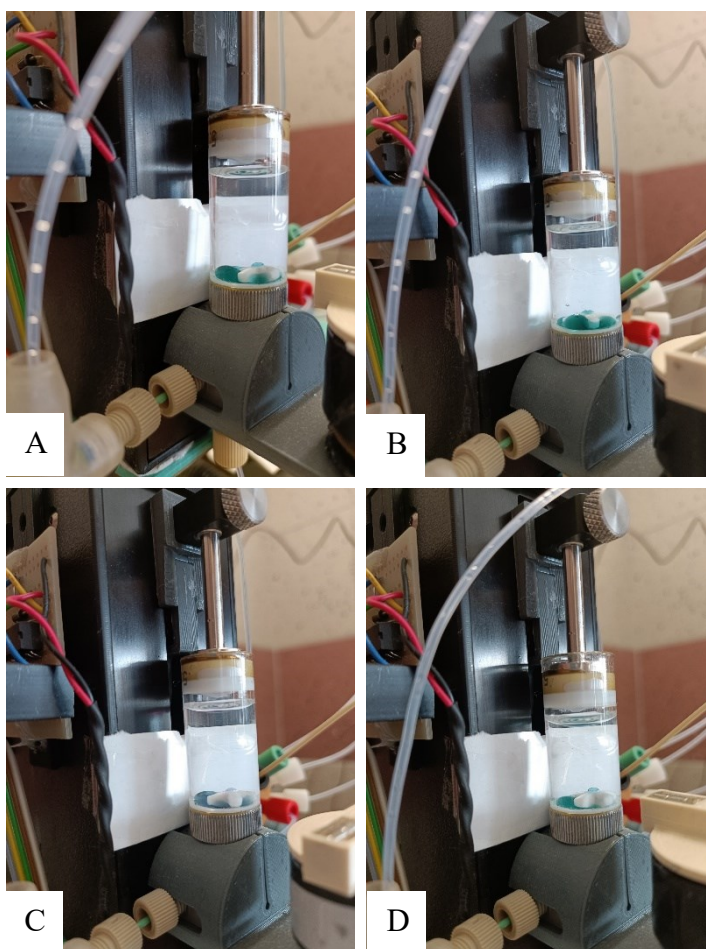
5.2.2 Využitie soľného roztoku

V snahe dosiahnuť čo najlepšiu účinnosť extrakcie bol zámer využiť soľný roztok u ktorého vo všeobecnosti dochádza pri pridaní soli u prechavých polárnych látok vo vodnom roztoku k znižovaniu ich rozpustnosti. Boli testované odlišné soľné roztoky, testovanie prebiehalo v troch opakovaníach a bola pozorované zmena kompaktnosti, správanie kvapky na začiatku extrakcie a prenos do GC vialky.

Boli použité tieto soľné roztoky:

- MgSO_4 a NaCl
- Na_2SO_4
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Keďže objemy extrakčného rozpúšťadla do 100 μl neboli vyhovujúce, aspirované objemy extrakčného rozpúšťadla boli pri týchto experimentoch väčšie. Testované boli objemy 120 a 200 μl extrakčného rozpúšťadla, soľné roztoky, bez použitia vnútorného štandardu, vždy v dvoch opakovaníach pre každý objem. Boli vyhotovované fotografické záznamy na začiatku a konci extrakcie a v GC vialke za účelom porovnania kompaktnosti a veľkosti kvapky. Na Obrázku 14 sú viditeľné po extrakcii trvajúcej 10 minút. Po vyhodnotení pozorovaní na základe písomných a fotografických záznamov bol za najvhodnejší soľný roztok zvolený roztok s obsahom MgSO_4 a NaCl , z dôvodu, že najviac vyhovoval z hľadiska celistvosti kvapky.



Obrázok 14 A MgSO_4 a NaCl , B $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, C Na_2SO_4 , D bez soľného roztoku

5.3 Spojenie LIS a GC

Po nastavení jednotlivých parametrov extrakcie a plynovej chromatografie bol vplyv jednotlivých parametrov extrakcie, ktoré boli hodnotené len vizuálne overované experimentálne za pomoci roztoku s označením štandard 1 a štandard 2.

5.3.1 Soľný roztok

Po otestovaní, aký vplyv má soľ na priebeh samotnej extrakcie a separácie bol testovaný rôzny objem aspirovaného soľného roztoku a štandardu 1 pri zachovaní celkového aspirovaného objemu 3400 μl . Jednalo sa konkrétne o objemy:

- 400 μl soľného roztoku a 3000 μl vzorky
- 200 μl soľného roztoku a 3200 μl vzorky
- 3400 μl vzorky.

Podmienky GC separácie boli zvolené ako bolo uvedené v Tabuľke 13. Výsledky z týchto meraní viedli k záveru, že soľ nemá vplyv na plochu píku, a teda aj napriek pôvodnému zámeru využiť ho k zlepšeniu účinnosti extrakcie nebol použitý.

5.3.2 Objem extrakčného rozpúšťadla

Veľkosť kvapky, resp. objem aspirovaného extrakčného rozpúšťadla bol 200 μl , 180 μl , 160 μl , 140 μl za podmienok výsledného programu, použitia štandardu 1, a to v štyroch opakovaní. Ako výsledný objem aspirovaného extrakčného rozpúšťadla bol zvolený objem 180 μl , nakoľko pri nižších objemoch bol síce pozorované vyššia výška píku, ale merania neboli reprodukovateľné.

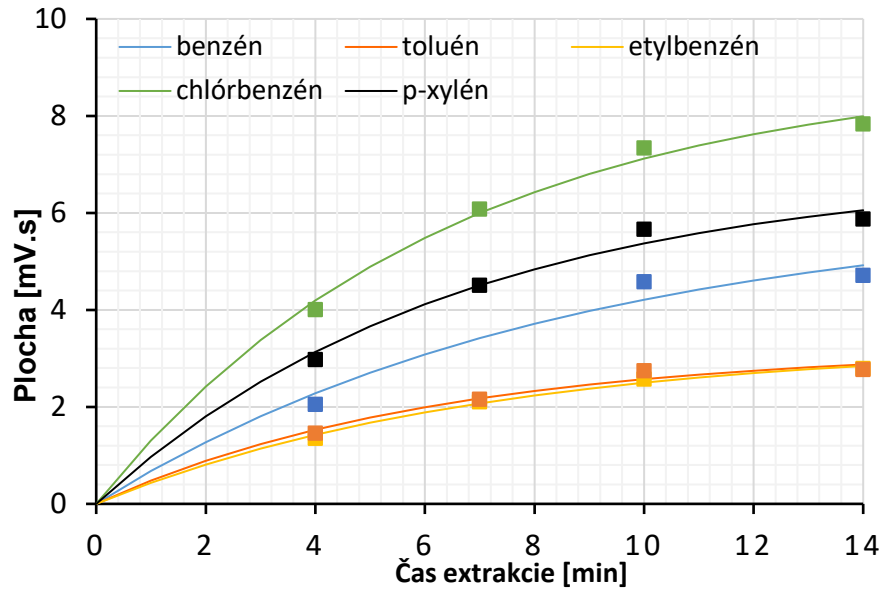
5.3.3 Čas extrakcie

Čas extrakcie je jedným z najdôležitejších parametrov, preto bola odhadnutá kinetika meraním signálov počas 4, 7, 10 a 14 minút trvajúcej extrakcie za podmienok výsledného programu a použitia roztoku s označením štandard 2. Čas 14 minút bol zvolený ako najdlhší čas extrakcie, ktorým by sa nepredĺžila celková doba analýzy.

Namerané data boli aproximované krivkou, podľa kinetiky 1. poriadku, ktorá zodpovedá saturačnej krivke. Jednoduchý model uvedený ako rovnica (5.1), kde A je maximálny teoretický výťažok, t čas extrakcie a B charakteristický čas. Využitá bola metóda najmenších štvorcov a funkcia Riešiteľa v programe Microsoft Excel, kde bod preložený krivkou bol zadaný ako priemer dvoch hodnôt v každom z meraní. Odl'ahlá

hodnota benzénu v čase 7 minút bola eliminovaná. Výsledkom matematického riešenia je Graf 7.

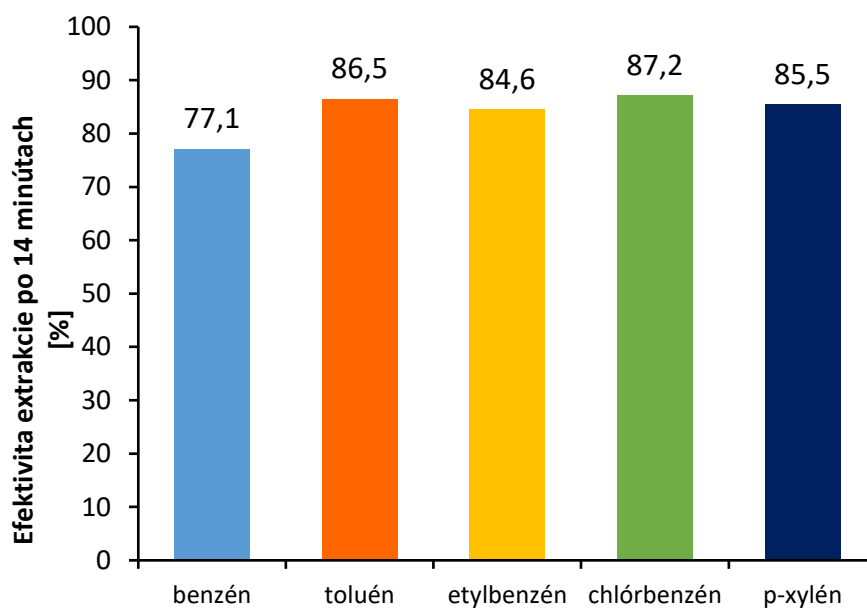
$$\text{výťažok} = A \times (1 - e^{(-\frac{t}{B})}) \quad (5.1)$$



Graf 7 Dynamika extrakcie

Teoretické výťažky v čase 14 minút uvedené na Grafe 8 boli vypočítané podľa vzťahu (5.2) spôsobom, že bola použitá hodnota teoretického koncového bodu z matematického modelu.

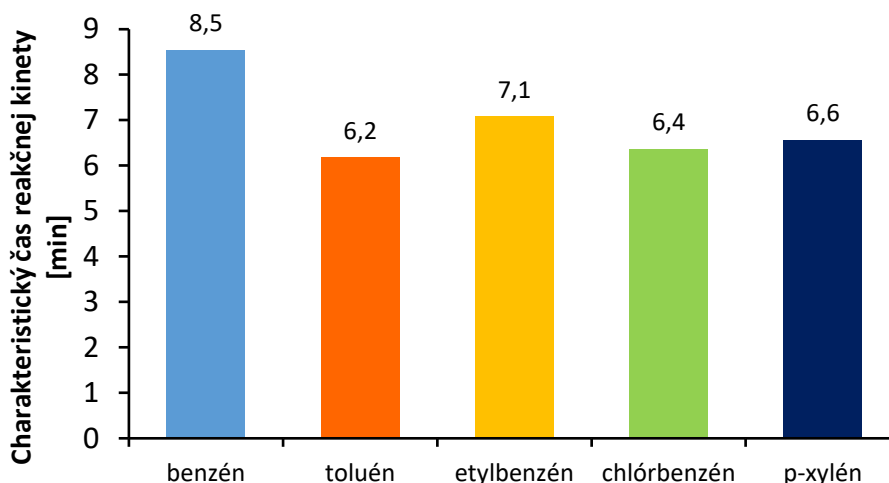
$$\text{efektivita} = \frac{\text{výťažok}}{A} \times 100 \quad (5.2)$$



Graf 8 Efektivita extrakcie po 14 minútach

Na základe efektivity extrakcie by bolo možné zistiť prekoncentračný faktor, ktorý je možné odhadnúť vynásobením efektivity použitým objemom vzorky vydeleným objemom extrakčného rozpúšťadla. Nakoľko nepoznáme presný objem použitého rozpúšťadla, nebol prekoncentračný faktor určený. Z výsledkov vyplýva, že v čase 14 minút bola efektivita extrakcie v rozmedzí 77,1 až 86,5 %. Analyty sa správali podobne, avšak v prípade benzénu bol pozorovaný výrazný rozdiel čo mohlo byť spôsobené presahmi píkovo alebo aj jeho vyššou rozpustnosťou vo vode.

Charakteristické časy sú uvedené na Grafe 9. Z tohto je možné vyjadriť, že extrakcia môže byť uskutočnená na 95 % po trojnásobku tohto času alebo na 99 % po päťnásobku daného času.



Graf 9 Charakteristický čas

6 Diskusia

Nakoľko BTEX sú skupinou látok, ktoré sa ľahko dostávajú do životného prostredia, je opodstatnené sa venovať vývoju stále nových, citlivých a efektívnych analytických metód pre ich detekciu v nízkych koncentráciách. Hlavnou voľbou pre stanovenie BTEX vo vzorkách vody životného prostredia je GC-FID. Dôležitou súčasťou pri výbere analytickej metódy je voľba úpravy vzorky pred vlastnou analýzou z dôvodu, že týchto techník je mnoho a každá má svoje výhody a nevýhody. Pri výbere sa zohľadňuje viacero faktorov, okrem iných je snahou používať čo najjednoduchšiu techniku za spotreby čo najmenšieho množstva organického rozpúšťadla, ale aj ďalších reagentov a samotnej vzorky a bola aj ekonomicky prijateľná [58].

Extrakcie typu LLE a sa už v minulosti používali pri extrahovaní toxických zlúčenín z vodných matric. Tento postup je ale časovo náročný a vyžaduje veľké množstvo organických rozpúšťadiel, ktoré sú spravidla toxické. Využívaná je aj SPE, kde sa síce používa menšie množstvo rozpúšťadiel, ale desorpcia analytu na malých diskoch alebo kolónkach spôsobuje ich zanesenie, ak vodná vzorka obsahuje jemné tuhé častice. V súčasnosti pri využití extrakcie je žiadúce využívať prístup miniaturizácie. Nakoľko extrakcie SPME sú charakteristické relatívne dlhými extrakčnými časmi, niekedy v dĺžke viac ako 30 minút, a to v dôsledku menšieho prenosu hmoty ako na rozpúšťadle založené extrakcie, je práve z tohto hľadiska výhodnejšie využívať extrakcie typu LPME [59, 60]. Jednou z techník extrakcie, ktorou sa zaoberala aj táto práca je SDME, pri ktorej sú problémy a nedostatky uvedené týkajúce sa nestability rozpúšťania v organickom rozpúšťadle pri rýchlejšom miešaní alebo dlhšom čase extrakcie. Najdôležitejšími parametrami, ktoré musíme zohľadniť pri výbere extrakčného rozpúšťadla tejto techniky pre dosiahnutie efektivity extrakcie je jeho nemiešateľnosť s vodou, vysoká afinita k analytom a nízka prchivosť, aby nedochádzalo k strate počas extrakcie. Samozrejmosťou je aj kompatibilita s detekčným systémom. Pri DI-SDME tieto žiadúce vlastnosti obmedzujú počet organických rozpúšťadiel do značnej miery, pretože pri použití rozpúšťadiel s nízkou viskozitou a vysokými tlakmi par je spôsobený pokles efektivity [61, 62]. Dichlórmétán používaný v tejto práci je s vodou nemiešateľný, bod varu má 39,75 °C s hustotou vyššou ako voda [63]. Hustota rozpúšťadla je kritická pri mnohých prístupoch LPME. Veľký rozdiel v hustote medzi vodnou a organickou fázou umožňuje ohraničenie fázového rozhrania, ale nie je dostačujúce zohľadňovať len relatívne hustoty extrahovaného roztoku a rozpúšťadla, pretože pri vzájomnom

premiešavanie sa menia [62]. Voľba dichlórmetánu bola uskutočnená aj na základe toho, že je relatívne veľký rozdiel práve v bodoch varu pri porovnaní s benzénom, t.j. najviac prchavým analytom a bol predpoklad dosiahnutia optimálnej separácie. Využitie extračného rozpúšťadla s hustotou vyššou ako voda môže byť účinným prístupom vďaka, ktorému je možné dosiahnuť lepšie výsledky z hľadiska získania vyšších prekoncentračných faktorov ako pri iných extrakciách z kvapaliny do kvapaliny.

Objem extračného rozpúšťadla priamo ovplyvňuje efektívnosť i obohacovacie faktory analytov. Zväčšením objemu extračného rozpúšťadla sa zvýši účinnosť extrakcie, avšak to platí len do určitého objemu, pri ktorom dosiahneme maximálnu citlivosť. Ďalšie zvýšenie objemu môže spôsobiť zriedenie analytov a pokles efektívnosti extračného postupu. Väčšinou sa objem extračného rozpúšťadla volí v rozmedzí 5-200 μl [61, 62]. V prípade našej práce bol objem zoptimalizovaný na objem 180 μl , pretože pri experimentoch sme zistili, že pri objemoch menších ako 180 μl bola pri meraniach síce zaznamenaná vyššia výška pík analytov, avšak prenos kvapky do GC vialky nebol reprodukovateľný. Dochádzalo k strate a nekompaktnosti kvapky, vytvorenie pretlaku v systéme a reaspirácií kvapky, resp. aj k jej strate čo malo za následok nutnosť opakovať postup extrakcie.

Iónová sila je jedným z parametrov, ktorým sa dá dosiahnuť vyššia účinnosť extrakcie. V závislosti od cieľových zlúčenín môže v prítomnosti vodnej vzorky extrakcie aj účinnosť neovplyvniť či dokonca zhoršiť. Roztoky s iónovou silou dokážu prispieť k extrahovateľnosti analytov okrem vysol'ovacieho efektu tým, že dochádza k zmenám fyzikálnych vlastností na rozhraní organickej a vodnej fázy, a to spôsobuje zmenu rýchlosti difúzie analytov do rozpúšťadla [58]. Prístup využiť iónovú silu pre zmeny v rozpustnostiach vo vodnej a organickej fáze, teda znížiť rozpustnosť za použitia niekoľkých soľných roztokov, ktoré sme experimentálne overovali. Využitie soľného roztoku so zložením MgSO_4 a NaCl aj v spojení s GC sme zvýšenie účinnosti extrakcie nepotvrdili, a preto aj napriek prvotnému zámeru soľný roztok využiť, jeho aspirovanie v konečnej verzii metódy extračného postupu v systéme LIS nebolo zahrnuté nakoľko bolo vhodnejšie použiť väčší objem vzorky ako nahradiť časť vzorky za soľný roztok.

Efekt času extrakcie je významným faktorom najmä pri využití, pretože práve ten závisí skôr od rovnováhy než od úplnej extrakcie, teda množstvo analytu extrahovaného

do kvapky v čase závisí od prenosu hmoty analytu z vodnej fázy do fázy organického rozpúšťadla. Za normálnych okolností však nie je praktické využívať časy, ktoré sú dostatočne dlhé na to, aby sa vytvorila rovnováha [58, 59]. Pre odhad kinetiky reakcie bol vytvorený model a maximálne experimentálne overovaný čas bol 14 minút, aby sme celú analýzu nepredlžovali a mohla prebiehať paralelne analýza a extrakcia.

Jedným z pozorovaných bola strata kvapky či už pri aspirovaná roztoku s vyšším obsahom metanolu, kde dochádzalo k reaspirovaniu do zásobníka s dichlórmetánom alebo jej prenos do nádoby s odpadom. Dôvodom bolo vytvorenie pretlaku v systéme. Možnosť použitia extrakčného rozpúšťadla s relatívne vysokým bodom varu a vysokým povrchovým napätím znižuje možnosť strát odparovaním a zároveň znižuje pravdepodobnosť tvorby bublín vo vnútri kvapky [62], avšak je potrebné zohľadniť následnú separáciu v plynovom chromatografe, a teda vlastnosti analytov, pretože sa uvádza, že bod varu rozpúšťadla by sa mal líšiť s bodom varu najprchavejšieho analytu asi o 25 °C. Pri spojení s plynovou chromatografiou je dôležité zohľadniť aj správne umiestnenie kvapky vo vialke a tým zabezpečiť, aby sa do chromatografu nedostala voda, prípadne iné neprchavé zložky, ktoré by mohla viesť k jeho poškodeniu.

V systéme je priestor pre pridanie ďalšie prvku ako automatické pridávanie ďalšieho reagentu, prípadne automatizované pridávanie vnútorného štandardu. Vnútorný štandard je možné využiť pre elimináciu interferencií a kompenzáciu niektorých chýb. Chlórbenzén ako vnútorný štandard bol úspešne využívaný aj v práci Horstkotte et. al. [18]. Dokázali sme, že chlórbenzén poskytuje selektívne pozorovateľný signál a počas separácie sa správa podobne ako analyty, teda je možné využiť ho k tomuto účelu v prípade analýzy reálnych vzoriek.

7 Záver

Cieľom diplomovej práce bolo štúdium uskutočniteľnosti automatizovaného stanovenia prchavých monoaromatických uhľovodíkov BTEX pomocou DI-SDME v systéme Lab-in-syringe v spojení s GC-FID.

V prvej časti práce boli popísané vlastnosti analytov, ktoré boli predmetom záujmu v experimentálnej časti práce. Zároveň bol vytvorený prehľad používaných techník spolu s extrakčným postupom za posledných 10 rokov, z ktorej je možné vytvoriť záver, že v najväčšej miere je pri kvantifikácii BTEX v environmentálnych vzorkách vody využívaná plynová chromatografia čo je dané fyzikálno-chemickými vlastnosťami týchto analytov. Zmena prístupu je viditeľná však v používaných extrakčných technikách, pri ktorých je možné pozorovať smerovanie k miniaturizovaným verziám extrakčných postupov. Ďalej boli popísané prietokové techniky od starších k novším a popísaná základná charakteristika práve systému LIS a SDME, a tiež základná charakteristika plynovej chromatografie.

Experimentálna časť pozostávala z optimalizácie podmienok plynovej chromatografie a SDME v prevedení Lab-in-syringe. Pre analýzu pomocou plynovej chromatografie bolo použité hélium ako nosný plyn a stacionárnu fázu tvorila kolóna so stacionárnou fázou zloženou z kyanopropylfenylu a metylpolysiloxánu. Detekcia stanovovaných analytov prebiehala plameňovo-ionizačným detektorom za teploty 300 °C. Na chromatograme nie sú viditeľné píky o-xylénu, m-xylénu a p-xylénu, pretože eluovali spoločne. Pre SDME v systéme LIS boli optimalizovaný objem extrakčného rozpúšťadla na 180 µl. Vplyv solného roztoku na účinnosť extrakcie nebol potvrdený, resp. bolo výhodnejšie použiť väčší objem vzorky.

Plynová chromatografia v kombinácii s prekoncentračnými technikami je vhodnou metódou pre analýzu zmesí prchavých látok vzhľadom na možnosti dosiahnutia vysokej účinnosti separácie a citlivosti detekcie. SDME je technikou, ktorej výhody sú malé potreby organických rozpúšťadiel, činidiel a vzorky a zníženie aj ekonomických nákladov. Pozitívum, ktoré poskytuje zavedenie vzorky on-line cestou je znížené riziko kontaminácie vzorky alebo strát analytov a manuálna náročnosť zjednodušená automatizáciou. Vzhľadom k tomu, že rozpustnosť analytov bola vyššia vo vode ako v dichlórmetáne a predovšetkým dôvodov, ktoré boli zmienené v časti Diskusia nebola vykonaná validácia metódy.

Pre budúcnosť v rámci zlepšenia efektivity extrakcie je možné použiť striekačku v „upsideright“ pozícií a použiť, tak iné extrakčné rozpúšťadlo, ktoré sa typicky používa v SDME, napr. hexán. Zároveň sa pokúsiť týmito zmenami využiť menší objem extrakčného rozpúšťadla a dosiahnuť vyšší prekoncentračný faktor. Následne aj zrealizovať meranie reálnych environmentálnych vzoriek vôd a zistiť možné interferencie, ktoré by mohli spôsobiť látky, ktoré sa bežne v týchto vzorkách nachádzajú a mohli by mať následne vplyv na citlivosť analýzy.

8 Zdroje

- 1 GHOUAS, Halima, Boumediene HADDOU a Jean Paul CANSÉLIER et al. Wastewater Pollution Prevention for volatile organic compounds (Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylene) using cloud point extraction and regeneration of surfactant by evaporation. *Euro-Mediterranean Journal for Environmental Integration*. 2022, 7(2022), 1-12. Dostupné z: doi:10.1007/s41207-022-00292-9
- 2 PubChem Compound Summary for CID 241, Benzene. *National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information* [online]. USA: Bethesda, 2004 [cit. 2023-01-29]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/241>
- 3 PubChem Compound Summary for CID 1140, Toluene. *National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information* [online]. USA: Bethesda, 2004 [cit. 2023-01-29]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/241>
- 4 Toxicological profile for toluene. In: *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* [online]. Atlanta: Department of Health and Human Services, Public Health Service., 2017 [cit. 2023-01-29]. Dostupné z: <https://wwwn.cdc.gov/TSP/ToxProfiles/ToxProfiles.aspx?id=161&tid=29>
- 5 PubChem Compound Summary for CID 7500, Ethylbenzene. *National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information* [online]. USA: Bethesda, 2004 [cit. 2023-01-29]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7500>
- 6 PubChem Compound Summary for Xylene. *National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information* [online]. USA: Bethesda [cit. 2023-01-29]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/xylene>
- 7 PubChem Compound Summary for CID 7237, o-Xylene. *National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information* [online]. USA: Bethesda, 2004 [cit. 2023-01-29]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7237>
- 8 PubChem Compound Summary for CID 7929, m-Xylene. *National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information* [online]. USA: Bethesda, 2004 [cit. 2023-01-29]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7929>

- 9 PubChem Compound Summary for CID 7809, p-Xylene. *National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information* [online]. USA: Bethesda, 2004 [cit. 2023-01-29]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7809>
- 10 Toxicological profile for xylene. In: *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* [online]. Atlanta: Department of Health and Human Services, Public Health Service., 2017 [cit. 2023-01-29]. Dostupné z: <https://wwwn.cdc.gov/TSP/ToxProfiles/ToxProfiles.aspx?id=161&tid=29>
- 11 Toxicological Profile for Benzene: Analytical Methods. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* [online]. Atlanta: Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2015 [cit. 2023-02-24]. Dostupné z: <https://wwwn.cdc.gov/TSP/ToxProfiles/ToxProfiles.aspx?id=40&tid=14>
- 12 Toxicological Profile for Toluene: Analytical Methods. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* [online]. Atlanta: Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2016 [cit. 2023-02-24]. Dostupné z: <https://wwwn.cdc.gov/TSP/ToxProfiles/ToxProfiles.aspx?id=161&tid=29>
- 13 Toxicological Profile for Ethylbenzene: Analytical Methods. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* [online]. Atlanta: Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2015 [cit. 2023-02-24]. Dostupné z: <https://wwwn.cdc.gov/TSP/ToxProfiles/ToxProfiles.aspx?id=383&tid=66>
- 14 Toxicological Profile for Xylene: Analytical Methods. *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* [online]. Atlanta: Department of Health and Human Services, Public Health Service, 2014 [cit. 2023-02-24]. Dostupné z: <https://wwwn.cdc.gov/TSP/ToxProfiles/ToxProfiles.aspx?id=296&tid=53>
- 15 MOINFAR, Soleyman et al. Continuous sample drop flow-based microextraction method as a microextraction technique for determination of organic compounds in water sample. *Talanta*. 2014, **129**, 309-314. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2014.05.058
- 16 RAHMANI, Mashaallah. Comparison of Air-Assisted, Vortex-Assisted and Ultrasound-Assisted Dispersive Liquid–Liquid Microextraction for the Determination of BTEX Compounds in Water Samples Prior to GC-FID Analysis. *Chromatographia*. 2016, **2017**(80), 109-117. Dostupné z: doi:10.1007/s10337-016-3216-8

- 17 RAHMANI, Mashaallah. Application of In-Syringe Dispersive Liquid–Liquid Microextraction and Narrow-Bore Tube Dispersive Liquid–Liquid Microextraction for the Determination of Trace Amounts of BTEX in Water Samples. *Journal of Chromatographic Science*. 2015, **53**(7), 1210-1216. Dostupné z: doi:10.1093/chromsci/bmu163
- 18 HORSTKOTTE, Burkhard, Natalia LOPEZ DE LOS MOZOS ATOCHERO a Petr SOLICH. Lab-In-Syringe automation of stirring-assisted room-temperature headspace extraction coupled online to gas chromatography with flame ionization detection for determination of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes in surface waters. *Journal of Chromatography A*. 2018, **1555**, 1-9. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2018.04.055
- 19 KHAJEH, Mostafa, Leyla AZARSA a Mansoureh RAKHSHANIPOUR. Chitosan–Zinc Oxide Nanoparticles Combined with Dispersive Liquid–Liquid Microextraction for the Determination of BTEX in Water Samples. *Australian Journal of Chemistry*. 2014, **68**(3), 481-487. Dostupné z: doi:10.1071/CH14353
- 20 NOJAVAN, Saeed a Mina YAZDANPANAH. Micro-solid phase extraction of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes from aqueous solutions using water-insoluble -cyclodextrin polymer as sorbent. *Journal of Chromatography A*. 2017, **1525**, 2017. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2017.10.027 0021-9673
- 21 ANBIA, Mansoor a Sanaz IRANNEJAD. Modified SBA-15 mesoporous silica as a novel fiber coating in solid-phase microextraction and determination of BTEX compounds in water samples using gas chromatography-flame ionization detection. *Analytical Methods*. 2013, **5**(6), 1596-1603. Dostupné z: doi:10.1039/c3ay26379g
- 22 HU, Hongmei. Determination of benzene series compounds and chlorobenzenes in water sample by static headspace gas chromatography with flame ionization detection. *Journal of Separation Science*. 2015, **38**(11), 1916-1923. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201401434
- 23 BEIRANVAND, Mohammad. Determination of BTEX Compounds in Contaminated Water Using the Novel Vacuum-Assisted-Total Vaporization SPME Method and GO-APTES Fiber. *Journal of Chromatographic Science*. 2021, **60**(5), 486-492. Dostupné z: doi:10.1093/chromsci/bmab111
- 24 GHANI, Milad, Sayed Mehdi GHOREISHI a Saeed MASOUM. Highly porous nanostructured copper oxide foam fiber as a sorbent for head space solid-phase

- microextraction of BTEX from aqueous solutions. *Microchemical Journal*. 2019, **145**, 210-217. Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2018.10.036
- 25 SARAFRAZ-YAZDI, Ali a Hossein VATANI. A solid phase microextraction coating based on ionic liquid sol–gel technique for determination of benzene, toluene, ethylbenzene and o-xylene in water samples using gas chromatography flame ionization detector Author links open overlay panel. *Journal of Chromatography A*. 2013, **1300**, 104-111. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2013.03.039.
- 26 SARAJI, Mohammad et al. Highly porous nanostructured copper foam fiber impregnated with an organic solvent for headspace liquid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*. 2016, **1469**, 25-34. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2016.09.058
- 27 YOUSEFI, Seyedeh Mahboobeh et al. Enhanced headspace single drop microextraction method using deep eutectic solvent based magnetic bucky gels: Application to the determination of volatile aromatic hydrocarbons in water and urine samples. *Journal of Separation Science*. 2017, **41**(4), 966-974. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201700807
- 28 FARAJI, Hakim, Alireza FEIZBAKHSH a Masoumeh HELALIZADEH. *Modified dispersive liquid-liquid microextraction for pre-concentration of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes prior to their determination by GC*. 2013, **180**, 1141-1148. Dostupné z: doi:10.1007/s00604-013-1037-0
- 29 CARNEIRO, Patrícia M et al. Multivariate optimization of headspace-GC for the determination of monoaromatic compounds (benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes) in waters and wastewaters. *Journal of Separation Science*. 2013, **37**(3), 265-271. Dostupné z: doi:10.1002/jssc.201300668
- 30 PASCALE, Raffaella et al. Method development and optimization for the determination of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes in water at trace levels by static headspace extraction coupled to gas chromatography–barrier ionization discharge detection. *Journal of Chromatography A*. 2018, **1548**, 10-18. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2018.03.018 Get rights and content
- 31 NEVES FERNANDES, Andreia et al. Determination of Monoaromatic Hydrocarbons (BTEX) in Surface Waters from a Brazilian Subtropical Hydrographic Basin. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2014, **92**, 455-459. Dostupné z: doi:10.1007/s00128-014-1221-x

- 32 BEHZADI, Mansoureh a Mohammad MIRZAEI. Poly(o-anisidine)/graphene oxide nanosheets composite as a coating for the headspace solid-phase microextraction of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes. *Journal of Chromatography A*. 2016, **1443**, 35-42. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2016.03.039
- 33 FERNÁNDEZ, Elena, Lorena VIDAL a Antonio CANALS. Zeolite/iron oxide composite as sorbent for magnetic solid-phase extraction of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes from water samples prior to gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of chromatography A*. 2016, **1458**, 18-24. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2016.06.04
- 34 LIU, Xiwen. Sample bottle coated with sorbent as a novel solid-phase extraction device for rapid on-site detection of BTEX in water. *Analytica Chimica Acta*. 2021, **1151**, 338226. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2021.338226
- 35 LIU, Shuqin et al. Knitting aromatic polymers for efficient solid-phase microextraction of trace organic pollutants. *Journal of Chromatography A*. 2016, **1450**, 9-16. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2016.04.065
- 36 HORSTKOTTE, Burkhard, Manuel MIRÓ a Petr SOLICH. Where are modern flow techniques heading to?. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2018, **410**(25), 6361-6370. Dostupné z:doi:10.1007/s00216-018-1285-2
- 37 RUZICKA, Jarda, Petr CHOCHOLOUŠ a Graham MARSHALL. From continuous to programmable flow. *Advances in flow injection analysis* [online]. Česká republika: Farmaceutická fakulta, 2021 [cit. 2023-02-02]. Dostupné z: <https://portal.faf.cuni.cz/Flowtutorial/Methods/Introduction/From-continuous-to-programmable-flow/>
- 38 RUZICKA, Jarda a Petr CHOCHOLOUŠ. Flow Injection Techniques. *Advances in flow injection analysis* [online]. Česká republika: Farmaceutická fakulta, 2019 [cit. 2023-02-02]. Dostupné z: <https://www.flowinjectiontutorial.com/Theory%201.3.%20Flow%20Injection%20Techniques.html>
- 39 TROJANOWICZ, Marek a Kamila KOŁACIŃSKA. Recent advances in flow injection analysis. *Analyst*. 2016, **141**(7), 2085-2139. Dostupné z: doi:10.1039/C5AN02522B
- 40 ROCHA, Fábio R.P. a Elias A.G. ZAGATTO. Flow analysis during the 60 years of Talanta. *Talanta*. 2020, **206**. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2019.120185

- 41 ECONOMOU, A. Sequential-injection analysis (SIA): A useful tool for on-line samplehandling and pre-treatment. *Trends in Analytical Chemistry*. 2005, **24**(5), 416-425. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2004.12.004
- 42 RUZICKA, Jarda a Petr CHOCHOLOUŠ. Flow Injection Techniques. *Advances in flow injection analysis* [online]. Česká republika: Farmaceutická fakulta, 2019 [cit. 2023-02-02]. Dostupné z: <https://www.flowinjectiontutorial.com/Theory%200.1.3.%20Flow%20Injection%20Techniques.html>
- 43 McKELVIE, Ian D. Principles of Flow Injection Analysis. In: *Comprehensive Analytical Chemistry* [online]. Elsevier Science, 2008, s. 81-109 [cit. 2023-02-26]. ISBN 9780080932125.
- 44 RŮŽIČKA, Jaromír a Graham D. MARSHALL. Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. *Analytica Chimica Acta*. 1990, **237**, 329-343. Dostupné z: doi:10.1016/S0003-2670(00)83937-9
- 45 RUZICKA, Jarda a Petr CHOCHOLOUŠ. Configurations of SIA Systems. *Advances in flow injection analysis* [online]. Česká republika: Farmaceutická fakulta, 2019 [cit. 2023-02-02]. Dostupné z: <https://www.flowinjectiontutorial.com/Methods%202.1.4.%20Configurations%20of%20SIA%20Systems.html>
- 46 HORSTKOTTE, Burkhard a Petr SOLICH. The Automation Technique Lab-In-Syringe: A Practical Guide. *Molecules*. 2020, **25**(7), 1612. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25071612
- 47 CERDÀ, Víctor, Sergio L. C. FERREIRA a Piyawan PHANSI. Lab-in-Syringe, a Useful Technique for the Analysis and Detection of Pollutants of Emerging Concern in Environmental and Food Samples. *Molecules*. 2022, **27**(21), 7279. Dostupné z: doi:10.3390/molecules27217279
- 48 FERNANDO, Maya et al. Lab in a syringe: fully automated dispersive liquid-liquid microextraction with integrated spectrophotometric detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012, **404**, 909-917. Dostupné z: doi:10.1007/s00216-012-6159-4
- 49 MITANI, Constantina, Alexadra KOTZAMANIDOU a Aristidis N. ANTHEMIDIS. Automated headspace single-drop microextraction via a lab-in-syringe platform for mercury electrothermal atomic absorption spectrometric determination after in situ

- vapor generation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*. 2014, **29**, 1491-1498.
Dostupné z: doi:10.1039/C4JA00062E
- 50 YILDIRIM, Sercan et al. Lab-In-Syringe automation of deep eutectic solvent-based direct immersion single drop microextraction coupled online to high-performance liquid chromatography for the determination of fluoroquinolones. *Talanta*. 2022, **246**. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2022.123476
- 51 H ŠRÁMKOVÁ, Ivana et al. Direct-immersion single-drop microextraction and in-drop stirring microextraction for the determination of nanomolar concentrations of lead using automated Lab-In-Syringe technique. *Talanta*. 2018, **184**, 162-172. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2018.02.101
- 52 PENA-PEREIRA, Francisco, Isela LAVILLA a Carlos BENDICHO. Liquid-phase microextraction techniques within the framework of green chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2010, **29**(7), 617-628. Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2010.02.016
- 53 ŠRÁMKOVÁ, Ivana et al. A novel approach to Lab-In-Syringe Head-Space Single-Drop Microextraction and on-drop sensing of ammonia. *Analytica Chimica Acta*. 2016, **934**, 132-144. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2016.06.039
- 54 HARVEY, David. *Modern Analytical Chemistry*. United States of America: The McGraw-Hill Companies, 2000. ISBN 0-07-237547-7.
- 55 KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Druhé, upravené a doplněné vydání. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. ISBN 80-86369-07-2.
- 56 TURNER, Diane. Gas Chromatography – How a Gas Chromatography Machine Works, How To Read a Chromatograph and GCxGC. In: *Technology networks* [online]. United Kingdom: Technology Networks, 2021 [cit. 2022-10-11]. Dostupné z: <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/gas-chromatography-how-a-gas-chromatography-machine-works-how-to-read-a-chromatograph-and-gcxgc-335168>
- 57 ROOD, Dean. *The Troubleshooting and Maintenance Guide for Gas Chromatographers*. Fourth, Revised and Updated Edition. Weinheim (Germany): WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2007. ISBN 978-3-527-31373-0.
- 58 FAKHARI, Ali Reza et al. A simple and rapid method based on direct transfer of headspace vapor into the GC injector: application for determination of BTEX compounds in water and wastewater samples. *Analytical Methods*. 2012, **4**, 1996-2001. Dostupné z: doi:10.1039/C2AY05839A

- 59 SARAFRAZ-YAZDI, A, A.H. AMIRI a Z. ES'HAGHI. Separation and determination of benzene, toluene, ethylbenzene and o-xylene compounds in water using directly suspended droplet microextraction coupled with gas chromatography-flame ionization detector. *Talanta*. 2009, **78**(3), 936-941. Dostupné z: doi:10.1016/j.talanta.2008.12.069
- 60 MOSOTHO, George J., Ljiljana MARJANOVIC a D. Bradley G. WILLIAMS. Solvent-Assisted Headspace Sampling Using Solid Phase Microextraction for the Analysis of Phenols in Water. *Analytical Chemistry*. 2015, **87**(19), 9559-9562. Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.5b02539
- 61 SARAFRAZ-YAZDI, Ali, Seyed-Hadi KHALEGHI-MIRAN a Zarrin ES'HAGHI. Comparative study of direct immersion and headspace single drop microextraction techniques for BTEX determination in water samples using GC-FID. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 2010, **90**(14-15). Dostupné z: doi:10.1080/03067310902962593
- 62 DADFARNIA, Shayessteh a Ali Mohammad HAJI-SHABANI. Choice of Solvent in Liquid-Phase Microextraction. In: PEREIRA, Francisco Pena. *Miniaturization in Sample Preparation* [online]. Warsaw, Poland: De Gruyter Open Poland, 2014, s. 253-275 [cit. 2023-04-18]. ISBN 9783110410181. Dostupné z: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.2478/9783110410181.5/html?lang=en#Chicago>
- 63 PubChem Compound Summary for CID 6344, Methylene Chloride. *National Library of Medicine: National Center for Biotechnology Information* [online]. USA: Bethesda, 2004 [cit. 2023-05-06]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methylene-Chloride>

Zoznam obrázkov

Obrázok 1 Vzorec benzénu.....	9
Obrázok 2 Vzorec toluénu	10
Obrázok 3 Vzorec etylbenzénu.....	11
Obrázok 4 Vzorce izomérov xylénu (zľava o-xylén, m-xylén, p-xylén).....	12
Obrázok 5 Zjednodušená schéma prietokovej a sekvenčnej injekčnej analýzy	19
Obrázok 6 Schéma Lab-in-syringe	20
Obrázok 7 Orientácia upright (vľavo) a upside-down (vpravo)	21
Obrázok 8 Schéma plynového chromatografu.....	23
Obrázok 9 Schéma použitého Lab-in-syringe	30
Obrázok 10 A vialka, B autosampler.....	31
Obrázok 11 Držiak.....	31
Obrázok 12 3D tlačené prvky v reálnom zobrazení	32
Obrázok 13 Plynový chromatograf.....	34
Obrázok 14 A MgSO_4 a NaCl , B $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, C Na_2SO_4 ,	43

Zoznam tabuliek

Tabuľka 1 Vybrané fyzikálno-chemické vlastnosti benzénu.....	8
Tabuľka 2 Vybrané fyzikálno-chemické vlastnosti toluénu	9
Tabuľka 3 Vybrané fyzikálno-chemické vlastnosti etylbenzénu	10
Tabuľka 4 Vybrané fyzikálno-chemické vlastnosti xylénov	12
Tabuľka 5 Metódy stanovenia BTEX vo vzorkách vody	14
Tabuľka 6 Zloženie zásobného roztoku.....	28
Tabuľka 7 Zloženie pracovných roztokov	28
Tabuľka 8 Koncentrácie soľných roztokov	29
Tabuľka 9 Aspirácia roztokov pred extrakciou a extrakcia.....	33
Tabuľka 10 Program 1	36
Tabuľka 11 Program 2	38
Tabuľka 12 Program 3	39
Tabuľka 13 Výsledný program GC analýzy	40

Zoznam grafov

Graf 1 Teplotný gradient.....	35
Graf 2 Chromatografický záznam benzénu toluénu a benzínu.....	37
Graf 3 Výšky píkuv benzénu a toluénu v závislosti na t_0	38
Graf 4 Chromatografické záznamy (optimalizácia T2)	39
Graf 5 Benzén vo vyššej a nižšej koncentrácií	40
Graf 6 Chromatogram za výsledných podmienok	41
Graf 7 Dynamika extrakcie.....	45
Graf 8 Efektivita extrakcie po 14 minútach.....	45
Graf 9 Charakteristický čas.....	46

Priloha A

Syringe pump head valve; port IN: Selection valve, OUT: Waste and Air, UP: GC Selection valve; Port 1: Air, 2: Water, 3: Cleaning solvent, 4: Buffer, 5: Internal standard, 6: Sample, 7: Extraction solvent, 8: Closed

```
Syringe_pump.relay(1,0)
Syringe_pump.relay(3,0)

OptionEmptyInterface = 0
OptionCleanOneTube = 0
OptionCleanAllTubes = 0
OptionCleanSyringe = 0
OptionCleanInterface = 0
OptionExtraction = 1

# Empty syringe pump to waste
Syringe_pump.valve_out()
Syringe_pump.set_speed_uL_min(30000)
Syringe_pump.dispense_uL()
Wait(1)

If(OptionEmptyInterface == 1)
Routine_call("Empty_GC_vial")
If_end()

# Clean tubes
If(OptionCleanAllTubes == 1)
CleanVol = 400
CleanTimes = 1
PosClean = 4
Routine_call("Clean_Channel")
PosClean = 5
Routine_call("Clean_Channel")
PosClean = 6
Routine_call("Clean_Channel")
PosClean = 7
# Routine_call("Clean_Channel")
PosValve = 3
CleanVol = 500
CleanTimes = 1
Routine_call("Clean_Syringe")
PosValve = 2
CleanVol = 800
CleanTimes = 2
Routine_call("Clean_Syringe")
If_end()
```

```
# CleanChannel
If(OptionCleanOneTube == 1)
CleanVol = 600
PosClean = Wait("Which position?")
Routine_call("Clean_Channel")
If_end()
```

```
# Cleaning of Interface
If(OptionCleanInterface == 1)
# Clean syringe with MeOH
Routine_call("Empty_GC_vial")
Loop(2)
PosValve = 3
CleanVol = 500
CleanTimes = 1
Routine_call("Clean_Syringe")
Routine_call("Fill_GC_vial")
Routine_call("Empty_GC_vial")
Routine_call("Clean_Syringe")
Loop_end()
If_end()
```

```
# Cleaning of Syringe
If(OptionCleanSyringe == 1)
# Clean syringe with MeOH
PosValve = Wait("Which position?")
CleanVol = Wait("Which volume?")
CleanTimes = Wait("How often?")
Routine_call("Clean_Syringe")
If_end()
```

METHOD FOR SDME

```
If(OptionExtraction == 1)
tExtract = 840
tWait =
VolSalt = 0
VolSample = 3400
Loop(3)
```

Initial cleaning of syringe

```
PosValve = 3
CleanVol = 500
CleanTimes = 1
Routine_call("Clean_Syringe")
PosValve = 2
CleanVol = 800
CleanTimes = 2
Routine_call("Clean_Syringe")
```

```

# Aspiration of salt solution
# Syringe_pump.set_speed_uL_min(10000)
# Selection_valve.position(4)
# Syringe_pump.aspirate_uL(VolSalt)
# Wait(2)

# Aspiration of IS
# Selection_valve.position(5)
# Syringe_pump.set_speed_uL_min(10000)
# Syringe_pump.aspirate_uL(100)
# Wait(2)
# Syringe_pump.relay(1,1)

# Aspiration of Sample
Syringe_pump.set_speed_uL_min(25000)
Selection_valve.position(6)
Syringe_pump.aspirate_uL(VolSample)
Beep()
Wait(5)

# Deactivation of stirring before aspiration of extraction solvent
Syringe_pump.relay(1,0)
Syringe_pump.valve_out()
Wait(1)

# Aspiration of Extraction Solvent
Syringe_pump.valve_in()
Syringe_pump.set_speed_uL_min(6000)
Selection_valve.position(7)
Wait(0.5)
Syringe_pump.aspirate_uL(180)
Wait(1)

# Aspiration of Water
Selection_valve.position(2)
Wait(0.5)
Syringe_pump.aspirate_uL(100)
Wait(1)

# Changing valve to closed position
Selection_valve.position(8)
Wait(1)

# Activation of stirring and extraction
Syringe_pump.relay(1,1)
Wait(tExtract)
Syringe_pump.relay(1,0)
Wait(5)
Syringe_pump.aspirate_uL(180)
Wait(1)
Syringe_pump.valve_up() # Let the drop escape
Wait(2)

```

```

# Discharge remains of solution
Syringe_pump.valve_out()
Syringe_pump.set_speed_uL_min(30000)
Syringe_pump.dispense_uL()
Wait(1)
PosValve = 2
CleanVol = 1500
CleanTimes = 1
Routine_call("Clean_Syringe")
Wait(0.5)

# Re-Aspiration of drop
Syringe_pump.valve_up()
Syringe_pump.aspirate_uL(tExtract)
Wait(5)

# Push drop into GC vial
Syringe_pump.dispense_uL(260)
Wait(2)
Syringe_pump.relay(3,1)
Wait(.3)
Syringe_pump.relay(3,0)
Wait(60)

# Cleaning of GC vial
Routine_call("Empty_GC_vial")
# Clean syringe with MeOH
PosValve = 3
CleanVol = 500
CleanTimes = 1
Routine_call("Clean_Syringe")
Routine_call("Fill_GC_vial")
Routine_call("Empty_GC_vial")
Routine_call("Clean_Syringe")

# Wait for GC to be so much advanced that we can restart method
Wait(tWait)
Loop_end()
If_end()

# ROUTINES
Routine_define("Clean_Syringe")
Syringe_pump.set_speed_uL_min(30000)
Loop(CleanTimes)
# Aspiration of cleaning solution
Selection_valve.position(PosValve)
Syringe_pump.valve_in()
Syringe_pump.aspirate_uL(CleanVol)
Syringe_pump.relay(1,1)
Wait(1)
# Aspiration of air

```

```
Selection_valve.position(1)
Syringe_pump.aspirate_uL(500)
Wait(0.5)
# Discharge to cleaning solution to waste
Syringe_pump.relay(1,0)
Wait(1)
Syringe_pump.valve_out()
Syringe_pump.dispense_uL()
Loop_end()
Routine_end()
```

```
Routine_define("Empty_GC_vial")
# Empty GC vial
Syringe_pump.set_speed_uL_min(30000)
Syringe_pump.valve_up()
Syringe_pump.aspirate_uL(2000)
Wait(1)
# Discharge remains of solution
Syringe_pump.valve_out()
Syringe_pump.dispense_uL()
Routine_end()
```

```
Routine_define("Fill_GC_vial")
# Aspiration of solution
Syringe_pump.set_speed_uL_min(30000)
Selection_valve.position(3)
Syringe_pump.valve_in()
Syringe_pump.aspirate_uL(250)
Wait(1)
# Aspiration of air to empty holding coil
Selection_valve.position(1)
Syringe_pump.aspirate_uL(125)
Wait(0.5)
# Dispense of solution into GC line
Syringe_pump.valve_up()
Syringe_pump.dispense_uL(375)
Wait(3)
Routine_end()
```

```
Routine_define("Clean_Channel")
# Aspiration of water
Syringe_pump.relay(1,1)
Syringe_pump.set_speed_uL_min(20000)
Selection_valve.position(PosClean)
Syringe_pump.valve_in()
Syringe_pump.aspirate_uL(CleanVol)
Wait(1)
# Aspiration of air to empty holding coil
Selection_valve.position(1)
Syringe_pump.aspirate_uL(100)
Wait(1)
```



```
# Empty syringe to waste  
Syringe_pump.relay(1,0)  
Wait(1)  
Syringe_pump.valve_out()  
Syringe_pump.dispense_uL()  
Routine_end()
```