

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Analytická chemie



**Mgr. Miroslava Bursová**

Moderní mikroextrakční techniky pro analýzy plynovou chromatografií  
*Modern microextraction techniques for gas chromatographic analysis*

Disertační práce

Vedoucí závěrečné práce: doc. RNDr. Radomír Čabala, Dr.

Praha, 2018

Disertační práce shrnuje výsledky získané v letech 2009-2018 během doktorského studia na Katedře analytické chemie, Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze, 18. 6. 2018

Mgr. Miroslava Bursová

# Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala panu doc. RNDr. Radomíru Čabalovi, Dr. za velkou trpělivost a rady poskytnuté během celého doktorského studia a při vypracování této disertační práce.

Ráda bych také poděkovala mé rodině za podporu poskytovanou během celého studia.

Disertační práce vznikla díky finanční podpoře z Grantové Agentury Univerzity Karlovy v Praze (číslo projektu: 21210) a podpoře z výzkumných projektů Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky a Univerzitě Karlově (Specifický vysokoškolský výzkum, SVV).

# Prohlášení o spoluautorství

Jako zástupce spoluautorů prohlašuji, že Mgr. Miroslava Bursová se podílela na níže uvedených publikovaných pracích měrou uvedenou v závorkách.

Univerzita Karlova. Vírový extrakční přípravek pro mikroextrakci kapaliny kapalinou. Česká republika. Původci: Radomír Čabala a Miroslava Bursová. Patentový spis CZ 302 841 B6. 7. 12. 2011.

(podíl: 50 %)

Čabala, R.; Bursová, M.: Bell-shaped extraction device assisted liquid – liquid microextraction technique and its optimization using response-surface methodology.

*Journal of Chromatography A* **1230**, 24–29 (2012).

(podíl: 50 %)

Krejčová, M.; Dejmková, H.; Bursová, M.: Optimalizace podmínek chromatografického stanovení aromatických aminů s elektrochemickou detekcí. *Chemické listy* **108**, 229-232 (2014).

(podíl: 15 %)

.....  
doc. RNDr. Radomír Čabala, Dr.



## Abstrakt

Předkládaná disertační práce se věnuje vývoji, optimalizaci, testování a praktickému použití nové mikroextrakční metody s názvem Mikroextrakce kapaliny kapalinou pomocí extrakčního přípravku ve tvaru zvonu (Bell Shaped Extraction Device Assisted Liquid-Liquid Microextraction, BSED-LLME). Podstatou metody je použití miniaturní extrakční pomůcky tvarované do formy zvonu, ve které probíhá vlastní extrakce, díky tomu dochází jen k minimálním ztrátám rozpouštědla, navíc BSED umožňuje reprodukovatelné dávkování a odběr malého objemu extrakčního rozpouštědla. BSED-LLME metoda byla použita pro prekoncentraci vybraných těkavých i méně těkavých analytů z vodných vzorků do organického rozpouštědla, které musí mít hustotu nižší než voda. Po extrakci byly analyty stanoveny metodami rychlé plynové chromatografie s plamenově ionizační detekcí a plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí.

Ke zjištění optimálních extrakčních podmínek pro BSED-LLME metodu byly použity multifaktorové statistické metody označované jako experimentální design (DOE). Princip DOE je založen na hledání matematického popisu systému a predikci optimálního nastavení experimentálních parametrů, které mohou ovlivnit účinnost extrakce. Byly testovány faktory jako doba extrakce, objem extrakčního činidla, přírůstek chloridu sodného (iontová síla), rychlost míchání a průměr extrakční nádoby apod., přičemž jako podstatné se ukázaly doba extrakce, rychlost míchání, objem extrakčního činidla jejichž hodnoty byly optimalizovány.

Pro soubor vybraných analytů byly určeny obohacující faktory (EF) extrakce, instrumentální limity stanovení (ILOQ) a limity stanovení metody (MLOQ). Hodnoty EF se pohybovaly v rozmezí od 5 do 138 s opakovatelností do 15 % a limity stanovitelnosti metody BSED-LLME byly zjištěny v rozmezí od 0,3 do 11,0 ng ml<sup>-1</sup>. Technika BSED-LLME byla testována na vzorcích říčních a minerálních vod.

Nová mikroextrakční metoda BSED-LLME se ukázala jako jednodušší, rychlejší, ekologičtější a levnější alternativou k již používaným extrakčním metodám, jako jsou extrakce na pevné fázi (SPE), mikroextrakce kapaliny kapalinou (LLME), nebo mikroextrakce na pevné fázi (SPME) pro stanovení organických sloučenin ve vodných vzorcích.

Mikroextrakční metoda BSED-LLME byla v roce 2011 uznána Úřadem průmyslového vlastnictví jako patent č. 302841.

## Abstract

The submitted thesis is focused on the development, optimization, testing and practical application of the new microextraction method called Bell Shaped Extraction Device assisted Liquid-Liquid Microextraction (BSED-LLME).

The method is based on the application of a miniature bell-shaped extraction tool in which the extraction takes place, so that only minimal solvent losses can occur, and which allows a reproducible dosing and collection of a small volume of the extraction solvent. The BSED-LLME method was used to preconcentrate selected volatile and less volatile analytes from aqueous samples into organic solvents of a density lower than water. After the extraction, the analytes were determined by fast gas chromatography with flame ionization detection and gas chromatography with mass spectrometry.

The statistical methods known as Design of Experiment (DOE) were used for determination of the optimal extraction conditions for BSED-LLME procedure. DOE is based on a mathematical description of the system and the prediction of the optimal setting of experimental parameters that may influence extraction efficiency. Factors such as extraction time, volume of extraction solvent, addition of sodium chloride (ionic strength), stirring rate and the diameter of the extraction vessel ect., have been tested. The statistical significant factors have been optimized.

Enriched Factors (EF), instrumental limits of quantification (ILOQ) and method limits of quantification (MLOQ) were determined for a set of selected analytes. EF values ranged from 5 to 138 with a repeatability of up to 15%, and Method limits of quantification (MLOQ) were found in range from 0.3 to 11.0 ng ml<sup>-1</sup>. The BSED-LLME technique has been tested on river and mineral water samples.

The new BSED-LLME microextraction method has proven to be a simpler, faster, more environmentally friendly and cheaper alternative to extraction methods, such as solid phase extraction (SPE), liquid-liquid microextraction (LLME) or solid phase microextraction (SPME) for extraction of organic compounds from aqueous samples. Industrial Property Office in Czech Republic has patented BSED-LLME method for commercial applications (Patent n. 302841) in 2011.

## **Předmětová hesla**

Analytická chemie

Chemometrie

Mikroextrakce

Plynová chromatografie

## **Klíčová slova**

Mikroextrakce kapaliny kapalinou

Experimentální design

Mikroextrakce kapaliny kapalinou pomocí přípravku ve tvaru zvonu

## **Subject words**

Analytical Chemistry

Chemometry

Microextraction

Gas chromatography

## **Key words**

Liquid liquid microextraction

Experimental design

Bell shaped extraction device assisted liquid-liquid microextraction

## Seznam zkratk a symbolů

$\alpha$	axiální bod
$\beta$	koeficient
A	anilin
ANOVA	Analysis of Variance, analýza rozptylu
$a_{(X_{aq})}$	aktivita extrahované látky X ve vodném vzorku
$a_{(X_{org})}$	aktivita extrahované látky X v organické fázi
BSED-LLME	Bell-shaped Extraction Device Assisted Liquid Liquid Microextraction, Mikroextrakce kapaliny kapalinou pomocí extrakčního nástavce ve tvaru zvonu
$c_{aq}$	celková koncentrace látky ve vodném vzorku
$c_i$	koncentrace analytu ve vodném vzorku před extrakcí
$c_{org}$	celková koncentrace látky v organické fázi
$c_{aq,eq} = X_{aq}$	rovnovážná koncentrace ve vodném vzorku
$c_{org,eq} = X_{org}$	rovnovážná koncentrace v organické fázi
CE	Capillary Electrophoresis, kapilární elektroforéza
CCD	Central Composite Design
CFME	Continuous Flow Microextraction, mikroextrakce za konstatního toku
D	koncentrační rozdělovací poměr
DD	Drop to Drop Microextraction
DI	Direct Immersion, přímé ponoření
DLLME	Dispersive Liquid Liquid Microextraction, disperzní mikroextrakce kapaliny kapalinou
DOE	Design of Experiment, experimentální design
DSDME	Directly Suspended Droplet Microextraction
EA	2-ethylanilin
ED	elektrochemický detektor
EF	Enrichment Factor, obohacující faktor
EI	Electron Ionization, elektronová ionizace
eV	elektronvolt
FID	Flame Ionization Detector, plamenově ionizační detektor
GC	Gas Chromatography, plynová chromatografie
GLM-ANOVA	General Analysis of Variance
HF	Hollow Fiber, duté vlákno

HF LLME	Hollow Fiber Liquid Liquid Microextraction,
HFH-LLLME	Hollow Fiber-Protected Ionic Liquid-Liquid-Liquid Microextraction
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography, kapalinová chromatografie
HS	headspace
HSSE	High-Capacity Headspace Sorptive Extraction
ID	vnitřní průměr
ILOD	Instrument Limit of Detection, limit detekce přístroje
ILOQ	Instrument Limit of Quantification, limit stanovitelnosti přístroje
INCAT	Inside Needle Capillary Absorption Trap
$\kappa$	rozdělovací konstanta
$K_D^0$	termodynamická rozdělovací konstanta
LLE	Liquid Liquid Extraction, extrakce kapaliny kapalinou
LLME	Liquid Liquid Microextraction, mikroextrakce kapaliny kapalinou
LLLME	Liquid Liquid Liquid Microextraction
LPME	Liquid Phase Microextraction, mikroextrakce kapalnou fází
MASE	Membrane Assisted Solvent Extraction
MEPS	Microextraction by Packed Sorbent
MLOD	Method Limit of Detection, limit detekce mikroextrační metody
MLOQ	Method Limit of Quantification, limit stanovitelnosti mikroextrační metody
MS	Mass Spectrometry, hmotnostní spektrometrie
NCSS	komerční název statistického programu
NIST	National Institute of Standards and Technology, databáze
NT	Needle Trap
OFAT	One Factor At a Time, druh optimalizace
PDMS	Polydimethylsiloxan
RHF-LPME	Revolving Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction
Rpm	Rotation per Minute, počet otáček za minutu
RSD	Relative Standard Deviation, relativní směrodatná odchylka
RSM	Response Surface Methodology, metodologie odezvové plochy
S/N	Signal/Noise ratio, poměr signál/šum
SBSE	Stir Bar Sorptive Extraction
SDME	Single Drop Microextraction, mikroextrakce na jedné kapce
SDLPME	Solid Drop Liquid Phase Microextraction
SIM	Single Ion Monitoring, druh hmotnostní detekce
SPE	Solid phase extraction, extrakce na pevné fázi

SPME	Solid phase microextraction, mikroextrakce na tuhé fázi
T	o-toluidin
TBAC	Terciální butanol
USAE	Ultrasound Assisted Emulsification Microextraction
VALLME	Vortex-Assisted Liquid–Liquid Microextraction
1-AN	1-Aminonaftalen
2-AA	2-Aminoantracen
2-AB	2-Aminobifenyl
2-AF	2-Aminofluoren
2-AN	2-Aminonaftalen
2-NA	2-Nitroanilin
4-AB	2-Aminobifenyl

# Obsah

Abstrakt.....	5
Abstract.....	6
Seznam zkratk a symbolů.....	8
1. Úvod.....	13
2. Teoretický základ.....	15
2.1. Názvosloví, terminologie.....	15
2.2. Příprava vzorků.....	15
2.3. Teorie extrakčních metod.....	16
2.4. Mikroextrakce.....	17
2.4.1. Rozdělení mikroextrakčních metod.....	18
2.4.1.1. Mikroextrakce na jedné kapce.....	19
2.4.1.2. Membránová mikroextrakce.....	21
2.4.1.3. Mikroextrakce založené na kvazi-homogenním systému více kapalin.....	22
2.4.1.4. Mikroextrakční metody bez použití rozpouštědel.....	23
2.5. Výpočet limitů detekce a stanovitelnosti.....	25
2.6. Optimalizace – Experimentální design.....	27
2.6.1. Terminologie DOE.....	27
2.6.2. Experimentální design.....	29
2.6.3. Optimalizace.....	35
2.7. Rychlá plynová chromatografie.....	36
3. Cíl práce.....	37
4. Experimentální část.....	38
4.1. Chemikálie, rozpouštědla a příprava zásobních roztoků.....	38
4.2. Reálné vzorky.....	39
4.3. Instrumentace.....	39
4.4. Statistický software.....	41
4.5. Postup mikroextrakce metodou BSED-LLME.....	42
5. Výsledky a diskuse.....	44
5.1. Vývoj nástavce pro BSED-LLME metodu.....	44
5.2. Stanovení modelové skupiny těkavých látek metodou BSED-LLME spojenou s rychlou plynovou chromatografií.....	48
5.2.1. Experimentální design.....	49
5.2.2. Validace metody.....	60

5.3. Stanovení modelové skupiny analytů metodou BSED-LLME s GC-MS pomocí extrakčních rozpouštědel heptanu a terciálního butylacetátu.....	64
5.3.1. Optimalizace podmínek extrakce.....	64
5.3.1.1. Optimalizace metody BSED-LLME pro TBAC.....	67
5.3.1.2. Optimalizace metody BSED-LLME pro heptan.....	71
5.3.2. Validace metody BSED-LLME pro heptan a TBAC.....	75
5.3.3. Analýza reálných vzorků.....	76
5.3.4. Porovnání BSED-LLME s jinými mikroextrakčními metodami.....	77
5.4. Stanovení aromatických aminů ve vodných vzorcích metodou BSED-LLME spojenou s GC-MS.....	80
5.4.1. Optimalizace extrakčních podmínek BSED-LLME metody.....	80
5.4.2. Validace metody.....	88
5.4.3. Analýza říční vody.....	89
5.4.4. Porovnání metody BSED-LLME s jinými metodami.....	92
6. Shrnutí.....	94
7. Použitá literatura.....	95
8. Seznam příloh.....	112

#### Příloha 1.

Seznam publikací, prezentací, abstraktů a plakátových sdělení

#### Příloha 2.

Univerzita Karlova. Vírový extrakční přípravek pro mikroextrakci kapaliny kapalinou. Česká republika. Původci: Radomír Čabala a Miroslava Bursová. Patentový spis CZ 302 841 B6. 7. 12. 2011.

#### Příloha 3.

Čabala, R.; Bursová, M.: Bell-shaped extraction device assisted liquid-liquid microextraction technique and its optimization using response-surface methodology. *Journal of Chromatography A* **1230**, 24-29 (2012).

#### Příloha 4.

Krejčová, M.; Dejmková, H.; Bursová, M.: Optimalizace podmínek chromatografického stanovení aromatických aminů s elektrochemickou detekcí. *Chemické listy* **108**, 229-232 (2014).



# 1. Úvod

Disertační práce je zaměřena na rychle se rozvíjející oblast prekoncentračních a mikroextrakčních metod a jejich možné využití při úpravě vzorků pro analytické účely. Navzdory velkým pokrokům v oblasti analytických instrumentálních metod, nelze většinu analytů stanovit přímo v přítomnosti matrice, a proto je nutné provést separaci analytu ze vzorku. Při stopové analýze organických směsí tento krok zahrnuje nejčastěji extrakce, jež by měla selektivně izolovat sloučeniny z matrice. Koncentrace cílových analytů se tím zvýší a přítomnost nežádoucích složek matrice je redukována. V posledních letech se výzkum zaměřil na miniaturizaci tradiční metody extrakce kapaliny kapalinou (LLE), kdy dochází k přechodu analytu mezi dvěma nemísitelnými fázemi na základě rozdělovací rovnováhy. Klasický postup LLE je jednoduchý, ale časově náročný a pro jeho provedení jsou často třeba velké objemy organických rozpouštědel, které mohou neúměrně zatěžovat životní prostředí. Proto byly vyvinuty nové postupy zakoncentrování analytů označované souhrnně jako mikroextrakční metody. Nové přístupy potřebují mnohonásobně nižší objemy extrakčních rozpouštědel, čímž se mikroextrakční techniky řadí do oblasti tzv. „zelené analytické chemie“<sup>1,2</sup>.

Hlavním cílem disertační práce je vývoj, optimalizace a testování nové mikroextrakční metody s názvem mikroextrakce kapaliny kapalinou pomocí přípravku ve tvaru zvonu (Bell-Shaped Extraction Device Assisted Liquid Liquid Microextraction, BSED-LLME). Nová mikroextrakční metoda je založena na dávkování velmi malého objemu extrakčního rozpouštědla k vodnému vzorku (poměr řádově desítky až stovky mikrolitrů rozpouštědla k desítkám mililitrů vzorku). Dávkování a vlastní extrakce je provedena s použitím speciálního plastového nástavce ve tvaru zvonu (BSED), který umožňuje použít poměrně vysoké intenzity míchání a reprodukovatelný, téměř bezztrátový odběr rozpouštědla po skončení extrakce. Důležitou podmínkou je výběr rozpouštědla o menší hustotě než má voda. Možnost relativně širokého výběru rozpouštědel přináší velkou flexibilitu v kroku úpravy vzorku a umožňuje tak snadné přizpůsobení extrakce vlastnostem stanovovaných analytů. Během extrakce je rozpouštědlo díky intenzivnímu míchání v nástavci rozprostřeno do velkého povrchu, což značně urychlí extrakci.

Podstatou metody BSED je vytvoření víru na hladině kapalného vzorku pro extrakci vodných vzorků malým množstvím kapaliny, která má nižší hustotu než voda a je nemísitelná s vodou, za použití míchání během extrakce.

Předkládaná disertační práce se věnuje také praktickému použití statistických metod označovaných jako experimentální design (Design of Experiment, DOE) pro hledání optimálních experimentálních podmínek nové mikroextrakční metody<sup>3</sup>.

Nejjednodušším a nejčastěji používaným experimentálním designem je One Factor at a Time (OFAT), který označuje optimalizaci, při které se mění pouze jeden experimentální parametr, zatímco ostatní zůstávají konstantní. Cílem je zjistit, jaký vliv má tento parametr na výsledek (odpověď), aniž by byly zahrnuty vlivy ostatních parametrů, čímž se OFAT optimalizace stává finančně a časově náročná. Proto se v posledních několika letech začaly používat složitější experimentální designy, které jsou založeny na efektivním navrhování experimentů, z nichž lze získat objektivní a ucelené závěry o sledovaných veličinách. Hlavní podstatou experimentálního designu je zjištění, které parametry mají na zkoumanou odpověď statisticky významný vliv a nalezení konkrétních hodnot zkoumaných parametrů pro získání optimální odpovědi. Vyjádřením experimentálního designu je tedy matematická funkce, která poskytuje ucelené informace o zkoumaném systému.

## 2. Teoretický základ

### 2.1. Názvosloví, terminologie

Z důvodu neexistujícího, nepřesně popisujícího nebo neustáleného českého názvosloví týkajícího se mikroextrakčních metod a chemometrických pojmů bylo v disertační práci zachováno původní anglické názvosloví uvedené ve zdrojové literatuře. Z tohoto důvodu nemusí odpovídat aktuálním doporučením pro tvorbu názvů.

### 2.2. Příprava vzorků

Příprava vzorků je považována za nejdůležitější a ve většině případů i nejpomalejší krok v celém postupu chemické analýzy. Při přípravě je nezbytné extrahovat, izolovat a zakoncentrovat zkoumaný analyt z původní matrice do vhodného rozpouštědla a následně stanovit pomocí instrumentálního zařízení. Mnoho let byla příprava vzorku založena převážně na extrakci kapaliny kapalinou (liquid-liquid extraction, LLE), extrakci tuhou fází (solid phase extraction, SPE) pro kapalně vzorky, Soxhletovou extrakci pro pevné vzorky a adsorpcí do kapaliny nebo na povrch sorbentu pro plynné vzorky. Tyto prekoncentrační postupy jsou obvykle časově a ekonomicky náročné. Na jejich činnost je třeba použít nemalé objemy vzorků a organických rozpouštědel, která jsou často toxická a mohou poškodit životní prostředí<sup>4,5</sup>.

Extrakce je dělicí proces, při kterém jsou v kontaktu dvě vzájemně nemísitelné fáze, které mohou být i různého skupenství. Analyty se mezi tyto fáze dělí na základě různé afinity (rozdílné rozdělovací koeficienty) k použité extrakční fázi. Čímž větší je rozdíl v afinitě látek, tím dokonalejší je jejich vzájemné oddělení. V průběhu extrakce může docházet nejen k separaci, ale i k zakoncentrování analytu z velkého objemu vzorku do malého objemu kontaktní fáze (extrakční činidlo). Cílem extrakce je selektivní oddělení analytu od ostatních složek či oddělení rušivých látek od analytu. Extrakce kapaliny do kapaliny (LLE) stále patří mezi standardní analytické separační metody a umožňuje mnoho jednoduchých a rychlých dělení různých látek v širokém rozmezí koncentrací. I když LLE nabízí vysokou reprodukovatelnost, je považována za časově a finančně nákladnou metodu, kterou lze obtížně automatizovat. LLE vyžaduje velké objemy extrakčních rozpouštědel o vysoké čistotě, která jsou drahá a často toxická. Potřeba překonat uvedené nevýhody vedla k vývoji nových metod pro rychlou a efektivní přípravu vzorků pro analytické účely.

### 2.3. Teorie extrakčních metod

Základní princip extrakce je založen na přechodu rozpuštěné látky z jedné fáze do druhé, během něhož je dosaženo rovnováhy a poměr aktivit látky v obou fázích je konstantní při dané teplotě. Tento proces popisuje Nernstův rozdělovací zákon (1)<sup>6</sup>:

$$K_D^0 = \frac{a_{(X_{org})}}{a_{(X_{aq})}} \quad (1)$$

kde  $K_D^0$  označuje termodynamickou rozdělovací konstantu,  $a_{(X_{org})}$  aktivitu extrahované látky X v organické fázi a  $a_{(X_{aq})}$  aktivitu extrahované látky X ve vodném vzorku. Jestliže je roztok dostatečně zředěný, tak je možné aktivity zaměnit za rovnovážné koncentrace v jednotlivých fázích ( $X_{org}$  nebo  $c_{org,eq}$  a  $X_{aq}$  nebo  $c_{aq,eq}$ ) (2):

$$K = \frac{[X_{org}]}{[X_{aq}]} = \frac{c_{org,eq}}{c_{aq,eq}} \quad (2)$$

kde  $\kappa$  označuje koncentrační rozdělovací konstantu. Koncentrační rozdělovací poměr  $D$  se vypočítá jako poměr celkových koncentrací látky ( $c_{org}$  nebo  $c_{aq}$ ) ve všech jejích formách, ve kterých se vyskytuje v jednotlivých fázích (3):

$$D = \frac{c_{org}}{c_{aq}} \quad (3)$$

Při ideálních podmínkách, kdy extrahovaná látka nereaguje se žádnou složkou obsaženou v rozpouštědle nebo vodném vzorku, lze koncentračním rozdělovacím poměrem nahradit koncentrační rozdělovací konstantu<sup>6</sup>.

Obohacující (prekoncentrační) faktor (enrichment factor, EF)<sup>7</sup> je definován jako (4):

$$EF = \frac{c_{org}}{c_i} \quad (4)$$

kde  $c_{org}$  je koncentrace analytu v organickém rozpouštědle po provedení extrakce a  $c_i$  je koncentrace analytu ve vodném vzorku před extrakcí

Obohacující faktor (EF) udává míru, s jakou byl analyt zkoncentrován do organické fáze a je tak měřítkem účinnosti metody.

## 2.4. Mikroextrakce

Podle jedné z definic je mikroextrakce technika, při které je objem extrakční fáze velmi malý ve vztahu k objemu vzorku a extrakce analytů není tudíž „vyčerpávající“<sup>8</sup> tj. množství analytu přešlého do extrakční fáze je ve srovnání s jeho celkovým množstvím ve vzorku malé až zanedbatelné.

Mikroextrakční metody většinou poskytují vyšší prekoncentrační faktory, jsou rychlejší a mnohem levnější než klasické extrakční postupy. Hlavním účelem nových metod je snížení spotřeby organických rozpouštědel a zlepšení možností detekce a stanovení analytů v nízkých koncentracích, jelikož pro prekoncentraci jsou třeba malé (či žádné) objemy extrakčních rozpouštědel. Důraz je rovněž kladen na možnosti miniaturizace a automatizace.

První úspěšně používanou mikroextrakční metodou se stala mikroextrakce tuhou fází (Solid Phase Microextraction, SPME)<sup>9</sup>, která byla poprvé uvedena r. 1990. Princip SPME metody je založen na sorpci analytů ze vzorku do stacionární fáze, umístěné na povrchu křemenného vlákna v SPME držáku.

Celý proces je dvoustupňový, kdy dochází nejprve k rozdělení analytu mezi vzorkem a stacionární fází. Druhým krokem je desorpce analytu z vlákna do měřicího zařízení.

Výhodami SPME jsou snadná manipulace, rychlost extrakce a možnost automatizace. SPME je velmi citlivá metoda a vhodná pro stanovení polárních i nepolárních sloučenin z různých druhů matic. Nevýhodami metody jsou vysoká cena komerčně dostupných sorbentů, velká křehkost vláken a poměrně úzký výběr stacionárních fází.

Mimo jiné i na základě těchto nedostatků začal vývoj dalších typů prekoncentračních technik souhrnně nazývaných mikroextrakce kapaliny kapalinou (Liquid Liquid Microextraction, Liquid Phase Microextraction, LLME, LPME)<sup>10</sup>.

Jejich největší předností oproti SPME je široký výběr extrakčních rozpouštědel, která lze zvolit a kombinovat dle specifických chemických a fyzikálních vlastností stanovovaných analytů. Techniky LLME je možné propojit se separačními (plynová a kapalinová chromatografie<sup>11</sup>, kapilární elektroforéza<sup>12</sup>), ale i s elektrochemickými<sup>13</sup> či optickými<sup>14</sup> metodami.

V následujícím textu je uveden stručný přehled a klasifikace metod LLME, který má objasnit principy těchto metod, protože ty byly výchozím bodem pro vlastní vývoj, optimalizaci a aplikaci nové mikroextrakční metody.

#### **2.4.1. Rozdělení mikroextrakčních metod**

Mikroextrakční techniky lze rozdělit podle provedení extrakce na čtyři hlavní skupiny: (1) mikroextrakce na jedné kapce<sup>10,15</sup>, (2) membránové mikroextrakce<sup>16</sup>, (3) mikroextrakce založené na kvazi-homogenním systému více kapalin a (4) mikroextrakce bez použití rozpouštědel<sup>17</sup>.

Mikroextrakce kapaliny kapalinou (LLME) lze rovněž rozdělit podle typu vzorkování na dvoufázové a třífázové. Ve dvoufázovém uspořádání je analyt extrahován z vodného vzorku (donorová fáze) přímo do organického rozpouštědla. Dvoufázové LPME metody mohou být použity pro středně polární a nepolární analyty. Hlavním požadavkem pro úspěšné použití dvoufázových mikroextrakčních metod je nerozpustnost (nemísitelnost) extrakčního rozpouštědla ve vodných vzorcích. V třífázovém módu je analyt extrahován z vodného vzorku (donorová fáze) do organického rozpouštědla a následně je analyt znovu extrahován do jiného rozpouštědla (akceptorová fáze)<sup>18</sup>.

Mikroextrakční metody se dají rovněž rozdělit podle typu odběru, tedy headspace, kdy dochází k extrakci z plynné fáze nad vzorkem, nebo přímé ponoření (direct immersion), je-li extrakční rozpouštědlo v přímém kontaktu se vzorkem<sup>19</sup>.

Pro snadnější přechod analytů mezi jednotlivými fázemi jsou používány různé typy míchání či zahřívání vzorků jako jsou např. míchání pomocí magnetického míchadla, ultrazvuku, třepačky či zahřátí pomocí mikrovlnného záření<sup>20</sup>.

Rozdělení a názvosloví u mikroextrakčních metod je v současné době problematické, protože jednotlivé metody mezi sebou prolínají a dají se různým způsobem modifikovat a kombinovat<sup>21</sup>.

#### **2.4.1.1. Mikroextrakce na jedné kapce**

Metoda mikroextrakce na jedné kapce (Single Drop Microextraction, SDME) je nejstarší mikroextrakční metodou LLME, která byla uvedena r. 1996. Princip metody je založen na extrakci analytu z plynného (headspace typ) či kapalného (direct immersion typ) vzorku do velmi malého objemu (nejčastěji jediná kapka) organického rozpouštědla. Po extrakci je organická fáze odebrána pomocí mikrostříkačky a následně nadávkována do měřicího zařízení. Metoda SDME se považuje za nevyčerpávající (non-exhaustive), tzn. pouze malá frakce analytu je extrahována do organické fáze<sup>10,15</sup>.

Do skupiny SDME metod, které používají pro extrakci dvě fáze (kapalný vzorek, extrakční rozpouštědlo) jsou zařazeny SDME v přímém ponoření (Direct Immersion, DI-SDME)<sup>10</sup>, Continuous Flow Microextraction (CFME<sup>22</sup>), Drop to Drop (DD<sup>23</sup>), Directly Suspended Droplet Microextraction (DSDME)<sup>24</sup> a mikroextrakce na pevné kapce (Solid Drop Liquid Phase Microextraction, SDLPME)<sup>25</sup>.

Mezi metody SDME, které používají tři fáze (vzorek, přechodová fáze, extrakční rozpouštědlo) patří headspace SDME<sup>26</sup>, Liquid Liquid Liquid Microextraction (LLLME)<sup>27</sup> a spojení metody Directly Suspended Droplet Microextraction s Liquid Liquid Liquid Microextraction<sup>28</sup>.

Hlavními výhodami metod zahrnutých pod pojmem mikroextrakce na jedné kapce je rychlost a zanedbatelný objem užívaných rozpouštědel. Nenulová rozpustnost používaných organických rozpouštědel ve vodě vede k redukci objemu kapky, proto je k analýze třeba použít objem okolo 1  $\mu$ l.

Ze všech uvedených metod SDME se v praxi nejvíce osvědčila metoda headspace a metoda přímého ponoření, jelikož jsou technicky a časově nejméně náročné a dají se snadno automatizovat.

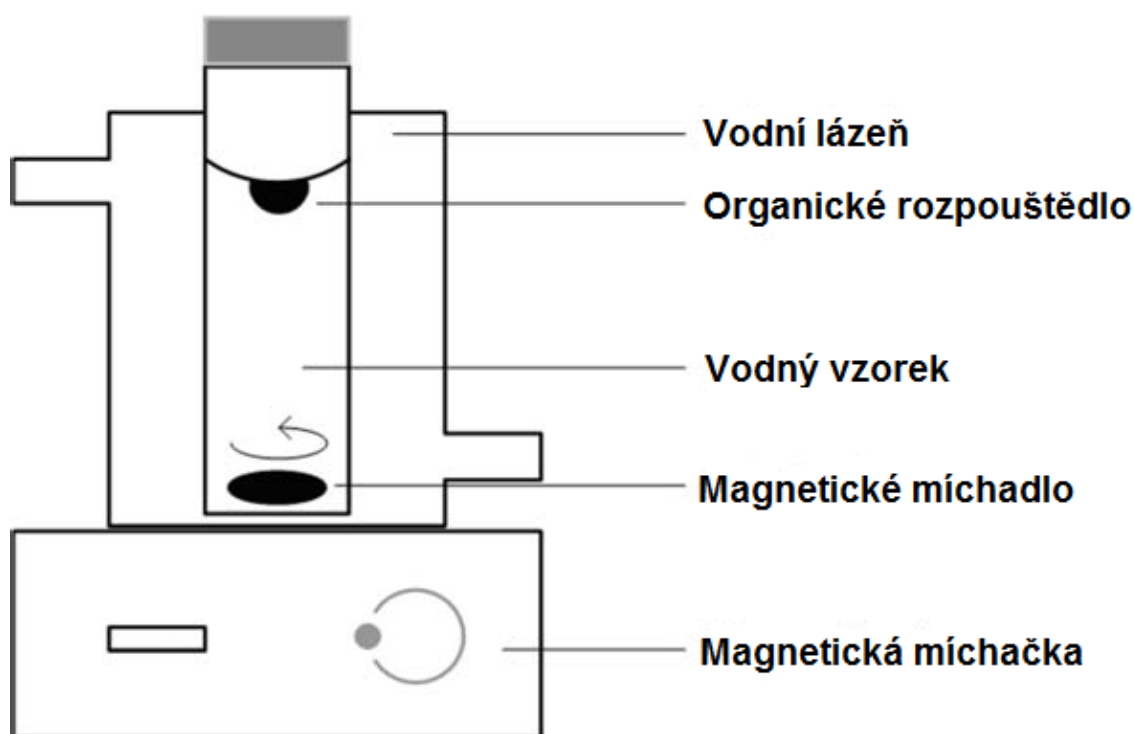
#### **Directly Suspended Droplet Microextraction (DSDME)**

Tato metoda byla poprvé uvedena r. 2006<sup>24</sup> a je založena na systému stabilní mikrokapky rozpouštědla a využívá pro její vytvoření souměrně rotující vír ve středu

hladiny vodného vzorku, vytvořený magnetickým míchadlem na dně vialky se vzorkem. Na počátku měření se pomocí kapátka nanese organické rozpouštědlo (5-100  $\mu$ l) na povrch vodného roztoku vzorku, zatímco je vzorek míchán míchadlem umístěným na dně vialky. Na povrchu vodného vzorku se vytvoří plovoucí volná mikropapka rozpouštědla. Po extrakci je mikropapka natažena stříkačkou a analyzována v instrumentálním zařízení. Za optimálních podmínek extrakce a konstantní rychlosti míchání vodného vzorku, je kapka extrakčního rozpouštědla zčásti ponořena uvnitř roztoku vzorku, přičemž si udržuje stabilní tvar. V tomto systému dvou kapalin nedochází k poškození mikropapky i když není použito podpůrného systému (jehla nebo vlákno). Výhodou DSDME jsou rychlé dosažení extrakční rovnováhy, minimální přenos matrice vzorku a možnost použití vyšších rychlostí míchání. Podstatnou nevýhodou metody DSDME je obtížný odběr mikropapky ze vzorku, kdy může dojít i k nechtěnému odběru vodné fáze vzorku, což může mít nepříznivý vliv na následné instrumentální měření<sup>29,30</sup>. Schéma metody je uvedeno na Obr. 1.

V disertační práci je DSDME popsána podrobněji, protože principem je nejbližší mikroextrakční metodě, které je věnována další část disertační práce.





**Obrázek 1.** Schéma metody Directly Suspended Droplet Microextraction (DSDME) Obrázek upraven podle<sup>24</sup>.

#### 2.4.1.2. Membránová mikroextrakce

Mikroextrakční metody založené na použití membrán jsou další z možností prekoncentrace analytů, které eliminují nevýhody mikroextrakčních metod na jedné kapce, jako jsou nestabilita kapky či příliš malý objem extrakčního rozpouštědla.

Metoda je založena na použití polymerní membrány, která slouží jako nosič pro extrakční rozpouštědlo a při přechodu analytů brání přímému kontaktu mezi donorovou a akceptorovou fází.

Membránové mikroextrakční techniky lze dělit na dvě základní skupiny:

- a) Metody používající porézní membrány, kam se řadí metoda Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction<sup>31</sup> a Microporous-Membrane Liquid Liquid Extraction<sup>16</sup>.
- b) Metody používající neporézní membrány. U těchto metod tvoří membrána samostatnou oddělenou fází (polymerní či kapalnou) mezi donorovým a akceptorovým roztokem. Do této skupiny se řadí metoda Membrane Assisted Solvent Extraction (MASE)<sup>32</sup>. Nejpoužívanější metodou u membránových metod je metoda označovaná jako Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction<sup>33</sup>.

### **Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction (HF-LPME)**

Tato metoda byla poprvé uvedena r. 1999<sup>31</sup>. Při tomto postupu je extrakční organická fáze umístěna do těla dutého hydrofobního vlákna tak, že tvoří slabou vrstvu na povrchu a uvnitř pórů dutého vlákna, přes kterou jsou analyty extrahovány z vodného vzorku<sup>16</sup>.

Výhodným materiálem dutého vlákna je polypropylen, který je odolný vůči většině organických rozpouštědel a snadno je imobilizuje v pórech.

Metody založené na membránové mikroextrakci jsou vhodné pro analýzu „špinavých“ vodných vzorků, protože nedochází ke kontaminaci akceptorové fáze. HF-LPME používá oproti SDME větší extrakční objemy organické fáze (4-20  $\mu$ l) a vyšší rychlosti míchání vzorku. Nevýhodou membránových mikroextrakcí je delší doba extrakce nezbytná k ustavení rovnováhy. Technika mikroextrakce na membráně je vhodná pro anorganické a organické analyty v široké šíři polarit. Další výhodou je její možné on-line spojení s chromatografickými i jinými instrumentálními technikami<sup>34</sup>.

#### **2.4.1.3. Mikroextrakce založené na kvazi-homogenním systému více kapalin**

Do skupiny označované jako mikroextrakce založené na kvazi-homogenním systému více kapalin, lze zařadit metody Ultrasound Assisted Emulsification Microextraction (USAE)<sup>35</sup> a Dispersive Liquid Liquid Microextraction (DLLME)<sup>36,37</sup>.

### **Dispersive Liquid Liquid Microextraction (DLLME)**

Metoda DLLME byla poprvé publikována r. 2006 a je prekoncentrační technikou, založenou na ternárním systému kapalin<sup>36</sup>. Mikroextrakce začíná nadávkováním homogenní směsi extrakčního a dispergujícího rozpouštědla do vodného vzorku obsahujícího analyt. Dispergující rozpouštědlo (např. methanol, aceton) se rozpustí ve vodě a extrakční organická fáze (např. chloroform), nerozpustná ve vodě, utvoří mikroskopické kapičky, které způsobují zakalení roztoku. Jelikož jsou vzniklé kapky extrakčního rozpouštědla velmi malé, lze na takto vzniklou disperzi pohlížet jako na kvazi-homogenní fázi. V tomto kroku DLLME dochází k extrakci analytu do rozptýlených mikroskopických kapek organické fáze. Díky velké ploše povrchu mikroskopických kapek extrakčního rozpouštědla dochází k rychlému ustavení extrakční rovnováhy, a proto je extrakce prakticky okamžitá a nezávislá na čase.

Po extrakci dochází k odstředění zakaleného roztoku, kdy se částičky organického rozpouštědla usadí a spojí do homogenní fáze na dně kónické zkumavky. Usazená fáze je odebrána mikrostříkačkou a extrahované analyty jsou stanoveny některou z instrumentálních metod.

Jako extrakční rozpouštědla jsou nejčastěji používány halogenované sloučeniny (chlorbenzen, chloroform apod.), jelikož mají vyšší hustotu než voda a mají vhodné chemické vlastnosti pro chromatografická měření. Jako dispergující rozpouštědla se používají např. methanol, acetonitril či aceton, která musí být zároveň mísitelná s extraktantem i s vodným vzorkem.

Modifikací metody DLLME se stala Ultrasound Assisted Emulsification Microextraction (USAE)<sup>35</sup>. Její princip je stejný jako u DLLME, ale pro vznik disperze je namísto disperzního rozpouštědla použit ultrazvuk. Tato metoda byla následně spojena s metodou mikroextrakce na pevné kapce (USAE-SDLPME)<sup>38,39</sup>.

Podrobnější informace, další modifikace a různé aplikace metody DLLME jsou uvedeny v několika článcích<sup>40,41</sup>.

#### **2.4.1.4. Mikroextrakční metody bez použití rozpouštědel**

Do této skupiny patří nejčastěji používaná metoda mikroextrakce na pevné fázi (solid phase microextraction, SPME<sup>9</sup>). Princip metody je založen na extrakci analytů z plynné či kapalné fáze do tenkého filmu sorbentu (kapalina či pevná fáze) naneseného na tenkém křemenném vlákne. O metodě SPME bylo napsáno mnoho souborných článků<sup>42-44</sup> a knih<sup>45,46</sup>, kde jsou shrnuty teorie, různé aplikace a možnosti použití. Technika SPME má potíže s křehkostí vlákna, omezeným počtem použití jednoho vlákna, nízkým počtem komerčně dostupných sorbentů ale hlavním nedostatkem je omezená extrakční účinnost, která je způsobena nižším objemem extrakční fáze na vlákne (cca. 0,6  $\mu$ l)<sup>47</sup>. Mezi další nevýhody lze zahrnout možnost přenosu analytů z předchozí analýzy do další (tzv. carry-over error).

Další používanou metodou je Inside Needle Capillary Absorption Trap (INCAT)<sup>48</sup> nebo metoda nazvaná jako Solid-Phase Dynamic Extraction (SPDE)<sup>49</sup>, kde je vrstva stacionární fáze nanesená přímo na vnitřní povrch nerezové jehly. SPDE nabízí lepší mechanickou stabilitu a snadnou automatizaci s autosamplerem.

Jiný postup je založen na použití extrakční fáze na povrchu míchadel či trubiček k zakoncentrování analytů. Do této skupiny se řadí techniky jako: High-Capacity Headspace Sorptive Extraction (HSSE)<sup>50</sup>, Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE)<sup>51</sup>, Dual Twister<sup>52</sup> a Rod Extraction<sup>53</sup>. Oproti klasické SPME mají větší objem extrakční fáze (cca 200 µl), nedají se však jednoduše automatizovat. U metod, kde je jako nosič extrakční fáze použito míchadlo či tyčka, je třeba je vyjmout ze vzorku, usušit a zavést extrahované analyty do GC nebo HPLC. Další nevýhodou je úzký výběr materiálů pro extrakční fáze, protože komerčně dostupným je pouze polydimethylsiloxan (PDMS)<sup>54,55</sup>.

### **Sorbent Packed Needle Microextraction techniky**

Jako materiály sorbentů lze použít stacionární fáze z plynové chromatografie či ze systémů purge and trap. Tento způsob umožňuje lepší možnost zachycení těkavých sloučenin<sup>17</sup>. Sorbenty mohou být naplněny přímo do těla jehly jako v případě Needle Microconcentrator<sup>56</sup>, Fiber-Packed Needle<sup>57</sup> a v Needle Trap (NT)<sup>58</sup>. Sorbenty mohou být také ve větších trubičkách připojených k jehle jako v případě Cylindrical Microconcentrator<sup>56</sup>.

Na základě prostudovaných informací je vidět, jak vývoj mikroextrakčních metod postupuje rychlým tempem, přičemž metody jsou různými způsoby kombinovány, což přináší problémy s jejich názvoslovím (klasifikací). Velký počet publikací pro různé mikroextrakční metody a jejich aplikace používané v různých odvětvích ať již v chemii životního prostředí či ve forenzní oblasti je tedy obtížné sledovat.

## 2.5. Výpočet limitů detekce a stanovitelnosti

Jako jeden z výchozích parametrů v rámci validace je určení (výpočet) limitů detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ). Pro jejich určení se používají různé postupy, které se liší dle účelu a možností jednotlivých analytických metod jako např. zjištění LOQ za použití nejnižšího nenulového kalibrátoru, použití rozhodujícího bodu jako limitu detekce, odhad limitu detekce za použití referenčního materiálu apod<sup>59</sup>.

Pro některé používané přístroje je vhodnější počítat limit detekce a stanovitelnosti  $LOD$  a  $LOQ$  z naměřeného poměru signál/šum ( $S/N$ ), kdy bývá tento výpočet přesnější než výpočet ze směrodatné odchylky regrese. V separačních metodách se mez detekce obvykle vyjadřuje jako trojnásobek šumu základní linie a mez stanovitelnosti jako desetinásobek šumu základní linie<sup>60</sup>. Novější přístroje většinou umí tento poměr pro jednotlivé píky rovnou vypočítat.

Limit detekce přístroje ( $ILOD$ ) se pak počítá z nejnižšího bodu kalibrace přímou úměrou dle rovnice 5. Limit stanovitelnosti přístroje ( $ILOQ$ ) se pak počítá obdobně, jen je koncentrace vynásobena desíti (6).

$$ILOD = \frac{3c}{S/N} \quad (5)$$

$$ILOQ = \frac{10c}{S/N} \quad (6)$$

Pro výpočet limitu detekce a stanovitelnosti extrakční metody byly definovány následující pojmy: limit detekce mikroextrakční metody ( $MLOD$ ) a limit stanovitelnosti mikroextrakční metody ( $MLOQ$ ). Limit detekce mikroextrakční metody se vypočítá jako poměr mezi limitem detekce použitého přístroje ( $ILOD$ ) a zjištěným obohacujícím faktorem (EF) pro daný analyt extrahovaný příslušnou extrakční metodou (7).

$$MLOD = \frac{ILOD}{EF} \quad (7)$$

Limit kvantifikace (stanovitelnosti) mikroextrakční metody (*MLOQ*) je definován jako poměr mezi limitem kvantifikace měřicího přístroje (*ILOQ*) a obohacujícího faktoru (EF) daného zkoumaného analytu (8)<sup>7</sup>.

$$MLOQ = \frac{ILOQ}{EF} \quad (8)$$

## 2.6. Optimalizace – Experimentální design

V současné době vzrůstá počet nových mikroextrakčních metod a různých postupů přípravy vzorků. Tento nárůst s sebou nese nutnost optimalizovat nové metody pro praktické použití a šetřit tak náklady a čas. Počet parametrů, které je nutné prověřit je velký, a proto je výhodné používat pokročilé statistické metody souhrnně označované jako experimentální design<sup>4,52</sup>. Zmíněné metody jsou založeny na efektivním navrhování experimentů, z nichž lze získat objektivní a ucelené závěry o sledovaných veličinách. Hlavní podstatou experimentálního designu je zjištění, které parametry mají na zkoumanou odpověď (výsledek) statisticky významný vliv a nalezení konkrétních hodnot zkoumaných parametrů pro získání optimální odpovědi. Vyjádřením experimentálního designu je tedy matematická funkce, která poskytuje ucelené informace o zkoumaném systému. Experimentálních designů a různých přístupů pro hledání optimálních podmínek existuje více možností jako jsou Design of Experiment (DOE)<sup>61</sup>, Response Surface Methodology (RSM)<sup>62</sup>, Doehlert design<sup>63</sup> či Taguchi design<sup>64</sup>, který se nejvíce uplatňuje v průmyslové oblasti.

Nejjednodušším experimentálním designem je One Factor at a Time (OFAT, jednorozměrná analýza dat), který označuje optimalizaci, při kterém se mění pouze jeden experimentální parametr, a ostatní zůstávají konstantní. Cílem je zjistit, jaký vliv má tento parametr na odpověď, aniž by k tomu byly zahrnuty ostatní parametry, čímž se OFAT způsob optimalizace stává finančně a časově náročný, jelikož pro požadovaný výsledek je třeba velký počet nadbytečných pokusů, měření jsou neuspořádaná, nelze zjistit případné interakce mezi parametry a ani nelze prokázat celkový vliv parametru na odpověď<sup>65</sup>.

### 2.6.1. Terminologie DOE

Z důvodu specifické terminologie používané v pokročilých statistických metodách optimalizace jsou dále uvedena vysvětlení základních pojmů<sup>66</sup>.

**Odpověď (odezva, závislá proměnná)** – veličina nebo více veličin, pomocí kterých vyjadřujeme výsledky experimentů<sup>62</sup>. V analytické chemii se jako odpověď nejčastěji

používá signál (absorbance, napětí, elektrický proud), absolutní či relativní plocha píku, výška píku, rozlišení píků, poměr signál/šum, chromatografická odpověď apod.<sup>67,68</sup>.

**Faktor (parametr, nezávislá proměnná)** – je experimentální proměnná, kterou lze měnit nezávisle na ostatních parametrech, tj. nejsou mezi parametry zjištěné korelace<sup>69</sup>. Pro každý faktor jsou stanoveny úrovně (minimálně dvě), s jejichž použitím lze nalézt požadované optimum. Jsou-li úrovně faktorů stanoveny experimentátorem, v tom případě hovoříme o říditelných (konstrukčních) faktorech. Druhým typem faktorů jsou tzv. neřiditelné (šumové), které vznikají během procesu. Jejich hodnoty nemůže operátor ovlivnit a proces musí být nastaven tak, aby tyto faktory měly minimální vliv. Tyto faktory jsou příčinou vzniku tzv. experimentálních chyb. Faktory mohou být popsány kvalitativně (druh chemikálie, způsob provedení operace), tak kvantitativně (tlak, teplota, pH)<sup>70</sup>.

**Úroveň faktoru** – zvolený rozsah hodnot, který vymezuje oblast, v níž je odpověď hledána. Podle počtu úrovní jsou jednotlivé experimentální designy pojmenovány (dvoufaktorový, třífaktorový atd.). Úrovně faktorů mohou být v kódované či nekódované podobě. Kódování představuje definovaný přepočtení hodnoty faktoru na jednotnou škálu a bylo zavedeno pro porovnávání faktorů s různým rozsahem a s různými jednotkami.

**Vliv faktoru** – číselné vyjádření efektu faktoru, tj. rozdíl hodnoty odezvy odpovídající různým verzím (hodnotám) faktoru.

**Interakce mezi faktory** – vliv jednoho faktoru na odpověď závisí na úrovni jiného faktoru.

**Experimentální design (návrh)** – je specifický soubor pokusů, definovaný maticí tvořenou kombinacemi různých úrovní studovaných faktorů<sup>67</sup>.

Důležitou podmínkou použití experimentálních designů je (a) **opakování**, čímž lze odhalit případnou experimentální chybu a získat tak přesnější odhad, (b) **náhodnost** (randomization), kdy jsou měření prováděna v náhodném pořadí, čímž je snížen vliv neočekávaných či nekontrolovatelných změn.



**Experimentální prostor** – oblast vymezená úrovněmi faktorů. V tomto prostoru je hledána požadovaná odpověď

**Model** – matematická rovnice (lineární nebo polynomická) vyjadřující číselný vztah mezi faktory a zkoumanou odpovědí.

### 2.6.2. Experimentální design

Statistické metody označované jako experimentální design (Design of Experiment, DOE) jsou také známy pod názvem metodologie odezvové plochy (Response Surface Methodology, RSM) a označují soubor statistických metod založených na hledání matematické rovnice, která charakterizuje vliv faktorů či jejich interakcí na zkoumanou odpověď. Podstatou DOE metod je zjištění významných faktorů a současně nalezení optimálního nastavení faktorů. Zároveň celý postup vyžaduje méně počátečních zdrojů (čas, materiál, energie)<sup>62</sup>.

DOE postup se dělí na čtyři hlavní kroky: (1) definice zkoumané odpovědi a výběr faktorů, (2) screening, (3) modelování a (4) optimalizace<sup>67,71</sup>.

#### Definice odpovědi a výběr faktorů

Před vlastním provedením experimentálního designu je třeba zvolit si vhodnou odpověď či více odpovědí (veličiny), které nejlépe charakterizují daný účel. Pro chromatografické separace se volí nejčastěji např. čas analýzy, rozlišení, plocha píků apod., zatímco pro prekoncentrační metody jsou vhodnými odpověďmi obohacující faktor či součet ploch analytů. Výhodou DOE metod je možnost nalezení optimálního nastavení metody pro více odpovědí bez nutnosti dalších experimentů.

Zkoumané faktory a jejich úrovně by měly být voleny na základě technických a experimentálních možností dané metody a podle zkušeností pracovníků<sup>68</sup>.

## Screening

Hlavní podstatou screeningu je snížení počtu zkoumaných faktorů a určení, které z nich mají statisticky významný vliv na definovanou odpověď. K úspěšnému provedení screeningu je třeba vytvořit plán experimentu (tabulka), který stanovuje počet a pořadí měření a podmínky, za kterých se jednotlivá měření uskuteční.

Plán experimentu je tvořen pomocí různých faktoriálních návrhů, které se dělí do několika skupin:

### *Úplný faktoriální návrh (Full Factorial Design)*

Při použití úplného faktoriálního návrhu jsou měřeny všechny kombinace úrovní všech faktorů. V tomto případě jsou podchyceny všechny možné kombinace. Nevýhodou úplného návrhu je velký počet měření, proto je tento způsob vhodný pouze pro malý počet faktorů. Počet experimentů lze vypočítat podle rovnice (9) <sup>62</sup>:

$$N = L^k \quad (9)$$

kde  $N$  je počet experimentů,  $L$  počet úrovní faktoru a  $k$  je počet sledovaných faktorů.

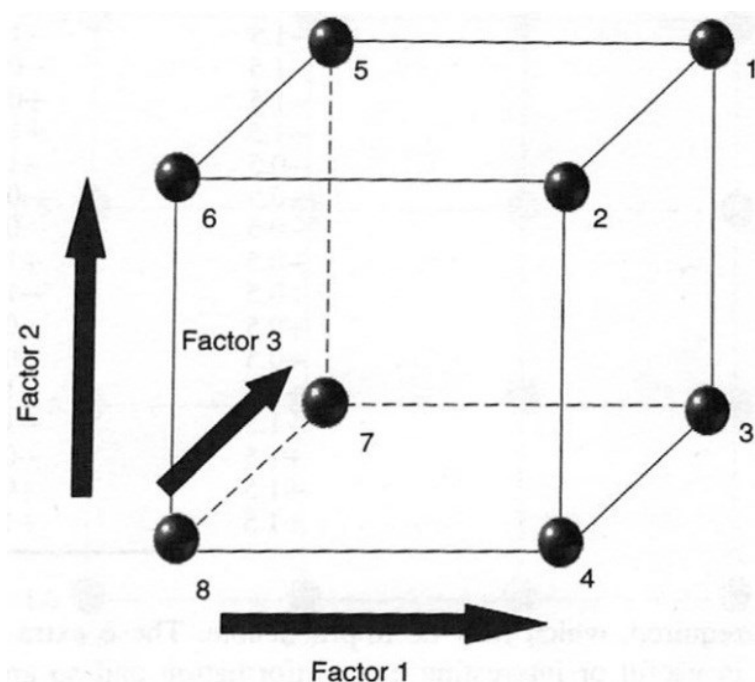
Jednou z možností, jak snížit počet měření, je použití dvouúrovňového úplného faktoriálního návrhu (Two-Level Full Factorial Design), který je tvořen kombinací hodnot jednotlivých faktorů a obsahuje  $2^k$  měření. (Číslo 2 označuje nižší (-1) a vyšší (+1) hodnotu faktoru,  $k$  počet zkoumaných faktorů). Na Obr. 2 je uvedeno schéma úplného dvouúrovňového třífaktorového návrhu. Problém u úplného dvouúrovňového faktoriálního návrhu nastává, zahrnuje-li velký počet faktorů (např. je-li 10 faktorů,  $2^{10} = 1024$  pokusů), což není v praxi proveditelné.

Proto byly vytvořeny jiné návrhy, které účelně snižují počet měření. Jedním z nich je dvouúrovňový neúplný faktoriální design (Two-Level Fractional Factorial Design), který je založen na kombinaci měření, kdy je použita pouze část faktorového designu, která je uměle snížena (např. je-li počet faktorů  $k = 4$ , pak počet měření bude  $2^{k-1} = 2^{4-1} = 8$  měření). Frakční (neúplné) faktoriální návrhy jsou výhodné pro otestování většího počtu faktorů (Obr. 3).

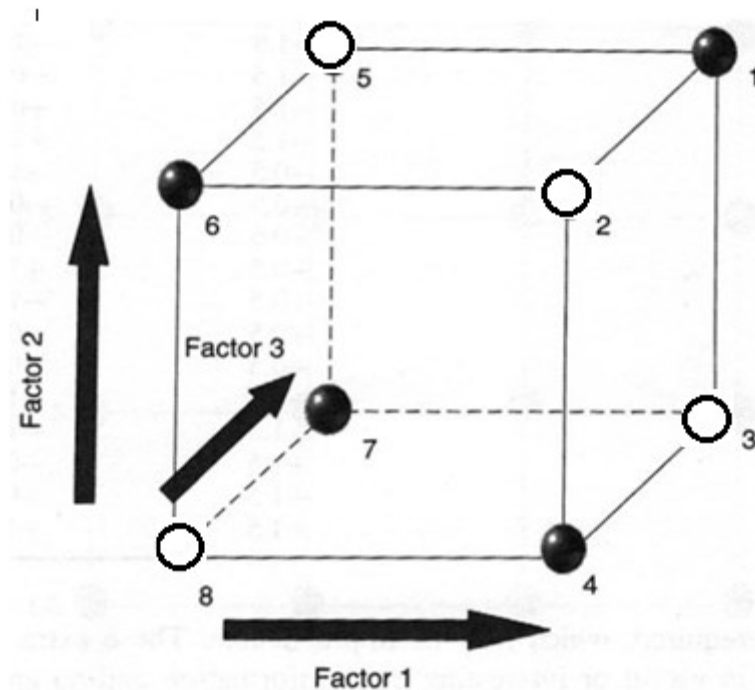
### ***Plackett-Burman design***

Plackett-Burman design je speciálním typem neúplného faktoriálního návrhu, sloužící ke zjištění pouze statisticky významných faktorů bez jejich vzájemných interakcí. Tento design je výhodný pro počet experimentů rovný násobku čtyř, v rozsahu 12 – 48 měření, přičemž počet faktorů musí být vždy o jeden nižší, než je počet experimentů<sup>72</sup>.

Z naměřených dat podle plánu experimentu se pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) zjistí, které faktory mají na zkoumanou odpověď vliv. O tom, zda jsou statisticky významné, rozhoduje p-hodnota na hladině 95% významnosti. Statisticky významné faktory mohou být uvedeny v grafické podobě (Paretův graf).



**Obrázek 2.** Grafické znázornění úplného dvouúrovňového třífaktorového návrhu. Černé body označují úroveň jednotlivých faktorů (Obrázek upraven podle<sup>73</sup>).



**Obrázek 3.** Grafické znázornění neúplného dvouúrovňového třífaktorového návrhu (Obrázek upraven podle <sup>73</sup>).

### Modelování

Účelem modelování je nalezení matematického popisu závislosti odezvy (odpovědi) na hodnotách vybraných faktorů. Dvouúrovňové faktoriální návrhy, uvedené v předcházející části, jsou vhodné pouze pro zjištění lineárních modelů a nedávají informace o maximu či nelineárních vztazích mezi zkoumanými faktory. Proto se začaly používat jiné metody jako Central Composite Design (CCD) či Box–Behnken design<sup>3,65</sup>.

### *Central composite design*

Central composite design (CCD) je jednou z nejvíce používaných metod v postupu experimentálního designu. CCD je velmi účinný, jelikož poskytuje nejvíce informací o experimentech a celkové experimentální chybě při minimálním počtu nutných měření<sup>62,66</sup>.

CCD byl vytvořen spojením několika odlišných návrhů. Prvním z nich je dvouúrovňový úplný faktoriální návrh, který používá kódované hodnoty faktorů  $-1$  a  $+1$ . Dalším je „star“ design, který kóduje jiný druh bodů jako:  $-\alpha$ ,  $0$  a  $+\alpha$ , kdy  $0$  odpovídá centrálnímu bodu, který je uprostřed experimentálního prostoru modelu,  $\alpha$  body se

nazývají axiální a umožňují odhalit případné kvadratické zakřivení odezvové plochy (grafické znázornění funkce v souřadnicovém systému). Poslední součástí CCD jsou opakovaná měření v centrálním bodě<sup>3,65</sup>. Na Obr. 4 je uveden příklad rozdělení bodů pro tři faktory a vymezení experimentálního prostoru.

### **Box–Behnken design**

Jinou možností v oblasti modelování je použití Box-Behnkenova návrhu. Jeho princip je založen na kombinaci neúplných faktoriálních návrhů a centrálního bodu s vynecháním axiálních ( $\alpha$ ) bodů. Počet požadovaných měření je nižší a tento návrh je vhodný pro časově, materiálně a finančně náročné experimenty<sup>74</sup>.

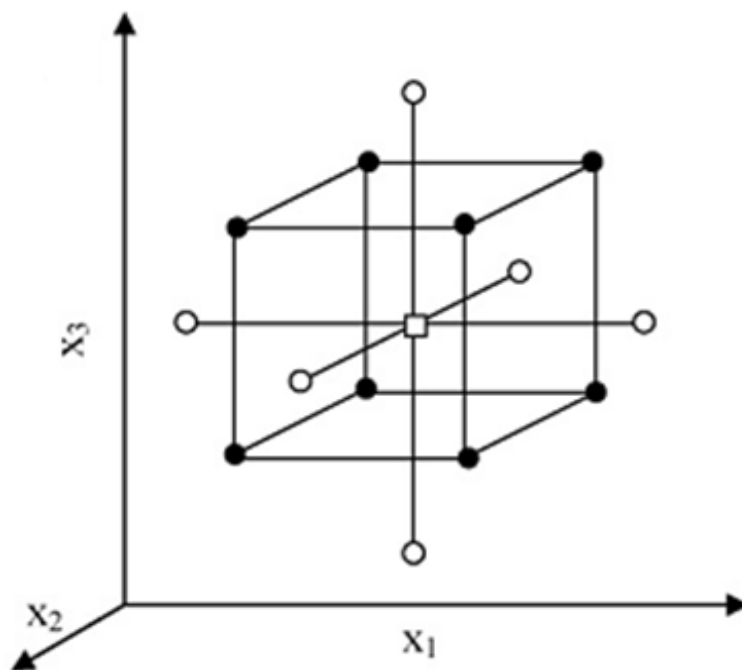
Jak bylo uvedeno v předchozí kapitole, jsou změřené odpovědi statisticky vyhodnoceny pomocí statistické metody analýzy rozptylu (ANOVA testy).

Výsledkem obou výše jmenovaných designů je polynomiální rovnice (10):

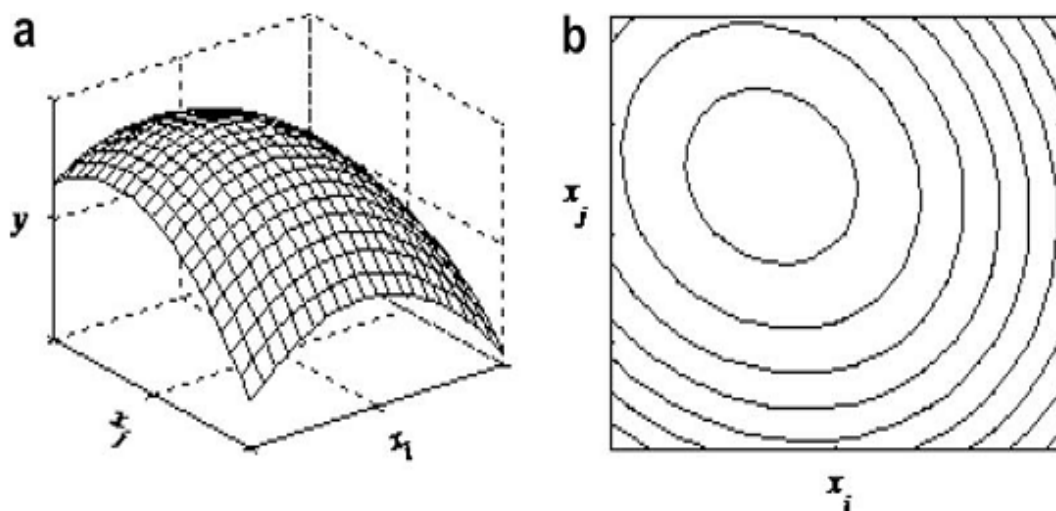
$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \beta_{ij} x_i x_j \quad (10)$$

kde  $y$  označuje odpověď (odezvu systému),  $\beta_0$  konstantu,  $\beta_i$  lineární koeficient,  $\beta_{ii}$  kvadratický koeficient,  $\beta_{ij}$  interaktivní koeficient a  $x_i$  je kódovaná úroveň faktoru  $i$ .

Matematický model popisuje interakce jednotlivých faktorů (členy  $\beta_{ij} x_i x_j$ ) a jejich působení na odpověď systému a případné zakřivení odezvové plochy (členy  $\beta_{ii} x_i^2$ ). Výsledný model je možné znázornit graficky pomocí plošných nebo trojrozměrných grafů (Obr. 5).



**Obrázek 4.** CCD pro optimalizaci třech faktorů, ● – body faktoriálního designu, ○ – axiální body ( $\alpha$ ), □ – centrální bod<sup>67</sup>.



**Obrázek 5.** Grafická znázornění matematického modelu pro dva faktory a libovolný počet ostatních faktorů nastavených na konstantních hodnotách, a) trojrozměrný graf zobrazující závislost zkoumané odpovědi ( $y$ ) na faktorech  $x_i$  a  $x_j$ ; b) konturový plošný graf zobrazující závislost dvou faktorů<sup>74</sup>.

### 2.6.3. Optimalizace

Po určení matematické rovnice je posledním krokem experimentálního designu nalezení takové kombinace konkrétních hodnot pro jednotlivé faktory, aby bylo dosaženo požadované optimální odezvy. Požadovanou odpovědí je míněna maximální, minimální či libovolně zvolená hodnota hledané odpovědi.

K určení optimálních podmínek měření jsou používány různé možnosti výpočtu, mezi nejpoužívanější se řadí Derringerova (Desirability) funkce<sup>75</sup>, kdy jsou změřené výsledky odpovědi převedeny do bezrozměrné škály ( $d$ ), která je v rozsahu od  $d = 0$  pro úplně nevhodnou odpověď do  $d = 1$ , pro vhodnou odpověď.

Dalšími možnostmi nalezení optimálních podmínek jsou metoda simplexu<sup>76</sup> a metoda Hooka a Jeevese<sup>77</sup>. Metody patří mezi nelineární regresní metody, které nepotřebují výpočet derivací.

Zjišťování konkrétních hodnot je poměrně složité, neboť výše zmíněné metody jsou velmi komplexní a jejich popis by přesahoval rozsah této práce. Základní principy a postupy jednotlivých funkcí jsou uvedeny v několika souborných článcích<sup>78,79</sup> a v učebnicích<sup>3,62</sup>.

## 2.7. Rychlá plynová chromatografie

Rychlá plynová chromatografie (fast GC) je speciálním typem metody plynové chromatografie. Rychlá GC používá kratší kapilární kolony (20 m a méně) s menším vnitřním průměrem (ID 0,10 – 0,20 mm) tenké filmy stacionární fáze ( $< 0,2 \mu\text{m}$ ) a vodík jako nosný plyn, čímž se dají redukovat doby analýz 3x až 10x<sup>80</sup>. Při optimalizovaných podmínkách bývá zpravidla účinnost rychlé GC vyšší, avšak vzhledem k menšímu dávkovanému množství vzorku bývá citlivost maximálně srovnatelná s klasickou GC, obvykle však nižší. Teoretické základy rychlé GC byly vytvořeny již v 60. letech, ale v praxi byla rychlá chromatografie poprvé využita až v 90. letech, kdy byly na trh uvedeny moderní přístroje a další vybavení.

Výhodou použití metody rychlé GC je možnost kratší doby měření, větší propustnost vzorků, levnější kolony, vyšší poměr signál/šum a díky tenčím filmům i nižší bleeding (porušení polymerních řetězců v Si-O vazbě, kdy se uvolňuje stacionární fáze z kolony). Častěji u této metody dochází k přetížení kapacity stacionární fáze, což souvisí i s obtížnějším splitless dávkováním<sup>81,82</sup>. Oproti klasickým GC kolonám je menší i citlivost. Rychlá GC metoda je vhodná pro tzv. screening vzorků, kdy je třeba rychle určit povahu zkoumaných analytů.



### 3. Cíl práce

Hlavním cílem disertační práce byl vývoj účinné a rychlé mikroextrakční metody bez použití rozpouštědel s hustotou větší než voda, tj. halogenovaných rozpouštědel, což vedlo k metodě s názvem mikroextrakce kapaliny kapalinou pomocí přípravku ve tvaru zvonu (Bell-shaped Extraction Device Assisted Liquid Liquid Microextraction, BSED-LLME).

Práce byla rozdělena do následujících dílčích kroků:

1. Vývoj plastového nástavce ve tvaru zvonu.
2. Zjištění optimálních extrakčních podmínek BSED-LLME pomocí statistických metod (experimentální design) a výběr vhodného statistického programu.
3. Testování nové metody BSED-LLME ve spojení s rychlou plynovou chromatografií s plamenově ionizačním detektorem na modelové skupině analytů.
4. Prekoncentrace a separace vybraných modelových analytů metodou BSED-LLME s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí za použití dvou organických rozpouštědel.
5. Stanovení aromatických aminů metodou BSED-LLME s GC-MS detekcí.

## 4. Experimentální část

### 4.1. Chemikálie, rozpouštědla a příprava zásobních roztoků

Methanol (p. a.), ethylbenzen, nitrobenzen, oktanol a dimethylftalát (všechny 99 %) byly zakoupeny ve firmě Lachema (Neratovice, ČR), mesitylen (99 %) byl zakoupen od firmy Fluka (Denmark, Německo). Methylhexadekanoát (99 %) byl zakoupen z Polyscience (USA). Chlorid sodný (p. a.) byl zakoupen v Lach-Ner (Neratovice, ČR) a acetonitril (Chromasolve,  $\geq 99,9$  %) u Sigma Aldrich (Merck, ČR). Analyty jako anilin (99,5 %), o-toluidin (99 %), 2-ethylanilin (98 %), 2-nitroanilin (98 %), 1-aminonaftalen (99 %), 2-aminonaftalen (99 %), 2-aminobifenyl (97 %), 4-aminobifenyl, 2-aminofluoren (98 %) a 2-aminoantracen (96 %) byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (Merck, ČR). Toluén (p. a.) a terciální butylacetát (2-methyl-2-propylacetát, TBAC, 99 %, oba Sigma Aldrich, Merck ČR) a heptan (99,5 %, Fluka) byly použity jako extrakční rozpouštědla.

Deionizovaná voda byla vyčištěna pomocí Mille-Q Plus (Millipore, Billerica, MA, USA).

### Příprava zásobních a pracovních roztoků

Zásobní roztoky toluenu, etylbenzenu, mesitylenu, fenolu, nitrobenzenu, oktanolu, naftalenu a dimethylftalátu o koncentraci  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  byly připraveny v methanolu. Pracovní roztoky byly připravovány o různých koncentracích ředěním zásobních roztoků v deionizované vodě. Jako extrakční rozpouštědla byly použity heptan, TBAC. Jako vnitřní standard v extrakčním rozpouštědle byl použit methylhexadekanoát o koncentraci  $100,2 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$ . Všechny zásobní a extrakční roztoky byly uloženy v lednici o teplotě  $4 \text{ } ^\circ\text{C}$ .

Zásobní roztoky aromatických aminů ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) byly připraveny do acetonitrilu a pracovní roztoky byly připravovány denně, rozpuštěním vhodného množství do deionizované vody. Methylhexadekanoát o koncentraci  $5 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$  byl použit jako vnitřní standard v extrakčních rozpouštědlech (toluén, TBAC) při stanovení aromatických aminů. Všechny zásobní roztoky byly uloženy při teplotě  $-18 \text{ } ^\circ\text{C}$ .

## 4.2. Reálné vzorky

Vzorky říční vody byly odebrány v listopadu 2012 v Praze a byly uchovány v lednici při teplotě 4 °C. Před analýzou byly vzorky filtrovány přes membránový filtr (0,45 µm, Fisher Scientific, USA).

## 4.3. Instrumentace

Pro mikroextrakční postup byly použity: magnetická míchačka typ MR 3001 (Heidolph, Německo), skleněné uzavíratelné vialky o objemu 16 ml (7 cm výška a 2 cm průměr) a mikrostříkačka o objemu 250 µl (Hamilton, Švýcarsko). K dávkování do GC byla používána 10µl stříkačka (Hamilton, USA).

### Experimentální podmínky metody rychlé plynové chromatografie

Separace a měření analytů bylo prováděno na plynovém chromatografu GC-2010 (Shimadzu), který byl vybaven kolonou Chromacol CP-Sil 5CB (9,7 m x 0,15 mm ID, 0,12 µm; stacionární fáze 5 % difenyl-95 % dimethyl-polysiloxan, Chrompack). Jako nosný plyn byl použit vodík (99,99 %) s lineární průtokovou rychlostí 71 cm s<sup>-1</sup>. Teplota injektoru byla nastavena na 300 °C. Teplotní program kolony byl nastaven na počáteční teplotu 40 °C po dobu 1 min, poté byl nastaven program na rampu 50 °C min<sup>-1</sup> do 100 °C následovanou další rampou 100 °C min<sup>-1</sup> do 250 °C (1 min). Vzorek o objemu 0,25 µl byl dávkován pomocí stříkačky autosampleru (AOC-20i, Shimadzu) do GC injektoru ve split módu (split poměr 10). Jako detektor byl použit plamenově ionizační detektor s teplotou 300 °C.

Dusík (99,9995 %), vodík (99,99 %) a syntetický vzduch pro FID byly odebírány z tlakových lahví (Linde, ČR).

### Experimentální podmínky metody GC-MS ke stanovení modelové skupiny analytů

Analýzy byly prováděny na plynovém chromatografu s MS detektorem GCMS-QP 5050A (Shimadzu, Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japonsko). Kapilární kolona DB-5ms (30 m x 0,25 mm ID, pokryta 5 % difenyl-95 % dimethyl-polysiloxanem, 0,25 µm; Agilent Technologies, USA) byla použita k separaci analytů. Jako nosný plyn bylo použito helium (99,999 %, Linde, ČR) s průtokovou rychlostí

40 cm s<sup>-1</sup>. Teplotní program byl nastaven od 50 °C (5 min), teplotní rampa byla 30 °C·min<sup>-1</sup> do 250 °C (3 min). Celková doba analýzy byla 14,7 min. Vzorek o objemu 2,5 µl byl dávkován pomocí stříkačky autosampleru (AOC-20i, Shimadzu) do GC injektoru ve split módu (split poměr 25), teplota injektoru byla 250 °C.

Hmotnostní spektrometr pracoval s EI ionizací (energie 70 eV) a vybrané ionty byly měřeny v SIM módu. Teplota MS interface (transfer line) byla 275°C. Cílové hodnoty m/z analytů jsou uvedeny v Tab.1. (kdy první číslo vyjadřuje kvantifikační iont a další dvě označují pomocné/konfirmační ionty k přesné identifikaci).

**Tabulka 1.** Kvantifikační a konfirmační ionty modelové skupiny analytů

Analyt	Kvantifikační iont	Konfirmační iont 1	Konfirmační iont 2
Toluen	91	92	65
Ethylbenzen	91	106	51
Mesitylen	105	120	77
Fenol	94	66	39
Oktanol	56	55	41
Nitrobenzen	77	51	123
Naftalen	128	51	64
Dimethylftalát	163	77	194
Methylhexadekanoát (Interní standard)	74	87	43

### **Instrumentální podmínky GC-MS metody ke stanovení aromatických aminů**

Analýzy byly prováděny na plynovém chromatografu s MS detektorem GCMS-QP 5050A (Shimadzu). Kapilární kolona DB-5ms UI (29,7 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm, pokryta 5 % difenyl-95 % dimethyl-polysiloxanem; Agilent Technologies, USA) byla použita k separaci analytů. Helium (99,999 %, Linde, Česká republika) bylo použito jako nosný plyn při rychlosti průtoku 36 cm s<sup>-1</sup>. Vzorky (1 µl) byly dávkovány do injektoru pomocí autosampleru (AOC-20i, Shimadzu) ve split módu (split poměr 10) při teplotě 300 °C. Teplotní program byl nastaven od 75 °C (3 min), s teplotní rampou 35 °C min<sup>-1</sup> do 115 °C (0,5 min) a poté 40 °C min<sup>-1</sup> do 290 °C (3 min). Analýza trvala 11 min. Teplota transfer line do MS detektoru byla nastavena na 260°C. Hmotnostní spektrometr pracoval

v EI módu (70 eV), kdy měření probíhala ve SCAN a SIM módech. Cílové hodnoty m/z (kdy první číslo vyjadřuje cílový iont a další dvě označují pomocné ionty k přesné identifikaci) hledaných analytů jsou uvedeny v Tab. 2.

**Tabulka 2.** Kvantifikační a konfirmační ionty skupiny aromatických aminů

Analyt	Kvantifikační iont	Konfirmační iont 1	Konfirmační iont 2
Anilin	93	66	65
o-Toluidin	106	107	77
2-ethylanilin	106	121	77
2-nitroanilin	65	138	92
1-aminonaftalen	143	115	116
2-aminonaftalen	143	115	116
2-aminobifenyl	169	168	167
4-aminobifenyl	169	168	170
2-aminofluoren	181	180	90
2-aminoantracen	193	165	82
Methylhexadekanoát (Interní standard)	74	87	43

Ke sběru dat z GC-MS přístroje sloužil program LabSolution (GCMSsolution 1.2, Shimadzu). K interpretaci hmotnostních spekter byla použita knihovna NIST 08 (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, National Institute of Standards and Technology, USA).

#### 4.4. Statistický software

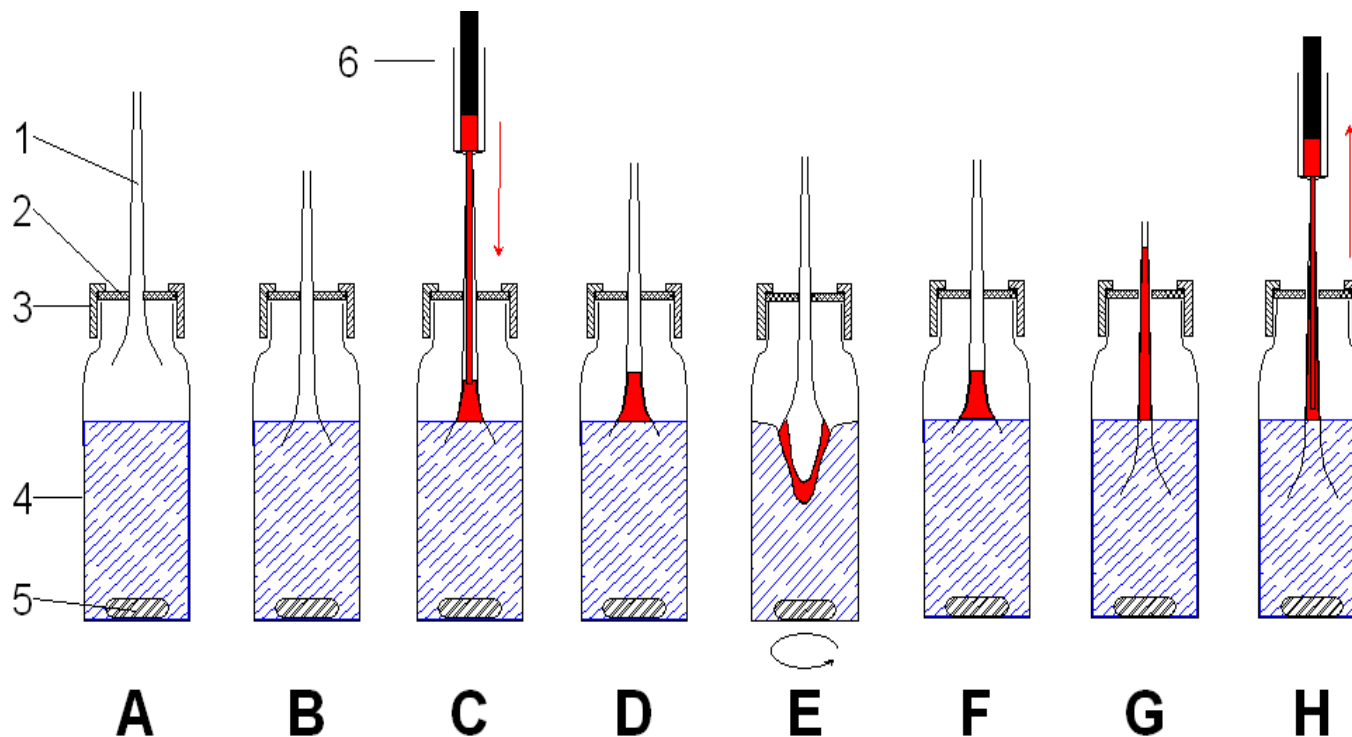
Experimentální designy a data byly statisticky vyhodnoceny komerčními programy NCSS 2004 (NCSS 2004 and PASS, Number Cruncher Statistical Systems, Kaysville, Utah, USA), Design Expert (verze 8.0.10., Stat-ease, Inc., Minneapolis, USA) a Minitab 16 (Minitab Inc., State College PA, USA).

#### 4.5. Postup mikroextrakce metodou BSED-LLME

Do skleněné nádoby o objemu 16 ml byl odměřen vodný roztok se zkoumanými analyty o objemu 10 ml. Aby bylo zabráněno zbytečným ztrátám způsobeným tékáním analytů, byly všechny vodné vzorky připraveny těsně před každým experimentem. Do roztoku bylo přidáno malé magnetické míchadlo. Vialka byla upevněna držákem do středu magnetické míchačky Heidolph (MR3001, Německo), aby se nemohla během extrakce pohybovat. Před vlastní extrakcí byla vialka se vzorkem se uzavřena víčkem, v němž je vloženo plastové septum s plastovým extrakčním přípravkem ve tvaru zvonu protaženým středem septa (Obr. 6A). Konec nástavce ve tvaru obráceného trychtýře byl ponořen do vodného vzorku tak, aby hladina vzorku sahala k ohybu rozšířeného konce přípravku (Obr. 6B). Do trubičky plastového přípravku bylo 250 $\mu$ l stříkačkou nadávkováno organické rozpouštědlo (Obr. 6C). Vlastní extrakce byla zahájena zapnutím magnetické míchačky, kdy byly pozvolna zvyšovány otáčky (max. rychlost cca 1 000 rpm) dokud se ve vialce nevytvořil stabilní vír (Obr. 6E).

Za optimálních podmínek je organické rozpouštědlo udržováno na povrchu vodného vzorku uvnitř přípravku. Na rozhraní mezi kapalinami bylo dosaženo extrakce analytů z vodné do organické fáze. Před vlastní extrakcí je důležité zjistit maximální rychlost míchání, kdy ještě nedochází k odtrhávání kapek organického rozpouštědla a jeho rozptýlu do vzorku. Po uplynutí dané doby extrakce, bylo pomalým snižováním otáček zastaveno míchání a organická fáze se vrátila zpět do extrakčního přípravku (Obr. 6F). Následně byl plastový nástavec ponořen o 0,5 cm do vodného roztoku (Obr. 6G), čímž se organické rozpouštědlo dostalo do horní zúžené části přípravku a bylo možné jej snadněji odebrat stříkačkou do kónické vialky (Obr. 6H). Následně proběhla analýza extrakčního činidla metodou plynové chromatografie.

Stříkačka byla před každým nadávkováním extrakčního činidla propláchnuta pentanem, destilovanou vodou, heptanem a acetonem, aby byla jehla vysušena a vyčištěna od přebytečného extrakčního činidla a nedocházelo tak k nechtěnému přenosu analytů.



**Obrázek 6.** Schéma postupu mikroextrakce pomocí přípravku ve tvaru zvonu (BSED-LLME). A...výchozí stav, B...ponoření nástavce do vodného vzorku, C...nadařkování organického rozpouštědla lehčího než voda do extrakčního přípravku, D...stav před začátkem extrakce, E...vytvoření víru a extrakce analytů, F...ukončení míchání, G...vytlačení organického rozpouštědla do užší části přípravku, H...odběr organického rozpouštědla pro analýzu pomocí stříkačky; 1 ...extrakční přípravek ve tvaru zvonu (BSED), 2 ...silikonové septum, 3 ...plastové víčko, 4 ...skleněná vialka s vodným vzorkem 5 ...magnetické míchadlo, 6 ...mikrostříkačka s organickým rozpouštědlem.

## 5. Výsledky a diskuse

### 5.1. Vývoj nástavce pro BSED-LLME metodu

Dosud bylo popsáno velké množství metod založených na mikroextrakci kapaliny kapalinou. Ve většině případů se jedná o extrakci kapalinou těžší než voda, což jsou prakticky jen chlorované látky a rozpouštědla. Tyto lze jednoduše přidat do vodného vzorku, intenzivně míchat a po extrakci oddělit obě fáze a jednoduše odebrat ze dna nádoby. Pro extrakci za použití kapalin lehčích než voda je možné použít rovněž klasickou extrakci v dělicí nálevce, ale objem použité extrakční kapaliny je řádově srovnatelný s objemem vzorku. Pro extrakci to znamená malý fázový poměr (poměr objemů vzorku a extrakční kapaliny) a tudíž i malý obohacující faktor.

Příkladem extrakce kapaliny kapalinou s velkým fázovým poměrem je např. mikroextrakce na jedné kapce (single drop microextraction, SDME<sup>83</sup>). Nevýhodou tohoto postupu je malá stabilita kapky, která visí v roztoku, který nemůže být příliš intenzivně míchán, a dále pak velmi malý objem výsledného roztoku extrahované látky v extrakční kapalině postačující prakticky jen k jedné analýze.

Nevýhodou dříve uvedených prekoncentračních metod (SPE) je také velká spotřeba extrakčního činidla, zatímco u prekoncentračních metod jako např. DSDME je problémem odběr extrakční kapaliny z hladiny vzorku, protože extrakční kapalina bude v takovém případě tvořit velmi tenký film na hladině vzorku.

Nová prekoncentrační metoda mikroextrakce kapaliny kapalinou pomocí extrakčního přípravku ve tvaru zvonu (Bell-shaped extraction device assisted liquid liquid microextraction, BSED-LLME)<sup>84,85</sup> je založena na dávkování velmi malého objemu extrakčního rozpouštědla k vodnému vzorku (poměr řádově desítky až stovky  $\mu\text{l}$  rozpouštědla k desítkám ml vzorku). Jde o mikroextrakční metodu nevyčerpávající (non-exhaustive) a rovnovážnou. Dávkování a vlastní extrakce je provedena s použitím speciálního plastového nástavce ve tvaru zvonu (BSED), který umožňuje použít poměrně vysoké intenzity míchání a reprodukovatelný, téměř bezeztrátový odběr rozpouštědla po skončení analýzy (Obr. 7). Důležitou podmínkou je výběr rozpouštědla o menší hustotě než má voda. Možnost relativně širokého výběru rozpouštědel přináší velkou flexibilitu v kroku úpravy vzorku a umožňuje tak snadné přizpůsobení extrakce vlastnostem stanovovaných analytů. Během extrakce je rozpouštědlo díky intenzivnímu míchání v nástavci rozprostřeno do velkého povrchu, což značně urychluje extrakci.

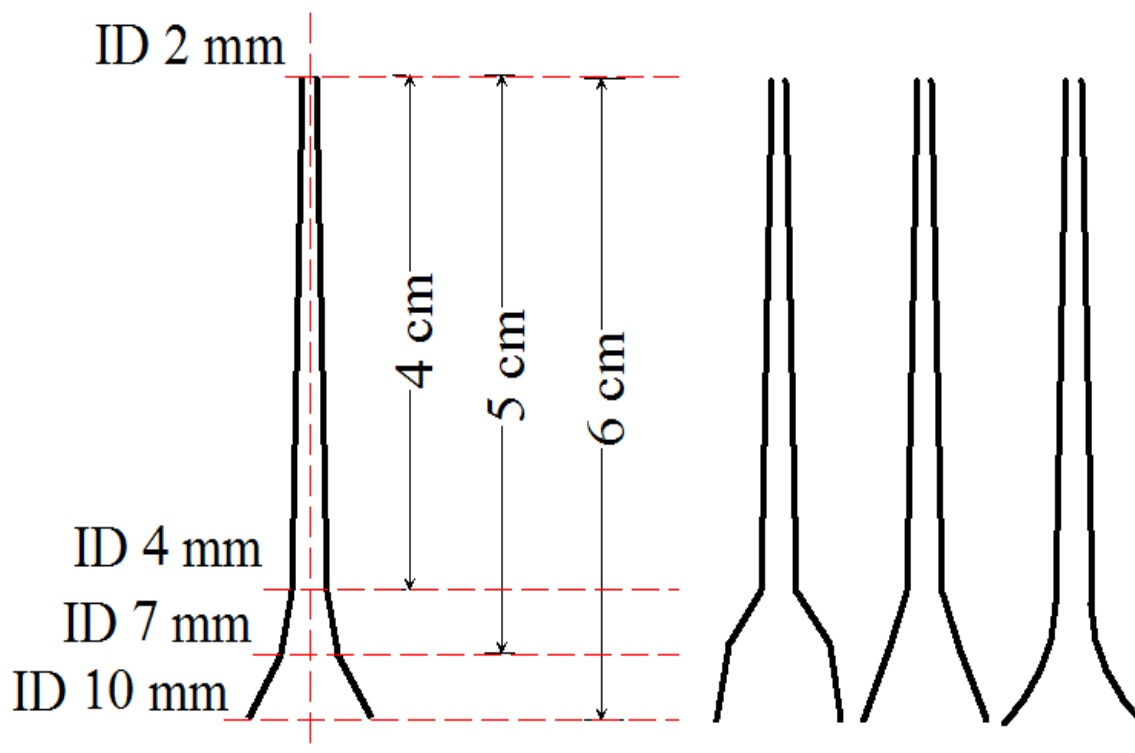


Podstatou metody BSED je vytvoření víru na hladině kapalného vzorku pro extrakci vodných vzorků malým množstvím kapaliny, která má nižší hustotu než voda a je nemísitelná s vodou, za použití míchání během extrakce.

Problémem byl vlastní odběr organického rozpouštědla po provedení extrakce, proto byl vyvinut speciální extrakční přípravek (Obr. 7), který je složen z extrakčního kónusu ve vrcholu ústící do dávkovací/odběrné trubice. Kónusem je míněna spodní, širší část přípravku zvonovitého tvaru. Přípravek byl vyroben z plastu, ale může být vyroben i z jiného materiálu např. skla. Podmínkou je, aby byl materiál dostatečně průhledný a hladký na povrchu, aby nedocházelo k adsorpci analytů na povrch přípravku. Materiál přípravku by měl být rovněž odolný vůči působení extrakční kapaliny. Přípravek zabraňuje přílišnému rozptýlení extrakční kapaliny ve vzorku a napomáhá k reprodukovatelnému odběru extrakční kapaliny pro její následnou analýzu.

Při uvedeném způsobu extrakce je zachován vysoký fázový poměr, což umožňuje vysokou účinnost při zachování snadné proveditelnosti úkonu odběru malého objemu extrakční kapaliny. Jako extrakční kapalinu lze použít jakoukoli kapalinu nemísitelnou s vodou a s hustotou menší než je hustota vody. Tyto podmínky splňuje široká škála kapalin: čisté uhlovodíky (hexan, heptan, cyklohexan, methylcyklohexan, benzen, toluen) a všechny jejich rozvětvené, cyklické a aromatické izomery. Pro extrakci polárnějších analytů je možné použít ketony, ethery či estery, pro polární sloučeniny je možné použít alkoholy nemísitelné s vodou. Tento široký výběr extrakčních kapalin umožňuje jejich velmi selektivní volbu vzhledem k polaritě a dalším vlastnostem cílových analytů (např. rozpustnost ve vodě, tlak nasycených par, Henryho konstanta, rozdělovací koeficient oktanol-voda apod.).

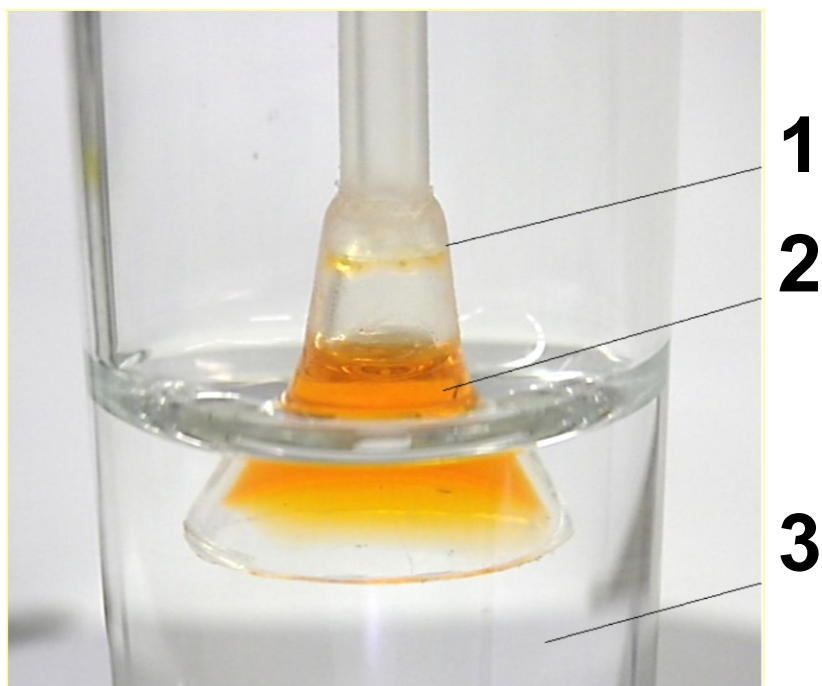
Možné je rovněž použití směsi uvedených extrakčních kapalin (pokud jsou vzájemně mísitelné) v případě specifických požadavků na extrahované analyty i požadavků na další zpracování extraktů.



**Obrázek 7.** Tvar a rozměry extrakčního nástavce a další testované tvary BSED nástavce.

Na Obr. 7 jsou vidět detaily mikroextrakčního přípravku. Na Obr. 8 je vidět obarvené extrakční rozpouštědlo (heptan) umístěné v těle BSED přípravku těsně před extrakcí. Na Obr. 9 je zobrazen vír obsahující extrakční rozpouštědlo, který vzniká mícháním vodného vzorku.

Úřad průmyslového vlastnictví České republiky udělil mikroextrakční metodě BSED-LLME a celému extrakčnímu postupu patentovou listinu č. 302841 (Vírový extrakční přípravek pro mikroextrakci kapaliny kapalinou)<sup>85</sup>.



**Obrázek 8.** Fotografie detailu BSED přípravku umístěného ve vialce o objemu 4 ml před zahájením extrakce (1- část přípravku ve tvaru zvonu; 2 - extrakční rozpouštědlo (obarvený heptan); 3 - vialka s vodným vzorkem obsahující analyty).



**Obrázek 9.** Fotografie detailu BSED přípravku s vytvořeným stabilním vírem během extrakce při otáčkách míchačky přibližně 800 rpm.

## 5.2. Stanovení modelové skupiny těkavých látek metodou BSED-LLME spojenou s rychlou plynovou chromatografií

Vlastnosti a použitelnost nového extrakčního nástavce a účinnost postupu celé mikroextrakční metody byly otestovány na extrakci modelové skupiny těkavých látek s odlišnou polaritou (toluen, ethylbenzen, mesitylen, fenol, nitrobenzen, n-oktanol, naftalen, dimethylftalát) ze spikovaných vodných vzorků. Jako extrakční rozpouštědlo byl vybrán heptan, který je nemísitelný s vodou a zároveň má nižší hustotu.

Pro nalezení nejvhodnějších extrakčních podmínek pro BSED-LLME metodu byly použity chemometrické postupy souhrnné označované jako experimentální design. Ke zjištění faktorů (čas extrakce, objem extrakčního činidla, rychlost míchání, vliv iontové síly a průměr extrakční nádoby), které významně ovlivňují účinnost extrakce, byl použit Plackett-Burman design. Po určení statisticky významných faktorů, bylo dalším krokem zjištění vztahů mezi nimi, k tomuto účelu posloužila metoda Central Composite Designu (CCD). Následujícím krokem byla vlastní optimalizace metodou Hooka a Jeevese a metodou tzv. Desirability funkce. Jako odpověď byl zvolen celkový součet relativních ploch píků zkoumaných analytů (toluen, ethylbenzen, mesitylen, fenol, nitrobenzen, n-oktanol, naftalen, dimethylftalát) vztažených k internímu standardu (methylhexadekanoát) extrahovaných do heptanu. Experimentální design byl tvořen a testován na třech odlišných statistických softwarech (Minitab 16, NCSS a Design Expert.)

Separace a analýza byla provedena metodou rychlé plynové chromatografie, při které byla použita kratší kolona o menším průměru, než je běžné u klasické GC. Kratší kolona dovoluje rychlejší průběh separace a možnost nastavení velmi rychlých teplotních programů. Díky tomu se podstatně sníží provozní náklady, jelikož nedochází k tak velké spotřebě nosného plynu. Za další výhodu lze považovat, že do kolony není nutné dávkovat velké množství vzorku<sup>81</sup>.

### 5.2.1. Experimentální design

#### Výběr zkoumaných faktorů a odpovědi

Jako odpověď byl vybrán celkový součet relativních ploch píků zkoumaných analytů (toluen, ethylbenzen, mesitylen, fenol, nitrobenzen, n-oktanol, naftalen, dimethylftalát) vztažených k internímu standardu (methylhexadekanoát) extrahovaných do heptanu.

Nejdůležitějším předpokladem pro optimalizaci je výběr jednotlivých faktorů, které byly voleny na základě informací z literatury, zkušenosti autorů a specifických poznatků získaných v průběhu používání nové mikroextrakční metody<sup>68</sup>. Proto byly jako faktory vybrány: čas extrakce, objem extrakčního činidla, přídavek chloridu sodného (iontová síla), rychlost míchání a průměr extrakční nádoby. Průměr nádoby byl vybrán jako jeden z parametrů k ověření, zda na extrakci nemá vliv délka sloupce víru s extrakčním rozpouštědlem, proto byly vybrány dvě skleněné nádoby s odlišným průměrem (2 a 2,7 cm). Úrovně pro další faktory byly zvoleny podle technických možností BSED nástavce, tj. objem extrakčního rozpouštědla by se měl pohybovat ve stovkách  $\mu\text{l}$ , aby během intenzivního míchání během extrakce nedošlo k velkému úbytku rozpouštědla. Čas extrakce byl dalším ze zkoumaných faktorů, který byl nastaven v rozmezí od 20 do 30 min. Rychlost míchání byla testována v rozmezí od 500 do 850 rpm, pokud by rychlost míchání byla příliš malá, nevytvořil by se během extrakce vír, čímž by došlo ke snížení extrakční účinnosti. Přídavek chloridu sodného byl zkoumán, zda na extrakci pomocí BSED nemá vliv iontová síla, která může podstatně změnit extrakční účinnost (Tab. 1).

#### Screening

Podstatou screeningu je určení faktorů, které mají na zkoumanou odpověď statisticky významný vliv. K tomuto účelu byl zvolen Plackett-Burman design, jenž je založen na předpokladu, že interakce mezi jednotlivými faktory jsou ignorovány a jsou zjišťovány pouze hlavní efekty. Proto je pro zjištění hlavních faktorů třeba menší počet experimentů<sup>62</sup>.

Pro každý zkoumaný faktor - čas extrakce, objem extrakčního činidla, přídavek chloridu sodného, rychlost míchání a průměr extrakční nádoby - byly vybrány dvě reálné hodnoty a těm přiřazeny dvě kódované hodnoty: -1 pro nižší a 1 pro vyšší (+1)<sup>62</sup>. K uvedeným faktorům byly přidány pro kontrolu dva tzv. Dummy faktor (umělý faktor, který se používá jen jako kontrolní; pokud by Dummy faktor vyšel jako statisticky

významný, pak nejsou ostatní faktory nebo jejich rozmezí vhodně zvoleny<sup>65,86</sup>). Všechny vybrané faktory a jejich úrovně jsou uvedeny v Tab. 3.

Na základě uvedených faktorů byl ve statistickém programu vytvořen plán experimentů, podle něhož bylo provedeno osm měření (Tab. 1). Po provedení experimentů bylo v programu NSCC provedeno statistické vyhodnocení dle GLM-ANOVA (General Linear Model-Analysis of Variance, analýza rozptylu), kde byly pomocí t-testu stanoveny hlavní efekty (statisticky významné faktory) s 95% pravděpodobností. Pro lepší představu o vlivu jednotlivých parametrů na mikroextrakci byl vytvořen tzv. Paretův graf (Obr. 10) pro celkový součet relativních ploch analyzovaných sloučenin. Na ose *x* jsou uvedeny standardizované efekty a na ose *y* jsou zkoumané faktory bez jejich vzájemných interakcí.

Test významnosti efektů na základě Plackett-Burman designu ukázal, že největší vliv na odpověď má objem extrakčního činidla (heptan) a doba extrakce. Z Paretova grafu je patrné, že přídavek chloridu sodného má na extrakci minimální vliv, ale z ostatních výsledků pro jednotlivé sloučeniny bylo zjištěno, že chlorid sodný ovlivňuje extrakci u polárnějších sloučenin (fenol, dimethylftalát). Z tohoto důvodu byla proměnná přídavek chloridu sodného spolu s časem a objemem zahrnuta do modelování. Nejmenší vliv na extrakční účinnost má rychlost míchání. Pokud by byla použita rychlost míchání větší než 1 000 rpm, mohlo by dojít během extrakce k odtrhávání kapek heptanu ze spodní strany vodního víru, čímž by došlo ke zbytečným ztrátám extrakčního činidla, které se rozptýlí ve vzorku a zachycuje se na stěnách nádoby a nešlo by po ukončení extrakce odebrat. Jako dalším nevýznamným faktorem se ukázala šířka nádoby.

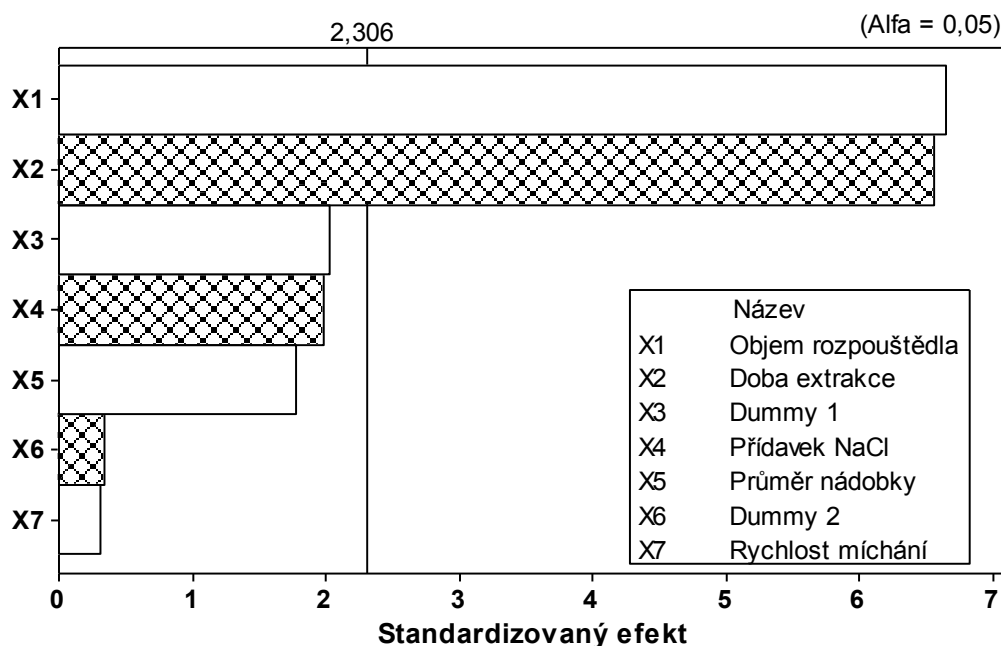
Ze zjištěných výsledků screeningové studie bylo v optimalizaci pokračováno se třemi proměnnými (čas extrakce, objem extrakčního činidla a přídavek chloridu sodného). U nevýznamných faktorů byla rychlost míchání nastavena na 850 rpm a použitá extrakční nádoba měla průměr 2,0 cm.

**Tabulka 3.** Seznam faktorů, jejich úrovně a plán experimentu vytvořený statistickým programem podle Plackett-Burman designu.

	Faktor	Úroveň	
		nižší	vyšší
		(-1)	(+1)
X <sub>1</sub>	Objem extrakčního rozpouštědla (μl)	150	250
X <sub>2</sub>	Doba extrakce (min)	20	30
X <sub>3</sub>	Dummy 1	-1	1
X <sub>4</sub>	Přídavek chloridu sodného (g)	0,8	2,0
X <sub>5</sub>	Průměr nádoby (cm)	2,0	2,7
X <sub>6</sub>	Dummy 2	-1	1
X <sub>7</sub>	Rychlost míchání (rpm)	500	850

Měření	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
2	-1	1	-1	-1	1	-1	1
3	1	-1	-1	-1	-1	1	1
4	1	-1	1	-1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	1	-1	-1	1
6	1	1	-1	1	-1	-1	-1
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	1	1	1	1	1	1	1



**Obrázek 10.** Paretův graf pro celkový součet relativních ploch analytů extrahovaných metodou BSED-LLME. Svislá čára v grafu definuje 95% hladinu významnosti.

### Modelování

V následujícím kroku byl použit Central Composite Design (CCD) pro tři faktory (doba extrakce, objem extrakčního činidla a přídavek chloridu sodného). V Tabulce 2 jsou uvedeny hladiny jednotlivých faktorů, kde (-1) označuje nižší a (+1) vyšší úroveň, 0 odpovídá centrálnímu bodu. Navíc jsou k nim přidány axiální body ( $\alpha$ ), které rozšiřují experimentální prostor a rovněž charakterizují i zakřivení plochy odezvy<sup>3,62</sup>.

Rozdíl mezi použitými statistickými programy je v hodnotách použitých pro axiální (tzv. star neboli  $\alpha$ ) body, což se odvíjí od odlišného typu modelování a následné matematické optimalizace, kdy program NCSS používá sférický typ CCD s hodnotami  $\pm 1,73$ , zatímco statistické programy Design Expert a Minitab 16 používají tzv. rotatable CCD, a proto mají axiální body hodnoty  $\pm 1,68$ <sup>87</sup>.

V Tab. 4 je uveden plán experimentů (20 měření) podle navrženého CCD plánu s jednotlivými kombinacemi a úrovněmi faktorů podle programů Minitab 16 a Design Expert. Stejným způsobem byl navržen plán experimentů programem NCSS, pouze s jinou hodnotou axiálních bodů ( $\pm 1,73$ ) (není uvedeno v textu).



**Tabulka 4.** Experimentální faktory, jejich úrovně a plán experimentu podle CCD návrhu pro optimalizaci extrakčních podmínek BSED-LLME s fast GC-FID. Plán měření navržený programem Minitab 16 a Design Expert.

Faktor	Úroveň				
	- $\alpha$	nižší	střední	vyšší	+ $\alpha$
	(-1,68)	(-1)	(0)	(+1)	(+1,68)
X <sub>1</sub> Doba extrakce (min)	16	20	25	30	34
X <sub>2</sub> Objem extrakčního rozpouštědla ( $\mu$ l)	115	150	200	250	285
X <sub>3</sub> Přídavek NaCl (g)	0,0	0,8	1,8	2,8	3,5

Měření	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Měření	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	1	-1	1	11	1	1	-1
2	-1	-1	-1	12	0	-1,68	0
3	0	0	0	13	0	0	+1,68
4	0	0	0	14	0	0	-1,68
5	-1	1	-1	15	0	0	0
6	-1	1	1	16	+1,68	0	0
7	0	0	0	17	0	0	0
8	1	1	1	18	0	+1,68	0
9	1	-1	-1	19	-1,68	0	0
10	-1	-1	1	20	0	0	0

Po statistickém vyhodnocení výsledků experimentů metodou analýzy rozptylu (ANOVA) byly ze statistických programů získány matematické rovnice (viz. rovnice 10) pro celkový součet relativních ploch, jejichž regresní koeficienty jsou uvedeny v Tabulce 5. Z nich lze vyčíst, že závislost není lineární a že významnou interakcí mezi faktory je interakce mezi dobou extrakce a objemem extrakčního rozpouštědla. Kladná znaménka ukazují, že doba extrakce by měla být co nejdelší a objem rozpouštědla a přídavek soli by měly být co nejnižší.

Koeficient determinace  $R^2$  pro celkovou plochu se pohyboval v rozmezí od 0,8884 do 0,9056, což ukazuje na dobrou shodu mezi modelem (polynomiální rovnice) a změřenými daty.

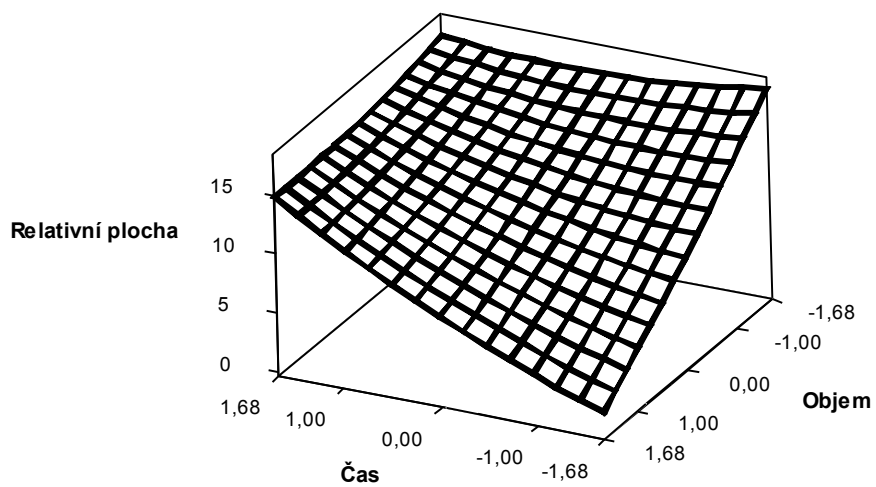
**Tabulka 5.** Regresní koeficienty pro zkoumané faktory pro celkový součet relativních ploch píků analytů extrahovaných metodou BSED-LLME vypočtených analýzou experimentálních dat získaných dle plánů měření navržených použitými programy.

	NCSS	Design Expert	Minitab 16
Konstanta $\beta$	+11,61	+11,63	+11,21
$X_1$ ...Doba extrakce	+ 1,78	+ 1,79	+ 1,79
$X_2$ ...Objem extrakčního rozpouštědla	- 2,60	- 2,62	- 2,62
$X_3$ ...Přídavek NaCl	- 1,50	- 1,52	- 1,52
$X_1^2$			
$X_2^2$			
$X_3^2$	- 1,36	- 1,41	- 1,36
$X_1 \cdot X_2$	+ 1,22	+ 1,22	+ 1,22
$X_1 \cdot X_3$			
$X_2 \cdot X_3$			
$R^2$	0,8884	0,8807	0,9056

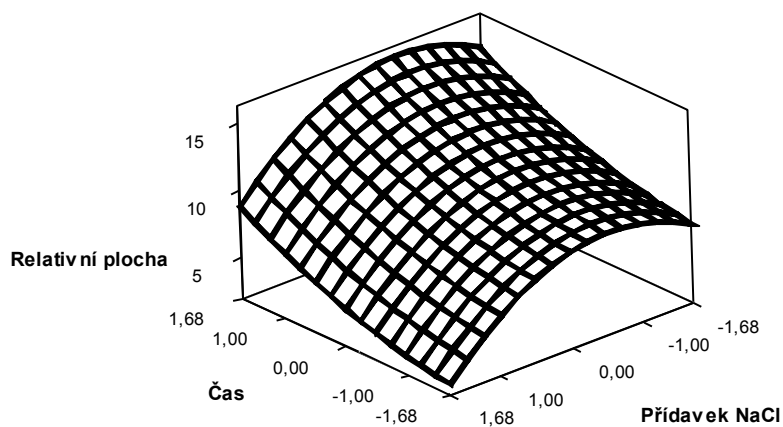
V programu Minitab 16 byly vytvořeny trojrozměrné grafy odezвовých ploch na základě získaných matematických rovnic, které ukazují vzájemné vztahy mezi jednotlivými zkoumanými faktory (Obr. 11-13), za podmínky, kdy je vždy jeden z faktorů konstantní při střední hodnotě experimentálního rozsahu. Na Obr. 11 je vidět

závislost odezvy na objemu a čase, kdy v nejdelším čase je závislost odezvy plochy na objemu prakticky zanedbatelná. Naopak v nejkratším použitém čase se závislost odezvy na objemu extrakčního rozpouštědla stává strmou s maximem při minimálním objemu. Obdobně je vidět tendence, že při minimálním objemu extrakčního rozpouštědla je závislost na čase zanedbatelná, zatímco závislost odezvy je strmá při maximálním objemu, s minimem při maximálním čase, tj. čím větší objem extrakčního rozpouštědla, tím je třeba pro extrakci delší čas. Na Obr. 12 je zobrazen průběh závislosti relativní plochy na době extrakce a přídavku chloridu sodného. Z obrázku je patrné, že závislost odezvy na přídavku NaCl se v krajních polohách použitých časů neliší svým průběhem, ale pouze hodnotou maxima. Obdobné rozdíly jsou patrné i pro závislost odezvy na použitém čase extrakce pro krajní hodnoty přídavků NaCl. Na Obr. 13 je vidět nárůst relativní plochy s klesajícím objemem, pokud je přídavek chloridu sodného minimální klesá. V případě maximálního použitého přídavku NaCl je pozorovatelná obdobná tendence, avšak s podstatně menší směrnici. Obdobná situace panuje pro závislost relativní plochy na přídavku NaCl v mezních hodnotách použitého objemu, kdy při minimálním objemu je odezva největší s nevýrazným maximem pro menší množství NaCl.

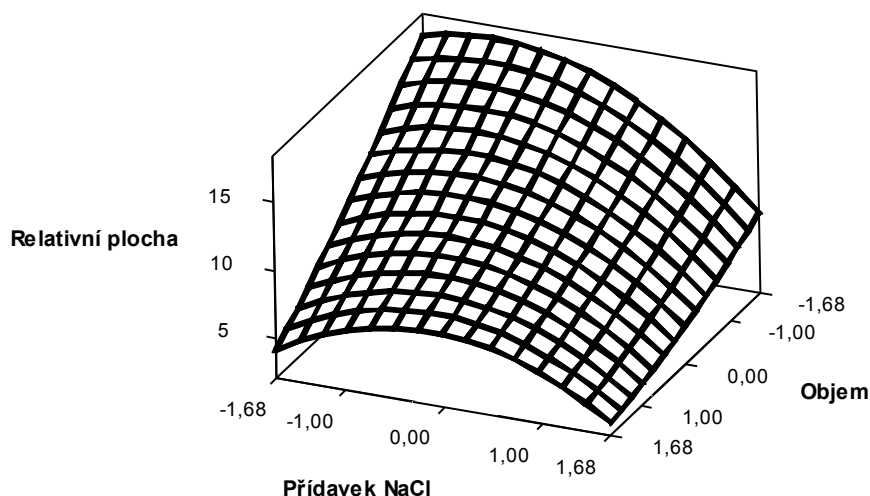
Pomocí trojrozměrných grafů je možné popsat pouze průběh (trend) dvou vybraných faktorů, kdy všechny ostatní faktory jsou nastaveny konstantně. Pro nalezení optimálních podmínek více než dvou faktorů je tedy nutné použít složitější čistě matematické metody více popsané v části optimalizace. Z tohoto důvodu nejsou tyto vybrané příklady závislostí faktorů dále rozebírány.



**Obrázek 11.** Graf závislosti odezvové plochy (celkový součet relativních ploch píků analytů) na době extrakce ( $X_1$ ) a na objemu extrakčního rozpouštědla ( $X_2$ ); extrakční rozpouštědlo: heptan, přídavek chloridu sodného ( $X_3$ ) je 1,8 g. Hodnoty na osách x jsou v kódované podobě.



**Obrázek 12.** Graf závislosti odezvové plochy (celkový součet relativních ploch píků analytů) na době extrakce ( $X_1$ ) a přídavku chloridu sodného ( $X_3$ ); extrakční rozpouštědlo: heptan, objem extrakčního rozpouštědla ( $X_2$ ) je 200  $\mu\text{l}$ . Hodnoty na osách x jsou v kódované podobě.



**Obrázek 13.** Graf závislosti odezvové plochy (celkový součet relativních ploch píků analytů) na přídavku chloridu sodného ( $X_3$ ) a na objemu extrakčního rozpouštědla ( $X_2$ ); extrakční rozpouštědlo: heptan, doba extrakce ( $X_1$ ) je 25 min. Hodnoty na osách x jsou v kódované podobě.

### Optimalizace

Posledním krokem v rámci DOE je nalezení konkrétních hodnot pro jednotlivé statisticky významné faktory, aby zkoumaná odpověď byla optimální. V tomto případě byla jako odpověď zvolena maximální hodnota celkového součtu relativních ploch píků analytů. Po zjištění jednotlivých rovnic byla v programu NCSS provedena optimalizace metodou Hooka a Jeevese a v programu Design Expert a Minitab byly hodnoty jednotlivých faktorů a předpovězené odpovědi zjištěny pomocí Desirability funkce. Zjištěná optimální nastavení jednotlivých statisticky významných faktorů jsou uvedena v Tab. 6. Následně byly provedeny experimenty podle výsledků z jednotlivých programů a v grafu je uvedeno porovnání mezi předpovězenou a reálně zjištěnou odpovědí (Obr. 14). Nejlepší shoda mezi předpovězenou a experimentálně zjištěnou odpovědí byla u programu NCSS, ale obě hodnoty byly nižší než u programů Minitab 16 a Design Expert. Navíc tento rozdíl je způsoben použitím rozdílných CCD designů<sup>87</sup> a metod pro optimalizaci, kdy Minitab 16 a Design Expert používají tzv. rotatable CCD, zatímco v NCSS softwaru je zabudován sférický CCD design. Optimální faktory stanovené

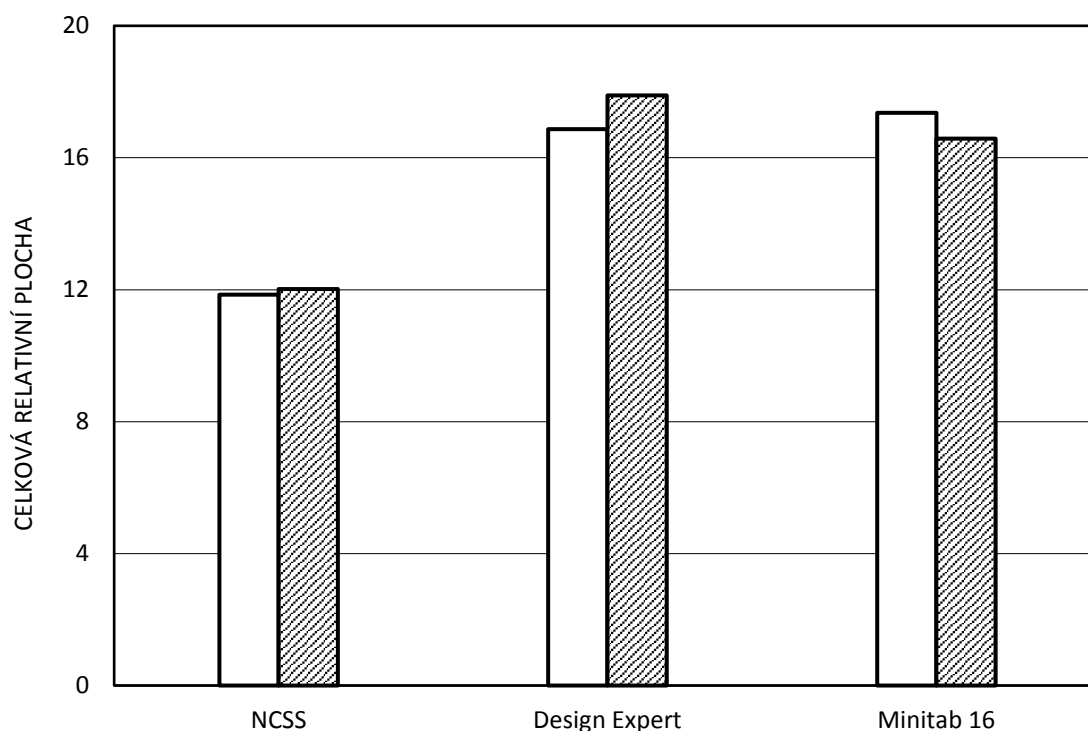
Design Expertem a Minitabem 16 se liší jen v přidavku soli a dávají sice podobné předpovědi, ale rozdílné výsledky. Z důvodu malého počtu měření nebylo možno provést statistické hodnocení shody předpovězených a naměřených hodnot.

Pro další práci byl vybrán program Minitab 16, a to z důvodů uživatelské přívětivosti a poměrné jednoduchosti v ovládání.

**Tabulka 6.** Optimální hodnoty zjištěné ze statistických programů pro maximální odpověď (celkový součet relativních ploch pík analytů extrahovaných metodou BSED-LLME).

Program	t (min)	V (heptan) ( $\mu$ l)	m (NaCl) (g)
Design Expert	16	115	1,24
NCSS	25	200	1,26
Minitab 16	16	115	1,01

Jako optimální podmínky prekoncentrační metody BSED-LLME s fast GC-FID bylo vybráno nastavení zjištěné z programu Minitab 16: doba extrakce 16 min, objem extrakčního rozpouštědla heptanu 115  $\mu$ l, objem vzorku 10 ml, přidavek chloridu sodného 1,01 g, průměr nádoby 2,0 cm a rychlost míchání během extrakce 850 rpm.



**Obrázek 14.** Graf porovnávající optimální hodnoty zjištěné statistickými programy a experimentálně zjištěné hodnoty celkového součtu relativních ploch píků za uvedených optimálních podmínek extrakční metody BSED-LLME (Tab. 4). Bílé sloupce označují předpovězenou hodnotu odpovědi zjištěnou statistickými programy. Šrafované sloupce označují hodnoty, které byly zjištěny experimentálně.

### 5.2.2. Validace metody

Po zjištění optimálních podmínek byly naměřeny kalibrační závislosti jednotlivých látek v rozsahu od 0 do 1 000  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (8 kalibračních bodů). Korelační koeficienty se pohybovaly v rozmezí od 0,9979 (n-oktanol) do 0,9998 (nitrobenzen). Meze stanovitelnosti ILOQ byly v rozmezí od 5,4  $\mu\text{g ml}^{-1}$  pro n-oktanol až do 19,2  $\mu\text{g ml}^{-1}$  pro dimethyltalát. Meze stanovitelnosti (MLOQ) metody BSED-LLME byly v oblasti od 0,2  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (n-oktanol) do 34,5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (fenol). V Tab. 7 jsou uvedeny obohacující faktory (EF) v rozmezí od 0,2 (fenol) do 40 (naftalen) s opakovatelností od 2 % do 9 %

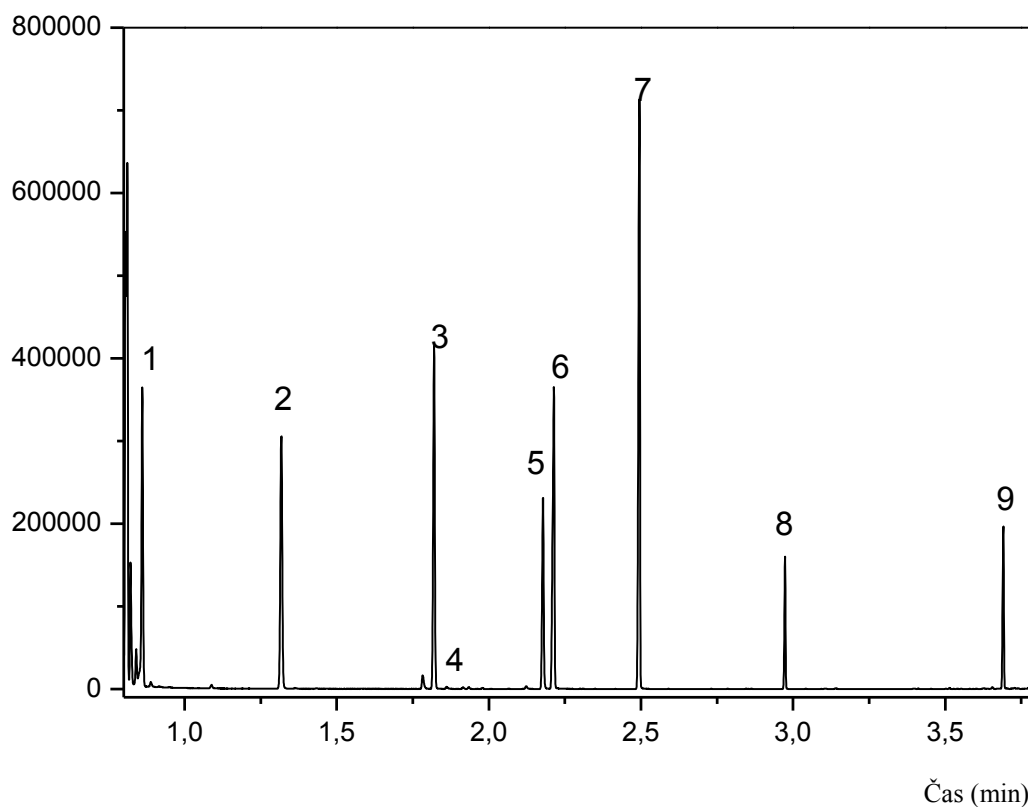
Na chromatogramu (Obr. 15) je uveden záznam separace vybraných analytů, které byly extrahovány metodou BSE-LLME za optimálních podmínek.



**Tabulka 7.** Koeficienty determinace kalibračních přímk (R<sup>2</sup>), limity stanovitelnosti rychlé GC-FID metody a mikroextrakce BSED-LLME pro vybrané analyty extrahované do heptanu. Obohacující faktory a jejich relativní směrodatné odchylky.

Analyt	R <sup>2</sup>	ILOQ	MLOQ	EF	RSD
		µg ml <sup>-1</sup>	µg ml <sup>-1</sup>		%
Toluen	0,9997	13,0	0,4	35	6
Ethylbenzen	0,9995	8,7	0,3	33	7
Mesitylen	0,9996	9,7	0,3	33	5
Fenol	0,9963	6,9	34,5	0,2	9
Nitrobenzen	0,9998	9,4	0,4	24	3
n-Oktanol	0,9979	5,4	0,2	36	3
Naftalen	0,9998	6,8	0,2	40	2
Dimethylftalát	0,9992	19,2	1,9	10	4

*R<sup>2</sup> koeficient determinace; koncentrace spikovaných analytů 10 µg ml<sup>-1</sup> v deionizované vodě. RSD...relativní směrodatná odchylka pro n=3 měření;*



**Obrázek 15.** Chromatogram skupiny analytů extrahovaných do heptanu za optimálních extrakčních podmínek metody BSED-LLME spojenou s fast GC-FID. Extrakční podmínky: doba extrakce 16 min, objem heptanu 115  $\mu\text{l}$ , přídavek 1,01 g NaCl, rychlost míchání 850 rpm. Koncentrace všech analytů v destilované vodě 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Separální podmínky GC-FID: kolona Chromacol CP-Sil 5CB, teplota injektoru: 300  $^{\circ}\text{C}$ , teplotní program: 40  $^{\circ}\text{C}$  (1 min), 50  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  do 100  $^{\circ}\text{C}$ , 100  $^{\circ}\text{C min}^{-1}$  do 250  $^{\circ}\text{C}$  (1 min), teplota FID: 300  $^{\circ}\text{C}$ . (1...toluen; 2...ethylbenzen; 3...mesitylen; 4...fenol; 5...nitrobenzen; 6...n-oktanol; 7...naftalen; 8...dimethylftalát; 9...methylhexadekanoát-IS).

Mikroextrakční metoda BSED-LLME ve spojení s rychlou plynovou chromatografií se ukázala jako vhodnou a rychlou metodou pro stanovení těkavých analytů z vodných vzorků.

Vzhledem k převažujícímu nepolárnímu charakteru modelové skupiny analytů byl heptan vybrán jako extrakční rozpouštědlo pro optimalizaci extrakce pomocí BSED. Rozborem extrakčního procesu bylo vybráno pět faktorů (čas extrakce, objem extrakčního činidla, rychlost míchání, vliv iontové síly a průměr extrakční nádoby), které by mohly mít na extrakční účinnost vliv. Pro účely screeningu (Plackett-Burman design) k určení významnosti jednotlivých faktorů, navrhl statistický software sadu měření v rámci definovaných experimentálních rozsahů jednotlivých faktorů.

Test významnosti efektů na základě Plackett-Burmanova designu ukázal, že největší vliv na odpověď má objem extrakčního činidla a doba extrakce. Přestože množství přídavku chloridu sodného nemělo statisticky významný vliv na extrakci celé skupiny analytů, z výsledků pro jednotlivé analyty však bylo zjištěno, že chlorid sodný významně ovlivňuje extrakci polárnějších sloučenin. Z tohoto důvodu byla proměnná přídavek chloridu sodného spolu s časem a objemem zahrnuta do další fáze optimalizace, kterou je Central composite design sloužící k nalezení matematické rovnice popisující vztahy mezi statisticky významnými faktory a následné predikce konkrétních hodnot jednotlivých faktorů pro maximální účinnost extrakce vyjádřenou součtem relativních ploch píků modelových analytů.

V této kapitole bylo cílem ověřit možnosti optimalizace nově vyvíjené extrakční techniky za pomoci tří různých statistických programů (NCSS, Design Expert a Minitab 16). Z hlediska ceny a jednoduchého ovládání byl pro další statistické optimalizace zvolen statistický program Minitab 16. Statistický program NCSS obsahoval velké množství funkcí, které nebyly nutné pro daný účel a Design Experiment program byl finančně nákladný. Navíc je v NCSS softwaru používán sférický CCD a pro nalezení optimálních hodnot se pracuje s metodou Hooka a Jeevese.

### **5.3. Stanovení modelové skupiny analytů metodou BSED-LLME s GC-MS pomocí extrakčních rozpouštědel heptanu a terciálního butylacetátu**

Metoda BSED-LLME byla použita pro stanovení stejné modelové skupiny analytů jako v předchozí kapitole (toluen, ethylbenzen, mesitylen, fenol, nitrobenzen, n-oktanol, naftalen, dimethylftalát, methylhexadekanoát) s tím rozdílem, že pro separaci byla použita metoda plynové chromatografie s hmotnostní detekcí.

Na základě nově získaných zkušeností s BSED nástavcem a celým extrakčním postupem byly upraveny rozsahy u zkoumaných faktorů, které byly zjištěny v předchozí kapitole. Navíc bylo pro extrakci vybrané skupiny analytů testováno jiné extrakční rozpouštědlo - terciální butylacetát (TBAC), který má oproti heptanu vyšší polaritu, ale je lehčí než voda a má i podobnou teplotu varu.

#### **5.3.1. Optimalizace podmínek extrakce**

##### **Výběr faktorů a odpovědi**

Jako zkoumané faktory byly vybrány: rychlostí míchání, přidavek chloridu sodného (vliv iontové síly), typ extrakčního rozpouštědla (heptan a TBAC), doba extrakce, objem rozpouštědla, průměr vialky. Jako další faktory byly přidány: použití plastové zátky na BSED nástavec, která měla zabránit případnému odpařování extrakčního rozpouštědla během extrakce, výběr ze dvou identických BSED přípravků, kdy byla zkoumána jejich robustnost, čištění BSED přípravku acetonem těsně před extrakcí, aby nedocházelo případnému přenosu vzorku (carry over error) z předchozích pokusů. Jako poslední faktor byl přidán opět jeden umělý faktor (Dummy) ke kontrole screeningového postupu.

Celkový součet relativních ploch pík analytů (toluen, ethylbenzen, mesitylen, naftalen, dimethylftalát) byl vybrán jako zkoumaná odpověď a bylo hledáno její maximum. Pro fenol, nitrobenzen a oktanol nebyly získány výsledky v žádném z uvedených organických rozpouštědel, jelikož se u těchto analytů projevila velká asymetrie pík. Při nízkých koncentracích nebylo možné tyto analyty detekovat.

##### **Screening**

Pro metodu screeningu, tedy nalezení statisticky významných faktorů, byl vybrán Plackett-Burmanův design, který je založen na hledání hlavních efektů bez interakce mezi

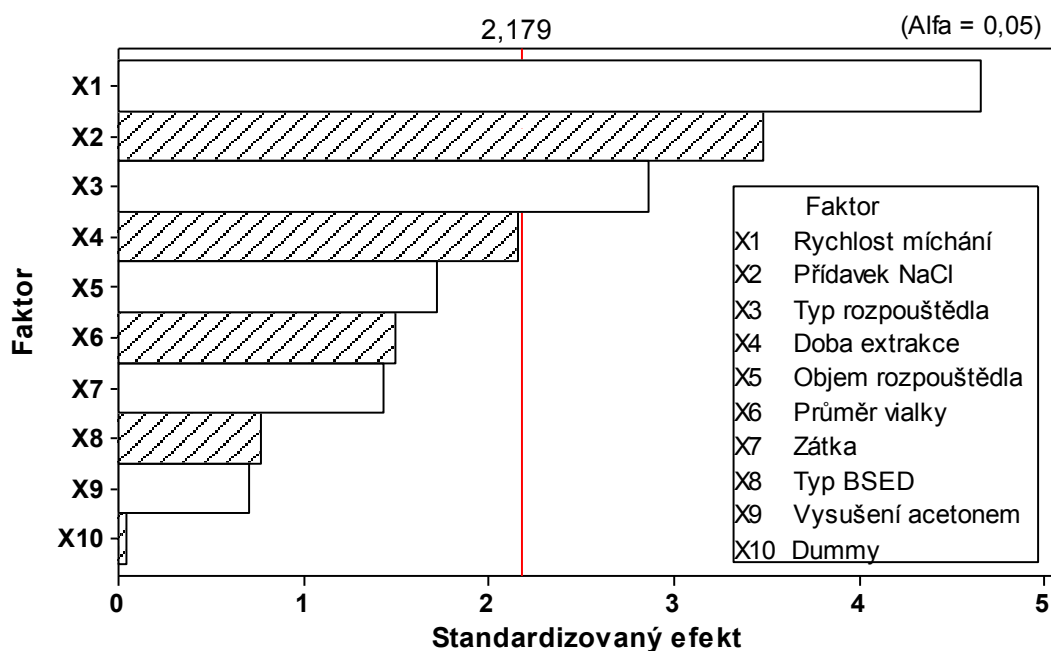
faktory. Úrovně pro jednotlivé faktory byly oproti Tab.3 upraveny podle praktických zkušeností s BSED nástavcem. V Tab. 8 jsou uvedeny experimentální faktory a jejich jednotlivé úrovně (-1, nižší) a (+1, vyšší). Plán experimentů obsahuje skupinu dvanácti měření, které byly dvakrát zopakovány, aby se zabránilo případným systematickým chybám. Po provedení předepsaných pokusů byly získané výsledky (celkový součet relativních ploch píků analytů) zpracovány pomocí ANOVA testů. Jako statisticky významné faktory byly určeny: rychlost míchání, vliv iontové síly, typ rozpouštědla a doba extrakce, které překročily hranici 95 % na hladině významnosti. Faktor typ rozpouštědla se ukázal jako statisticky významný, ale do modelování nebyl zahrnut, protože pro modelování byl vybrán jako extrakční rozpouštědlo TBAC. Ostatní faktory se ukázaly jako statisticky nevýznamné a pro další postup měření byly nastaveny takto: objem rozpouštědla 150  $\mu$ l, průměr vialky 2 cm, použití zátky BSED přípravku a před použitím byl BSED nástavec propláchnut acetonem. Faktor Dummy 1 se ukázal jako statisticky nevýznamný, což dokázalo, že vybraný model byl v pořádku. Výsledky byly zpracovány v grafické podobě (Paretův graf, Obr. 16).

**Tabulka 8.** Experimentální faktory, jejich úrovně a plán měření podle Plackett-Burmanova návrhu pro zjištění statisticky významných faktorů metody BSED-LLME pro extrakci skupiny analytů (toluen, ethylbenzen, mesitylen, naftalen, dimethylfталát).

Faktor	Úroveň	
	nižší	vyšší
	(-1)	(+1)
X <sub>1</sub> Rychlost míchání (rpm)	750	950
X <sub>2</sub> Přídavek NaCl (g)	0,5	3,0
X <sub>3</sub> Typ extrakčního rozpouštědla	Heptan	TBAC
X <sub>4</sub> Doba extrakce (min)	8	20
X <sub>5</sub> Objem rozpouštědla (μl)	150	250
X <sub>6</sub> Průměr vialky (cm)	2,0	2,7
X <sub>7</sub> Zátka BSED přípravku	Ne	Ano
X <sub>8</sub> Typ extrakčního BSED nástavce	-1	+1
X <sub>9</sub> Čištění BSED nástavce acetonem	Ne	Ano
X <sub>10</sub> Dummy 1	-1	+1

Měření	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	X <sub>10</sub>
1	-1	1	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1	-1
3	1	1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	1
4	1	-1	-1	1	1	-1	1	1	-1	1
5	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
6	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
7	-1	1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	1
8	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1	1	1
9	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1	1
10	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
11	1	1	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1
12	-1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1



**Obrázek 16.** Paretův graf statisticky významných faktorů metody BSED-LLME pro extrakci vybraných analytů. Svislá příčka znázorňuje hladinu 95% významnosti.

### 5.3.1.1. Optimalizace metody BSED LLME pro TBAC

Modelování bylo provedeno na základě CCD, který byl vytvořen v programu Minitab 16. V Tab. 9 jsou uvedeny statisticky významné faktory, jejich úrovně a plán experimentů. V tabulce 8 je dále uveden seznam 20 měření (8 - faktoriálních, 6 - centralních a 6 - axiálních bodů) podle navrženého CCD plánu s jednotlivými kombinacemi. Po vyhodnocení metodou analýzy rozptylu (ANOVA) byla z programu Minitab 16 získána kvadratická rovnice popisující závislost odpovědi na objemu rozpouštědla (TBAC), době extrakce a přídavku chloridu sodného (11).

$$R = 10,56 + 2,73 \cdot X_1 + 2,85 \cdot X_4 + 2,02 \cdot X_1^2 \quad (11)$$

kde R označuje hledanou odpověď,  $X_1$ ...rychlost míchání,  $X_4$ ...doba extrakce.

Koeficient determinace  $R^2$  měl hodnotu 0,7624.

Minitab 16 vytvořil na základě získané matematické rovnice odpovídající trojrozměrné grafy odezvodových ploch, které zobrazují závislosti zkoumané odpovědi (celkový součet relativních ploch píků analytů) na jednotlivých faktorech (Obr. 17-19). Na osách  $x$  a  $y$  jsou uvedeny statisticky významné faktory a na ose  $z$  je hledaná odpověď za podmínky, kdy jsou ostatní faktory konstantní. Z uvedených závislostí je možné odvodit, že rychlost míchání vzorku by měla být co nejvyšší, maximálně však kolem rychlosti 1000 rpm. Při rychlosti nad 1000 rpm může docházet k odtržení kapek rozpouštědla z víru. Pro extrakční účinnost bylo zjištěno, že je vhodnější nepřidávat vůbec žádný chlorid sodný.

Po nalezení kvadratické rovnice byla v program Minitab 16 provedena optimalizace, kdy bylo pomocí statistické Desirability funkce nalezeno optimální nastavení pro statisticky významné faktory: rychlost míchání 1000 rpm, přídavek chloridu sodného 0 g, doba extrakce 24 min. Ostatní faktory byly nastaveny jako typ rozpouštědla TBAC, objem rozpouštědla 150  $\mu$ l, průměr vialky 2 cm, bez použití zátky, vyčištění BSED přípravku před extrakcí acetonem nebylo nutné.

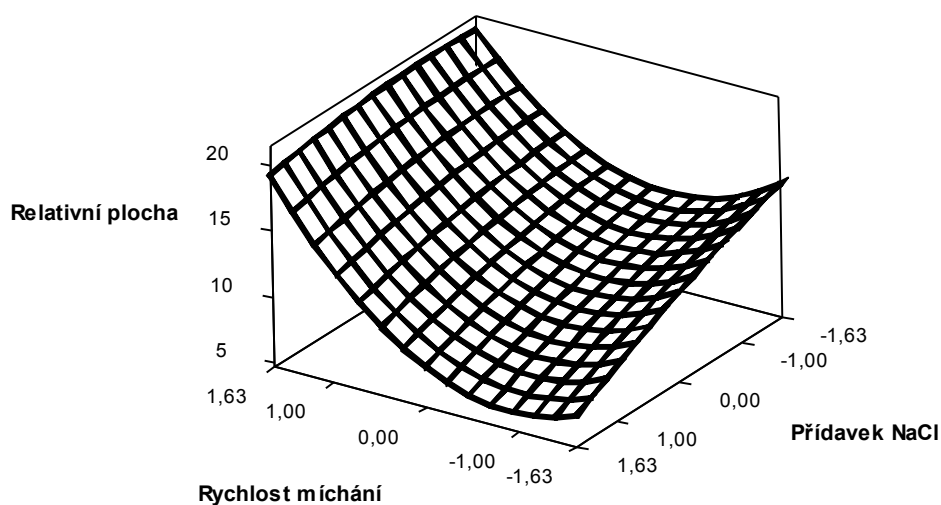


**Tabulka 9.** Experimentální faktory, jejich úrovně a plán experimentů podle Central Composite Designu pro optimalizaci extrakčních podmínek metody BSED-LLME pro extrakci skupiny analytů (toluen, ethylbenzen, mesitylen, naftalen, dimethylftalát) do TBAC.

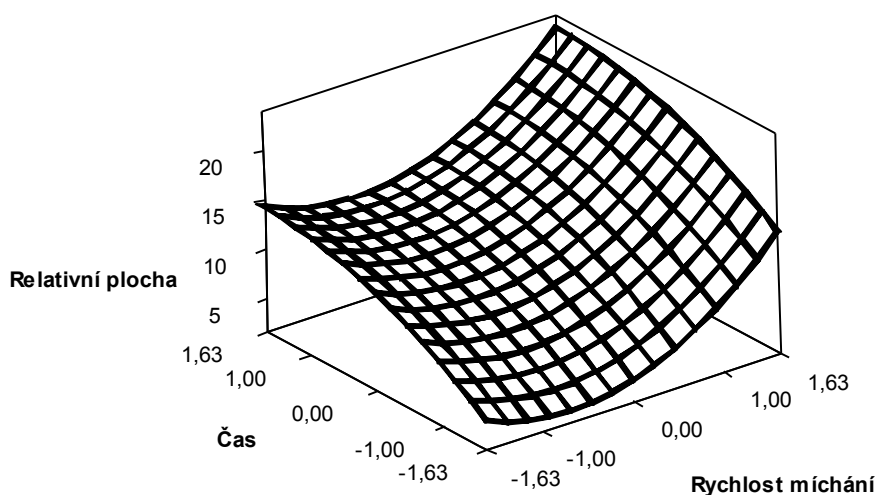
Faktor	Úroveň				
	- $\alpha$ (1,63)	nižší (-1)	střední (0)	vyšší (+1)	+ $\alpha$ (1,63)
X <sub>1</sub> Rychlost míchání (rpm)	690	750	850	950	1013
X <sub>2</sub> Přídavek NaCl (g)	0,0	0,5	1,8	3,0	3,5
X <sub>4</sub> Doba extrakce (min)	4	8	14	20	24

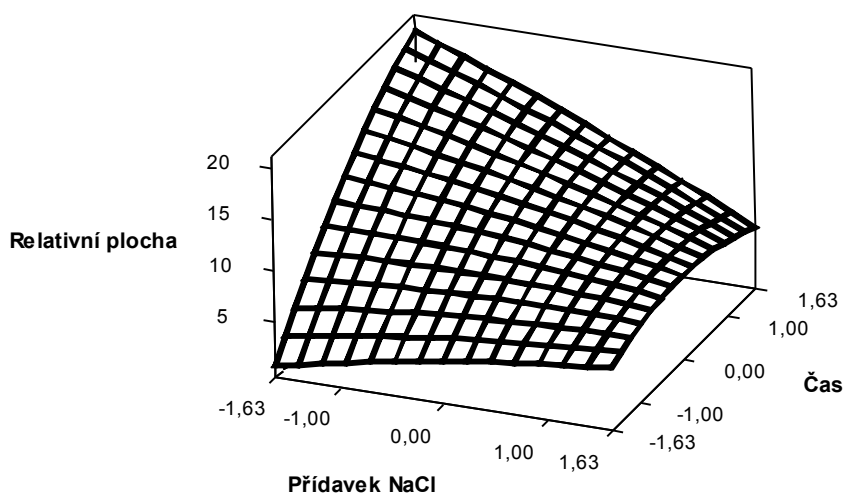
Měření	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Měření	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	0	-1,63	0	11	0	0	0
2	0	+1,63	0	12	1	1	-1
3	+1,63	0	0	13	1	-1	1
4	0	0	0	14	0	0	0
5	0	0	+1,63	15	-1	1	-1
6	0	0	0	16	-1	1	1
7	-1,63	0	0	17	0	0	0
8	0	0	-1,63	18	1	1	1
9	1	-1	-1	19	0	0	0
10	-1	-1	-1	20	-1	-1	1



**Obrázek 17.** Graf závislosti odezvové plochy (celkový součet relativních ploch píků analytů) na rychlosti míchání ( $X_1$ ) a přídavku chloridu sodného ( $X_2$ ); extrakční rozpouštědlo: TBAC, doba extrakce ( $X_4$ ) je 14 min. Hodnoty na osách x jsou v kódované podobě.



**Obrázek 18.** Graf závislosti odezvové plochy (celkový součet relativních ploch píků analytů) na rychlosti míchání ( $X_1$ ) a na době extrakce ( $X_4$ ), extrakční rozpouštědlo: TBAC, přídavek chloridu sodného ( $X_2$ ) je 1,75 g. Hodnoty na osách x jsou v kódované podobě.



**Obrázek 19.** Graf závislosti odezvové plochy (celkový součet relativních ploch píků analytů) na době extrakce ( $X_4$ ) a na přídavku chloridu sodného ( $X_2$ ); extrakční rozpouštědlo: TBAC, rychlost míchání ( $X_1$ ) je 850 rpm. Hodnoty na osách x jsou v kódované podobě.

### 5.3.1.2. Optimalizace metody BSED-LLME pro heptan

Z předchozí kapitoly týkající se optimalizace experimentálních podmínek metody BSED-LLME s rychlou plynovou chromatografií byly vybrány tři statisticky významné faktory (objem rozpouštědla, doba extrakce a přídavek chloridu sodného). Z praktického použití BSED nástavce a z povahy extrakčního rozpouštědla heptanu bylo možné snížit rozsah objemu rozpouštědla na 90-140  $\mu\text{l}$ , dobu extrakce prodloužit na 30 min a rozsah přídavku chloridu sodného zmenšit na 0-2 g. Pro tyto faktory bylo provedeno modelování pomocí metody CCD postupem, aby byla zjištěna matematická rovnice a následně optimální hodnoty pro jednotlivé faktory. Statistický program Minitab 16 navrhl plán měření s 20 experimenty (Tab. 10).

**Tabulka 10.** Experimentální faktory, jejich úrovně a plán experimentů vytvořený statistickým programem Minitab 16 podle CCD pro metodu BSED-LLME s GC-MS pro extrakci skupiny analytů (toluen, ethylbenzen, mesitylen, naftalen, dimethylftalát) do extrakčního rozpouštědla heptanu.

Faktor	Úroveň				
	- $\alpha$	nižší	střední	vyšší	+ $\alpha$
	(1,68)	(-1)	(0)	(+1)	(1,68)
X <sub>1</sub> Objem rozpouštědla ( $\mu$ l)	90	100	115	130	140
X <sub>2</sub> Doba extrakce (min)	2,5	8,0	16,0	24,0	29,5
X <sub>4</sub> Přídavek NaCl (g)	0,0	0,4	1,0	1,6	2,0

Měření	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>4</sub>	Měření	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>4</sub>
1	0	1,68	0	11	1	-1	-1
2	1,68	0	0	12	-1	1	1
3	0	0	0	13	0	0	0
4	1	1	-1	14	0	0	0
5	0	0	-1,68	15	1	1	1
6	0	0	1,68	16	0	0	0
7	1	-1	1	17	-1	-1	-1
8	0	-1,68	0	18	0	0	0
9	0	0	0	19	-1	1	-1
10	-1	-1	1	20	-1,68	0	0

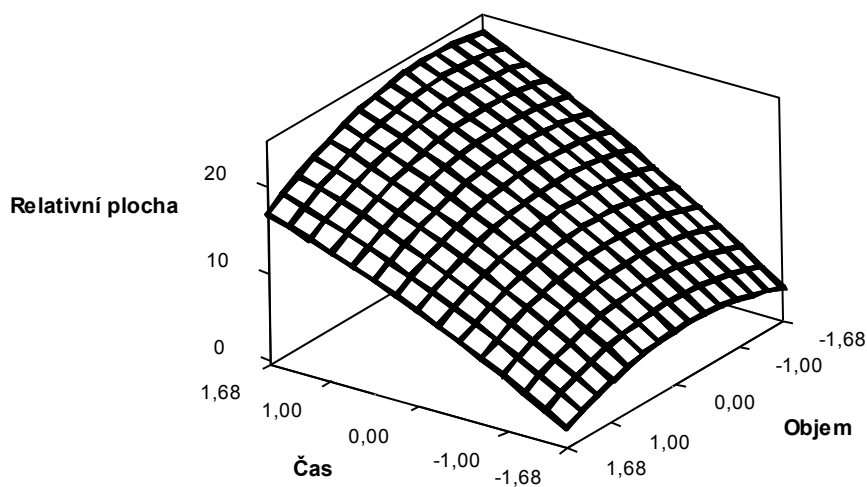
Po provedení příslušných měření byly výsledky vyhodnoceny metodou ANOVA a matematický vztah mezi faktory byly vyjádřeny v rovnici (12). Jedinou významnou interakcí se ukázala interakce mezi faktorem doby extrakce a přídavkem chloridu sodného

$$R = 2,39 - 0,18 \cdot X_1 + 0,84 \cdot X_2 - 0,41 \cdot X_4 - 0,19 \cdot X_2^2 - 0,31 \cdot X_2 \cdot X_4 \quad (12)$$

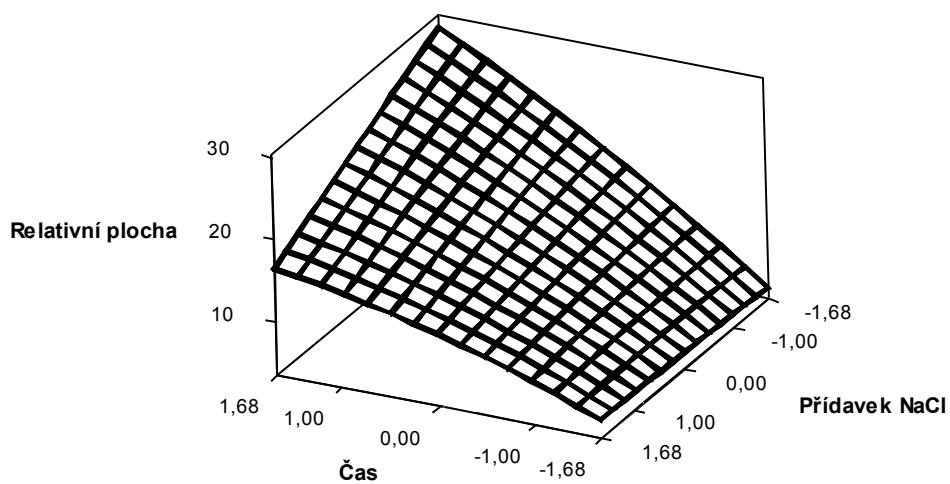
$R$ ...odpověď,  $X_1$ ...objem rozpouštědla,  $X_2$ ...doba extrakce,  $X_4$ ...přídavek chloridu sodného.

Hodnota koeficientu determinace  $R^2$  pro celkovou relativní plochu byla určena 0,9792. Vysoká hodnota dokazuje dobrou korelaci mezi experimentálními daty a zjištěným modelem. Výsledky z modelování byly zpracovány do trojrozměrných grafů, kde jsou uvedeny závislosti zkoumané odpovědi (celkový součet relativních ploch analytů) na statisticky významných faktorech (Obr. 20-22). Z nich vyplývá, že pro extrakci jsou vhodné podmínky s co nejdelším časem a bez přídavku chloridu sodného.

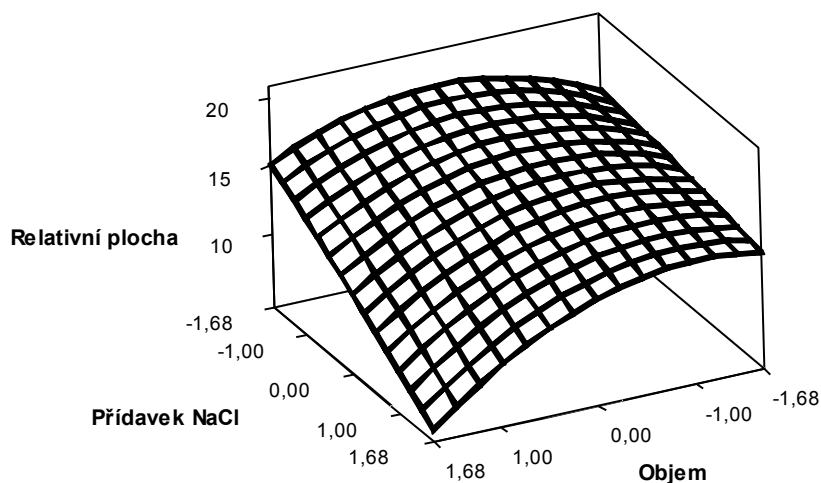
Optimální hodnoty vybraných faktorů byly zjištěny pomocí Desirability funkce: objem heptanu 90  $\mu$ l, doba extrakce 29,5 min a bez přídavku soli.



**Obrázek 20.** Graf závislosti odezvové plochy (celkový součet relativních ploch píků analytů) na objemu extrakčního rozpouštědla ( $X_1$ ) a na době extrakce ( $X_2$ ); extrakční rozpouštědlo: heptan, přídavek chloridu sodného ( $X_4$ ) 1,01 g. Hodnoty na osách x jsou v kódované podobě.



**Obrázek 21.** Graf závislosti odezvové plochy (celkový součet relativních ploch píků analytů) na době extrakce ( $X_2$ ) a na přídavku chloridu sodného ( $X_4$ ); extrakční rozpouštědlo: heptan, objem extrakčního rozpouštědla ( $X_1$ ) je 115  $\mu\text{l}$ . Hodnoty na osách x jsou v kódované podobě.



**Obrázek 22.** Graf závislosti odezvové plochy (celkový součet relativních ploch píků analytů) na objemu extrakčního rozpouštědla ( $X_1$ ) a na přídavku chloridu sodného ( $X_4$ ); extrakční rozpouštědlo: heptan, doba extrakce ( $X_2$ ) je 16 min. Hodnoty na osách x jsou v kódované podobě.

### 5.3.2. Validace metody BSED-LLME pro heptan a TBAC

Po zjištění optimálního nastavení faktorů pro obě rozpouštědla (heptan, TBAC) bylo provedeno měření kalibrační závislosti pomocí GC-MS v rozsahu 0 – 10 000 ng ml<sup>-1</sup> pro všechny analyty. Koeficienty determinace kalibračních rovnic jednotlivých analytů se pohybovaly v rozmezí od 0,9984 až 0,9999 v obou extrakčních rozpouštědlech (Tab. 11).

Regresní rovnice kalibračních křivek byly použity k výpočtu obohacujících faktorů jednotlivých analytů. Obohacující faktory byly zjištěny v rozsahu od 8 do 138 pro extrakční rozpouštědlo heptan a od 63 do 103 pro TBAC. Z porovnání vyplývá, že z hlediska účinnosti je pro dimethylftalát vhodnějším extrakčním rozpouštědlem TBAC.

Limity stanovitelnosti GC-MS metody byly vypočítány z poměru signál/šum ( $S/N \geq 10$ ). ILOQ se pohybovaly v rozmezí od 41 do 200 ng ml<sup>-1</sup>. Limity kvantifikace extrakční metody BSED-LLME byly v rozsahu od 0,3 do 10,7 ng ml<sup>-1</sup>. Opakovatelnost měření (vyjádřená relativní směrodatnou odchylkou) se pohybovala v rozmezí 3-8 % pro TBAC a 7–14 % pro heptan.

**Tabulka 11.** Limity stanovitelnosti instrumentální a extrakční metody, obohacující faktory pro heptan a TBAC.

Rozpouštědlo	Analyt	R <sup>2</sup>	ILOQ ng ml <sup>-1</sup>	MLOQ ng ml <sup>-1</sup>	c ng ml <sup>-1</sup>	EF	RSD %
Heptan	Toluen	0,9999	43	0,9	18	48	9
	Ethylbenzen	0,9997	41	0,3	20	138	7
	Mesitylen	0,9984	147	2,2	20	67	14
	Naftalen	0,9993	60	0,8	17	75	13
	Dimethylftalát	0,9995	86	10,7	170	8	7
TBAC	Toluen	0,9999	86	1,2	100	72	3
	Ethylbenzen	0,9997	62	0,7	100	89	4
	Mesitylen	0,9984	200	2,7	100	74	8
	Naftalen	0,9993	52	0,5	100	103	7
	Dimethylftalát	0,9995	107	1,7	100	63	5

*ILOQ, MLOQ...limity stanovitelnosti přístroje a extrakční metody; R<sup>2</sup>... koeficient determinace kalibrační přímky; RSD... relativní směrodatná odchylka EF pro n=3., c...spikovaná koncentrace analytů ve vodném vzorku.*

### 5.3.3. Analýza reálných vzorků

K ověření nové mikroextrakční metody byly použity vzorky pitné a minerální vody. Vzorky byly spikovány stanovovanými analyty, které byly následně extrahovány pomocí heptanu a TBAC (koncentrace pro spikované analyty byla rozdílná, aby bylo po extrakci dosaženo podobných intenzit pro všechny analyty s dostatečnou výškou a S/N). V Tab. 12 jsou uvedeny prekoncentrační faktory pro heptan v rozmezí od 7 do 162 a pro TBAC se pohybují mezi 53-105. Opakovatelnost se pohybovala v rozmezí od 2 do 9 % pro TBAC a od 2 do 14 % pro heptan. Z výsledků vyplývá, že vhodnější rozpouštědlo pro extrakci celé skupiny analytů je TBAC. Mezi vybranými maticemi nebyly zjištěny žádné podstatné rozdíly.



**Tabulka 12.** Obohacující faktory metody BSED-LLME ve dvou extrakčních rozpouštědlech pro spikované vodné vzorky v různých maticích.

Rozpouštědlo heptan							
Analyt	c <sup>a</sup>	Deionizovaná voda		Pitná voda		Minerální voda	
	ng ml <sup>-1</sup>	EF	RSD (%)	EF	RSD (%)	EF	RSD (%)
Toluen	4,5	48	2	52	4	60	7
Ethylbenzen	3,8	137	9	124	7	162	8
Mesitylen	3,0	68	7	56	12	70	9
Naftalen	2,0	75	3	50	4	65	4
Dimethyl ftalát	30,0	8	14	8	13	7	13

Rozpouštědlo TBAC							
Analyt	c <sup>a</sup>	Deionizovaná voda		Pitná voda		Minerální voda	
	ng ml <sup>-1</sup>	EF	RSD (%)	EF	RSD (%)	EF	RSD (%)
Toluen	2,8	64	3	75	8	56	7
Ethylbenzen	2,4	54	5	54	8	56	8
Mesitylen	3,4	56	6	74	7	68	2
Naftalen	2,0	105	5	95	7	105	6
Dimethyl ftalát	3,4	53	5	62	9	59	8

*c<sup>a</sup>...spikovaná koncentrace analytů ve vodném vzorku, RSD... relativní směrodatná odchylka pro n=3 měření*

#### 5.3.4. Porovnání BSED-LLME s jinými mikroextrakčními metodami

V Tab. 13 jsou uvedeny prekoncentrační faktory pro stanovované analyty, které byly zjištěny jinými mikroextrakčními technikami ve vodných vzorcích. Obohacující faktory u metody disperzní mikroextrakce (DLLME)<sup>88</sup> byly zjištěny sice vyšší než u metody BSED-LLME, ale velkou nevýhodou těchto metod je používání toxických rozpouštědel, která poškozují životní prostředí.

Metody založené na jedné kapce ponořené v kapalině ukazují srovnatelné výsledky, avšak DI-SDME<sup>89</sup> používá příliš malé objemy extrakčního rozpouštědla, takže není možné provést měření opakovaně a odběr organické kapky po extrakci je obtížný.

Metoda SPME<sup>90</sup> používá drahá a velmi křehká vlákna, což zvyšuje celkové náklady na analýzy a obohacující faktory jsou oproti BSED nižší u toluenu a ethylbenzenu. Prekoncentrační metody založené na dutém vlákne (HF-LPME)<sup>91-93</sup> ukazují vyšší obohacující faktory.

**Tabulka 13.** Porovnání obohacujících faktorů pro vybrané analyty získané pro jiné mikroextrakční techniky.

Metoda	Toluen	Ethylbenzen	Mesitylen	Naftalen	Ref.
DI-SDME-GC-FID	54,4	57,3			89
HS-SDME-GC-FID	206,6	387,7			89
DLLME-GC-FID	231	309			88
DSDME-GC-FID	254,88	275,44			94
HF-LPME-GC-FID	98,09	66,45			91
Fiber in tube-GC-FID	361	290	224		95
HS-SPME-GC-FID	16,7	16,1			96
RHF-LPME-GC-MS			35,1		90
SDME-GC-MS			18,1		90
SPME-GC-MS			127,8		90
HFH-LPME-GC-MS				160	92
HFH-LLLME-GC-MS				210	93
BSED-LLME GC-MS	72	89	74	103	

*DI – Direct Immersion, HS - Headspace, SDME Single Drop Microextraction, DLLME – Dispersive Liquid Liquid Microextraction, DSDME - Directly suspended droplet microextraction, HF-LPME - Hollow Fiber Liquid Liuid Microextraction, SPME – Solid Phase Microextraction, RHF-LPME - Revolving Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction, HFH-LLLME - Hollow Fiber-Protected Ionic Liquid-Liquid-Liquid Microextraction, BSED-LLME – Bell Shaped Extraction Device Assisted Liquid - Liquid Microextraction.*

## 5.4. Stanovení aromatických aminů ve vodných vzorcích metodou BSED-LLME spojenou s GC-MS

Aromatické aminy jsou důležitou skupinou sloučenin, které se používají v mnoha oblastech chemického průmyslu např. při výrobě syntetických polymerů, pesticidů, barviv, léčiv či výbušnin<sup>97,98</sup>. Většina aromatických aminů má mutagenní a karcinogenní účinky, jelikož snadno tvoří adukty s proteiny a DNA<sup>99,100</sup>. Kvůli jejich relativně vysoké polaritě a rozpustnosti ve vodě se aromatické aminy řadí do skupiny látek, které značně poškozují životní prostředí. Mohou rovněž snadno přecházet z půd a kontaminovat povrchové vody.

Izolace aminů z vodných vzorků byla prováděna různými prekoncentračními metodami např. extrakcí na pevné fázi (SPE)<sup>101-105</sup>, mikroextrakcí na pevné fázi (SPME)<sup>106-110</sup>, Stir-Bar Sorptive extrakcí (SBSE)<sup>111</sup>, mikroextrakcí kapaliny kapalinou (LLME)<sup>112-115</sup>, extrakcí kapaliny kapalinou (LLE)<sup>116,117</sup>, Microextraction by Packed Sorbent (MEPS)<sup>118</sup>, disperzní mikroextrakcí kapaliny kapalinou (DLLME)<sup>119</sup> či Vortex-Assisted Liquid-Liquid microextrakcí (VALLME)<sup>120</sup>.

Pro separaci a stanovení aromatických aminů pak byla používána plynová chromatografie<sup>101,103,110,117,121</sup>, kapalinová chromatografie HPLC<sup>111,122-125</sup> nebo kapilární elektroforéza<sup>126</sup>.

Cílem této kapitoly je stanovení aromatických aminů z vodných vzorků metodou BSED-LLME spojenou s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí a porovnání výsledků s metodou extrakce na pevné fázi spojenou s kapalinovou chromatografií s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED).

### 5.4.1. Optimalizace extrakčních podmínek BSED-LLME metody

Pro nalezení vhodných podmínek mikroextrakce byly vybrány tyto faktory: doba extrakce, rychlost míchání, přídavek chloridu sodného, objem a typ extrakčního rozpouštědla (toluen a TBAC) a průměr vialky. Celkový součet relativních ploch (vztažených k absolutní ploše methylhexadekanoátu) vybraných analytů (anilin, o-toluidin, 2-ethylanilin, 2-nitroanilin, 1-aminonaftalen, 2-aminonaftalen, 2-aminobifenyl, 4-aminobifenyl, 2-aminofluoren, 2-aminoantracen) byl vybrán jako zkoumaná odpověď.

Neúplný (frakční) faktorový design byl použit pro zjištění statisticky významných faktorů. Tento způsob designu je vhodný pro velký počet faktorů a díky tomuto návrhu je možné určit i případné interakce mezi jednotlivými faktory (což u Plackett-Burmanova designu není možné). Dummy v tomto případě nebyly použity, protože pro screening byl vybrán jiný typ designu - frakční faktorový design, který dummy nepoužívá. Vybrané faktory a jejich úrovně jsou uvedeny v Tab. 14. Faktory a jejich úrovně byly zvoleny na základě předchozích zkušeností s BSED nástavcem. Jedním ze zkoumaných faktorů byl typ rozpouštědla, jedním z nich byl TBAC a jako druhé extrakční rozpouštědlo byl vybrán toluen, jelikož má podobnou chemickou strukturu jako extrahovaná skupina analytů.

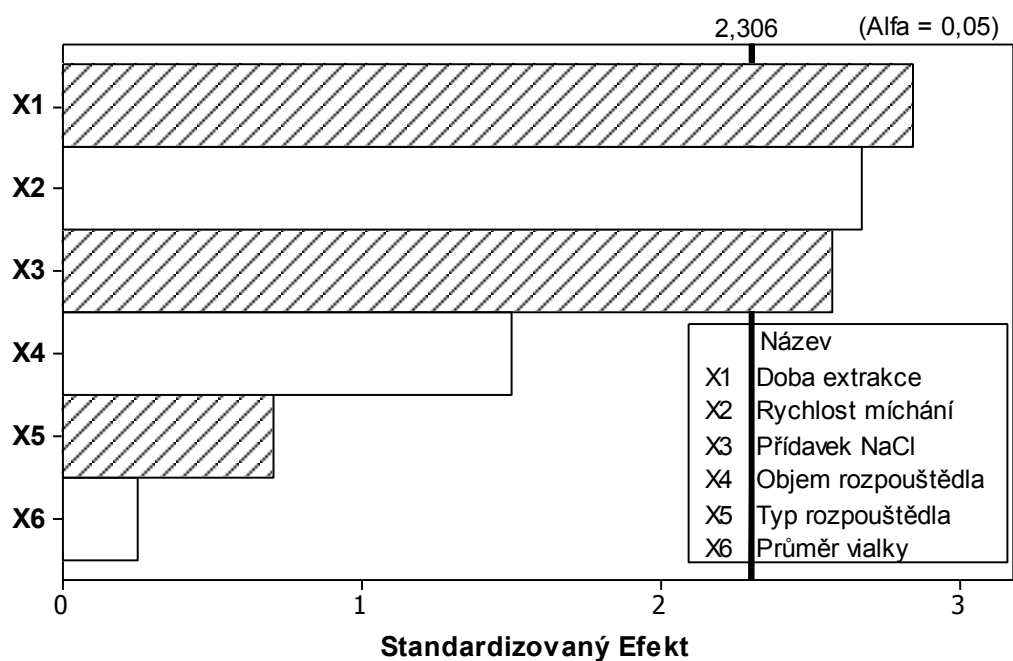
Minitab 16 na jejich základě vytvořil plán experimentů s 8 měřeními, která byla dvakrát zopakována, aby se zabránilo případné systematické chybě. Po zpracování dat (odpovědi získaných měřeními kombinací uvedených faktorů) byly jako statisticky významné faktory určeny tyto: doba extrakce, rychlost míchání a přídavek chloridu sodného (Paretův graf, Obr. 23).

**Tabulka 14.** Experimentální faktory, jejich úrovně a plán experimentů podle neúplného faktoriálního návrhu pro optimalizaci mikroextrakčních podmínek prekoncentrace skupiny aromatických aminů metodou BSED-LLME.

Faktor	Úroveň	
	nižší	vyšší
	(-1)	(+1)
X <sub>1</sub> Doba extrakce (min)	9	25
X <sub>2</sub> Rychlost míchání (rpm)	500	900
X <sub>3</sub> Přídavek NaCl (g)	0,5	2,3
X <sub>4</sub> Objem rozpouštědla (μl)	170	310
X <sub>5</sub> Typ rozpouštědla	Toluen	TBAC
X <sub>6</sub> Průměr vialky (cm)	2,0	2,7

Měření	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>
1	-1	-1	-1	1	1	-1
2	1	1	1	1	1	1
3	-1	1	1	1	-1	-1
4	1	-1	-1	1	-1	1
5	1	-1	1	-1	-1	-1
6	-1	1	-1	-1	-1	1
7	1	1	-1	-1	1	-1
8	-1	-1	1	-1	1	1



**Obrázek 23.** Paretův graf pro neúplný faktoriální návrh zobrazující statisticky významné faktory pro BSED extrakci aromatických aminů. Svislá čára označuje 95% hladinu významnosti.

Modelování bylo provedeno na základě CCD. V Tab. 15 jsou uvedeny faktory, jejich úrovně a plán měření (20 měření) s jednotlivými kombinacemi: nižší a vyšší hodnoty (-1) a (+1), 0 centrální bod,  $\alpha$  označuje axiální body.

**Tabulka 15.** Experimentální faktory, jejich úrovně a plán experimentů podle central composite designu pro stanovení optimálních podmínek BSED-LLME extrakce aromatických aminů do toluenu.

Faktor	Úroveň				
	$-\alpha$	nižší	střední	vyšší	$+\alpha$
	(-1,68)	(-1)	(0)	(+1)	(+1,68)
X <sub>1</sub> Doba extrakce (min)	4	9	17	25	30
X <sub>2</sub> Přídavek NaCl (g)	0,0	0,5	1,3	2,1	2,6
X <sub>3</sub> Rychlost míchání (rpm)	324	460	660	860	996

Měření	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Měření	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	0	0	-1,68	11	1	1	-1
2	0	0	0	12	-1	1	1
3	0	0	1,68	13	0	0	0
4	1,68	0	0	14	0	0	0
5	1,68	0	0	15	-1	1	-1
6	0	1,68	0	16	-1	-1	1
7	0	-1,68	0	17	0	0	0
8	0	0	0	18	0	0	0
9	1	-1	1	19	1	-1	-1
10	1	1	1	20	-1	-1	-1

Na základě změřených výsledků byla analýzou rozptylu (ANOVA) vytvořena polynomiální rovnice (13), která představuje závislost odpovědi na statisticky významných faktorech (doba extrakce, rychlost míchání, přídavek chloridu sodného). Žádná z interakcí se neukázala jako statisticky významná.

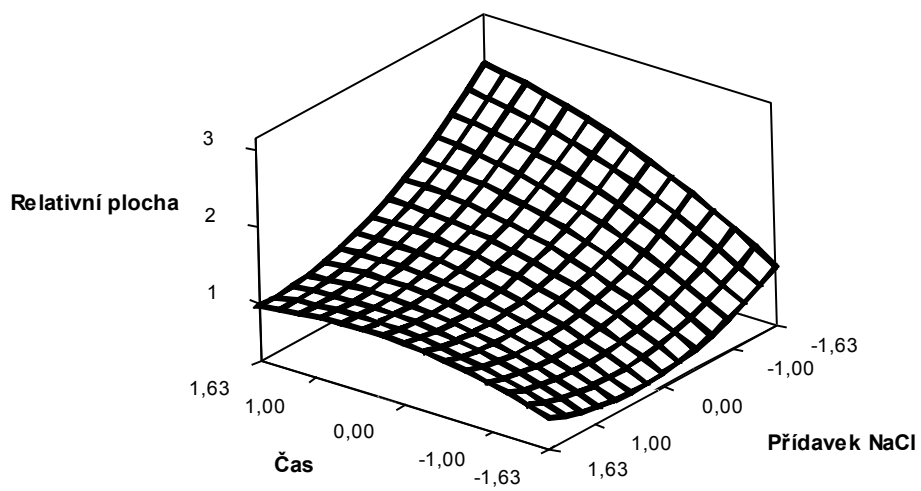


$$R = -1,711 + 0,112 \cdot X_1 + 0,004 \cdot X_2 - 0,132 \cdot X_3 + 0,240 \cdot X_3^2 \quad (13)$$

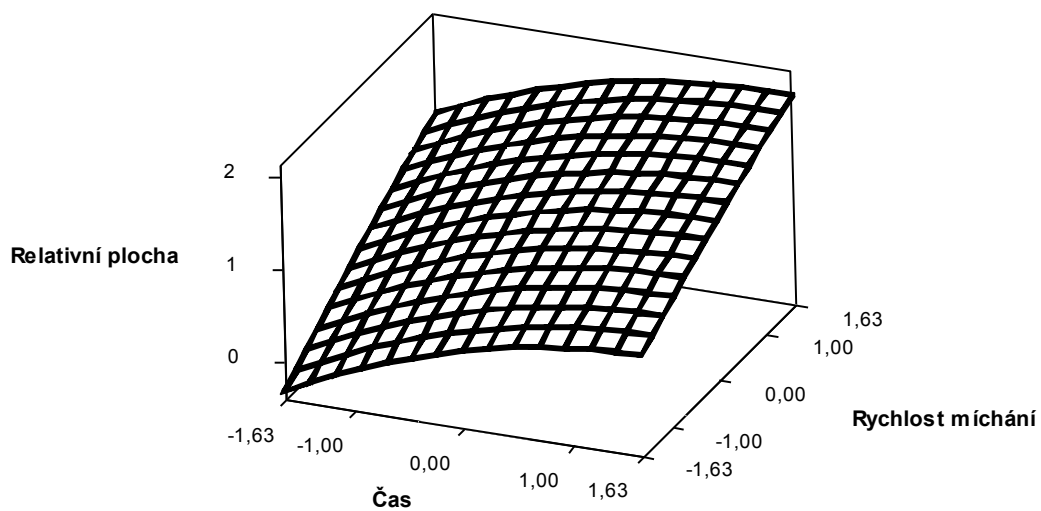
$X_1$ ... doba extrakce,  $X_2$ ... přídavek chloridu sodného,  $X_3$ ... rychlost míchání,  $R$ ... odpověď (celkový součet relativních ploch analytů).

Hodnota koeficientu determinace se blížila k jedné ( $R^2 = 0,9393$ ), což ukazuje dobrou shodu mezi statistickým modelem a změřenými daty. Statistický program Minitab 16 vytvořil na základě matematické rovnice trojrozměrné grafy, které zobrazují závislosti celkové relativní plochy na statisticky významných faktorech (Obr. 24-26), je-li vždy zbývající z faktorů na konstantní hodnotě. Z uvedených grafů bylo určeno, že faktor čas a rychlost míchání by měly být co nejdélejší, zatímco iontová síla roztoku by měla zůstat stejná (tedy bez přídatku chloridu sodného).

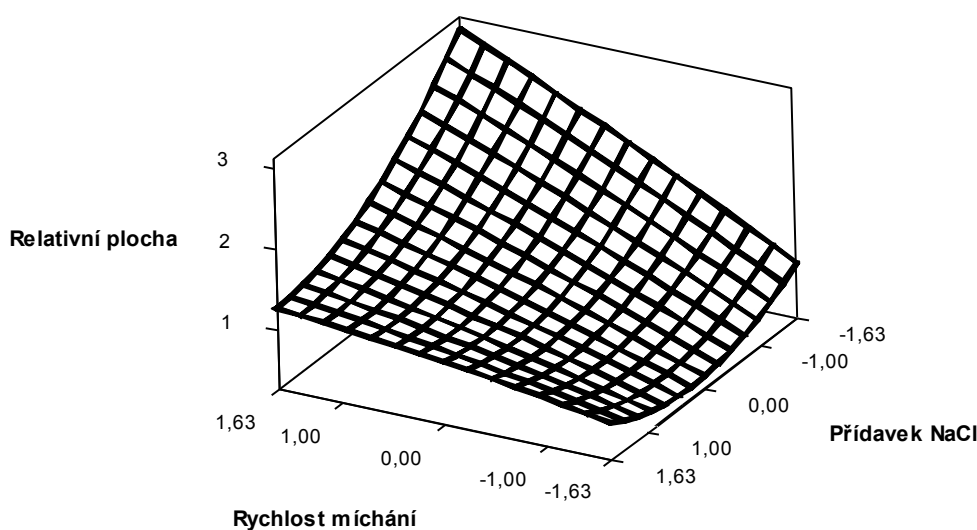
Následně byla provedena optimalizace metodou Desirability funkce<sup>65</sup>. Optimální podmínky pro vybrané faktory byly zjištěny následovně: rychlost míchání 996 rpm, doba extrakce 30 min, bez přídatku chloridu sodného, objem extrakčního rozpouštědla (toluen) 170  $\mu$ l a průměr extrakční nádoby 2 cm.



**Obrázek 24.** Graf závislosti odezvové plochy (celkový součet relativních ploch analytů-aromatické aminy) na přidavku chloridu sodného ( $X_2$ ) a na době extrakce ( $X_1$ ); extrakční rozpouštědlo: toluen, rychlost míchání ( $X_3$ ) je 660 rpm. Hodnoty na osách x jsou v kódované podobě.



**Obrázek 25.** Graf závislosti odezvové plochy (celkový součet relativních ploch analytů-aromatické aminy) na době extrakce ( $X_1$ ) a na rychlosti míchání ( $X_3$ ); extrakční rozpouštědlo: toluen, přídavek chloridu sodného ( $X_2$ ) je 1,3 g. Hodnoty na osách x jsou v kódované podobě.



**Obrázek 26.** Graf závislosti odezvové plochy (celkový součet relativních ploch analytů-aromatické aminy) na rychlosti míchání ( $X_3$ ) a na přídavku chloridu sodného ( $X_2$ ); extrakční rozpouštědlo: toluen, doba extrakce ( $X_1$ ) je 17 min. Hodnoty na osách x jsou v kódované podobě.

#### 5.4.2. Validace metody

Kalibrační závislosti pro jednotlivé analyty v toluenu byly stanoveny v koncentračním rozsahu od 0 do 10 000 ng ml<sup>-1</sup> (8 kalibračních bodů). Koeficienty determinace kalibračních přímků  $R^2$  se pro jednotlivé analyty pohybovaly v rozmezí od 0,9957 (2-aminonantracen) do 0,9999 (anilin). Limity stanovitelnosti GC-MS přístroje (ILOQ) byly vyjádřeny jako desetinásobek šumu základní linie a byly zjištěny v rozmezí od 5 ng ml<sup>-1</sup> (1-aminonaftalen) do 97 ng ml<sup>-1</sup> (2-nitroanilin). Limity stanovitelnosti metody BSED-LLME (MLOQ) byly určeny v rozsahu 0,4 ng ml<sup>-1</sup> (2-ethylanilin, 2-aminonaftalen) do 11 ng ml<sup>-1</sup> (anilin) (Tab. 16).

Regresní rovnice kalibračních křivek byly použity ke zjištění obohacujících faktorů, EF pro stanovované analyty ve vodě za optimálních experimentálních podmínek. Koncentrace analytů v deionizované vodě byla 50 ng ml<sup>-1</sup> a odpovídající obohacující faktory se pohybovaly v rozsahu od 7 (anilin) do 60 (2-aminobifenyl). Opakovatelnosti (vyjádřené relativní směrodatnou odchylkou) byly zjištěny v rozmezí od 1 % do 10 % (Tab. 14).

**Tabulka 16.** Limity stanovitelnosti GC-MS přístroje (ILOQ) a BSED-LLME extrakčního postupu (MLOQ), koeficienty determinace kalibračních přímk, obohacující faktory ve spikované deionizované vodě.

Analyty	ILOQ (ng ml <sup>-1</sup> )	MLOQ (ng ml <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	Intra-day		Inter-day	
				EF	RSD (%)	EF	RSD (%)
Anilin	50	7,1	0,9990	7	1	7	3
o-Toluidin	15	0,8	0,9997	18	1	15	1
2-ethylanilin	11	0,3	0,9991	35	2	35	5
2-nitroanilin	97	4,2	0,9987	23	3	20	6
1-aminonaftalen	10	0,2	0,9993	45	3	48	3
2-aminonaftalen	8	0,2	0,9981	45	4	46	5
2-aminobifenyl	26	0,4	0,9987	60	7	64	7
4-aminobifenyl	49	0,9	0,9979	56	6	56	9
2-aminofluoren	19	0,4	0,9992	53	6	50	10
2-aminoantracen	31	0,7	0,9957	45	8	44	9

*ILOQ...limit stanovitelnosti GC-MS; MLOQ...limit stanovitelnosti BSED-LLME metody; R<sup>2</sup>...koeficient determinace kalibrační přímk; EF...obohacující faktor; RSD...relativní směrodatná odchylka pro n=3 měření; koncentrace aromatických aminů v deionizované vodě, c = 50 ng ml<sup>-1</sup>*

### 5.4.3. Analýza říční vody

K odhadu vlivu matricových efektů na obohacující faktor byly použity vzorky říčních vod. Zkoumané analyty nebyly zvolenou metodou zjištěny v říční vodě (Vltava) a proto musela být říční voda spikována. Obohacující faktory byly zjištěny v rozsahu od 5 (anilin) do 43 (2-aminobifenyl). Opakovatelnost (vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka) se pohybovala v rozmezí od 2 do 14 % (Tab. 17).

V porovnání mezi říční a deionizovanou vodou se projevil rozdíl v extrakční účinnosti zejména u 4-aminobifenyly, 2-aminofluorenu a 2-aminoantracenu. Jedním z vysvětlení může být přítomnost různých solí v reálných vzorcích. Přítomnost soli může změnit fyzikální vlastnosti na Nernstově difúzní vrstvě filmu organické fáze (salting in efekt). Tento případ byl pozorován také jinými autory zabývajícími se mikroextrakčními

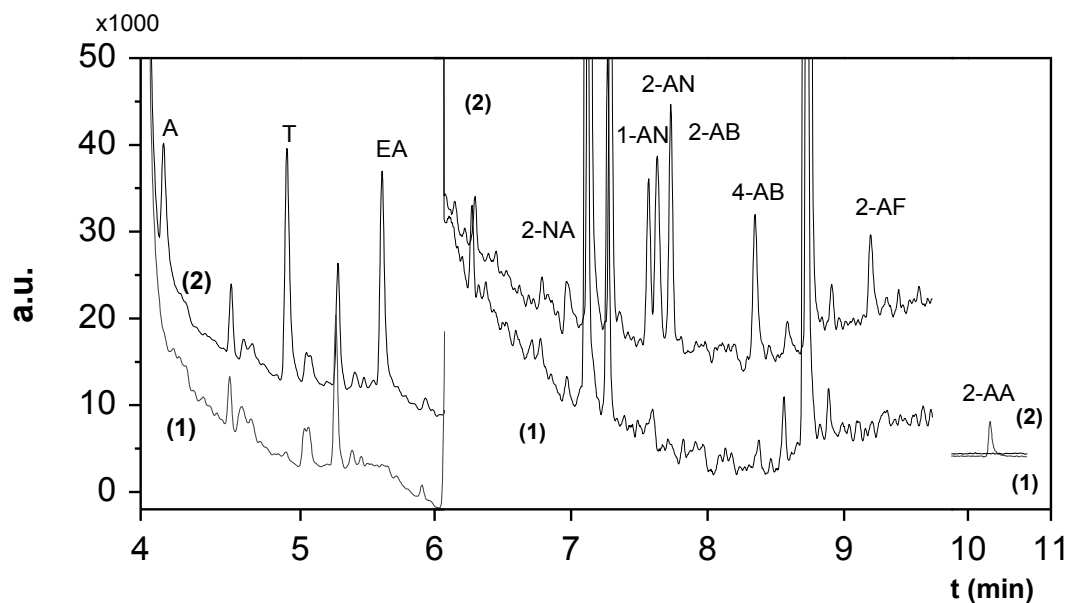
metodami<sup>94,127,128</sup>. Koncentrace pro spikované analyty byla rozdílná, aby bylo po extrakci dosaženo podobných intenzit pro všechny analyty s dostatečnou výškou a S/N.

**Tabulka 17.** Porovnání obohacujících faktorů aromatických aminů v deionizované a říční vodě.

Analyt	c ng ml <sup>-1</sup>	Deionizovaná voda		Říční voda	
		EF	RSD (%)	EF	RSD (%)
Anilin	50,0	6	4	5	2
o-Toluidin	20,0	19	2	17	6
2-ethylanilin	10,0	35	3	31	5
2-nitroanilin	15,0	23	3	18	14
1-aminonaftalen	7,5	41	5	29	10
2-aminonaftalen	7,5	45	10	39	2
2-aminobifenyl	6,0	58	2	43	10
4-aminobifenyl	7,5	60	9	31	14
2-aminofluoren	7,5	54	6	29	10
2-aminoantracen	10,0	45	1	18	9

*c...koncentrace spikovaných analytů; EF...obohacující faktor; RSD...relativní směrodatná odchylka pro n=3 měření*

Na Obr. 27 je uveden SIM chromatogram zobrazující záznam GC-MS separace aromatických aminů, které byly extrahovány ze spikované říční vody metodou BSED-LLME za optimálních podmínek.



**Obrázek 27.** GC-MS (SIM) chromatogram skupiny aromatických aminů extrahovaných metodou BSED-LLME ze spikované říční vody. Podmínky extrakce: doba extrakce 30 min, extrakční činidlo toluen 170  $\mu$ l, objem vzorku 10 ml. (1...chromatogram po extrakci BSED-LLME z říční vody; 2...chromatogram skupiny aromatických aminů extrahovaných ze spikované říční vody metodou BSED-LLME). Experimentální podmínky GC separace: Kolona: DB-5 UI, teplotní program: 75  $^{\circ}$ C (3 min), 35  $^{\circ}$ C  $\text{min}^{-1}$  do 115  $^{\circ}$ C (0,5 min) a poté 40  $^{\circ}$ C  $\text{min}^{-1}$  do teploty 290  $^{\circ}$ C (3 min). Doba analýzy 11 min. Teplota transfer line 260 $^{\circ}$ C, objem dávkovaného vzorku 1  $\mu$ l, split poměr 1/10; A...anilin; T...o-toluidin; EA...2-ethylanilin; 2-NA...2-nitroanilin; 1-AN...1-aminonaftalen; 2-AN...2-aminonaftalen; 2-AB...2-aminobifenyl; 4-AB...4-aminobifenyl; 2-AF...2-aminofluoren; 2-AA...2-aminoantracen

#### 5.4.4. Porovnání metody BSED-LLME s jinými metodami

Stejná skupina aromatických aminů byla zakoncentrována metodou extrakce na pevné fázi a následně stanovena kapalinovou chromatografií s elektrochemickou detekcí (HPLC-ED)<sup>129</sup>. Limit stanovitelnosti metody SPE se ve spikovaných vzorcích pohyboval v rozmezí od 0,2 do 1,0 ng ml<sup>-1</sup>. Obohacující faktory byly od 8 do 19 s opakovatelností do 12 %<sup>129,130</sup> (Tab. 18). Experimentální podmínky a výsledky měření metodou SPE HPLC-ED jsou uvedeny v diplomové práci s názvem Optimalizace elektrochemického stanovení aminoderivátů polycyklických aromatických uhlovodíků pomocí chemometrických metod<sup>129</sup>.

**Tabulka 18.** Obohacující faktory, relativní směrodatné odchylky a limit kvantifikace metody SPE-HPLC-ED po extrakci vybraných aromatických aminů ze spikovaných vzorků destilované a říční vody. Limit kvantifikace HPLC-ED metody po přímém nástřiku spikovaných vzorků říční vody (převzato a upraveno dle<sup>130</sup>).

Analyt	SPE-HPLC-ED			BSED-LLME	HPLC-ED
	EF <sup>a</sup>	RSD (%)	MLOQ (ng ml <sup>-1</sup> )	MLOQ (ng ml <sup>-1</sup> )	ILOQ (ng ml <sup>-1</sup> )
Anilin	10	1,8	0,3	7,1	5,2
o-Toluidin	19	3,0	0,4	0,8	6,2
2-ethylanilin	12	3,5	0,2	0,3	3,2
2-nitroanilin	11	9,2	0,8	4,2	9,7
1-aminonaftalen	12	9,7	1,0	0,2	10,2
2-aminonaftalen	11	9,1	0,4	0,2	5,3
2-aminobifenyl	10	3,8	0,6	0,4	6,1
4-aminobifenyl	11	4,7	0,4	0,9	4,5
2-aminofluoren	10	8,9	0,4	0,4	5,4
2-aminoantracen	8	12,2	0,4	0,7	5,8

<sup>a</sup>koncentrace aromatických aminů v deionizované vodě,  $c = 100 \text{ ng ml}^{-1}$

Obohacující faktory byly zjištěny vyšší pro metodu BSED-LLME GC-MS a limity stanovitelnosti byly obdobné jako u metody SPE ve spojení s metodou kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí.



Hlavní výhodou metody BSED-LLME je jednoduchá a rychlá manipulace s extrakčním nástavcem a vodným vzorkem, zatímco pro metodu extrakce na pevné fázi je třeba zakoupit komerční kolonky a pro provedení extrakce jsou nutné další pomůcky (pumpy, hadice, manifold apod.).

BSED-LLME metoda spotřebuje pro jednu analýzu cca. 200  $\mu$ l organického rozpouštědla a 10 ml vodného vzorku, pro SPE metodu jsou nutné desítky ml různých rozpouštědel pro kondicionaci a vlastní extrakci a objem vzorku se pohybuje kolem 100 ml.

V porovnání mezi separačními metodami je vhodnější použít metodu HPLC s elektrochemickou detekcí, protože je možné nadávkovat zkoumaný vzorek přímo do přístroje bez nutnosti prekoncentrace, ale limity stanovitelnosti byly vyšší v rozmezí od 3,2 do 10,2  $\text{ng ml}^{-1}$  (Tab. 18). Nevýhodou metody HPLC je velká spotřeba methanolu jako mobilní fáze.

## 6. Shrnutí

Disertační práce byla zaměřena na vývoj nové mikroextrakční techniky s názvem Mikroextrakce kapaliny kapalinou přípravkem ve tvaru zvonu (Bell-shaped extraction device assisted liquid liquid microextraction, BSED-LLME). Metoda byla vyvinuta pro rychlou prekoncentraci analytů z vodných vzorků, které byly následně stanoveny plynovou chromatografií.

Mezi hlavní výhody prekoncentrační metody BSED-LLME patří jednoduchá a rychlá manipulace s plastovým nástavcem, možnost volby extrakčního organického rozpouštědla dle povahy zkoumaných analytů a minimální toxická zátěž pro životní prostředí, čímž je nová mikroextrakce ve shodě s principy „zelené analytické chemie“. Nový postup lze použít jako další možnost k již používaným extrakčním či mikroextrakčním metodám jako jsou SPE, SPME či LLME. BSED-LLME lze spojit nejen s metodou plynové chromatografie, ale i s dalšími separačními metodami, čímž může poskytnout informace při analýze různých druhů analytů.

Multifaktorové statistické metody použité pro určení významných faktorů, a zjištění optimálního nastavení pro prekoncentraci vybraných analytů, se ukázaly jako vhodné a účelné řešení při vývoji a testování nových i stávajících postupů.

Výsledky získané při řešení disertační práce byly podkladem pro udělení patentu č. 302841 od Úřadu průmyslového vlastnictví pro Vírový extrakční přípravek pro mikroextrakci kapaliny kapalinou a celý postup mikroextrakce.

## 7. Použitá literatura

1. Tobiszewski, M.; Mechlinska, A.; Zygmunt, B.; Namiesnik, J.: Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants. *Trends in Analytical Chemistry* **28**, 943-951 (2009).
2. Farre, M.; Perez, S.; Goncalves, C.; Alpendurada, M. F.; Barcelo, D.: Green analytical chemistry in the determination of organic pollutants in the aquatic environment. *Trends in Analytical Chemistry* **29**, 1347-1362 (2010).
3. Ryan, T. P.: *Modern Experimental Design*. Hoboken, Wiley 2007.
4. de Koning, S.; Janssen, H. G.; Brinkman, U. A. T.: Modern Methods of Sample Preparation for GC Analysis. *Chromatographia* **69**, S33-S78 (2009).
5. Smith, R. M.: Before the injection - modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of Chromatography A* **1000**, 3-27 (2003).
6. Churáček, J. a. kol.: *Analytická separace látek*. Praha, SNTL 1990.
7. Kokosa, J., M.; Przyjazny, A.; Jeannot, M. A.: *Solvent Microextraction- Theory and Practice*. Hoboken, Wiley 2009.
8. Lord, H.; Pawliszyn, J.: Microextraction of drugs. *Journal of Chromatography A* **902**, 17-63 (2000).
9. Arthur, C. L.; Pawliszyn, J.: Solid-Phase Microextraction with Thermal-Desorption Using Fused-Silica Optical Fibers. *Analytical Chemistry* **62**, 2145-2148 (1990).
10. Jeannot, M. A.; Cantwell, F. F.: Solvent microextraction into a single drop. *Analytical Chemistry* **68**, 2236-2240 (1996).

11. Novakova, L.; Vlckova, H.: A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Analytica Chimica Acta* **656**, 8-35 (2009).
12. Pedersen-Bjergaard, S.; Rasmussen, K. E.: Liquid-phase microextraction and capillary electrophoresis of acidic drugs. *Electrophoresis* **21**, 579-585 (2000).
13. Collins, C. J.; Arrigan, D. W. M.: A review of recent advances in electrochemically modulated extraction methods. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **393**, 835-845 (2009).
14. Pena-Pereira, F.; Lavilla, I.; Bendicho, C.: Liquid-phase microextraction approaches combined with atomic detection: A critical review. *Analytica Chimica Acta* **669**, 1-16 (2010).
15. Liu, H. H.; Dasgupta, P. K.: Analytical chemistry in a drop. Solvent extraction in a microdrop. *Analytical Chemistry* **68**, 1817-1821 (1996).
16. Lambropoulou, D. A.; Albanis, T. A.: Liquid-phase micro-extraction techniques in pesticide residue analysis. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **70**, 195-228 (2007).
17. Laaks, J.; Jochmann, M. A.; Schmidt, T. C.: Solvent-free microextraction techniques in gas chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **402**, 565-571 (2012).
18. Jeannot, M. A.; Przyjazny, A.; Kokosa, J. M.: Single drop microextraction- Development, applications and future trends. *Journal of Chromatography A* **1217**, 2326-2336 (2010).
19. He, Y.; Lee, H. K.: Liquid phase microextraction in a single drop of organic solvent by using a conventional microsyringe. *Analytical Chemistry* **69**, 4634-4640 (1997).

20. Deng, C. H.; Yao, N.; Wang, B.; Zhang, X. M.: Development of microwave-assisted extraction followed by headspace single-drop microextraction for fast determination of paeonol in traditional Chinese medicines. *Journal of Chromatography A* **1103**, 15-21 (2006).
21. Plotka-Wasyłka, J.; Owczarek, K.; Namieśnik, J.: Modern solutions in the field of microextraction using liquid as a medium of extraction. *Trends in Analytical Chemistry* **85**, 46-64 (2016).
22. Liu, W. P.; Lee, H. K.: Continuous-flow microextraction exceeding 1000-fold concentration of dilute analytes. *Analytical Chemistry* **72**, 4462-4467 (2000).
23. Wu, H. F.; Yen, J. H.; Chin, C. C.: Combining drop-to-drop solvent microextraction with gas chromatography/mass spectrometry using electronic ionization and self-ion/molecule reaction method to determine methoxyacetophenone isomers in one drop of water. *Analytical Chemistry* **78**, 1707-1712 (2006).
24. Lu, Y. C.; Lin, Q.; Luo, G. S.; Dai, Y. Y.: Directly suspended droplet microextraction. *Analytica Chimica Acta* **566**, 259-264 (2006).
25. Zanjani, M. R. K.; Yamini, Y.; Shariati, S.; Jonsson, J. A.: A new liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop. *Analytica Chimica Acta* **585**, 286-293 (2007).
26. Theis, A. L.; Waldack, A. J.; Hansen, S. M.; Jeannot, M. A.: Headspace solvent microextraction. *Analytical Chemistry* **73**, 5651-5654 (2001).
27. Sarafraz-Yazdi, A.; Beiknejad, D.; Es'haghi, Z.: LC determination of mono-substituted phenols in water using liquid-liquid-liquid phase microextraction. *Chromatographia* **62**, 49-54 (2005).

28. Sarafraz-Yazdi, A.; Mofazzeli, F.; Es'haghi, Z.: Directly suspended droplet three liquid phase microextraction of diclofenac prior to LC. *Chromatographia* **67**, 49-53 (2008).
29. Santana-Rodriguez, J. J.; Mahugo-Santana, C.; Sosa-Ferrera, Z.; Torres-Padron, M. E.: Application of new approaches to liquid-phase microextraction for the determination of emerging pollutants. *Trends in Analytical Chemistry* **30**, 731-748 (2011).
30. Jain, A.; Verma, K. K.: Recent advances in applications of single-drop microextraction: A review. *Analytica Chimica Acta* **706**, 37-65 (2011).
31. Pedersen-Bjergaard, S.; Rasmussen, K. E.: Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary electrophoresis. *Analytical Chemistry* **71**, 2650-2656 (1999).
32. Hauser, B.; Popp, P. Membrane-assisted solvent extraction of organochlorine compounds in combination with large-volume injection/gas chromatography-electron capture detection. *Journal of Separation Science* **24**, 551-560 (2001).
33. Pedersen-Bjergaard, S.; Rasmussen, K. E.: Liquid-phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction. *Journal of Chromatography A* **1184**, 132-142 (2008).
34. Dadfarnia, S.; Haji Shabani, A. M.: Recent development in liquid phase microextraction for determination of trace level concentration of metals--a review. *Analytica Chim Acta* **658**, 107-119 (2010).
35. Garcia-Jares, C.; Regueiro, J.; Llompарт, M.; Garcia-Monteaгudo, J. C.; Cela, R.: Ultrasound-assisted emulsification-microextraction of emergent contaminants and pesticides in environmental waters. *Journal of Chromatography A* **1190**, 27-38 (2008).

36. Rezaee, M.; Assadi, Y.; Hosseinia, M. R. M.; Aghaee, E.; Ahmadi, F.; Berijani, S.: Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A* **1116**, 1-9 (2006).
37. Rezaee, M., Yamini, Y., Faraji, M.: Evolution of dispersive liquid-liquid microextraction method. *Journal of Chromatography A* **1217**, 2342-2357 (2010).
38. Chang, Q. Y.; Zhang, J. W.; Du, X.; Ma, J. J.; Li, J. C.: Ultrasound-assisted emulsification solidified floating organic drop microextraction for the determination of trace amounts of copper in water samples. *Frontiers of Environmental Science & Engineering in China* **4**, 187-195 (2010).
39. Mansour, F. R.; Danielson, N. D.: Solidification of floating organic droplet in dispersive liquid-liquid microextraction as a green analytical tool. *Talanta* **170**, 22-35 (2017).
40. Herrera-Herrera, A. V.; Asensio-Ramos, M.; Hernandez-Borges, J.; Rodriguez-Delgado, M. A.: Dispersive liquid-liquid microextraction for determination of organic analytes. *Trac- Trends in Analytical Chemistry* **29**, 728-751 (2010).
41. Zuloaga, O.; Olivares, M.; Navarro, P.; Vallejo, A.; Prieto, A.: Dispersive liquid-liquid microextraction: trends in the analysis of biological samples. *Bioanalysis* **7**, 2211-2225 (2015).
42. Lord, H.; Pawliszyn, J.: Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A* **885**, 153-193 (2000).
43. Risticvic, S.; Niri, V. H.; Vuckovic, D.; Pawliszyn, J.: Recent developments in solid-phase microextraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **393**, 781-795 (2009).

44. Bojko, B.; Cudjoe, E.; Wasowicz, M.; Pawliszyn, J.: Solid-phase microextraction. How far are we from clinical practice? . *Trends in Analytical Chemistry* **30**, 1505-1512 (2011).
45. Pawliszyn, J.: *Solid phase microextraction: theory and practice*. New York, Wiley 1997.
46. Pawliszyn, J.: *Application of solid phase microextraction*. Cambridge, Royal Society of Chemistry 1999.
47. Bicchi, C.; Cordero, C.; Liberto, E.; Rubiolo, P.; Sgorbini, B. Automated headspace solid-phase dynamic extraction to analyse the volatile fraction of food matrices. *Journal of Chromatography A* **1024**, 217-226 (2004).
48. Shojanian, S.; Oleschuk, R. D.; McComb, M. E.; Gesser, H. D.; Chow, A.: The active and passive sampling of benzene, toluene, ethylbenzene and xylenes compounds using the inside needle capillary adsorption trap device. *Talanta* **50**, 193–205 (1999).
49. Musshoff, F.; Lachenmeier, D. W.; Kroener, L.; Madea, B.: Automated headspace solid-phase dynamic extraction for the determination of amphetamines and synthetic designer drugs in hair samples. *Journal of Chromatography A* **958**, 231–238 (2002).
50. Tienpont, B.; David, F.; Bicchi, C.; Sandra, P.: High capacity headspace sorptive extraction. *Journal of Microcolumn Separations* **12**, 577-584 (2000).
51. Baltussen, E.; Sandra, P.; David, F.; Cramers, C.: Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. *Journal of Microcolumn Separations* **11**, 737-747 (1999).



52. Bicchi, C.; Cordero, C.; Liberto, E.; Rubiolo, P.; Sgorbini, B.; David, F.; Sandra, P.: Dual-phase twisters: A new approach to headspace sorptive extraction and stir bar sorptive extraction. *Journal of Chromatography A* **1094**, 9-16 (2005).
53. Montero, L.; Popp, P.; Paschke, A.; Pawliszyn, J.: Polydimethylsiloxane rod extraction, a novel technique for the determination of organic micropollutants in water samples by thermal desorption–capillary gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1025**, 17-26 (2004).
54. Lancas, F. M.; Queiroz, M. E. C.; Grossi, P.; Olivares, I. R. B. Recent developments and applications of stir bar sorptive extraction. *Journal of Separation Science* **32**, 813-824 (2009).
55. Prieto, A.; Basauri, O.; Rodil, R.; Usobiaga, A.; Fernandez, L. A.; Etxebarria, N.; Zuloaga, O. Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions. *Journal of Chromatography A* **1217**, 2642-2666 (2010).
56. Berezkin, V. G.; Makarov, E. D.; Stolyarov, B. V.: Needle-type concentrator and its application to the determination of pollutants. *Journal of Chromatography A* **985**, 63-65 (2003).
57. Saito, Y.; Ueta, I.; Ogawa, M.; Abe, A.; Yogo, K.; Shirai, S.; Jinno, K.: Fiber-packed needle-type sample preparation device designed for gas chromatographic analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **393**, 861-869 (2009).
58. Wang, A.; Fang, F.; Pawliszyn, J.: Sampling and determination of volatile organic compounds with needle trap devices. *Journal of Chromatography A* **1072**, 127-135 (2005).

59. Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. *Journal of Analytical Toxicology* **37**, 452–474 (2013)
60. Braggio, S.; Barnaby, R. J.; Grosi, P.; Cugola, M.: A strategy for validation of bioanalytical methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **14**, 375-388 (1996).
61. Antony, J.: *Design of Experiments for Engineers and Scientists*. Oxford, Elsevier 2003.
62. Myers, R. H.; Montgomery, D. C.: *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*. New York, Wiley 2002.
63. Ferreira, S. L. C.; dos Santos, W. N. L.; Quintella, C. M.; Neto, B. c. B.; Bosquesendra, J. M.: Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry—review. *Talanta* **63**, 1061-1067 (2004).
64. Roy, R. K.: *Design of Experiments Using The Taguchi Approach: 16 Steps to Product and Process Improvement*. New York, Wiley 2001.
65. Mason, R. L.; Gunst, R. F.; Hess, J. L.: *Statistical design and analysis of experiment*. New York, Wiley 2003.
66. Brereton, R. G.: *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*. Chichester, Wiley 2005.
67. Bezerra, M. A.; Santelli, R. E.; Oliveira, E. P.; Villar, L. S.; Escaleira, L. A.: Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* **76**, 965-977 (2008).

68. Stalikas, C.; Fiamegos, Y.; Sakkas, V.; Albanis, T.: Developments on chemometric approaches to optimize and evaluate microextraction. *Journal of Chromatography A* **1216**, 175-189 (2009).
69. Tye, H.: Application of statistical 'design of experiments' methods in drug discovery. *Drug Discovery Today* **9**, 485-491 (2004).
70. Leardi, R.: Experimental design in chemistry: A tutorial. *Analytica Chimica Acta* **652**, 161-172 (2009).
71. Costa, N. R.; Pereira, Z. L. Multiple response optimization: a global criterion-based method. *Journal of Chemometrics* **24**, 333-342 (2010).
72. Wang, L.; Wang, Z. M.; Zhang, H. H.; Li, X. Y.; Zhang, H. Q.: Ultrasonic nebulization extraction coupled with headspace single drop microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for analysis of the essential oil in *Cuminum cyminum* L. *Analytica Chimica Acta* **647**, 72-77 (2009).
73. Brereton, R. G.: *Chemometrics: Data analysis for the laboratory and chemical plant*. Chichester, Wiley 2003.
74. Wang, J.; Wan, W.: Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy* **34**, 235-244 (2009).
75. McComb, M. E.; Oleschuk, R. D.; Giller, E.; Gesser, H. D.: Microextraction of volatile organic compounds using the inside needle capillary adsorption trap (INCAT) device. *Talanta* **44**, 2137- 2343 (1997).
76. Miller, J. N.; Miller, J. C.: *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Harlow, Pearson Education Limited 2005.

77. Hooke, R.; Jeeves, T. A.: "Direct Search" Solution of Numerical and Statistical Problems. *Journal of the ACM (JACM)* **8**, 212-229 (1961).
78. Kamel, K.; Reza Hadjmohammadi, M.: Application of multilinear gradient elution for optimization of separation of chlolphens using Derringer desirability function. *Chromatographia* **67**, 169-172 (2008).
79. Bourguignon, B.; Massart, D. L.: Simultaneous optimization of several chromatographic performance goals using Derringer's desirability function. *Journal of Chromatography A* **586**, 11-20 (1991).
80. Matisova, E.; Dömötörova, M. Fast gas chromatography and its use in trace analysis. *Journal of Chromatography A* **1000**, 199-221 (2003).
81. Korytar, P.; Matisová, E.: Fast gas chromatography. *Chemické Listy* **95**, 470-476 (2001).
82. Korytar, P.; Matisova, E. Instrumentation for fast gas chromatography. *Chemické Listy* **95**, 783-790 (2001).
83. Adam, M.; Dobias, P.; Eisner, A.; Ventura, K.: Headspace single-drop microextraction of herbal essential oils. *Journal of Separation Science* **31**, 356-363 (2008).
84. Čabala, R.; Bursová, M.: Bell-shaped extraction device assisted liquid-liquid microextraction technique and its optimization using response-surface methodology *Journal of Chromatography A* **1230**, 24-29 (2012).
85. Univerzita Karlova. Vírový extrakční přípravek pro mikroextrakci kapaliny kapalinou. Česká republika. Původci: Radomír Čabala a Miroslava Bursová. Patentový spis CZ 302 841 B6. 7. 12. 2011.

86. Zichová, J.: *Plánování experimentů a predikční vícerozměrová analýza*. Praha, Karolinum 2008.
87. Oyejola, B. A.; Nwanya, J. C.: Selecting the Right Central Composite Design. *International Journal of Statistics and Applications* **5**, 21-30 (2015).
88. Assadi, Y., Ahmadi, F., Reza Milani Hossieni, M.: Determination of BTEX Compounds by Dispersive Liquid–Liquid Microextraction with GC–FID. *Chromatographia* **71**, 1137–1141 (2010).
89. Sarafraz-Yazdi, A.; Khaleghi-Miran, S. H.; Es'haghi, Z.: 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* **90**, 1036-1047 (2010).
90. Chen, Y. C.; Wu, H. F.: Revolving hollow fiber-liquid phase microextraction coupled to GC/MS using electron ionization for quantification of five aromatic hydrocarbon isomers. *Journal of Separation Science* **32**, 3013-3019 (2009).
91. Sarafraz-Yazdi, A.; Amiri, A. H.; Es'haghi, Z.: BTEX determination in water matrices using HF-LPME with gas chromatography-flame ionization detector. *Chemosphere* **71**, 671-676 (2008).
92. Basheer, C.; Balasubramanian, R.; Lee, H. K.: Determination of organic micropollutants in rainwater using hollow fiber membrane/liquid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1016**, 11-20 (2003).
93. Basheer, C.; Alnedhary, A. A.; Rao, B. S. M.; Balasubramanian, R.; Lee, H. K.: Ionic liquid supported three-phase liquid-liquid-liquid microextraction as a sample preparation technique for aliphatic and aromatic hydrocarbons prior to gas

chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1210**, 19-24 (2008).

94. Sarafraz-Yazdi, A.; Amiri, A. H.; Es'haghi, Z. 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* **78**, 936-941 (2009).
95. Wang, J. X.; Jiang, D. Q.; Yan, X. P.: Determination of substituted benzenes in water samples by fiber-in-tube liquid phase microextraction coupled with gas chromatography. *Talanta* **68**, 945-950 (2006).
96. Shutao, W.; Yan, W.; Hong, Y.; Jie, Y.: Preparation of a Carbon-Coated SPME Fiber and Application to the Analysis of BTEX and Halocarbons in Water. *Chromatographia* **63**, 365-371 (2006).
97. Tsurugi, J.; Murakami, S.; Goda, K.: Charge Transfer Complexing Mechanism of Antioxidants. Fate of Aromatic Amines during Thermal Oxidation of Natural Rubber Vulcanizates. *Rubber Chemistry and Technology* **44**, 857-880 (1971).
98. Abdullin, I. F.; Chernysheva, N. N.; Budnikov, G. K.: Galvanostatic Coulometric Determination of Aromatic Amine Derivatives in Pharmaceutical Preparations Using Electrochemically Generated Bromine. *Journal of Analytical Chemistry* **57**, 629-631 (2002).
99. Vineis, P.; Pirastu, R.: Aromatic amines and cancer. *Cancer Causes Control* **8**, 346-355 (1997).
100. Freudenthal, R.; Stephens, E.; Anderson, D. P.: Determining the Potential of Aromatic Amines to Induce Cancer of the Urinary Bladder. *International Journal of Toxicology* **18**, 353-359 (1999).

101. Schmidt, T. C.; Less, M.; Haas, R.; von Löw, E.; Steinbach, K.; Stork, G.: Gas chromatographic determination of aromatic amines in water samples after solid-phase extraction and derivatization with iodine: I. Derivatization. *Journal of Chromatography A* **810**, 161-172 (1998).
102. Less, M.; Stork, G.; von Löw, E.; Stork, G.: Gas chromatographic determination of aromatic amines in water samples after solid-phase extraction and derivatization with iodine: II. Enrichment. *Journal of Chromatography A* **810**, 173-182 (1998).
103. Lacorte, S.; Guiffard, I.; Fraisse, D.; Barceló, D.: Broad Spectrum Analysis of 109 Priority Compounds Listed in the 76/464/CEE Council Directive Using Solid-Phase Extraction and GC/EI/MS. *Analytical Chemistry* **72**, 1430-1440 (2000).
104. Mishra, S.; Singh, V.; Jain, A.; Verma, K. K.: Simultaneous determination of ammonia, aliphatic amines, aromatic amines and phenols at  $\mu\text{g l}^{-1}$  levels in environmental waters by solid-phase extraction of their benzoyl derivatives and gas chromatography-mass spectrometry. *Analyst* **126**, 1663-1668 (2001).
105. Jurado-Sánchez, B.; Barceló, D.; Guiffard, I.: Comparison of several solid-phase extraction sorbents for continuous determination of amines in water by gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* **79**, 613-620 (2009).
106. Müller, L.; Fattore, E.; Benfenati, E.: Determination of aromatic amines by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry in water samples. *Journal of Chromatography A* **791**, 221-230 (1997).
107. Van Doorn, H.; Grabanski, C. B.; Miller, D. J.; Hawthorne, S. B.: Solid-phase microextraction with pH adjustment for the determination of aromatic acids and bases in water. *Journal of Chromatography A* **829**, 223-233 (1998).

108. Chang, W.; Sung, Y.; Huang, S.: Analysis of carcinogenic aromatic amines in water samples by solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* **495**, 109-122 (2003).
109. Zimmermann, T.; Ensinger, W. J.; Schmidt, T. C.: In Situ Derivatization/Solid-Phase Microextraction: Determination of Polar Aromatic Amines. *Analytical Chemistry* **76**, 1028-1038 (2004).
110. Sharma, N.; Jain, A.; Verma, K. K.: Headspace solid-phase microextraction and on-fibre derivatization of primary aromatic amines for their determination by pyrolysis to aryl isothiocyanates and gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Methods* **3**, 970-976 (2011).
111. Huang, X.; Qiu, N.; Yuan, D.; Lin, Q.: Sensitive determination of strongly polar aromatic amines in water samples by stir bar sorptive extraction based on poly(vinylimidazole-divinylbenzene) monolithic material and liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography A* **1216**, 4354-4360 (2009).
112. Zhu, L.; Tay, C. B.; Lee, H. K.: Liquid-liquid-liquid microextraction of aromatic amines from water samples combined with high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **963**, 231-237 (2002).
113. Peng, J.; Liu, J.; Jiang, G.; Tai, C.; Huang, M.: Ionic liquid for high temperature headspace liquid-phase microextraction of chlorinated anilines in environmental water samples. *Journal of Chromatography A* **1072**, 3-6 (2005).
114. Sarafraz-Yazdi, A.; Es'haghi, Z.: Two-step hollow fiber-based, liquid-phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography: A new approach to determination of aromatic amines in water. *Journal of Chromatography A* **1082**, 136-142 (2005).



115. Sarafray-Yazdi, A.; Es'haghi, Z.: Comparison of hollow fiber and single-drop liquid-phase microextraction techniques for HPLC determination of aniline derivatives in water. *Chromatographia* **63**, 563-569 (2006).
116. Zhou, Q.; Jiang, G.; Liu, J.; Cai, Y.: Combination of microporous membrane liquid-liquid extraction and capillary electrophoresis for the analysis of aromatic amines in water samples. *Analytica Chimica Acta* **509**, 55-62 (2004).
117. Akyüz, M.; Ata, S.: Simultaneous determination of aliphatic and aromatic amines in water and sediment samples by ion-pair extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1129**, 88-94 (2006).
118. Nogal Sánchez, M. d.; Pérez Sappó, C.; Pérez Pavón, J. L.; Moreno Cordero, B.: A method based on microextraction by packed sorbent-programmed temperature vaporizer-fast gas chromatography-mass spectrometry for the determination of aromatic amines in environmental water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **404**, 2007-2015 (2012).
119. Fan, Y. C.; Hu, Z. L.; Chen, M. L.; Tu, C. S.; Zhu, Y.: Ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction of aromatic amines in water samples. *Chinese Chemical Letters* **19**, 985-987 (2008).
120. Sun, X.-M.; Sun, Y.; Wu, L.-W.; Jiang, C.-Z.; Yu, X.; Gao, Y.; Wang, L.-Y.; Song, D. Q.: Development of a vortex-assisted ionic liquid microextraction method for the determination of aromatic amines in environmental water samples. *Analytical Methods* **4**, 2074-2080 (2012).
121. Reddy-Noone, K.; Jain, A.; Verma, K. K.: Liquid-phase microextraction and GC for the determination of primary, secondary and tertiary aromatic amines as their iodo-derivatives. *Talanta* **73**, 684-691 (2007).

122. Chang, W. Y.; Sung, Y. H.; Huang, S. D.: Analysis of carcinogenic aromatic amines in water samples by solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* **495**, 109-122 (2003).
123. Zhu, L. Y.; Tay, C. B.; Lee, H. K. Liquid-liquid-liquid microextraction of aromatic amines from water samples combined with high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **963**, 231-237 (2002).
124. Peng, J. F.; Liu, J. F.; Jiang, G. B.; Tai, C.; Huang, M. J.: Ionic liquid for high temperature headspace liquid-phase microextraction of chlorinated anilines in environmental water samples. *Journal of Chromatography A* **1072**, 3-6 (2005).
125. Sarafraz-Yazdi, A.; Es'haghi, Z.: Comparison of hollow fiber and single-drop liquid-phase microextraction techniques for HPLC determination of aniline derivatives in water. *Chromatographia* **63**, 563-569 (2006).
126. Zhou, Q. X.; Jiang, G. B.; Liu, J. F.; Cai, Y. Q.: Combination of microporous membrane liquid-liquid extraction and capillary electrophoresis for the analysis of aromatic amines in water samples. *Analytica Chimica Acta* **509**, 55-62 (2004).
127. Bagheri, H.; Saber, A.; Mousavi, S. R. Immersed solvent microextraction of phenol and chlorophenols from water samples followed by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1046**, 27-33 (2004).
128. Gioti, E. M.; Skalkos, D. C.; Fiamegos, Y. C.; Stalikas, C. D.: Single-drop liquid-phase microextraction for the determination of hypericin, pseudohypericin and hyperforin in biological fluids by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* **1093**, 1-10 (2005).

129. Krejčová, M.: *Optimalizace elektrochemického stanovení aminoderivátů polycyklických aromatických uhlovodíků pomocí chemometrických metod*. Praha, 2013. Bakalářská práce. Univerzita Karlova v Praze. Fakulta přírodovědecká.
130. Krejčová, M.; Dejmková, H.; Bursová, M.: Optimalizace podmínek chromatografického stanovení aromatických aminů s elektrochemickou detekcí. *Chemické Listy* **108**, s229-s232 (2014).

## 8. Seznam příloh

### Příloha 1: Seznam publikací, prezentací, abstraktů a plakátových sdělení

#### Publikace in extenso, které jsou podkladem disertační práce

##### Patent

Univerzita Karlova v Praze. Vírový extrakční přípravek pro mikroextrakci kapaliny kapalinou. Česká republika. Původci: Radomír Čabala a Miroslava Bursová. Patentový spis CZ 302 841 B6. 7. 12. 2011.

##### Články

Čabala, R.; **Bursová, M.**: Bell-shaped extraction device assisted liquid–liquid microextraction technique and its optimization using response-surface methodology. *Journal of Chromatography A* **1230**, 24–29 (2012).

Krejčová, M.; Dejmková, H.; **Bursová, M.**: Optimalizace podmínek chromatografického stanovení aromatických aminů s elektrochemickou detekcí. *Chemické listy* **108**, 229-232 (2014).

## **Prezentace**

Bursová, M.: Nové možnosti optimalizace v analytické chemii. Študentská vedecká konferencia Přírodovedeckej fakulty UK v Bratislavě (24. 4. 2013) Bratislava.

Bursová, M.: Optimalizace v analytické chemii, 64, sjezd Asociací českých a slovenských společností (27. 6. 2012) Olomouc.

Bursová, M.: Preconcentration of aromatic and polyaromatic amines with bell-shaped extration device assisted liquid-liquid microextraction. 8th International Students Conference “ Modern Analytical Chemistry“ (24. 9. 2012) Praha.

Bursová, M.: Presentation and optimization of a new microextraction technique. 7th International Students Conference “ Modern Analytical Chemistry“ (29. 9. 2011) Praha.

Bursová, M.: Development and optimization of new microextraction technique for determination of environmental pollutants by GC. 6th International Students Conference “ Modern Analytical Chemistry“ (23. 9. 2010) Praha.

## Abstrakty a příspěvky ve sbornících

Bursová, M.; Krejčová, M.; Dejmková, H.; Čabala, R.: Nové možnosti optimalizace v analytické chemii. In: *Študentská vedecká konferencia PriF UK 2013 - Zborník recenzovaných príspevkov*, M. Galamboš, V. Džugasová, A. Ševčovičová (Ed.), Bratislava: Univerzita Komenského v Bratislavě, Prírodovedecká fakulta, 2013, s. 935-940.

Bursová, M.; Čabala, R.: Preconcentration of aromatic and polyaromatic amines with bell-shaped extraction device assisted liquid-liquid microextraction. In: *Proceedings of the 8th International Students Conference "Modern Analytical Chemistry"*, K. Nesměrák (Ed.), Praha: Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, 2012, s. 21-23.

Bursová, M.; Čabala, R.: Determination of amino PAHs by bell-shaped extraction device assisted liquid-liquid microextraction and GC-MS. In: *29<sup>th</sup> international Symposium on Chromatography (29<sup>th</sup> ISC): abstract book*, B. Buszewski, J. Kowalska (Ed.), Torun: Nicolaus Copernicus University, 2012, s. 593.

Bursová, M.; Čabala, R.: Optimalizace v analytické chemii. In: *Chemické Listy (64, Sjezd chemických společností)* **106** (6), P. Tarkowski (Ed.), Praha: Česká společnost chemická, 2012, s. 487-488.

Bursová, M.; Čabala, R.: Mikroextrakce kapalina kapalina pomocí přípravku ve tvaru zvonu. In: *Chemické Listy (XII. Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků)* **106** (5), R. Řápková (Ed.), Praha: Česká společnost chemická, 2012, s. 418.

Bursová, M.; Čabala, R.: Presentation and optimization of a new microextraction technique. In: *Proceedings of the 7th International Students Conference "Modern Analytical Chemistry"*, K. Nesměrák (Ed.), Praha: Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, 2011, s. 11-15.

Bursová, M.; Čabala, R.: Statistical optimization of microextraction technique. In: *17th International Symposium on Separation Sciences: Book of Abstracts*, V. Coman (Ed.), Cluj-Napoca: Casa Cărtii de Știință, 2011, s. 125.

Bursová, M.; Čabala, R.: Computer-aided optimization of microextraction technique. In: *Analytické Metódy a Zdravie Človeka (18. Medzinárodná konferencia)-Zborník príspevkov*, M. Hutta (Ed.), Bratislava: Slovenská vákuová spoločnosť, 2011, s. 92-99.

Bursová, M.; Čabala, R.: Computer-aided optimization of microextraction technique. In: *Analytické Metódy a Zdravie Človeka (18. Medzinárodná konferencia)-Zborník abstraktov*, R. Bodor, J. Marák, M. Masár, A. Staňová (Ed.), Bratislava: Slovenská vákuová spoločnosť, 2010, s. 90-91.

Bursová, M.; Čabala, R.: Development and optimization of new microextraction technique of determination of environmental pollutants by GC. In: *Proceedings of the 6th International Students Conference "Modern Analytical Chemistry"*, K. Nesměrák (Ed.), Praha: Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, 2010, s. 41-45.

## Plakátová sdělení

Bursová, M.; Čabala, R.: Determination of amino PAHs by bell-shaped extraction device assisted liquid-liquid microextraction and GC-MS. *29<sup>th</sup> International Symposium on Chromatography (the 29<sup>th</sup> ISC) and 18<sup>th</sup> International Symposium on Separation Sciences*, Torún, Polsko (9. – 13. 9. 2012).

Bursová, M.; Čabala, R.: Mikroextrakce kapalina kapalina pomocí přípravku ve tvaru zvonu. *XII. Mezioborové setkání mladých biologů, biochemiků a chemiků*, Svatá Kateřina Počátky, Česká Republika (29. 5. – 1. 6. 2012).

Bursová, M.; Čabala, R.: Statistical optimization of microextraction technique. *17<sup>th</sup> International Symposium on Separation Sciences*, Cluj Napoca, Rumunsko (5. – 9. 9. 2011).

Bursová, M.; Čabala, R.: Computer-aided optimization of microextraction technique. *18. Medzinárodná konferencia: Analytické Metódy a Zdravie Človeka*, Bratislava, Slovensko (11. – 14. 10. 2010).



## **Publikace in extenso, které jsou bez vztahu k tématu disertační práce**

Křížek, T.; **Bursová, M.**; Horsley, R.; Kuchař, M.; Tůma, P.; Čabala, R.; Hložek, T.: Menthol-based hydrophobic deep eutectic solvents: Towards greener and efficient extraction of phytocannabinoids. *Journal of Cleaner Production* **193**, 391-396 (2018).

Hložek, T.; Křížek, T.; Tůma, P.; **Bursová, M.**; Coufal, P.; Čabala, R.: Quantification of paracetamol and 5-oxoproline in serum by capillary electrophoresis: Implication for clinical toxicology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **145**, 616-620 (2017).

Krajíček, J.; Havlíková, M.; **Bursová, M.**; Ston, M.; Čabala, R.; Exnerová, A.; Štýs, P.; Bosáková, Z.: Comparative analysis of volatile defensive secretion of three species of Pyrrhocoridae (Insecta: Heteroptera) by gas chromatography-mass spectrometry method. *Plos One* **11**, article number e0168827 (2016).

Hložek, T.; **Bursová, M.**; Coufal, P.; Čabala, R.: Gabapentin, pregabalin and vigabatrin quantification in human seruma by GC-MS after hexyl chloroformate derivatization. *Journal of Analytical Toxicology* **40**, 749-753 (2016).

Bierhanzl, V. M.; **Bursová, M.**; Ston, M.; Čabala, R.; Seydlová, G.: Simultaneous analysis of polar and non-polar components of cell membrane phospholipids by GC-MS. *Chemical Papers* **70**, 1309-1315 (2016).

Hložek, T.; **Bursová, M.**; Coufal, P.; Čabala, R.: Identification and quantification of acidosis inducing metabolites in cases of alcohols intoxication by GC-MS for emergency toxicology. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **114**, 16-21 (2015).

**Bursová, M.**; Hložek, T.; Čabala, R.: Simultaneous determination of methanol, ethanol and formic acid in serum and urine by headspace GC-FID. *Journal of Analytical Toxicology* **39**, 741-745 (2015).

Hložek, T.; **Bursová, M.**; Čabala, R.: Simultaneous and cost-effective determination of ethylene glycol and glycolic acid in human serum and urine for emergency toxicology by GC-MS. *Clinical Biochemistry* **48**, 189-191 (2015).

Hložek, T.; **Bursová, M.**; Čabala, R.: Fast determination of ethylene glycol, 1,2-propylene glycol and glycolic acid in blood serum and urine for emergency and clinical toxicology by GC-FID. *Talanta* **130**, 470-474 (2014).

Krajíček, J.; Kozlík, P.; Exnerová, A.; Štys, P.; **Bursová, M.**; Čabala, R.; Bosáková, Z.: Capillary electrophoresis of pterin derivatives responsible for the warning coloration of Heteroptera. *Journal of Chromatography A* **1336**, 94-100 (2014).

Hložek, T.; **Bursová, M.**; Čabala, R.: Fast ibuprofen, ketoprofen and naproxen simultaneous determination in human serum for clinical toxicology by GC-FID. *Clinical Biochemistry* **47**, 109-111 (2014).



ČESKÁ REPUBLIKA  
ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ



PATENTOVÁ  
LISTINA

A handwritten signature in black ink, reading "J. Kratochvíl".

Josef Kratochvíl  
předseda  
Úřadu průmyslového vlastnictví

# PATENTOVÝ SPIS

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2010-958**  
 (22) Přihlášeno: **21.12.2010**  
 (40) Zveřejněno: **07.12.2011**  
 (**Věstník č. 49/2011**)  
 (47) Uděleno: **26.10.2011**  
 (24) Oznámení o udělení ve Věstníku: **07.12.2011**  
 (**Věstník č. 49/2011**)

(11) Číslo dokumentu:

**302 841**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

**B01L 3/00** (2006.01)

**B01D 11/04** (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:  
US 2005191759 A1; CN 20110228Y Y.

(73) Majitel patentu:  
Univerzita Karlova v Praze, Praha 1, CZ

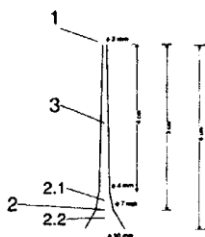
(72) Původce:  
Čabala Radomír RNDr. Dr., Praha 10, CZ  
Bursová Miroslava Mgr., Byšice, CZ

(74) Zástupce:  
Hák Janeček & Švestka, Patentová a známková kancelář,  
RNDr. Roman Hák, U Průhonu 5, Praha 7, 17000

(54) Název vynálezu:  
**Vírový extrakční přípravek pro mikroextrakci kapaliny kapalinou**

(57) Anotace:  
Řešení se týká mikroextrakce využíujícího víru na hladině kapalného vzorku. Předmětem řešení je přípravek (1) pro mikroextrakci kapaliny kapalinou, který obsahuje extrakční konus (2) přecházející v dávkovací/odběrovou trubici (3). Předmětem řešení je také způsob mikroextrakce kapaliny kapalinou, při kterém se užívá extrakční přípravek podle řešení. Způsob je vhodný pro extrakci kapalných vzorků kapalinou mající nižší hustotu než vzorek a nemísitelnou se vzorkem (extrakce kapaliny kapalinou).

**CZ 302841 B6**



## Vírový extrakční přípravek pro mikroextrakci kapaliny kapalinou

### Oblast techniky

Vynález spadá do oblasti mikroanalytických metod. Vynález se týká způsobu mikroextrakce využívajícího víru na hladině kapalného vzorku a technického přípravku k provádění tohoto způsobu. Způsob je vhodný pro extrakci kapalných vzorků kapalinou mající nižší hustotu než vzorek a nemísitelnou se vzorkem (extrakce kapaliny kapalinou).

### Dosavadní stav techniky

Dosud bylo popsáno mnoho metod jak extrakce, tak mikroextrakce kapaliny kapalinou. Často se jedná o extrakční kapaliny těžší než voda, což jsou prakticky jen chlorované látky a rozpouštědla. Tyto lze jednoduše přidat do vodného vzorku, intenzivně míchat a poté oddělit obě fáze, např. centrifugou. Extrakční kapalinu pak lze odebrat např. pipetou ze dna nádoby nebo za pomoci dělicí nálevky. Pro extrakce za použití kapalin lehčích než voda je možné použít rovněž klasickou extrakci v dělicí nálevce, ale objem použité extrakční kapaliny je řádově srovnatelný s objemem vzorku. Pro extrakci to znamená malý fázový poměr (poměr objemů vzorku a extrakční kapaliny) a tudíž malý obohacující faktor (podíl koncentrace látky v extrakční kapalině a koncentrace ve vzorku), dále pak velkou spotřebu extrakční kapaliny. Pokud by byl použit jen malý objem extrakční kapaliny, byl by fázový poměr velký a obohacující faktor vysoký, ale nebyla dosud známa metoda jednoduchého odběru velmi malého objemu extrakční kapaliny z hladiny vzorku. Extrakční kapalina bude v takovém případě tvořit velmi tenký film na hladině vzorku. Příkladem extrakce kapaliny–kapalinou s velmi velkým fázovým poměrem je např. extrakce jednou kapkou rozpouštědla o objemu řádově jednotky mikrolitrů („single drop micro-extraction“, SDME). Nevýhodami této metody je malá stabilita kapky visící v roztoku, který není možno z tohoto důvodu intenzivně míchat, a dále velmi malý objem výsledného roztoku extrahované látky v extrakční kapalině postačující prakticky na jedinou analýzu. Často používanou metodou je mikroextrakce pevnou fází („solid phase microextraction“, SPME), kdy jsou analyty extrahovány z vodného či plynného vzorku do tenkého filmu sorbentu (kapaliny či pevné fáze) naneseném na tenkém křemenném vlákne. Kromě mnoha praktických výhod má i tato metoda své nedostatky. Je to především malá mechanická odolnost vláken, omezený počet použití vláken, omezený počet komerčně dostupných sorbentů na vláknech, možnost přenosu zbytků analytů z jedné analýzy do druhé při neúplné desorpci („carry-over error“) a v neposlední řadě také relativně vysoká cena vláken. Další skupinou extrakčních metod široce užívaných v praxi je extrakce pevnou fází („solid phase extraction“, SPE). Nevýhodami této metody jsou jednorázové použití SPE kolonek (neekologické), omezený počet sorbentů v komerčních kolonkách, omezený počet velikostí kolonek a jejich vysoká cena.

Všechny výše zmíněné nedostatky odstraňuje přípravek a způsob podle předloženého vynálezu.

Konkrétní problém, který původci chtěli vyřešit, byla potřeba mikroextrakce vodných vzorků lehkými uhlovodíky pro potřeby chemické analýzy metodou plynové chromatografie (GC) a plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS), neboť žádná ze známých metod nevyhovovala.

### Podstata vynálezu

Výše uvedený problém byl vyřešen přípravkem a způsobem podle vynálezu, kdy se využívá víru na hladině kapalného vzorku pro extrakci vodných vzorků malým množstvím kapaliny, která má nižší hustotu než voda a je nemísitelná s vodou, za použití intenzivního míchání během extrakce.

Pro realizaci způsobu podle vynálezu vyvinuli původci extrakční přípravek. Extrakční přípravek podle vynálezu obsahuje extrakční kónus ve vrcholu ústící do dávkovací/odběrové trubice. Kónusem je zde míněna spodní, širší část přípravku přecházející do horní, užší části – dávkovací/odběrové trubice. Tento kónus, čili spodní část přípravku, může mít tvar nejen skutečného jednoduchého kónusu, čili kužele, resp. komolého kužele, ale i pláště tělesa sestávající ze dvou (nebo i více) na sobě postavených komolých kuželů, případně i tvar rotačního hyperboloidu či tvar zvonovitý. Výhodný je kónus sestávající z pláště dvou stejně vysokých komolých kuželů s různým úhlem mezi stěnou a podstavou kuželu, přičemž spodní kužel má menší úhel mezi stěnou a podstavou kuželu. Dávkovací/odběrová trubice zahrnuje jak trubici se shodnými průměry na obou koncích, tak i trubici s odlišnými průměry, přičemž přechod od jednoho průměru k druhému může být lineární a nelineární. Výhodně je i dávkovací/odběrová trubice ve tvaru pláště komolého kužele.

Přípravek může být zhotoven např. ze skla, z plastu, výhodně z průsvitného plastu, výhodněji z průhledného plastu (jako je např. polystyren, polykarbonát, polyester, polypropylen, polyvinylchlorid, akrylát) a nejvýhodněji z průhledného polypropylenu (PP). Obecně lze použít jakýkoliv materiál, který odolá působení extrakční kapaliny, je dostatečně průsvitný, je dostatečně hladký na povrchu, aby na něm neulpívaly zbytky vzorku, a nereaguje popř. nesrovnávaně s látkou ze vzorku. Použitím extrakčního přípravku se zabráňuje rozptýlení extrakční kapaliny ve vzorku, takže je pak možný reprodukovatelný odběr extrakční kapaliny pro její následnou analýzu.

Při způsobu podle vynálezu je zachován vysoký fázový poměr extrakce, a to umožňuje vysokou účinnost při zachování snadné proveditelnosti úkonu odběru malého objemu extrakčního činidla. Celý způsob lze označit za mikroextrakci vzhledem k malému objemu extrakční kapaliny. Jako extrakční kapalinu lze použít jakoukoliv kapalinu nemísitelnou s vodou a s hustotou menší než je hustota vody. Tyto dvě podmínky splňuje celá škála kapalin. Jako příklad lze uvést pro extrakci nepolárních látek (např. polyaromatické uhlovodíky, polychlorované bifenyly, polychlorované dibenzodioxiny a dibenzofurany – často stanovené polutanty životního prostředí) z vodných vzorků případně vzorků biologických tekutin zcela nepolárními kapalinami (např. čistými uhlovodíky jako jsou např. hexan, heptan, oktan, nonan, dekan, cyklohexan a methylycyklohexan, benzen, toluen, xylén, ethylbenzen a všechny jejich rozvětvené, cyklické a aromatické izomery). Pro extrakci více polárních látek (často jde např. o pesticidy, případně i léčiva, jejich metabolity a produkty jejich odbourávání) lze použít např. polárnější ketony (např. diethyl keton, cyklohexanon, atd.), étery (např. diethyl éter, dipropyl éter, diisopropyl éter a dibutyl éter, methylfenyl éter) a estery (např. propylacetát, 2-methyl-2-propylacetát, butylacetát, pentylacetát a dále estery dalších organických kyselin). Pro extrakci polárních látek lze použít alkoholy nemísitelné s vodou (např. 1- a 2-oktanol, ethyl-1-hexanol, nonanol). Tento široký výběr extrakčních kapalin umožňuje jejich velmi selektivní volbu vzhledem k polaritě a dalším vlastnostem cílových analytů (např. rozpustnost ve vodě, tlak nasycených par, Henryho konstanta, rozdělovací koeficient oktanol-voda, apod.). Možné je rovněž použití směsi uvedených extrakčních kapalin (pokud jsou mísitelné) v případě specifických požadavků na extrahované analyty či požadavků na další zpracování extraktů.

Při způsobu extrakce podle vynálezu se dávkovací/odběrová trubice extrakčního přípravku výhodně protáhne malým otvorem v eptu víčka extrakční nádoby tak, že je možné extrakčním přípravkem vertikálně pohybovat. Lze užít i otevřenou nádobku bez víčka se septem, a přípravek uchytit v požadované poloze prostřednictvím jakéhokoliv vhodného fixačního prostředku, který současně umožní horizontální i vertikální nastavení polohy přípravku. Odborník na základě předloženého popisu snadno najde alternativní řešení, která však spadají též do rozsahu předloženého vynálezu. Výhodný postup extrakce je následující:

Krok A: Nádobka se naplní vodným vzorkem, vloží se magnetické míchadélko vhodné velikosti a nádobka se uzavře víčkem se septem, skrz které je protažena dávkovací/odběrová trubice při-

pravku, přičemž extrakční kónus je na spodní straně víčka (tzn. uvnitř nádoby). Je samozřejmě možné využít i nádobku opatřenou jiným míchacím prostředkem.

5 Krok B: Po uzavření nádoby se vzorkem se extrakční kónus přípravku vertikálním posunutím ponoří do vzorku tak, aby hladina vzorku byla přibližně v polovině výšky kónusu.

10 Krok C: Nadávkuje se vhodný objem extrakční kapaliny do extrakčního kónusu přípravku dávkovací/odběrovou trubicí za použití vhodného dávkovacího zařízení, např. mikropipety nebo injekční stříkačky s přiměřeným objemem.

15 Způsob podle vynálezu se provádí s objemy extrakční kapaliny od 50 do 1500  $\mu$ l, výhodně od 50 do 500  $\mu$ l a nejvýhodněji od 100 do 300  $\mu$ l (mj. v závislosti na vnitřním objemu dávkovací/odběrové trubice).

20 Tento zvolený objem extrakční kapaliny je dávkován zvolna na hladinu vzorku uvnitř kónusu přípravku, takže vytvoří oddělenou vrstvu.

25 Krok D: Výška extrakčního přípravku v lahvičce se nastaví tak, že fázové rozhraní mezi vodným vzorkem a extrakční kapalinou se nachází výhodně přibližně ve čtvrtině výšky od dolní hrany kónusu. Toto nastavení pozice fázového rozhraní zaručuje, že se extrakční kapaliny během intenzivního míchání (viz krok E) neuvolní z přípravku a nerozptýlí do vzorku. Pozici fázového rozhraní je třeba předem experimentálně otestovat, protože závisí mj. na viskozitě a povrchovém napětí použité extrakční kapaliny.

30 Krok E: Celá sestava nádoby s extrakčním přípravkem se umístí na magnetickou míchačku a zapnutím míchání započne vlastní extrakce. Rotace vzorku v nádobce vytvoří ve středu hladiny výrazný vír, kde na povrchu vodné fáze je rovnoměrně rozprostřena extrakční kapalina.

35 Tímto způsobem je výrazně zvětšena styčná plocha mezi vzorkem a extrakční kapalinou, což zrychluje ustavení extrakční rovnováhy. Intenzivní míchání a rotace jak vzorku, tak i extrakční kapaliny výrazně zvyšuje transport extrahovaných látek do extrakční kapaliny. Důležitou funkcí zvonovité části přípravku, tj. kónusu, je udržení celého objemu extrakční kapaliny uvnitř přípravku a zabránění jejímu rozptýlení v extrakční nádobce.

40 Rychlost míchadla je nutno nastavit tak, aby nedocházelo na spodní straně víru k odtrhávání kapek extrakční kapaliny, a to v závislosti na velikosti nádoby a magnetického míchadla. Pro experimenty popsané v příkladech byla výhodná rychlost míchání v rozmezí 50 až 1000 ot./min, výhodněji od 100 až 800 ot./min. a nejvýhodněji od 600 do 800 ot./min.

45 Krok F: Po uplynutí zvolené doby extrakce stanovovaných látek do extrakční kapaliny se míchání zastaví, přičemž postupně se zpomalující rotace vzorku způsobuje postupné zmenšování víru a vyrovnání hladiny v nádobce, takže extrakční kapalina zůstává plavat jako oddělená vrstva uvnitř kónusu přípravku, stejně jako tomu bylo před zahájením míchání.

50 Krok G: Po úplném zastavení rotace vzorku je vertikálním pohybem přípravek zasunut hlouběji do vodného vzorku, což způsobí, že extrakční kapalina je vzorkem vytlačena do zúžené části přípravku a do dávkovací/odběrové trubice.

55 Krok H: Extrakční kapalina se odebere pomocí vhodného odběrového zařízení, např. pomocí mikropipety nebo injekční stříkačky. Tímto způsobem lze odebrat prakticky téměř veškerý objem extrakční kapaliny.

Extrakční kapalina s vyextrahovanými látkami může být dále zpracována, např. podrobena další chemické analýze.

Obecně lze uvedený způsob extrakce použít pro extrakci látek z kapalného vzorku kapalinou nemísitelnou se vzorkem a současně s hustotou nižší než má vzorek.

5 Způsob podle vynálezu může mj. sloužit jako doplňková metoda nejen k široce používané metodě mikroextrakce pevnou fází („solid phase microextraction“, SPME), ale i k ostatním mikroextrakčním technikám.

10 Předmětem vynálezu tedy konkrétně je extrakční přípravek pro mikroextrakci kapaliny kapalinou, který obsahuje extrakční kónus přecházející v dávkovací/odběrovou trubici.

V jednom výhodném provedení extrakčního přípravku se vnitřní průměr kónusu směrem k dávkovací/odběrové trubici zmenšuje rovnoměrně, v jiném provedení se vnitřní průměr kónusu směrem k dávkovací/odběrové trubici zmenšuje nerovnoměrně.

15 V dalším vhodném provedení extrakčního přípravku kónus sestává alespoň ze dvou částí, přičemž vnitřní průměr každé části kónusu se směrem k dávkovací/odběrové trubici zmenšuje rovnoměrně, avšak navzájem odlišně. V jednom provedení horní část kónusu má pomaleji se zmenšující průměr než spodní část kónusu, v jiném provedení má horní část kónusu rychleji se zmenšující průměr než spodní část kónusu. Výhodně mají části kónusu stejnou výšku.

20 Dále je předmětem vynálezu způsob mikroextrakce kapaliny kapalinou, který zahrnuje kroky, kdy se

- přípravek podle vynálezu vloží do nádoby opatřené míchacím prostředkem obsahující vodný vzorek pro extrakci a extrakční kónus přípravku se vertikálním posunutím ponoří do vzorku,
- 25 – nadávkuje požadovaný objem extrakční kapaliny do extrakčního kónusu dávkovací/odběrovou trubicí,
- uvede do činnosti míchací prostředek za vytvoření víru, a
- po zastavení míchání se přípravek vertikálním pohybem zasune hlouběji do vodného vzorku, čímž se extrakční kapalina vytlačí až do dávkovací/odběrové trubice extrakčního přípravku,
- 30 – odkud se extrakční kapalina může odebrat k dalšímu použití.

#### Přehled obrázků na výkresech

35 Obr. 1A: Extrakční přípravek podle vynálezu ve výhodném provedení.

Obr. 1B, 1C, 1D: Příklady dalších provedení extrakčního přípravku podle vynálezu.

Obr. 2: Extrakční přípravek podle vynálezu zasazený do víalky skrz víčko se septem.

Obr. 3: Schematické znázornění kroků výhodného způsobu extrakce s extrakčním přípravkem pole vynálezu. Šrafovaně je označen vzorek, černě extrakční kapalina.

40 Obr. 4: Příklad chromatogramu zkoumaných analytů extrahovaných za optimálních podmínek do heptanu;  $c = 10 \mu\text{g ml}^{-1}$  každého analytu ve vodě, (1) toluen, (2) ethylbenzen, (3) mesitylen, (4) fenol, (5) nitrobenzen, (6) n-oktanol, (7) naftalen, (8) dimethylfthalát (9) methylhexadekanoát.

45 Obr. 5: Grafické znázornění hodnot rozdělovacích poměrů  $K$  pro vybrané látky při jejich extrakci do organické fáze za použití extrakčního přípravku a při klasické extrakci do heptanu.

Obr. 6: Grafické znázornění hodnot obohacovacího faktoru  $EF$  pro vybrané látky při jejich extrakci do organické fáze za použití extrakčního přípravku a při klasické extrakci do heptanu.

50 Obr. 7: Grafické znázornění hodnot efektivity extrakce  $R$  (%) pro vybrané látky při jejich extrakci do organické fáze za použití extrakčního přípravku a při klasické extrakci do heptanu.



Příklady provedení vynálezu

## 5 Příklad 1

## Extrakční přípravek

10 Extrakční přípravek 1 podle vynálezu ve výhodném provedení, znázorněný na obr. 1A, obsahuje  
extrakční kónus 2 který přechází do dávkovací/odběrové trubice 3 (rozměry a tvar extrakčního  
přípravku uvedené na obr. 1 odpovídají prototypu přípravku a jsou výsledkem optimalizačních  
experimentů pro mikroanalytické postupy). Extrakční přípravek 1 byl zhotoven z průhledného  
polypropylenu.

15 Při extrakci je dávkovací/odběrová trubice 3 přípravku 1 protažena malým otvorem v septu 4  
víčka 5 extrakční nádoby 6 tak, že je možné přípravkem 1 vertikálně pohybovat. Extrakční pří-  
pravek 1 tak vytváří s extrakční nádobkou 6 sestavu znázorněnou na obr. 2.

## 20 Příklad 2

## Postup extrakce

V příkladu se uvádí výhodný postup extrakce obsahující 7 kroků (viz obr. 3):

25 Krok A. Nádobka 6 (typ B7999-4, obsah 16 ml, 70 mm výška, 21 mm průměr, National  
Scientific USA) se naplní vodným vzorkem, vloží se magnetické míchadélko 7 (Teflon, průměr  
6 mm, délka 14 mm) a nádobka 6 se uzavře víčkem 5 (typ B7807-18 s otvorem pro septum,  
National Scientific, USA) se septem 4 (typ B7995-18, National Scientific, USA, průměr 16 mm,  
30 tloušťka 2,5 mm, Teflon/silikon), skrz které je protažena dávkovací/odběrová trubice 3 přípravku  
1, přičemž extrakční kónus 2 je na spodní straně víčka 5.

35 Krok B. Po uzavření nádoby 6 se vzorkem se extrakční kónus 2 přípravku 1 vertikálním posu-  
nutím ponoří do vzorku tak, že hladina vzorku je přibližně v polovině výšky kónusu 2.

40 Krok C. Nadávkuje se požadovaný objem extrakční kapaliny do extrakčního kónusu 2 přípravku  
1 dávkovací/odběrovou trubicí 3 za použití vhodné injekční stříkačky. Zvolený objem extrakční  
kapaliny se dávkuje zvolna na hladinu vzorku uvnitř kónusu 2 přípravku 1, takže vytvoří odděle-  
nou vrstvu.

45 Krok D. Výška extrakčního přípravku 1 v nádobce 6 se nastaví tak, že fázové rozhraní mezi vod-  
ným vzorkem a extrakční kapalinou se nachází přibližně ve čtvrtině výšky od dolní hrany kónusu  
2.

50 Krok E. Poté se celá sestava nádoby 6 s extrakčním přípravkem 1 umístí na magnetickou  
míchačku a zapnutím míchání započne vlastní extrakce. Rotace vzorku v nádobce 6 vytvoří ve  
středu hladiny výrazný vír, kde na povrchu vodné fáze je rovnoměrně rozprostřena extrakční  
kapalina. Rychlost míchadla 7 je nutno nastavit tak, aby nedocházelo na spodní straně víru  
k odtrhávání kapek extrakční kapaliny. Optimum je v rozmezí 600 až 800 ot./min podle velikosti  
nádoby 6 a magnetického míchadla 7.

55 Krok F. Po uplynutí času nezbytného pro extrakci stanovených látek do extrakční kapaliny je  
míchání zastaveno, přičemž postupně zpomalující rotace vzorku způsobuje postupné zmenšování  
víru a vyrovnání hladiny v nádobce, takže extrakční kapalina zůstane plavat jako oddělená vrstva  
uvnitř kónusu 2 přípravku 1.

Krok G. Po úplném zastavení rotace vzorku se vertikálním pohybem přípravek 1 zasune hlouběji do vodného vzorku, což způsobí, že extrakční kapalina je vzorkem vytlačena do zužující se části přípravku 1 a až do dávkovací/odběrové trubice 3.

Krok H. Extrakční kapalina se odebere injekční stříkačkou. Tímto způsobem lze odebrat téměř veškerý objem extrakční kapaliny.

### 10 Příklad 3

15 Extrakce toluenu, ethylbenzenu, fenolu, naftalenu, mesitylenu, dimethylftalátu a methylhexadekanoátu byla provedena z vody do extrakční kapaliny. Uvedené látky byly vybrány tak, aby pokrývaly celou škálu polarit od nepolárních látek (toluen) až do polární látky (fenol). Jako příklad zcela nepolární organické extrakční fáze byl vybrán heptan, jako příklad středně polární fáze 2-methyl-2-propylacetát a jako příklad organické fáze s polární funkční skupinou 1-oktanol (tento je v předchozích dvou případech rovněž analytem). Vybrané vlastnosti těchto látek jsou uvedeny v tabulce 1.

20 Tabulka 1: Vybrané vlastnosti použitých látek

Analyt	CAS	$M_r$	$T_v$ (°C)	$\epsilon_r$	$\log P_{ow}$
<b>Toluen</b>	108-88-3	92,1	110,6	2,38	2,73
<b>Ethylbenzen</b>	100-41-4	106,2	136,2	2,5	3,15
<b>Mesitylen</b>	108-67-8	120,2	165,0	2,4	3,42
<b>Fenol</b>	108-95-2	94,1	181,7	4,3	1,5
<b>Nitrobenzen</b>	98-95-3	123,1	210,9	26,3	14,85
<b>1-oktanol</b>	111-87-5	130,2	195,0	10,3	2,88
<b>Naftalen</b>	91-20-3	128,2	218,0	2,3	3,35
<b>Dimethylftalát</b>	131-11-3	194,2	283-284	8,5	1,56
<b>Heptan</b>	142-88-5	100,2	98,4	1,92	4,66
<b>2-methyl-2-propylacetát</b>	540-88-5	116,2	97-98	5,67	1,76

CAS ... registrační číslo látky v Chemical Abstract System  
 $M_r$  ... relativní molekulová hmotnost  
 $T_v$  ... teplota varu  
 $\epsilon_r$  ... relativní permitivita  
 $\log P_{ow}$  ... rozdělovací koeficient oktanol/voda

25 Postupem podle příkladu 2 byly extrahovány uvedené látky do organické fáze jako extrakčního činidla a v něm byly stanoveny metodou rychlé plynové chromatografie za použití plamenové ionizačního detektoru (fast-GC-FID). Celý proces extrakce byl optimalizován následujícím způsobem. Byly vybrány experimentální podmínky, které mohou teoreticky ovlivňovat účinnost extrakce a rozsah jejich hodnot, které mohou prakticky nabývat – objem použitého rozpouštědla (50 až 300  $\mu$ l), doba extrakce (1 min až 1 hodina), rychlost míchání vzorku (0 až 1200 ot./min),  
 30 přídavek chloridu sodného ke vzorku (efekt vysolení organických látek z vodných roztoků, 0 až nasycený roztok), tvar použité extrakční nádoby (úzká vysoká až nízká široká, 10 ml). Stan-

dardními statistickými postupy optimalizace procesu v rámci systému odezvových ploch (screening – Plackett–Burman design, optimalizace – central composite design) byly zjištěny experimentální parametry, které jsou pro účinnost extrakce důležité a u nich zjištěny optimální hodnoty: objem heptanu 115  $\mu\text{l}$ , doba extrakce 16 min, přídavek soli 1,24 g. Za těchto optimálních podmínek byla provedena extrakce směsi látek z jejich vodného roztoku heptanem a tento analyzován metodou fast–GC–FID za těchto experimentálních podmínek: plynový chromatograf GC2010 Shimadzu vybavený FID, kapilární kolona CP–Sil 5CB (5% vodný bifenylyl – 95% dimethyl polysiloxane, Chrompack) o délce 10 m a vnitřním průměru 0,15 mm s tloušťkou stacionární fáze 0,12  $\mu\text{m}$ , vodík jako mobilní fáze s lineární průtokovou rychlostí kolonou 70 cm/s, nástřík vzorku o objemu 0,25  $\mu\text{l}$  s děličem v poměru 1/10, teploty: nástřík a detektor 300  $^{\circ}\text{C}$ , teplotní program analýzy: kolona 40  $^{\circ}\text{C}$  po dobu 1 min, poté teplotní nárůst 50  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  do 100  $^{\circ}\text{C}$  následovaný nárůstem 100  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  do 250  $^{\circ}\text{C}$  a při této teplotě 1 min. Příklad analýzy směsi látek extrahovaných do heptanu za výše uvedených podmínek je uveden na obr. 4. Analyty toluen, ethybenzen, mesitylen, fenol, nitrobenzen, n–oktanol, naftalen, dimethylftalát a methylhexadekanoát byly užity jako vodné roztoky v koncentraci 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

Dále byly naměřeny kalibrační závislosti jednotlivých látek, aby mohla být přesně stanovena jejich koncentrace v heptanu. S pomocí těchto kalibrací byly určeny rozdělovací poměry ( $K$ ), obohacující faktory ( $EF$ ) a recovery ( $R$ ) extrahovaných látek za výše uvedených experimentálních podmínek. Způsob výpočtu těchto parametrů je uveden níže a hodnoty těchto parametrů jsou uvedeny v grafech na obr. 5 až 7.

Rozdělovací poměr  $K$ :

$$K = \frac{c_{org}}{c_{aq}}, \quad \text{kde } c_{org} \text{ je rovnovážná koncentrace analytu v extrakční organické fázi,}$$

$c_{aq}$  je rovnovážná koncentrace analytu ve vodném vzorku.

Obohacující faktor („enrichment faktor“)  $EF$ :

$$EF = \frac{c_{org}}{C_0}, \quad \text{kde } c_{org} \text{ je rovnovážná koncentrace analytu v extrakční organické fázi, } C_0 \text{ je původní koncentrace analytu ve vodném vzorku.}$$

Recovery  $R$  (%):

$$R = \frac{n_{org}}{n_0} \cdot 100 = EF \cdot \frac{V_{org}}{V_{aq}} \cdot 100 = EF \cdot \beta \cdot 100, \quad \text{kde } n_{org} \text{ je látkové množství analytu}$$

vyextrahované do organické fáze,  $n_0$  je počáteční látkové množství analytu v objemu  $V_{aq}$  vzorku,  $V_{org}$  je objem použité extrakční organické fáze,  $V_{aq}$  je objem vodného vzorku, podíl  $V_{aq}/V_{heptan}$  je nazýván fázový poměr ( $\beta$ ).

Získané údaje ukazují, že způsobem podle vynálezu lze účinně extrahovat analyty do extrakční kapaliny pro účely chemické analýzy. Rozdělovací poměry dosahují hodnot od 0 pro látky, které prakticky nelze extrahovat, až po 70 pro látky, které lze extrahovat účinně. Toho lze výhodně využít při selektivní extrakci analytů ze směsi s látkami rušivými, popř. látkami, které nejsou objektem analýzy. Prakticky stejnou tendenci vykazují i hodnoty obohacovacích faktorů.

Z dat uvedených v grafech na obr. 5 až 7 je dále vidět, že jednotlivé extrakční kapaliny mají různou účinnost pro použité látky (tj. různou selektivitu). Z toho vyplývá, že je možno volbou vhodného rozpouštědla provést volbu látky či celé skupiny látek, které lze selektivně extrahovat

v přítomnosti ostatních, které nebudou extrahovány či budou extrahovány v daleko menší míře. To dokazuje velkou flexibilitu způsobu podle vynálezu plně srovnatelnou s flexibilitou klasické metody extrakce kapalinou kapalinou. Hodnoty  $R(\%)$  v grafu na obr. 5 dokazují, že účinnost způsobu extrakce není 100%, tj. nejedná se o kvantitativní, úplnou, extrakci, stejně jako u ostatních typů mikroextrakcí (SPME, SDME, apod.). Avšak úplná, 100%ní extrakce nebyla cílem způsobu podle vynálezu.

Pro srovnání byla provedena rovněž extrakce klasickým způsobem, kdy byl stejný objem vzorku extrahován 1 ml heptanu za stejných podmínek a v tomto objemu stanoveny analyty za stejných podmínek metodou fast-GC-FID. Výsledky jsou rovněž uvedeny v grafech na obr. 5 až 7. Porovnáním lze na první pohled zjistit lepší výsledky navrhované metody. Tato klasická extrakce poskytuje u většiny látek sice vyšší recovery ( $R(\%)$ ), to je ovšem logické a vyplývá to z podstatně většího použitého objemu extrakční kapaliny (heptanu). Koncentrace analytů v heptanu jsou však podstatně nižší (jak hodnoty  $K$ , tak i  $EF$ ), což výrazně snižuje citlivost následné fast-GC-FID analýzy. Recovery blížící se 100% nebyla cílem ani účelem způsobu podle vynálezu.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Extrakční přípravek (1) pro mikroextrakci kapaliny kapalinou, **vyznačující se tím**, že obsahuje extrakční kónus (2), který přechází v dávkovací/odběrovou trubici (3).
2. Extrakční přípravek (1) podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že vnitřní průměr kónusu (2) se směrem k dávkovací/odběrové trubici (3) zmenšuje rovnoměrně.
3. Extrakční přípravek (1) podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že vnitřní průměr kónusu (2) se směrem k dávkovací/odběrové trubici (3) zmenšuje nerovnoměrně.
4. Extrakční přípravek (1) podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že kónus (2) sestává alespoň ze dvou částí (2.1, 2.2), přičemž vnitřní průměr každé části (2.1, 2.2) kónusu (2) se směrem k dávkovací/odběrové trubici (3) zmenšuje rovnoměrně, avšak navzájem odlišně.
5. Extrakční přípravek (1) podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že horní část (2.1) kónusu (2) má pomaleji se zmenšující průměr než spodní část (2.2) kónusu (2).
6. Extrakční přípravek (1) podle nároku 4, **vyznačující se tím**, že horní část (2.1) kónusu (2) má rychleji se zmenšující průměr než spodní část (2.2) kónusu (2).
7. Extrakční přípravek (1) podle nároků 4 až 6, **vyznačující se tím**, že části (2.1, 2.2) kónusu (2) mají stejnou výšku.
8. Extrakční přípravek (1) podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7, **vyznačující se tím**, že je zhotoven ze skla.
9. Extrakční přípravek (1) podle kteréhokoliv z nároků 1 až 7, **vyznačující se tím**, že je zhotoven z plastu, výhodně z průsvitného plastu, výhodněji z průhledného plastu vybraného ze skupiny obsahující polystyren, polykarbonát, polyester, polypropylen, polyvinylchlorid a akrylát.
10. Způsob mikroextrakce kapaliny kapalinou, **vyznačující se tím**, že zahrnuje kroky, kdy

CZ 302841 B6

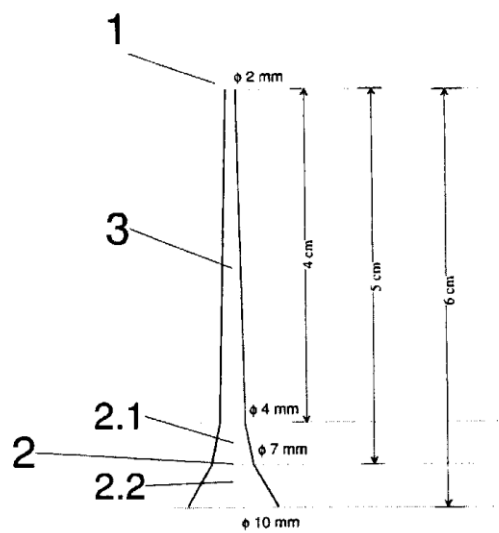
- přípravek (1) podle kteréhokoliv z nároků 1 až 9 se vloží do nádoby (6) opatřené míchacím prostředkem (7) obsahující vodný vzorek pro extrakci a extrakční kónus (2) přípravku (1) se vertikálním posunutím ponoří do vzorku,
- 5 – nadávkuje se požadovaný objem extrakční kapaliny do extrakčního kónusu (2) dávkovací/odběrovou trubicí (3),
- uvede se do činnosti míchací prostředek (7) za vytvoření víru, a
- po zastavení míchání se přípravek (1) vertikálním pohybem zasune hlouběji do vodného vzorku, čímž se extrakční kapalina vytlačí až do dávkovací/odběrové trubice (3) extrakčního přípravku (1), odkud se extrakční kapalina může odebrat k dalšímu použití.

10

5 výkresů

CZ 302841 B6

Obr. 1A



Obr.1B



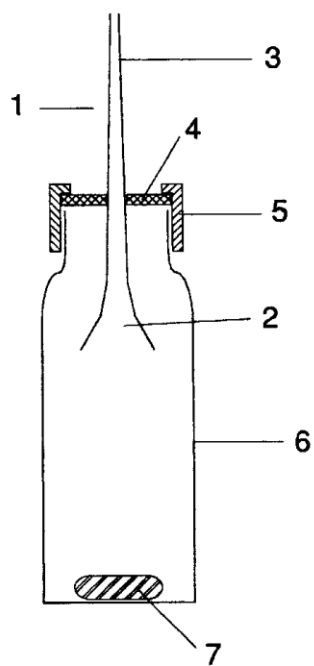
Obr.1C



Obr.1D

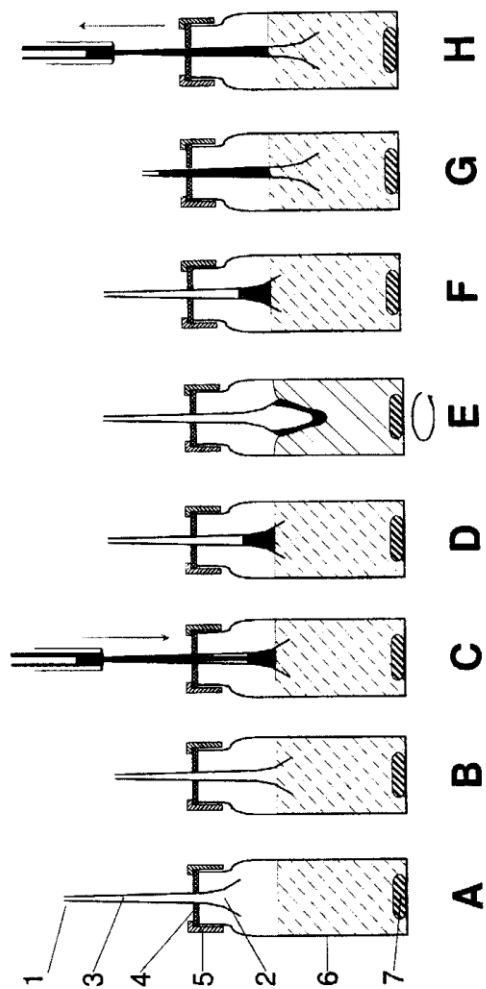


Obr. 2



CZ 302841 B6

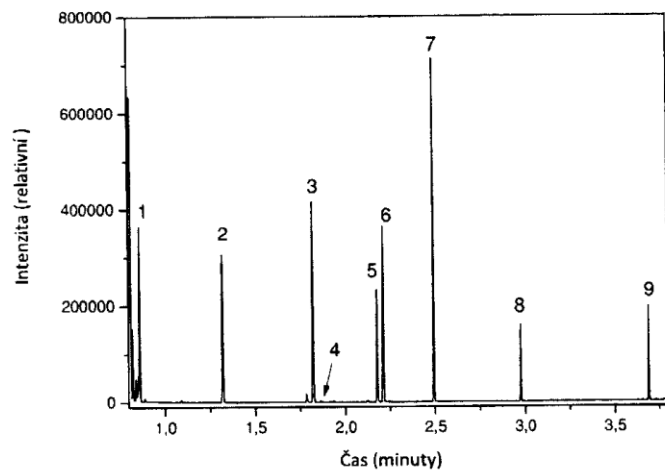
Obr. 3



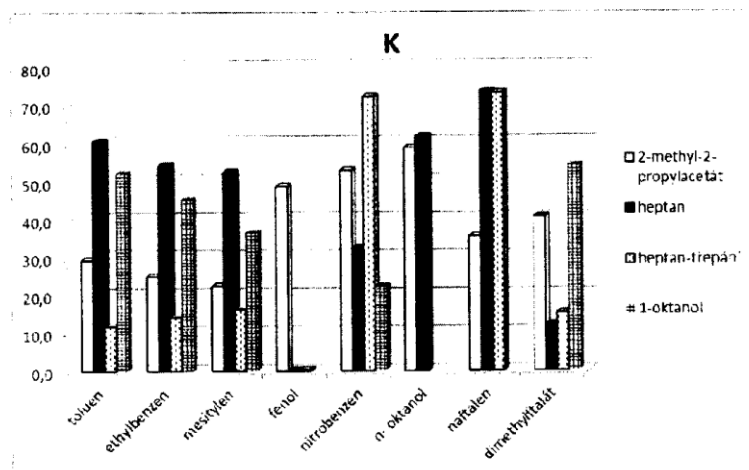


CZ 302841 B6

Obr. 4

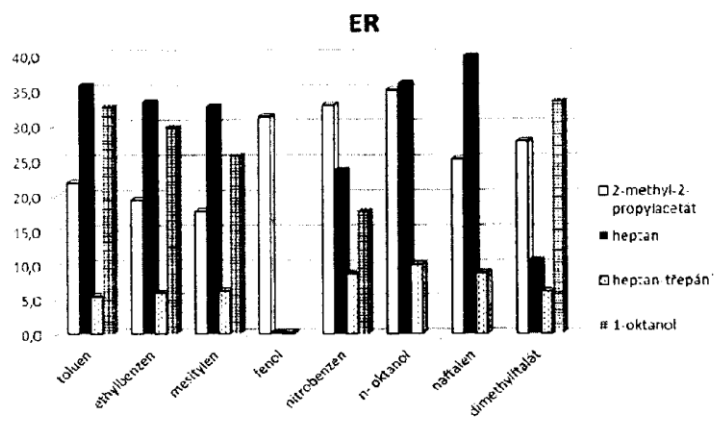


Obr. 5

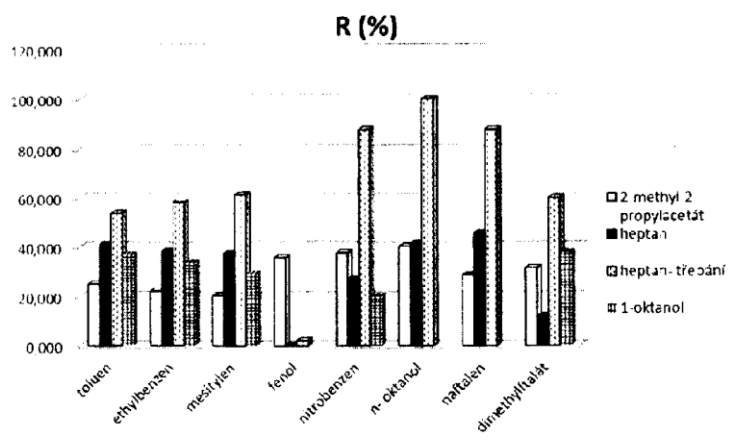


CZ 302841 B6

Obr. 6



Obr. 7



Konec dokumentu



## Bell-shaped extraction device assisted liquid–liquid microextraction technique and its optimization using response-surface methodology

Radomír Čabala\*, Miroslava Bursová

Charles University in Prague, Faculty of Science, Department of Analytical Chemistry, Albertov 6, 128 43 Prague 2, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 December 2011

Received in revised form 23 January 2012

Accepted 24 January 2012

Available online 31 January 2012

#### Keywords:

Liquid–liquid microextraction

Response-surface methodology

Gas chromatography

### ABSTRACT

We have developed a new microextraction technique for equilibrium, non-exhaustive analyte pre-concentration from aqueous solutions into organic solvents lighter than water. The key point of the method is application of specially designed and optimized bell-shaped extraction device, BSED. The technique has been tested and applied to the pre-concentration of selected volatile and semi volatile compounds which were determined by gas chromatography/mass spectrometry in spiked water samples. The significant parameters of the extraction have been found using chemometric procedures and these parameters were optimized using the central composite design (CCD) for two solvents. The analyte pre-concentration factors were in a range from 8.3 to 161.8 (repeatability from 7 to 14%) for heptane, and 50.0–105.0 (repeatability from 0 to 5%) for tert-butyl acetate. The reproducibility of the technique was within 1–8%. The values of limits of detection and determination were 0.1–3.3 ng mL<sup>-1</sup> for heptane and 0.3–10.7 ng mL<sup>-1</sup> for tert-butyl acetate. The new microextraction technique has been found to be a cheap, simple and flexible alternative to the common procedures, such as SPME or LLME. This BSED–LLME technique can also be combined with other separation methods, e.g., HPLC or CE.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Microextraction techniques have recently become very efficient approaches to sample pretreatment. Their main advantages lie in substantial limitation of the use of organic, and often toxic, solvents, in small production of other wastes and in acceleration of the sample pretreatment step. Therefore, they are much cheaper, less harmful to the environment and fit to the framework of “green analytical chemistry” [1].

Very many publications deal with various principles and procedures of liquid–liquid microextractions (LLME) and the great variety of abbreviated names of the techniques used makes the field somewhat difficult to survey [2,3]. In general, LLME procedures can be classified in terms of many criteria, e.g., into two- and three-phase ones [4], into those employing liquid films (e.g., hollow-fibre liquid–liquid microextraction, HFMLE [5]) or drops of extraction solvents (e.g., single-drop microextraction, SDME [6]) and directly suspended droplet microextraction, DSME [7]). Further procedures are based on homogeneous systems of two liquids (dispersion liquid–liquid microextraction, DLLME [8]). The selection of a suitable technique depends on the properties of the sample and on the analytical measuring method used. All the LLME techniques suffer from various drawbacks, such as a slow diffusion of

the analyte into the solvent static layer (HFMLE), a high cost and limited lifetime of some parts of the extraction system (HFMLE, solid-phase microextraction – SPME), a very small volume of the resultant extract permitting only a single analysis (SDME), high demands on manipulation of a single drop of the solvent (SDME), or the use of halogenated solvents (DLLME).

The newly by us developed microextraction technique described in the present paper belongs among two-phase, equilibrium, non-exhausting LLME procedures designed for aqueous sample solutions and is free of most of the drawbacks mentioned above. We call it “the bell-shaped extraction device assisted LLME (BSED–LLME)”, because of the extraction device characteristic shape. This technique is based on the extraction of an aqueous solution with a volume of units to tens of mL with a rather small volume of an extraction solvent (tens to hundreds of  $\mu$ L). The solvent is contained in the BSED for the whole extraction time. The important condition is that this solvent must have a density smaller than that of water, in order that it always forms the upper layer of the two-phase system. There are many solvents and their mixtures meeting this condition and thus the extraction procedure is flexible and the extraction conditions can readily match the properties of the analytes to be determined. The extraction starts with introduction of the solvent into the BSED which contains it through the whole procedure, in spite of intense stirring of the sample solution. Due to intense stirring, the extraction solvent is spread in a thin layer over a large area of the sample solution vortex and thus the extraction is accelerated. The specific BSED shape makes it possible

\* Corresponding author. Tel.: +420 221951228; fax: +420 221951236.  
E-mail address: [cabala@natur.cuni.cz](mailto:cabala@natur.cuni.cz) (R. Čabala).

to collect the solvent reproducibly, with almost no loss, at the end of the extraction.

To test the possibilities of this technique, the optimum conditions must be found for attainment of the maximum extraction efficiency. For this purpose, sophisticated multifactorial statistical methods, e.g., response surface methodology (RSM) [9], are recently gradually replacing the common one-factor-at-a-time (OFAT) procedures [9], because they are much more effective and make it also possible to find possible interactions among the individual parameters. Therefore, we used the RSM method in the present work. The RSM procedure can be divided into three principal steps: (a) screening, to find the parameters (e.g., temperature, volume, rate) which exert statistically significant influence on the response studied (e.g., extraction efficiency, peak area, etc.); (b) modeling, to find a mathematical description of the system response as a function (mostly polynomial one) of the statistically significant parameters; and (c) optimization, to specify the combination of the parameters yielding the optimum response [10].

This paper describes a new, simple and cheap microextraction technique, based on the use of a newly developed bell-shaped extraction device (BSED–LLME), combined with the GC–MS separation method. The experimental conditions have been optimized and the method has been applied to determination of some organic compounds in samples of drinking and mineral waters. The analytes selected are characterized by various polarities and thus by various solubilities in water (toluene, ethylbenzene, mesitylene, phenol, nitrobenzene, octanol, naphthalene and dimethyl phthalate) and represent examples of common volatile and medium volatile pollutants. Two extraction agents with different polarities have been used, heptane and tert-butyl acetate. Statistical methods have been employed, the Plackett–Burman design for screening and the central composite design for modeling and optimization [9], thus determining the precision, linearity and repeatability of the BSED–LLME method. The limits of detection and determination have been obtained, as well as the enrichment factors (the ratios of the final analyte concentrations in the extraction solvents to the original analyte concentrations in the samples). Analyses of drinking and mineral water samples have then been carried out.

## 2. Materials and methods

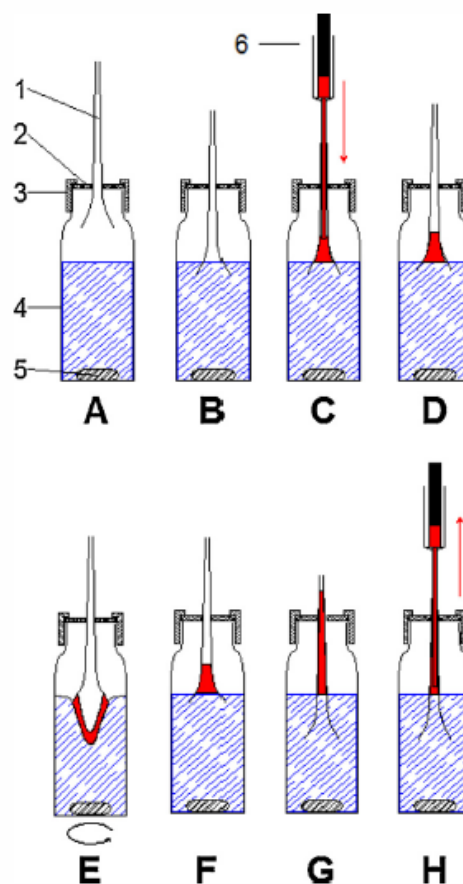
### 2.1. Chemicals and standard solutions

Ethylbenzene, nitrobenzene, octanol and dimethylphthalate (all 99%, Sigma–Aldrich, Germany), toluene and phenol (both p.a., Lachema, Czech Republic), mesitylene (99%, Fluka, Germany), methylhexadecanoate (GC standard, Polyscience, USA), NaCl (p.a., Lach-Ner, Czech Republic) were used as received. Methanol (p.a., Lachema), heptane (99.5%, Fluka) and tert-butyl acetate (99%, Sigma Aldrich) were used as the solvents. Water was purified (18.2 M $\Omega$ ) using a Mille-Q Plus (Millipore, USA).

The stock solutions of the analytes (1 mg mL<sup>-1</sup>) were prepared in methanol and the working solutions were obtained daily by appropriate dilution with bidistilled water. Methylhexadecanoate was used as the internal standard in the extraction solvents, at a concentration of 100.2  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. All the stock solutions were stored at a temperature of 4 °C.

### 2.2. Microextraction procedure

A volume of 10 mL of an aqueous solution containing the analytes was introduced into a 16 mL glass vessel, 7 cm high, 2 cm in diameter, provided with a screw cap. The solutions were prepared immediately prior to the experiments. A small magnetic rod (6 mm diameter, 14 mm length) was inserted into the vessel



**Fig. 1.** Steps of the liquid–liquid microextraction with the bell-shaped extraction device (BSED–LLME). 1 – bell-shaped extraction device (BSED), 2 – silicon rubber septum, 3 – screw cap, 4 – glass vial with aqueous sample, 5 – stirring bar, 6 – microsyringe with the extraction solvent; for (A)–(H) see the text.

which was then fixed on a Heidolph MR 3001 (BRD) magnetic stirrer. The vessel was closed with the screw cap through which passed the bell-shaped extraction device (BSED), made of transparent polypropylene (Fig. 1A and Fig. S1). The widened BSED end was immersed into the sample solution, with the sample solution level reaching the half height of the widened BSED part (Fig. 1B and Fig. S2). Using a 250  $\mu$ L syringe (Hamilton, USA), the required volume of the extraction solvent with IS added was injected into the upper, narrow part of the BSED (Fig. 1C and D and Fig. S3). The extraction itself was started by switching on the stirring; a stable vortex developed after a slow (within 2–3 s) increase of the stirring rate (Fig. 1E and Fig. S4). The layer of the organic solvent was maintained on the surface of the whirling aqueous solution and the analytes were extracted from the aqueous into the organic phase.

The maximum stirring rate, at which the organic layer still remained compact, had to be found prior to the experiments (a

value of ca. 1000 rpm in the present work). The time of microextraction followed from the results of optimization of the experimental conditions (see below). By gradually decreasing the stirring rate (within 2–3 s), the defined layer of the organic layer was re-established inside the BSED (Fig. 1F). By shifting the BSED by ca. 0.5 cm down, into the aqueous solution, the organic solvent was pressed up, into the narrow part (Fig. 1G), could be collected by the syringe and transferred to the GC autosampler (Fig. 1H) for the GC–MS analysis.

The analyte concentrations in water were selected so that their concentrations in the organic phase were located in a lower part of the calibration dependence (100–10000 ng mL<sup>-1</sup>). The syringe and the BSED were rinsed with pentane, acetone, distilled water and acetone again, to avoid analyte transfers between the experiments. The BSED and the BSED–LLME microextraction method are patented for commercial applications.

### 2.3. Instrumentation

GC–MS analyses were performed using a GC 17A gas chromatograph (Shimadzu, Japan), equipped with a detector GCMS-QP 5050A detector (Shimadzu). A DB-5ms capillary column (32 m × 0.25 mm ID, coated with 5% diphenyl-95% dimethylpolysiloxane, 0.25 μm (Agilent Technologies, USA) was used to separate the analytes. Helium (99.999%, Linde, Czech Republic) was used as the carrier gas at a constant linear flow velocity of 40 cm s<sup>-1</sup>. Samples (2.5 μL) were injected by an autosampler (AOC-20i, Shimadzu) in the split mode (split ratio, 1/25) at a temperature of 250 °C. The column temperature was maintained at 50 °C for 5 min, then it was ramped at 30 °C min<sup>-1</sup> to 250 °C and maintained for 3 min. The total analysis time was 14.67 min. The temperature of the transfer line to the MS detector was 275 °C. The mass spectrometer was operated in the EI mode (70 eV), and the SIM mode was used for quantification. The target *m/z* values of analytes were as follows (quantifier/qualifiers): toluene 91/92+65, ethylbenzene 91/106+51, mesitylene 105/120+77, phenol 94/66+39, octanol 56/55+41, nitrobenzene 77/51+123, naphthalene 128/51+64, dimethylphthalate 163/77+194 and methylhexadecanoate 74/87+43). The GC Solutions program (Shimadzu), ver. 2.30 was used for the data acquisition and evaluation. Screw-top glass vials of 16 mL volume (7 cm height and 2 cm diameter), magnetic stirrer (Heidolph MR3001, Germany) and 250 μL microsyringe (Hamilton, USA) were used for the microextraction.

### 2.4. Software

The construction and analyses of the experimental design and the response surfaces were carried out using the Minitab 16 statistical package (Minitab Inc., USA).

## 3. Results and discussion

### 3.1. Bell-shaped extraction device (BSED)

The BSED development aims at attaining the highest possible extraction efficiency with minimum time and material requirements. The device should permit extractions of sample solutions with volumes of the order of 10 mL with substantially smaller volumes of organic solvents, those of the order of tens to hundreds of microlitres. These general demands have led to the optimized shape and size (Fig. 2, the first one from the left was finally used in the work) of the device for extraction from 15 mL vials, 20–27 mm in diameter. There is an advantage in the possibility of scaling these dimensions in dependence on the volume of the sample to be extracted, on condition that the ratio of the vial and the device internal diameters (ID) remains within a range of ca. 1.8–2.5.

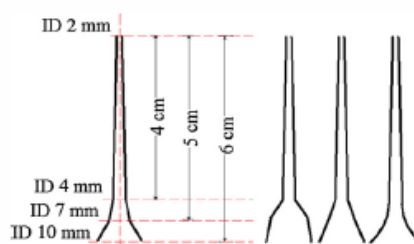


Fig. 2. Dimensions of optimized BSED and its shape variants tested (the first one from the left was finally used in the work).

We have optimized the device shape to attain a maximum possible stirring rate and to maintain simple introduction and removal of the extraction solvent. Several funnel and bell shapes of the device have been tested and the resultant optimal shape can be seen in Fig. 2. To make the device transparent, glass, polyethylene and polypropylene materials have been tested and the last one has been found most suitable. The whole this study has been carried out with 10 BSED prototypes, assuming single use of the device. The BSED cost roughly equals that of a common pipet tip.

### 3.2. Optimization of the experimental conditions

The experimental conditions have been optimized using heptane as the extraction solvent. The five parameters evaluated have been selected on the basis of the literature [11], the experience of the present authors and the results of the preliminary experiments and they involve the extraction time, the extraction agent volume, the ionic strength of the aqueous solution extracted (additions of NaCl), the stirring rate and the diameter of the extraction vessel. The laboratory temperature (23 °C) has been maintained and the maximum response, defined as the sum of the peak relative areas in relation to the analyte IS values, has been sought.

#### 3.2.1. Screening

To screen the parameters, the Plackett–Burman design has been used, which is based on ignoring the interactions among the individual factors and on determination of only the main effects [12,13]. Two coded values have been attributed to each parameter, the low (–1) and the high (+1) ones (Table 1). Dummy factors have been added to the test parameters, in order to estimate the experimental error in the statistical evaluation [14]. A coded table has been created using the Minitab 16 program and two eight-membered sets of measurements have been performed according this table, in random orders. The results have been evaluated using the ANOVA test, determining the main effects at a significance level of 95%. The result can be seen on the Pareto graph (Fig. 3).

This test of the parameter significance has indicated that the extraction agent volume and the extraction time have the greatest influence on the system response. The Pareto graph indicates that the additions of NaCl exerts a small effect on the overall analyte extractions, but these graphs for the individual analytes (not shown in this paper) have demonstrated that NaCl additions significantly affect the extraction of more polar extractants (phenol, dimethyl phthalate). Therefore, this parameter has also been included in the optimization by the CCD method. Surprisingly, the lowest effect on the extraction efficiency is due to the stirring rate, which has been expected to enhance the extractant transfer between the phases due to increase in the interface area and in the extractant transport rate toward the interface. Apparently, even a low stirring rate (500 rpm), which is required for the formation of a visible



**Table 1**  
Experimental parameters and their levels used in the screening by the Plackett–Burman design for heptane as the extraction solvent in BSED–LLME.

Parameter	Level	
	Low (–1)	High (+1)
$X_1$ – extraction volume ( $\mu\text{L}$ )	100	300
$X_2$ – extraction time (min)	5	20
$X_3$ – dummy 1	–1	+1
$X_4$ – amount of NaCl (g)	0	2
$X_5$ – vial diameter of (cm)	2	2.7
$X_6$ – dummy 2	–1	+1
$X_7$ – stirring rate (rpm)	500	1000

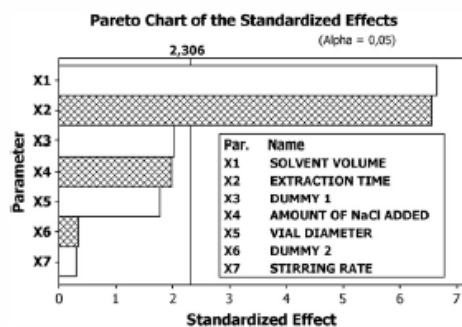
Run	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$	$X_6$	$X_7$
1	–1	1	1	–1	1	–1	–1
2	1	–1	1	–1	–1	1	–1
3	–1	–1	–1	–1	1	1	1
4	–1	–1	1	1	–1	–1	1
5	–1	1	–1	1	–1	1	–1
6	1	1	–1	–1	–1	–1	1
7	1	–1	–1	1	1	–1	–1
8	1	1	1	1	1	1	1

vortex, suffices for rapid extractant transfer. Growing stirring rate also increases the danger of separation of heptane droplets from the lower part of the vortex and their dispersion in the aqueous phase. It has been found that the limiting stirring rate for the maintenance of a stable vortex equals 1000 rpm. The diameter of the extraction vessel (20 or 27 mm) has also been found insignificant. Consequently, these two relatively insignificant parameters have been adjusted to 1000 rpm and 20 mm in further measurements.

### 3.2.2. Modeling

To optimize the operational parameters (extraction time, extraction agent volume and the amount of the salt added), the rotatable central composite design (CCD) [13] has been employed. Table 2 summarizes the levels of these parameters, the low and high values being denoted (–1) and (+1), respectively, zero corresponding to the central point and “star” points being denoted as  $\alpha$  (see reference [13]). The list of 20 measurements (8 – factorial, 6 – central, 6 – star) is further given, according to the CCD plan, with combinations of the parameter levels. To evaluate this system by the ANOVA method, the following functional polynomial dependence has been used:

$$R = a + b \cdot X_1 + c \cdot X_2 + d \cdot X_4 + e \cdot X_1^2 + f \cdot X_2^2 + g \cdot X_4^2 + h \cdot X_1 \cdot X_2 + i \cdot X_1 \cdot X_4 + j \cdot X_2 \cdot X_4 \quad (1)$$



**Fig. 3.** Standardized main effect Pareto chart for the Plackett–Burman design. Vertical line in the chart defines the 95% confidence level.

where  $R$  is the response,  $X_i$  are the individual factors (Table 2) and  $a$  to  $j$  are the coefficient of the polynomial equation. This dependence involves both the possible curvature of the response surface (the quadratic terms) and the possible interactions among the parameters ( $X_i \cdot X_j$  products).

On treating the results for the sum of the analyte peak relative areas by the Minilab 16 program and on exclusion of insignificant contributions to the response, the following quadratic equation,

$$R = 2.39 - 0.18 \cdot X_1 + 0.84 \cdot X_2 - 0.41 \cdot X_4 - 0.19 \cdot X_2^2 - 0.31 \cdot X_2 \cdot X_4 \quad (R^2 = 0.9792) \quad (2)$$

is obtained.

It follows from this equation that the response surface is curved and the interaction between the extraction time and the ionic strength parameters is significant. The lack of fit test has been insignificant at the 5% level and the determination coefficient,  $R^2$ , value indicates that there is an excellent agreement between the experimental data and the model created.

Response surfaces plots (Figs. S1–S6) showing the interrelationships of statistically significant parameters with the response for heptane and tert-butyl acetate are presented as Supplementary data.

### 3.2.3. Optimization

The system has been optimized in the Minilab 16 program, using the desirability function [15], to find the combination of the significant parameters which yields the maximum response value. The following optimum parameters have been obtained: extraction time, 29.5 min, extraction agent volume, 90  $\mu\text{L}$ , NaCl addition, zero.

The same procedure (screening, modeling and optimization) has been carried out for the identical set of analytes, but with tert-butyl acetate, as the extraction solvent of a higher polarity. The extraction time and the stirring rate have been found to be significant and the equation,

$$R = 10.56 + 2.85 \cdot X_2 + 2.73 \cdot X_7 + 2.02 \cdot X_2^2 \quad (R^2 = 0.7624) \quad (3)$$

has resulted for the response. The agreement between the experiment and the model is somewhat poorer than in the previous case, but it can still be considered as satisfactory. The optimum parameters for tert-butyl acetate extraction equal 24 min. for the extraction time, and, again, no addition of sodium chloride. Surprisingly, the tert-butyl acetate volume has not been found to be a significant parameter, and, from practical point of view, 150  $\mu\text{L}$  of the solvent have been used. This solvent is partially soluble in water (0.8%,

**Table 2**

Experimental parameters, their levels and modeling experimental plan of the central composite design for heptane as the extraction solvent in BSED–ILME.

Parameter	Level				
	Star point −α (1.68)	Low (−1)	Central (0)	High (+1)	Star point +α (1.68)
X <sub>1</sub> – extraction volume (μl)	90	100	115	130	140
X <sub>2</sub> – extraction time (min)	2.5	8	16	24	29.5
X <sub>4</sub> – amount of NaCl (g)	0.00	0.41	1.01	1.61	2.02

Run	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>4</sub>	Run	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>4</sub>
1	0	1.68	0	11	1	−1	−1
2	1.68	0	0	12	−1	1	1
3	0	0	0	13	0	0	0
4	1	1	−1	14	0	0	0
5	0	0	−1.68	15	1	1	1
6	0	0	1.68	16	0	0	0
7	1	−1	1	17	−1	−1	−1
8	0	−1.68	0	18	0	0	0
9	0	0	0	19	−1	1	−1
10	−1	−1	1	20	−1.68	0	0

**Table 3**

Limits of detection and quantification, and enrichment factors of the BSED–ILME method.

Extraction solvent	Compound	MLOD (ng mL <sup>−1</sup> )	MLOQ (ng mL <sup>−1</sup> )	R <sup>2</sup> of calibration curve	Concentration in water (ng mL <sup>−1</sup> )	Enrichment factor	R.S.D. of Enrichment factor (%)
Heptane	Toluene	0.3	0.9	0.9999	4.5	84.4	9
	Ethylbenzene	0.1	0.3	0.9997	3.8	136.8	7
	Mesitylene	0.7	2.2	0.9984	3.0	66.7	14
	Naphthalene	0.2	0.8	0.9993	2.0	75.0	13
	DMP	3.3	10.7	0.9995	30	8.3	7
Tert-butyl acetate	Toluene	0.4	1.2	0.9999	2.8	64.3	0
	Ethylbenzene	0.2	0.7	0.9997	2.4	54.2	1
	Mesitylene	0.8	2.7	0.9984	3.4	55.9	3
	Naphthalene	0.2	0.5	0.9993	2.0	105.0	5
	DMP	0.5	1.7	0.9995	3.4	52.9	5

MLOD, MLOQ are the limits of detection and quantification of the method, respectively. R.S.D. is the relative standard deviation for  $n=3$ .

w/w) and thus a part of its volume is "lost" in the sample solution. In extraction with 150 μL of the solvent, roughly one half of this volume can be collected after the procedure. The results are unaffected, because a nonpolar IS (methyl hexadecanoate) is contained in the extraction solvent and it does not dissolve in the aqueous sample solution.

### 3.3. Testing of the BSED–ILME Method

To test the quantification, calibration plots for the individual standards in heptane have been obtained within a concentration range from 100 to 10,000 ng mL<sup>−1</sup> (five concentration points), using GC–MS measurements. The signal-to-noise ratios for the lowest

analyte concentrations have yielded the method limits of detection (MLOD) and quantification (MLOQ) on multiplication by 3 and 10, respectively (Table 3). The calibration straight lines have further been used to determine the enrichment factors, EF (the enrichment factor is defined as the ratio between the analyte concentration in the sedimented phase and the initial concentration of analyte within the sample) [16], for the analytes in distilled water under the optimum experimental conditions (Table 3). The analyte concentrations are in a range from 2 to 4.5 ng mL<sup>−1</sup> and the corresponding EF values are between 52.9 (dimethylphthalate – tert-butyl acetate) and 136.8 (ethylbenzene – heptane). This value has been low (8.3) only for dimethyl phthalate (DMP) combined with heptane, apparently due to the great difference in their polarities.

**Table 4**

Enrichment factors of the BSED–ILME method using two extraction solvents in spiked aqueous samples with different matrices.

Extraction solvent	Compound	Concentration in sample (ng mL <sup>−1</sup> )	Enrichment factor		
			Distilled water	Tap water	Mineral water
Heptane	Toluene	4.5	84.4 <sup>a</sup>	52.2 <sup>a</sup>	60.0 <sup>a</sup>
	Ethylbenzene	3.8	136.8 <sup>a</sup>	123.7 <sup>a</sup>	161.8 <sup>a</sup>
	Mesitylene	3.0	66.7	36.7	40.0
	Naphthalene	2.0	75.0	50.0	65.0
	DMP	30	8.3	8.3	6.7
Tert-butyl acetate	Toluene	2.8	64.3	75.0	56.3
	Ethylbenzene	2.4	54.2	54.2	50.0
	Mesitylene	3.4	55.9	73.5	67.6
	Naphthalene	2.0	105.0	95.0	105.0
	DMP	3.4	52.9 <sup>a</sup>	61.8	58.8 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> This is a statistically significant difference.

**Table 5**  
Comparison of enrichment factors for selected analytes obtained by different microextraction techniques.

Method	Toluene	Ethylbenzene	Mesitylene	Naphthalene	Ref.
DI-SDME-GC-FID	54.4	57.3			[17]
HS-SDME-GC-FID	206.6	387.7			[17]
DLLME-GC-FID	231	309			[18]
DSDME-GC-FID	254.88	275.44			[19]
HF-LPME-GC-FID	98.09	66.45			[20]
Fiber in tube-GC-FID	361	290	224		[21]
HS-SPME-GC-FID	16.7	16.1			[22]
RHF-LPME-GC-MS			35.1		[23]
SDME-GC-MS			18.1		[23]
SPME-GC-MS			127.8		[23]
HFH-LPME-GC-MS				160	[24]
HFH-LLME-GC-MS				210	[25]

DI – direct immersion, HS – headspace, SDME – single drop microextraction, DLLME – dispersive liquid–liquid microextraction, DSDME – directly suspended droplet microextraction, HF-LPME – hollow fiber liquid phase microextraction, SPME – solid phase microextraction, RHF-LPME – revolving hollow fiber liquid phase microextraction, HFH-LLME – hollow fiber-protected ionic liquid–liquid–liquid microextraction.

Therefore, the DMP concentration has been increased to 30 ng mL<sup>-1</sup> (Tables 3 and 4).

The enrichment factor has not been reliably determined for phenol, nitrobenzene and octanol with any of the organic solvents used, because their peaks obtained in the separation procedure used are highly non-symmetrical and prevent reliable determinations at very low concentrations. Solvents with higher polarities and/or another separation system will be tested for these substances.

The EF reproducibility, in terms of R.S.D. (n=3), varies within 7–14% for heptane and 0–5% for tert-butyl acetate. The measuring repeatability is between 1 and 8%. The BSED–LLME method attains EF values which are fully comparable with those of other microextraction methods, as can be seen in Table 5 containing some literature data. The extraction times are also similar to those provided by other microextraction procedures, even if the present authors expected shorter times due to intense stirring in the device.

#### 3.4. Analyses of drinking and mineral water samples

To estimate the sample matrix effects on the EF values, some samples of drinking water from public supplies and of mineral water (Mattoni, CZ) have been analyzed. The analytes studied have not been present in these waters and thus the samples have been spiked with them and then subjected to extractions with heptane and tert-butyl acetate. Table 4 summarizes the EF values obtained, varying from 6.7 (DMP – heptane) to 161.8 (ethylbenzene – heptane). It can be seen that the sample matrix exerts statistically significant influence on the extraction of toluene and ethylbenzene with heptane and on that of DMP with tert-butyl acetate. No statistically significant EF differences have been found for the other analytes and samples studied. Therefore, the internal standard or standard addition techniques can be recommended for BSED–LLME determinations of the analytes studied in real samples.

#### 4. Conclusion

This paper describes a new, non-exhausting, equilibrium approach to liquid–liquid microextraction, employing a newly developed bell-shaped extraction device (BSED) combined with GC–MS measurements. The method has been effectively optimized, employing multifactorial statistical procedures (RSM and CCD), and tested on determinations of organic pollutants in drinking and mineral waters.

The main advantages of this new method (BSED–LLME) involve simple and rapid manipulation with the extraction solvent and aqueous sample, great flexibility in the selection of the organic

extraction solvent in dependence on the nature of the analytes to be determined, minimum toxicity to the environment and low costs. This new method is an efficient alternative to the standard techniques, such as SPE, SPME and other kinds of LLME. The BSED–LLME method can be combined not only with GC measurements, but also with other high-performance separations, such as HPLC or CE.

#### Acknowledgments

The authors thank for financial support the Grant Agency of Charles University in Prague (GA UK-21210) and the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (the Project No. VZ MSM 0021620857).

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.chroma.2012.01.069.

#### References

- [1] M. Tobiszewski, A. Mechlińska, B. Zygmont, J. Namiński, *TrAC Trends Anal. Chem.* 28 (2009) 943.
- [2] E. Psillakis, N. Kalogerakis, *TrAC Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 565.
- [3] E. Psillakis, N. Kalogerakis, *TrAC Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 53.
- [4] J. Wu, K.H. Ee, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A* 1082 (2005) 121.
- [5] E. Psillakis, N. Kalogerakis, *J. Chromatogr. A* 999 (2003) 145.
- [6] Y. He, H.K. Lee, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4634.
- [7] Y. Lu, Q. Lin, G. Luo, Y. Dai, *Anal. Chim. Acta* 566 (2006) 259.
- [8] S. Berijani, Y. Assadi, M. Anbia, M.R. Milani Hosseini, E. Aghaee, *J. Chromatogr. A* 1123 (2006) 1.
- [9] R.L. Mason, R.F. Gunst, J.L. Hess, *Statistical Design and Analysis of Experiment*, Wiley, New York, 2003.
- [10] N.R. Costa, Z. Lopes Pereira, *J. Chemometrics* 24 (2010) 333.
- [11] C. Stalikas, Y. Fiamegos, V. Sakkas, T. Albanis, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 175.
- [12] R.G. Brereton, *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*, Wiley, Chichester, 2003.
- [13] T.P. Ryan, *Modern Experimental Design*, Wiley, New York, 2007.
- [14] R. Verseput, *Quality Digest* 21 (2001) 33.
- [15] R.H. Myers, D.C. Montgomery, *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiments*, Wiley, New York, 2002.
- [16] M. Rezaee, Y. Assadi, M.R. Milani Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1.
- [17] A. Sarafraz-Yazdi, S.H. Khaleghi-Miran, Z. Es'haghi, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 90 (2010) 1036.
- [18] Y. Assadi, F. Ahmadi, M.R. Milani Hosseini, *Chromatographia* 71 (2010) 1137.
- [19] A. Sarafraz-Yazdi, A.H. Amiri, Z. Es'haghi, *Talanta* 78 (2009) 936.
- [20] A. Sarafraz-Yazdi, A.H. Amiri, Z. Es'haghi, *Chemosphere* 71 (2008) 671.
- [21] J.X. Wang, D.Q. Jiang, X.P. Yan, *Talanta* 68 (2006) 945.
- [22] W. Shutao, W. Yan, Y. Hong, Y. Jie, *Chromatographia* 63 (2006) 365.
- [23] Y.C. Chen, H.F. Wu, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 3013.
- [24] Ch. Basheer, R. Balasubramanian, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A* 1016 (2003) 11.
- [25] Ch. Basheer, A.A. Alnedhary, B.S. Madhava Rao, R. Balasubramanian, H.K. Lee, *J. Chromatogr. A* 1210 (2008) 19.



## OPTIMALIZACE PODMÍNEK CHROMATOGRAFICKÉHO STANOVENÍ AROMATICKÝCH AMINŮ S ELEKTROCHEMICKOU DETEKČÍ

MARKĚTA KREJČOVÁ, HANA DEJMKOVÁ  
a MIROSLAVA BURSOVÁ

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Uni-  
verzitní výzkumné centrum UNCE „Supramolekulární  
chemie“, Katedra analytické chemie, UNESCO labora-  
toř elektrochemie životního prostředí, Albertov 6,  
128 43 Praha 2  
marketa.krejцова@natur.cuni.cz

### Úvod

Tato práce byla zaměřena na vývoj metody pro stanovení směsi deseti aromatických aminů – anilinu (A), 2-aminonaphthalenu (2-AA), 2-aminobifenyly (2-AB), 4-aminobifenyly (4-AB), 2-aminofluorenu (2-AF), 1-amino-naphthalenu (1-AN), 2-aminonaphthalenu (2-AN), 2-ethylaminu (EA), 2-nitroanilinu (2-NA) a *o*-toluidinu (T) – pomocí vysokotlačné kapalinové chromatografie s obrácenými fázemi (RP-HPLC) za použití amperometrické (ED) a spektrofotometrické (UV) detekce.

Aromatické aminy, především aminoderiváty poly-cyklických aromatických uhlovodíků (APAH) se řadí mezi karcinogenní a mutagenní látky. Podle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC) patří ze studovaných analytů mezi prokazatelně karcinogenní pro člověka 4-AB, 2-AN a T (cit. 1). Aromatické aminy se poměrně často vyskytují jak v pracovním, tak životním prostředí. Vzhledem k přítomnosti těchto látek např. v barvách na vlasy, potravinářských barvivech či palivech je člověk jejich vlivu přímo vystaven, a je tedy nutné monitorovat i jejich stopová množství. Nejčastěji se pro tento účel používají chromatografické metody, především plynová chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí<sup>2</sup>.

K optimalizaci separačních podmínek byla v této práci použita metoda plánování experimentu (design of experiment, DOE), která umožňuje optimalizovat více parametrů současně, na rozdíl od nejčastěji využívané metody jedné proměnné v čase (one variable at time, OVAT). Použitím DOE výrazně klesne počet experimentů nutných k pokrytí celého uvažovaného rozsahu parametrů, a tedy i časová a finanční náročnost jejich provedení<sup>3</sup>.

### Experimentální část

Systém pro měření v režimu RP-HPLC se stával z degaseru DG 4014, gradientové pumpy Beta 10 (obojí Ecom, Česká republika), kolony LiChroCART® 250-4 Purospher RP-18 (5 μm) a předklonky LiChroCART® 4-4 Purospher RP-18 (obojí Merck, Německo). K detekci byl využit jak UV/VIS spektrofotometrický detektor Sapphire

600 (Ecom, Česká republika), tak amperometrický detektor ADLC 2 (Laboratorní přístroje Praha, Česká republika). Amperometrický detektor byl zapojen v tříelektrodovém uspořádání typu „wall-jet“ s referenční argentchloridovou elektrodou (3 mol l<sup>-1</sup> KCl, ETP CZ R-008-05, Monokrystaly, Česká republika) a pomocnou platinovou elektrodou. Pracovní elektrodou byla uhlíková pastová elektroda (vnitřní průměr teflonového těla 3 mm), která byla připravena smísením 250 mg mikrokulček skelného uhlíku (velikost částic 0,4–12 μm, Alfa Aesar, USA) se 100 μl minerálního oleje (Sigma-Aldrich, USA). K prekoncentraci analytů byla využita metoda extrakce na tuhé fázi (SPE) s použitím extrakčních kolonek LiChro-lut® EN 200 mg/3 ml (Merck, Německo). Extrakce byla prováděna ze 100 ml povrchové vody upravené na pH 9 a analyty byly následně eluovány 10 ml acetonitrilu.

Zásobní roztoky jednotlivých analytů o koncentraci 1 mg ml<sup>-1</sup> byly připraveny rozpustěním příslušného množství daných látek v 10 ml acetonitrilu. Zásobní roztok směsi analytů (o koncentraci 100 μg ml<sup>-1</sup>) byl připraven smísením stejných objemů zásobních roztoků daných látek. Pro nástřik do kolony byl tento vzorek zředěn směsí methanolu s deionizovanou vodou (1:1, *V/V*). Acetátový pufr představoval směsný roztok octové kyseliny (p.a., 99%, Lach-Ner, Česká republika) a kyseliny trihydrogenfosforečné (p.a., 85%, Lach-Ner, Česká republika) každé o koncentraci 50 mmol l<sup>-1</sup>; pH pufru bylo denně upravováno na požadovanou hodnotu pomocí 100 mmol l<sup>-1</sup> roztoku hydroxidu sodného (p.a., Lach-Ner, Česká republika).

### Výsledky a diskuse

#### Optimalizace podmínek separace

Pro optimalizaci podmínek chromatografického stanovení směsi analytů byla použita metoda DOE, konkrétně Boxův-Behnkenův experimentální plán využívající tři úrovně hodnot optimalizovaných parametrů; tento experimentální plán byl vybrán především vzhledem k nízkému počtu významných parametrů<sup>4</sup>. V tomto případě byly jako významné zvoleny následující parametry: pH acetátového pufru, počáteční podíl methanolu v mobilní fázi a jeho gradient; sledovanou odpovědí byla chromatografická odezvovalá plocha (CRF). Pomocí CRF byly nalezeny takové hodnoty studovaných parametrů, aby rozlišení dvojic sousedních pík bylo dostatečné a zároveň doba analýzy nebyla příliš dlouhá. K tomuto účelu byla použita Der-ingerova funkce vhodnosti<sup>4</sup>. Po proměření série experimentů, vycházejících z Boxova-Behnkenova plánu, byly za použití ANOVA testů zjištěny experimentální podmínky, které ovšem nebyly plně vyhovující, a byly tedy doplněny modifikací gradientu, díky které došlo ke zlepšení

separace prvních piků. Výsledné optimální podmínky použité pro stanovení směsi aromatických aminů byly následující: pH acetátosfátového pufru 2,5; počáteční podíl methanolu v mobilní fázi 30 %; prvních 6 min byl podíl methanolu udržován na počáteční hodnotě, následně byla tato hodnota během 24 min zvýšena na 90 %.

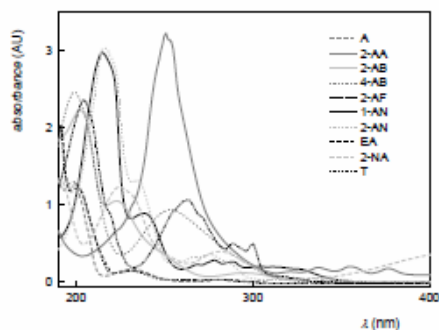
#### Optimalizace podmínek detekce

Vlnová délka vhodná pro dané stanovení byla určena proměněním spekter jednotlivých analytů proti acetonitrilu. Vlnové délky maxima absorpce daných látek se nepřekrývají (obr. 1), jako kompromisní hodnota byla zvolena vlnová délka 235 nm.

Z hydrodynamických voltamogramů jednotlivých látek, které byly proměřeny v rozmezí potenciálů od +0,5 V do +1,5 V, byl určen jako optimální potenciál +1,4 V. Takto vysoká hodnota byla, i přes poměrně vysoký proud pozadí, zvolena, jelikož 2-nitroanilin nebylo možné při nižších potenciálech detegovat (obr. 2).

#### Kalibrační závislosti

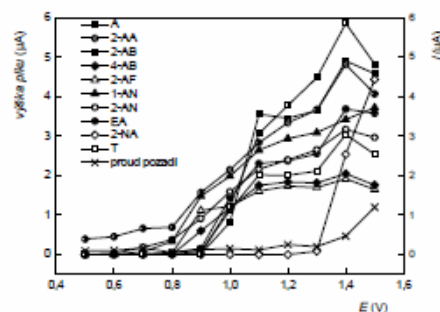
Kalibrační závislosti studovaných aromatických aminů byly proměřeny za optimálních pracovních podmínek jak ve směsi deionizované vody s methanolem (1:1, *V/V*), tak v říční vodě bez předchozí překoncentrace a po překoncentraci pomocí SPE. Kalibrační závislosti analytů ve všech maticích byly lineární v celém proměřovaném rozsahu koncentrací. V případě spektrofotometrické detekce ztěžoval vyhodnocení většiny piků poměrně výrazný drift základní linie; odezva prvních tří piků byla nízká v souvislosti s nízkým absorpčním koeficientem odpovídajících analytů (obr. 3). Co se týče detekce amperometrické, šum a drift základní linie ovlivnil měření až při stanovení nižších koncentrací (obr. 4). Drift základní linie je způso-



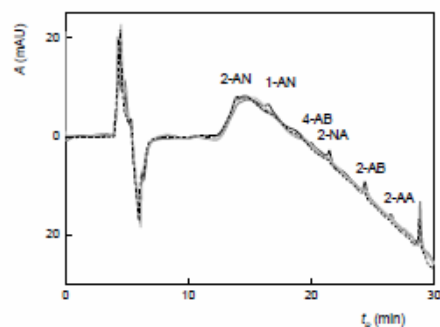
Obr. 1. UV/VIS spektra studovaných analytů. Roztoky látek o koncentraci  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  ve směsi methanolu a acetátosfátového pufru (1:1, *V/V*) o pH 2,5

ben použitím gradientové eluce pro urychlení separace analytů, ale roli hraje i nízká vlnová délka spektrofotometrické detekce a vysoký pracovní potenciál detekce amperometrické.

V případě všech stanovení bylo dosaženo nízkých detekčních mezí, přičemž pomocí amperometrické detekce bylo dosaženo přibližně o řád nižších mezí detekce než při spektrofotometrickém stanovení, a to jak u stanovení směsi látek v deionizované vodě s methanolem (1:1, *V/V*), tak ve vodě říční. Detekční meze analytů zakoncentrovaných



Obr. 2. Hydrodynamické voltamogramy studovaných analytů. Pracovní uhlíková pastová elektroda v uspořádání wall-jet, kolona LiChroCART® 250-4 Purospher RP-18 ( $5 \mu\text{m}$ ). Gradient (A: acetátosfátový pufr o pH 2,5; B: methanol): 0. – 6. min: 30 % B, 30. min: 90 % B, průtoková rychlost  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$

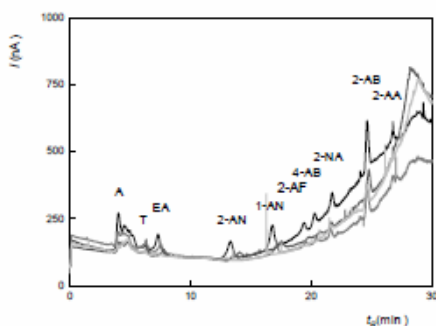


Obr. 3. Chromatogramy směsi látek (koncentrace analytů ve směsi: 25, 10, 7,5 a  $5 \text{ ng ml}^{-1}$ ) v říční vodě po překoncentraci pomocí SPE, spektrofotometrická detekce. Kolona LiChroCART® 250-4 Purospher RP-18 ( $5 \mu\text{m}$ ). Gradient (A: acetátosfátový pufr o pH 2,5; B: methanol): 0. – 6. min: 30 % B, 30. min: 90 % B, průtoková rychlost  $0,5 \text{ ml min}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{det}} = 235 \text{ nm}$

Tabulka I

Meze detekce studovaných analytů v říční vodě při přímém HPLC stanovení, po prekoncentraci pomocí SPE a za použití GC/MS po prekoncentraci s kapalinovou mikroextrakcí

Analyt	Mez detekce [ng ml <sup>-1</sup> ]				
	HPLC – přímé stanovení		HPLC – po SPE		GC/MS
	UV	ED	UV	ED	
A	–	5,2	–	0,33	3,30
2-AA	19	6,2	3,3	0,37	0,27
2-AB	18	3,2	2,9	0,22	0,12
4-AB	37	9,7	7,2	0,80	1,80
2-AF	84	10,2	15,7	1,01	0,09
1-AN	39	5,3	6,1	0,43	0,12
2-AN	53	6,1	4,1	0,56	0,21
EA	635	4,5	–	0,42	0,48
2-NA	11	5,4	2,1	0,37	0,21
T	–	5,8	–	0,41	0,51



Obr. 4. Chromatogramy směsi látek (koncentrace analytů ve směsi: 25, 10, 7,5 a 5 ng ml<sup>-1</sup>) v říční vodě po prekoncentraci pomocí SPE, amperometrická detekce. Kolona LiChroCART® 250-4 Purospher RP-18 (5 μm). Gradient (A: acetátfosfátový pufr o pH 2,5; B: methanol): 0–6 min: 30 % B, 30 min: 90 % B, průtoková rychlost 0,5 ml min<sup>-1</sup>, E<sub>DET</sub> = 1,4 V

pomocí SPE odpovídají pro oba druhy detekce této prekoncentraci, a jsou tedy přibližně desetkrát nižší než odpovídající meze detekce bez použití SPE. Hodnoty detekčních mezí pro stanovení v říční vodě jsou uvedeny v tab. I. Pro srovnání získaných výsledků jsou uvedeny rovněž detekční meze získané metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC-MS) po kapalinové mikroextrakci<sup>3</sup>.

## Závěr

V této práci bylo prozkoumáno chromatografické chování deseti aromatických aminů v systému RP-HPLC s amperometrickou a spektrofotometrickou detekcí. Separční podmínky byly stanoveny metodou plánování experimentu, konkrétně za použití Boxova-Behnkenova experimentálního plánu. Použitím tohoto přístupu byl značně snížen počet nutných experimentů a byly získány vyhovující pracovní podmínky. Současně se ovšem projevila některá omezení tohoto přístupu, např. aplikace v mezích zvolených podmínek znemožňuje postihnout modifikaci gradientu zalomením, kterou bylo při tomto stanovení vhodné použít pro lepší rozdělení prvních tří piků. Výsledné pracovní podmínky tedy byly: pH acetátfosfátového pufru 2,5; počáteční podíl methanolu v mobilní fázi 30 %; gradient mobilní fáze – prvních 6 min analýzy byl podíl methanolu udržován na počáteční hodnotě a během dalších 24 min byl zvýšen na 90 %; vlnová délka spektrofotometrického detektoru 235 nm; pracovní potenciál +1,4 V; průtoková rychlost mobilní fáze 0,5 ml min<sup>-1</sup>.

Pomocí RP-HPLC s amperometrickou a spektrofotometrickou detekcí byly proměřeny kalibrační závislosti jednotlivých analytů v deionizované vodě s methanolem (1:1, V/V) a říční vodě; stejně tak byly proměřeny i kalibrační závislosti těchto látek v říční vodě po prekoncentraci pomocí SPE.

Dosažené detekční meze ukazují převahu elektrochemické detekce nad detekcí spektrofotometrickou při chromatografickém stanovení aromatických aminů. Neméně zajímavé je ovšem i srovnání této metody s instrumentálně náročnou GC/MS, která sice překonává meze detekce zis-

kané přímým stanovením, ovšem při použití prekoncentrace pomocí SPE jsou výsledky dosažené elektrochemickou detekcí srovnatelné.

*Tato práce byla finančně podpořena Grantovou agenturou ČR (grant P206/12/G151).*

#### LITERATURA

1. International Agency for Research on Cancer: *Mono-graphs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man*. www.iarc.fr (staženo 3.5.2013).
2. del Nogal Sánchez M., Pérez Sappó C., Pérez Pavón J. L., Moreno Cordero B.: *Anal. Bioanal. Chem.* 404, 2007 (2012).
3. Bezerra M. A., Santelli R. E., Oliveira E. P., Villar L. S., Escaleira L. A.: *Talanta* 76, 965 (2008).
4. Hadjmohammadi M., Sharifi V.: *J. Chromatogr. B* 880, 34 (2012).
5. Bursová M., Krejčová M., Dejmková H., Čabala R.: *Nové možnosti optimalizace v analytické chemii*. Študentská vědecká konference Přírodovědecké fakulty Univerzity Komenského v Bratislavě 2013, Bratislava, 24.4.2013.