

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Michaela Paučová

**Testovanie poly(cyklo)fosfazénov pre účely
mikroextrakcie na pevnej fáze**

Testing of poly(cyclo)phosphazenes for applications in the solid phase
microextraction

Bakalářská práce

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

Praha 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto 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 v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze 18. května 2016

Abstrakt

Podstatou a experimentálnym zameraním tejto práce bolo testovanie piatich platinových vlákien, ktoré boli na svojom povrchu potiahnuté vrstvou poly(cyklo)fosfazénu. Predpokladalo sa, že tento materiál, pripravený elektrochemickou polymerizáciou by mohol vykazovať afinitu voči rôznym prchavým látkam, vďaka čomu by mohol zaujať miesto ďalšej efektívnej stacionárnej fázy využívanej v SPME.

Experimentálna časť poskytuje postupy a výsledky analýz vlákien ponechaných nad roztokmi obsahujúcimi prchavé analyty. Poukazuje na odozvu po analýze vlákien a ich následnom očistení po dobu niekoľkých minút vo výhrevnej piecke, neskôr v ultrazvuku. Pozorovaná je tiež zmena tejto odozvy vplyvom pripravenej polydimethylsiloxánovej stacionárnej fázy.

Ako pozitívne sa ukázalo vlákno č. 3, ktoré bolo schopné sorbovať na seba uhl'ovodíky a po nanesení nepolárnej stacionárnej fázy bola pozorovaná jeho narastajúca afinita. Avšak po očistení boli jeho výsledky negatívne, rovnako ako aj výsledky všetkých ostatných testovacím vlákien, v dôsledku čoho zatiaľ nie je možné poly(cyklo)fosfazén považovať za vhodnú polymérnu stacionárnu fázu využívanú v SPME.

Kľúčové slová

Plynová chromatografia, mikroextrakcia na pevnej fáze, cyklofosfazény, prekoncentrácia, izolácia, prchavé látky

Abstract

The main experimental focus of this thesis was to test five platinum fibers coated by a layer of poly(cyclo)phosphazene on their surface.

It was assumed that this material, prepared by electrochemical polymerization, might have an affinity to various volatile compounds. As a result it could take place of a new effective stationary phase used in SPME.

The experimental part provides procedures and results of analyses of fibers placed over solutions containing volatile compounds. It refers to the response after the analysis of fibers and its subsequent cleaning during a few minutes in the heated cleaner, later in an ultrasound cleaner. The change of this response due to prepared polydimethylsiloxane stationary phase is also observed.

The fiber 3 showed an ability to sorb the hydrocarbons and after coating by nonpolar stationary phase its growing affinity was observed. However, after cleaning the results of the analysis of this fiber showed to be negative and the same applies for results of all other testing fibers.

As a result of these analyses it is not possible to consider the poly(cyclo)phosphazene as a suitable polymer stationary phase used in SPME.

Keywords

Gas chromatography, solid phase microextraction, poly(cyclo)phosphazene, preconcentration, isolation, volatile compounds

Pod'akovanie

Týmto by som sa chcela pod'akovať vedúcemu tejto práce, doc. RNDr. Radomírovi Čabalovi, Dr. za usmernenie pri výbere témy, za vedenie počas celého teoretického a experimentálneho spracovania obohateného množstvom dôležitých rád a inštrukcií.

Ďalej by som sa chcela pod'akovať Mgr. Martinovi Stonovi za pomoc a spoluprácu pri praktickom vykonaní všetkých potrebných analýz.

Nakoniec by som sa tiež chcela pod'akovať mojich rodičom, za umožnenie štúdia, za ich lásku a podporu aj v tých v najhorších chvíľach, súrodencom, starým mamám a celej širokej rodine za to, že na mňa mysleli, keď to bolo najviac potrebné.

Taktiež moje pod'akovanie patrí všetkým priateľom, ktorí mi svojim radami a názormi pomohli pri spracovaní tejto práce.

Obsah

1	Úvod	9
2	Teoretická časť	10
2.1	Mikroextrakcia na tuhej fáze (SPME)	10
2.1.1	Princíp metódy	10
2.1.2	Výhody SPME	12
2.1.3	Typy SPME	12
2.1.4	Zariadenie pre SPME	16
2.1.5	Aplikácie SPME	18
2.2	Plynová chromatografia (GC)	21
2.2.1	Princíp metódy	21
2.2.2	Inštrumentácia GC	22
2.2.3	Aplikácie GC	26
2.3	Poly(cyklofosfázény)	27
2.3.1	Cyklofosfázény	27
2.3.2	Vlastnosti halogeno – cyklo - fosfázénov	28
2.3.3	Elektrochemická syntéza PPBQ filmu	29
2.3.4	Vplyv na polymerizáciu	30
3	Experimentálna časť	32
3.1	Chemikálie	32
3.2	Inštrumentácia	32
3.3	Pracovný postup	33
4	Výsledky a diskusia	36
5	Záver	42
6	Zoznam použitej literatúry	44

Zoznam použitých skratiek a symbolov

AFM	mikroskopia atomárnych síl
CAR	carboxén
CE	kapilárna elektroforéza
c_f	rovnovážna koncentrácia analytov v stacionárnej fáze
c_s	rovnovážna koncentrácia analytov vo vzorke
CW	carbowax
DVB	divinylbenzén
ECD	detektor elektónového záchytu
FID	plameňovo ionizačný detektor
FTIR	Fourierová transformačná infračervená spektroskopia
GC	plynová chromatografia
GC-MS	plynová chromatografia s hmotnostnou detekciou
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografia
HS-SPME	„headspace“ SPME
K_{fs}	distribučná konštanta
LC-MS	kapalinová chromatografia s hmotnostnou detekciou
PA	polyakrylát
PAH	polyaromatické uhl'ovodíky
PCB	polychlórované bifenyly
PDMS	polydimethylsiloxán
PPBQ	poly(cyklo)fosfazén-benzochinón
ppt	parts-per trillion
SPME	mikroextrakcia na pevnej fáze
TCD	tepelne vodivostný detektor
TPH	zmes ropných uhl'ovodíkov
TPR	živica
V_f	objem stacionárnej fázy
V_s	objem vzorky
XPS	Fotoelektrónová spektroskopia

„Myšlenka analyzovat parní fázi nad kapalným nebo pevným vzorkem pochází ještě z doby před rozvojem plynové chromatografie. Snad první zmínka v odborné literatuře o analýze plynné fáze vytvořené nad kapalinou pochází z práce Harger, Bridwell a Raney z roku 1939, ve které se autoři pokoušeli stanovit obsah alkoholu ve vodných roztocích. První zpráva o spojení statické head-space a plynového chromatografu se datuje do roku 1958 [1].

1 Úvod

S cieľom izolovať daný analyt spomedzi viacerých druhov matric vzoriek čo najrýchlejším spôsobom s možnosťou využitia vysokej citlivosti, presnosti a správnosti merania, bola v roku 1989 zásluhou prof. Janusza Pawliszyna a jeho kolektívu vyvinutá nová izolačná technika – Mikroextrakcia na tuhej fáze (*z angl. SPME = Solid phase microextraction*). Okrem samotnej izolácie analytu táto metóda umožňuje aj následné určenie jeho koncentrácie pomocou separačnej metódy ako je plynová chromatografia (GC), plynová chromatografia spojená s hmotnostným spektrometrom (GC-MS), kvapalinová chromatografia spojená s hmotnostným spektrometrom (LC-MS), vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) či kapilárna elektroforéza (CE).

Za pomoci kremenného vlákna potiahnutého stacionárnou fázou je možné zachytiť analyty takých nízkych koncentrácií, ktorých priame analyzovanie by nebolo možné. SPME teda kombinuje extrakciu a prekoncentráciu analytov v jednom kroku.

Keďže výber vhodnej stacionárnej fázy na povrchu SPME vlákna hrá najväčšiu rolu pri stanovení látok, ich vývoj a zdokonaľovanie je predmetom záujmu viacerých odborníkov zaoberajúcich sa touto metódou. Americká výskumníčka poľského pôvodu dr. Mira Josowicz v spolupráci so svojím kolektívom študovala elektrochemickú depozíciu anorganicko – organického hybridného materiálu z hexachlorocyklotrifosfázu a benzochinónu priamo na povrchu platinovej elektródy v rámci hľadania vysoko chemicky a termálne stabilných materiálov. Zároveň objasnila podmienky, vďaka ktorým by bola polymerizácia najúčinnějšía, resp. vylúčila faktory, ktoré by mohli vznik týchto polymérov nejakým spôsobom obmedzovať či úplne znemožniť.

Štúdium a aplikácie tohto materiálu pre účely SPME s následnou GC analýzou sú námetom tejto práce. V priebehu experimentovania bolo zisťované či je poly(cyklo)fosfazén schopný sorbovať na svojom povrchu nejaké analyty a tiež boli hľadané podmienky, pri ktorých by bolo využitie tohto materiálu optimálne.

2 Teoretická časť

2.1 Mikroextrakcia na tuhej fáze (SPME)

2.1.1 Princíp metódy

Jedná sa o jednoduchý a účinný spôsob extrahovania a zakoncentrovania analytov, pomocou ktorého možno analyzovať napr. vonné a chuťové látky či organické látky znečisťujúce životné prostredie. Podmienkou je, aby boli prchavé [2].

Základom je tavené kremenné vlákno potiahnuté vrstvou stacionárnej fázy, ktoré je v kontakte s kvapalnou alebo plynnou fázou vzorky [3].

Transport analytov zo vzorky do stacionárnej fázy vlákna začína v okamihu, keď sa vlákno dostane do kontaktu s danou vzorkou alebo s plynnou fázou nad touto vzorkou. Extrakcia sa považuje za ukončenú, keď rovnovážna koncentrácia analytov odpovedá distribučnej rovnováhe medzi povrchom vlákna a vzorkou [4].

Táto rovnováha je vyjadrená pomerom týchto dvoch koncentrácií vo vzťahu:

$$K_{fs} = \frac{c_f}{c_s}$$

kde K_{fs} je distribučná konštanta, c_f je rovnovážna koncentrácia analytov v stacionárnej fáze, c_s je rovnovážna koncentrácia analytov vo vzorke.

Množstvo analytu v stacionárnej fáze, n_f , je vyjadrené ako

$$n_f = K_{fs} V_f c_s$$

kde V_f je objem stacionárnej fázy.

Táto rovnica je platná iba v prípade, že objem kvapalnej fázy je porovnateľný s V_f .

Pre všeobecnejšie vyjadrenie slúži rovnica:

$$n_f = \frac{K_{fs} V_f V_s c_s}{K_{fs} V_f + V_s}$$

kde V_s je objem vzorky.

Po ukončení extrakcie sú analyty desorbované vysokou teplotou a prúdom čistého nosného plynu v injektore plynového chromatografu a následne analyzované [3].

Pracovný postup

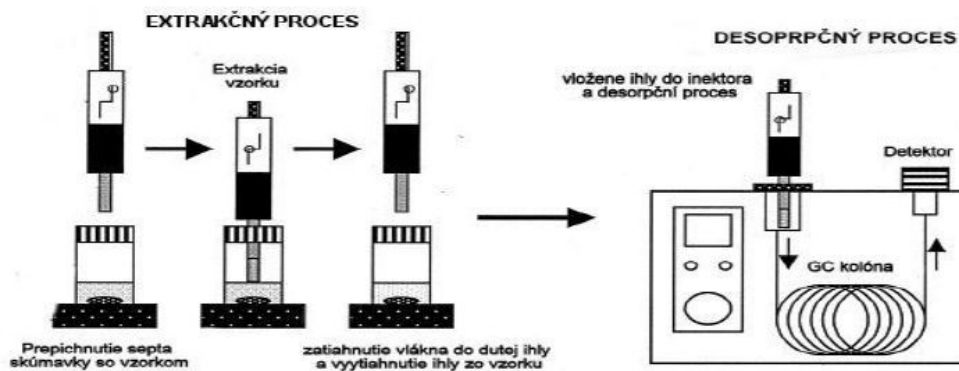
Postup v rámci metódy SPME sa dá všeobecne rozdeliť do dvoch častí (obr. 2.1) [5]:

I. Extrakčný proces:

1. Prepichnutie septa vialky obsahujúcej vzorku
2. Vysunutie vlákna z ihly (do vzorky alebo „headspace“)
3. Sorbcia analytov na vlákno
4. Zasunutie vlákna späť do ihly
5. Vysunutie ihly z vialky

II. Desorbčný proces:

1. Zasunutie ihly do vyhriateho injektora prístroja vopred zvolenej separačnej metódy
2. Vysunutie vlákna (začiatok analýzy)
3. Termická desorbcia
4. Zasunutie vlákna späť do ihly
5. Vysunutie ihly z injektora



Obr. 2.1 Postup pri HS - SPME [2]

2.1.2 Výhody SPME

V súvislosti s analýzou organických látok vo vzorkách za použitia jednej z „bežných“ metód, teda nie pomocou SPME, možno registrovať vyššiu cenu, dlhší čas na prípravu vzorky či prácu s drahými rozpúšťadlami. SPME však väčšinu týchto nevýhod eliminuje. Okrem hospodárnosti medzi jej ďalšie významné prednosti patrí [4, 5]:

- Jednoduchosť – je prístupná na úplnú automatizáciu
- Rýchlosť – vzorkovanie trvá len niekoľko minút do ustálenia rovnováhy (v porovnaní s inými metódami)
- Citlivosť – pracuje aj s takými nízkymi koncentráciami ako je ppt
- Presnosť a správnosť – v prípade manuálnej SPME je jej smerodajná odchýlka okolo 5%, pri automatickom dávkovaní len približne 1%
- Množstvo vzorky – k analýze stačí len niekoľko mililitrov

2.1.3 Typy SPME

Na základe rôzneho vzorkovania analytov na vlákno SPME je možné túto izolačnú metódu rozdeliť na tri základné extrakčné techniky:

- Priama („Direct sampling“)
- „Headspace“
- Membránová

Výber vzorkovacej techniky má významný vplyv na kinetiku extrakcie. Ak sa nachádza vlákno v „headspace“ priestore, ako prvé sa nasorbujú analyty z tejto oblasti, nasledované analytmi sorbovanými nepriamo zo vzorky. Prchavé analyty sú teda extrahované rýchlejšie ako menej prchavé, čo je spôsobené ich vyššou koncentráciou v „headspace“ priestore [4].

Priama SPME technika

Pri priamom vzorkovaní je potiahnuté vlákno ponorené do roztoku s analytmi, ktoré sú transportované zo vzorky do extrakčnej fázy priamou cestou. Rýchlosť extrakcie je

výhodné podporiť miešanim, čím sa urýchli transport analytov z objemu roztoku do okolia vlákna.

V prípade plyných vzoriek miešanie nie je nutné, pretože k urýchleniu extrakcie dôjde pomocou prirodzenej konvekcie vzduchu.

U kvapalných vzoriek je vhodné využiť techniku spojenú s rýchlym miešanim a to napríklad pomocou rýchleho prúdenia vzorky, pohybovaním vlákna či vialky s roztokom alebo sonikáciou [4].

Bez miešania by extrakcia trvala oveľa dlhšie a to vplyvom pomalšieho ustaľovania rovnováhy a tiež z dôvodu difúzie látky vo vode, ktorá túto rovnováhu limituje. Ak by došlo aspoň k pomalému miešaniu, v blízkosti vlákna by ostala nepohyblivá vrstva vody a tým by boli analyty nútené difundovať najprv cez vzniknutú vodnú vrstvu, čím by sa extrakcia spomalila.

V praxi sa na miešanie používa magnetické miešadlo, vďaka ktorému sa skrúti doba extrakcie z niekoľko desiatok až stoviek minút len na niekoľko minút.

Ďalší faktor, ktorý má významný vplyv na rýchlosť ustálenia rovnováhy je rozdeľovacia konštanta analytu. Čím majú analyty vyššiu hodnotu tejto konštanty, o to skôr budú difundovať statickou vrstvou [5].

„Headspace” SPME technika

Naopak pri „headspace” technike sa vzorkuje tzv. plyný priestor (z angl. headspace) nad vzorkou, čiže plyná fáza nad hladinou kvapalnej či nad povrchom pevnej vzorky [6].

Vďaka tomu prechádzajú dané analyty cez vzduchovú bariéru ešte pred tým, ako sa nasorbujú na vlákno. V dôsledku tohto deja je vlákno chránené pred kontamináciou vysokomolekulárnymi látkami či ďalšími interferujúcimi faktormi neprchavých látok obsiahnutých vo vzorke ako je napríklad humózný materiál či proteíny [4]. Ide teda o trojfázový systém, ktorý je tvorený:

- Vrstvou polymérnej fázy (SPME vlákno)
- „Headspace” (plynnou fázou nad vzorkou)
- Vzorkou (pevná alebo kvapalná)

Vzhľadom na to, že polymérne vrstvy vlákna sú veľmi podobné stacionárnej fáze

v separačnej kolóne plynového chromatografu, dochádza k podobnému rozdeleniu analytov medzi touto vrstvou a „headspace” [5].

V rámci „headspace” techniky je možné vykonávať modifikácie vzorky ako je napríklad zmena pH a to bez toho, aby došlo k poškodeniu vlákna.

V skutočnosti rovnovážny čas, teda čas, kedy sa ustáli rovnováha, je u prchavých látok v prípade „headspace” techniky kratší ako v prípade priameho extrahovania, čo je spôsobené dvoma faktormi:

1. Podstatná časť analytov je z „headspace” oblasti nasorbovaná prioritne.
2. Difúzne koeficienty v plynnej fáze majú štyrikrát väčšiu hodnotu ako v kvapalnej fáze.

Keďže koncentrácia stredne prchavých látok je pri izbovej teplote malá, odzrkadlí sa to nízkou rýchlosťou transportu a dlhším extrakčným časom. Vyhnúť sa týmto nedostatkom je možné intenzívnym miešaním, prípadne zvýšením teploty extrakcie [4]. Súčasťou „headspace” techniky sú vialky uzavreté vrchnákom s pružným septom, ktoré slúži k plynotesnému odberu plynu z „headspace” priestoru [6].

Analýza pomocou „headspace” techniky môže byť uskutočnená dvoma spôsobmi [1]:

- Statická „headspace” – ak sa vzorka plynu odoberá z priestoru nad kvapalnou fázou v uzavretom systéme
- Dynamická „headspace” – ak je analyt izolovaný zo vzorky pomocou kontinuálneho extrahovania kvapalnej fázy pomocou inertného plynu (prúdením, prebublávaním)

Membránová

Hlavným účelom membránovej bariéry je ochrániť povrch vlákna pred poškodením. Táto technika je výhodná pre určenie analytov, ktoré majú prchavosť dosť vysokú na to, aby boli analyzované pomocou „headspace” techniky. Okrem toho membrána vyrobená z príslušného materiálu môže prispieť k zvýšeniu selektivity extrakčného procesu. Kinetika tejto techniky je podstatne pomalšia ako v prípade priamej extrakcie. Dôvodom je prechod analytov cez membránu ešte predtým, ako sa nasorbujú na vlákno.

Pre skrátenie extrakčného času je najvýhodnejšie využívať čo najtenšie membrány a čo najvyššiu extrakčnú teplotu [4].

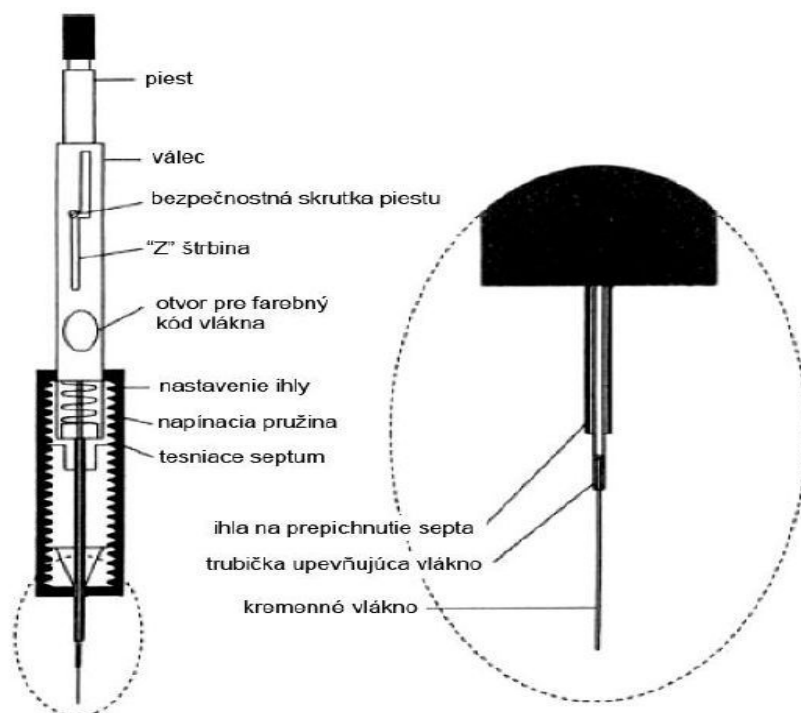
Membránová extrakčná technika pozostáva z dvoch súčasne prebiehajúcich procesov:

- Extrakcia analytov do membrány
- Prechod analytov z membrány do stacionárnej fázy vlákna

Difúzna rýchlosť membránou a „rozpustnosť“ v membráne určujú výslednú permeačnú rýchlosť zlúčenín. Za pomoci vhodného rozpúšťadla, v ktorom sa nechá membrána pred extrakciou napučať, možno docieľiť vyššiu účinnosť. V prípade silikónových membrán sa za najvýhodnejšie napučiacie činidlo považuje hexán. Difúzia látok rôznych fyzikálno-chemických vlastností, vysoká permeabilita analytov a relatívne nízka permeabilita vody sú parametre, ktoré výrazne ovplyvňujú selektivitu materiálu membrány, preto je dôležité dbať na jeho správny výber. Príkladom takéhoto materiálu je neporézny silikónový polykarbamát alebo polytetrafluórethylén, oba vyvinuté na báze dutých vlákien („hollow fibre“). Ďalej sa dôraz kladie na hrúbku membrány – čím menšia, tým sa ľahšie minimalizuje odpor difúzie. Typická hrúbka použitých membrán je 0,0025 – 0,005 mm. Najväčšie využitie nachádza membránová extrakcia v analyzovaní prchavých látok, avšak môže byť vhodná aj na analýzu stredne prchavých zlúčenín [7].

2.1.4 Zariadenie pre SPME

Zavedením potiahnutých vlákien zabudovaných do mikrostriekačky rozšírenie tejto metódy rapídne vzrástlo [1]. Vlákno, ktoré je pokryté polymérou látkou v dĺžke 1 – 2 cm sa nachádza vo vnútri ocelevej ihly, ktorá ho chráni pred mechanickým poškodením. Na túto ihlu nadväzuje neskôr oceľový piest, pomocou ktorého je možné vlákno vysúvať a zasúvať v rozsahu štrbiny „Z“ (obr. 2.2) [5, 8].



Obr. 2.2 Schéma zariadenia pre SPME [9]

Tab. 2.1 Typy vlákien pre SPME [10]

Stacionárna fáza/hrúbka vrstvy	Skratka názvu stacionárnej fázy	Typ fázy	Typ chromatografie	Doporučené pre analýzu
Polydimethylsiloxan	PDMS			Nepolárne Prchavé látky
100 µm		Neviazaná	GC/HPLC	Nepolárne, stredne prchavé látky
30 µm		Neviazaná	GC/HPLC	Slabo polárne až nepolárne stredne prchavé látky
7 µm		Viazaná	GC/HPLC	
polydimethylsiloxan/divinylbenzen	PDMS/DVB	Viazaná		Polárne prchavé látky
65 µm			GC	Všeobecné použitie (len pre HPLC)
60 µm			HPLC	
StableFlex™				
65 µm			GC	
Polyakrylát	PA	Viazaná	GC/HPLC	Polárne stredne prchavé látky
85 µm				
Carboxen™/polydimethylsiloxan	CAR™/PDMS	Viazaná		Stopové koncentrácie prchavých látok
75 µm			GC	
StableFlex™				
85 µm			GC	
Carbowax™/divinylbenzen	CW™/DVB			Polárne látky
65 µm			GC	
StableFlex™				
70 µm			GC	
Carbowax™/živica	CW™/TPR		HPLC	Povrchovo aktívne látky (len pre HPLC)
50 µm				
Divinylbenzen/Carboxen™/Polydimethylsiloxan	DVB/CAR™/PDMS			Prchavé až stredne prchavé látky C ₃ – C ₂₀
50 µm /30 µm			GC	

Dnes sa používajú komerčne dostupné zariadenia v podobe striekačiek firmy Supelco. Charakteristiky bežne používaných vlákien sú uvedené v Tab. 2.1. Voľba vlákna závisí od polarít analyzovaných látok, pričom platí, že polárne zlúčeniny sa dobre extrahujú polárnymi vláknami a nepolárne nepolárnymi. Napríklad vlákno typu PDMS, ktoré bolo v rámci SPME používané ako prvé, je nepolárne, čiže schopné vyextrahovať látky ako benzén, toluén, ethylbenzén, izoméry xylénu a polyaromatické uhľovodíky z vody. Naopak vlákno s PA stacionárnou fázou, ktorá je polárna, dobre extrahuje látky ako fenoly a jeho deriváty [5].

V súčasnosti sa začínajú používať plne automatizované vzorkovacie zariadenia, v ktorých dochádza ku kontinuálnemu pumpovaniu vzorky cez sklenú prietokovú celu a to pomocou peristaltickej pumpy. Prietoková cela je namontovaná na komerčný automatický dávkovací systém. Vlákno je pravidelne ponárané do pretekajúcej vzorky, ktorá je umiestnená v hnedej sklenej nádobe. Vďaka tomuto zariadeniu možno priamo a kontinuálne monitorovať stopové koncentrácie organických zlúčenín [5].

2.1.5 Aplikácie SPME

Využitie metódy SPME je v súčasnosti dostatočne preskúmané, hlavne čo sa týka skupenstiev (pevné, kvapalné, plynné), analytov (polarita či prchavosť) a tiež oblastí rôznych praktických aplikácií ako je environmentálna analýza, klinická a forenzná analýza, potraviny či lieky [4,5].

Environmentálna analýza

Medzi vzorky vhodné pre environmentálnu analýzu možno zahrnúť vzduch, vodu, sediment a pôdu. Často skúmanými organickými látkami v environmentálnej analýze sú prchavé látky ako benzén, toluén, ethylbenzén a xylény (BTEX), preto na ich stanovenie je výhodná „headspace” technika. Citlivosť metódy za použitia vlákna typu PDMS pri analyzovaní týchto látok je veľmi vysoká. Jedno z prvých stanovení metódou SPME bola extrakcia kvapalnej vzorky kontaminovanej benzínom [4].

Ďalej stanovenie zložiek zmesi ropných uhľovodíkov (z angl. *TPH = total petroleum hydrocarbons*) slúži na odhad hladiny kontaminácie vzorky. V prípade vzorky vzduchu je možné túto hodnotu získať priamo z chromatografických údajov bez identifikácie jednotlivých zložiek. TPH je možné stanoviť aj zo vzorky vody a to v prípade, že na analýzu bude použitá chromatografická metóda kombinovaná s hmotnostným spektrometrom. Na stanovenie TPH v pevnej vzorke je nutné analyty previesť do kvapalnej alebo plynnej fázy.

Polárne prchavé rozpúšťadlá ako alkoholy, ketóny či aldehydy je náročné stanoviť v stopových koncentráciách v kvapalných vzorkách. Ak sa na extrakciu použije vlákno potiahnuté polárnou polyméromou látkou, je možné dosiahnuť očakávaný výsledok. Vďaka tomu, pri detekčných limitoch rádovo v ppb je možné analýzu dosiahnuť aj za použitia plameňovo ionizačného detektoru (FID), vlákna typu PDMS/DVB a vysol'ovacieho efektu s koncentráciou 35% [4].

Nepolárne stredne prchavé látky ako polyaromatické uhľovodíky (z angl. *PAHs = polycyclic aromatic hydrocarbons*) či polychlórované bifenyly (z angl. *PCBs = polychlorinated biphenyls*) sú charakterizované vysokou hodnotou distribučnej konštanty K_{fs} , ktorá hovorí o vysokej citlivosti metódy SPME, dosahujúca limit detekcie rádovo v ppt [4].

V prípade pesticídov ide o analyticky dosť náročnú heterogénnu skupinu látok a to v dôsledku ich rôznorodej chemickej štruktúry či vlastností. Niektoré z nich sú charakterizované ako nepolárne (organochlórové pesticídy), ďalšie ako veľmi polárne stredne prchavé (herbicídy). Aj napriek ich bohatej rozmanitosti, je možné tieto látky analyzovať. Vo všeobecnosti, viaceré pesticídy sú neprchavé, takže na ich analýzu je potrebná priama extrakcia, ktorej výsledkom je dlhotrvajúce ustaľovanie rovnováhy, často presahujúce 60 minút a to aj za použitia magnetického miešadla [4].

Klinická a forenzná analýza

Hlavnou výhodou metódy SPME v oblasti klinickej a forenznej analýzy je jej prenosnosť, čo umožňuje okamžitú analýzu priamo na mieste. Takýto prístup by dovoľoval lepšie monitorovanie zdravotného stavu pacienta počas jeho liečby ako aj lepšiu ochranu miesta činu pred zneškodnením možných dôkazov. Monitorovať ľudské

zdravie možno pomocou neinvazívnych SPME metód, čiže takých, prostredníctvom ktorých sa nezasahuje do tela pacienta. Typickým príkladom je analýza dychu [4].

Analýza alkoholu a drog prítomných v telových tekutinách prebieha v klinických a forenzných laboratóriách. SPME umožňuje monitorovanie hladiny alkoholu a drog ako aj v krvi, tak aj v moči, hoci drogy sa stanovujú z telových tekutín o niečo obtiažnejšie, pretože sú stredne prchavé. Známa je analýza amfetamínov, valproovej kyseliny, kokaínu, tricyklických antidepresív či lokálnych anestetík [4].

Terénna analýza pomocou SPME umožňuje bezpečné vyšetrovanie na mieste činu, napríklad pri podozrení z podpaľáčstva. V takomto prípade je možné zistiť prítomnosť horľaviny v ohni [4].

Potraviny

Jedinečnou črtou metódy SPME v analyzovaní potravín je schopnosť extrahovať látky z produktov bez ich otvorenia. Napríklad, príchute obsiahnuté vo víne môžu byť skontrolované ešte pred predajom alebo nákupom a to pomocou SPME vlákna zasunutého do fľaše vína cez korkový uzáver a následnou „headspace” extrakciou. Keďže sa vyextrahuje len malé, bezvýznamné množstvo, zloženie produktu sa nezmení a extrakčné rozpúšťadlo nekontaminuje obsah produktu, pokiaľ nie je polymérna fáza prchavá. Avšak, potraviny bývajú často kontaminované prchavými organickými rozpúšťadlami, ktoré sa používajú pri ich výrobe.

SPME sa využíva na analýzu rôznych potravinárskych produktov ako oleje, korenia, nápoje, dokonca aj arómy z hľuzovky [4].

Takisto bolo pomocou SPME zistené, že pivo obsahuje viac ako 800 zložiek, pričom viaceré z nich prispievajú k jeho charakteristickej chuti ako napríklad horkosť, sladkosť, kyslosť, príchutť alkoholu či ovocia.

V prípade príchute syra sa ukázalo, že obsahuje heterogénnu zmes zložiek pochádzajúcich z mlieka. Okrem toho je v syre prítomných viac ako 200 zložiek, ktoré sú výsledkom enzymatických a chemických reakcií, ktoré vedú ku vzniku peptidov, aminokyselín či prchavých látok [2].

2.2 Plynová chromatografia (GC)

Plynová chromatografia (z *angl.* GC = *Gas chromatography*) je analytická a separačná metóda vhodná pre analýzu prchavých látok a látok, ktoré je možné definovaným spôsobom previesť do plynného skupenstva. Pracuje jednoducho, rýchlo a dokáže účinne analyzovať veľké množstvo vzoriek [11, 12]. Umožňuje tiež kvalitatívne analyzovať a kvantitatívne stanovovať jednotlivé látky.

2.2.1 Princíp metódy

Základom separácie analytov zo vzorky pomocou GC sú interakcie analytov medzi dvoma fázami, stacionárnou a mobilnou [13].

Stacionárna fáza môže existovať v pevnom skupenstve, pričom má na svojom povrchu naviazané funkčné skupiny. V prípade GC môže byť stacionárna fáza aj vo forme kvapalného skupenstva.

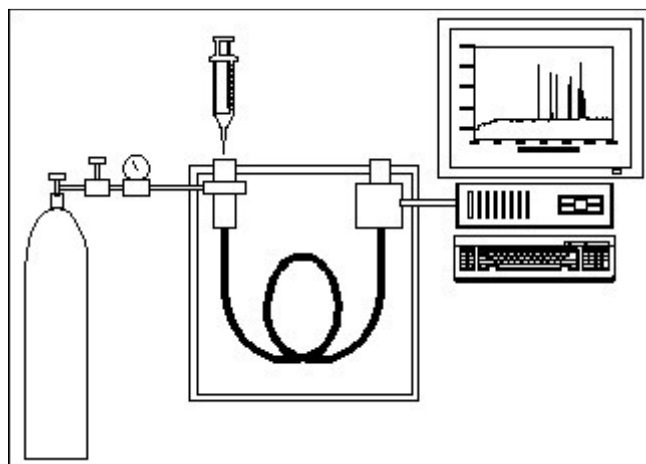
Mobilnú fázu predstavuje tzv. nosný plyn, ktorého úlohou je danú vzorku unášať kolónou po celú dobu analýzy [14].

K separácii dochádza pomocou rôznej schopnosti analytov viazať sa na stacionárnu fázu a vplyvom týchto interakcií analyty migrujú systémom rôznymi rýchlosťami a z kolóny sú eluované v rôznych retenčných časoch. Za kolónou nasleduje detektor, ktorý dané zložky indikuje. Zo získaného signálu a z časového priebehu intenzity signálu sa zistí druh a množstvo všetkých eluovaných zložiek (univerzálna detekcia) alebo jednotlivých zložiek (selektívna detekcia) [14].

Na zaistenie bezproblémového transportu vzorky je dôležité, aby látka nadávkovaná do kolóny bola v plynnom skupenstve. Keďže veľké množstvo látok patrí medzi neprchavé alebo len málo prchavé, ich príprava na analýzu pomocou GC je o niečo zložitejšia a vyžaduje tzv. derivatizáciu. Týmto procesom sú látky prevedené pomocou chemickej reakcie na prchavejšie deriváty, ktoré možno dobre analyzovať plynovým chromatografom [13].

2.2.2 Inštrumentácia GC

Hlavnou súčasťou GC je plynový chromatograf, ktorého neoddeliteľnou časťou je zdroj nosného plynu, dávkovač a vyhodnocovacie zariadenie. Samotná analýza prebieha v termostate, v ktorom sa nachádza kolóna a detektor a kde je možné nastavovať teploty jednotlivých častí. Dôležité sú tiež regulačné prvky zaisťujúce konštantný prietok nosného plynu kolónou a počítačom pre spracovanie signálu z detektora a celkové riadenie analýzy (obr. 2.3) [12].



Obr. 2.3 Schéma plynového chromatografu [15]

Zdroj nosného plynu

Zásobníkom nosného plynu bývajú tlakové nádoby, z ktorých je cez redukčný ventil vedený ďalej do dávkovača [12]. Najčastejšie používanou mobilnou fázou je hélium, vodík a dusík. Tento plyn musí byť inertný, aby nereagoval ani so stacionárnou fázou ani s analytmi. Zároveň by mal byť vysokej čistoty a ak je to nevyhnuté, pred analýzou sa ešte odstránia stopy kyslíka, vody a uhlíkovodíkov a to pomocou adsorbčnej trubice obsahujúcej aktívne uhlie či molekulové sito, ktoré odstraňujú uhlíkovodíky s nízkou molekulovou hmotnosťou a vodu, ktorá by mohla spôsobiť degradáciu stacionárnej fázy. Prítomnosťou oboch nežiaducich faktorov by mohlo dôjsť k problémom s detektorom. Na odstránenie kyslíka sa využíva trubica s katalyzátorom [14].

Dávkovanie

O tom, aký dávkovač sa na analýzu použije rozhoduje typ kolóny. V prípade náplňových kolón je priame dávkovanie na kolóne – „*on column*” najčastejším spôsobom. Vykonané môže byť buď manuálne pomocou ručnej mikrostriekačky cez septum, čo je tesnenie zo silikónovej gumy alebo automaticky pomocou „autoinjektoru”. U kapilárnych kolón sa častejšie využíva dávkovanie s deličom – „*split injection*” alebo bez deliča – „*splitless injection*”.

„*Split*“ umožňuje dávkovanie malého množstva prchavej vzorky, ktorá sa ďalej dostáva do otvorenej kolóny. Mobilná fáza, ktorá je kontrolovaná regulátorom tlaku alebo kombináciou regulátoru prietoku a regulátoru spätného tlaku vstupuje do injektoru vedľa septa. Prietok tejto fázy je už pri vstupe do injektoru rozdelený do dvoch prúdov. Pri nízkej rýchlosti prietoku mobilnej fázy smeruje prúd nahor, kde dochádza k čisteniu vstupu a septa injektoru. Naopak vysoká rýchlosť zaistí vstup mobilnej fázy do injektoru, kde dochádza k vyparovaniu vzorky a následne k jej zmiešaniu s mobilnou fázou. Takýto prúd sa potom rozdelí na vstupe kolóny, do ktorej sa dostane malé množstvo vzorky. Vstup kolóny sa nachádza vo vyhriatej zóne injektoru, čím sa zabezpečuje ochrana vzorky pred jej opätovnou kondenzáciou ešte pred tým ako dôjde k jej rozdeleniu.

„*Splitless*” dávkovanie sa od „*splitu*” odlišuje geometrickým usporiadaním injektora, v ktorej sa vzorka vyparuje a v zaistení elektromagnetického ventilu za rozdeľovačom. Tento ventil môže byť po dobu dávkovania, vyparovania a prenosu na kolónu vypnutý (normálne 30 – 90 s, záleží na množstve vzorky). Injektor predstavuje sklenenú alebo kremennú trubicu, ktorá umožňuje minimálne miešanie, takže výpary vzorky môžu byť prenášané do kolóny s čo najmenším riedením. Vzhľadom na veľký objem injektora a exponenciálne riedenie v „*splitless*” injektore je potrebné zaistiť jeho rýchle čistenie a to zapnutím prietoku mobilnej fázy po nadávkovaní cez elektromagnetický ventil.

Všeobecne platí pre všetky typy dávkovania, že na zabránenie kondenzácie je potrebné, aby teplota dávkovača bola vyššia ako bod varu najmenej prchavej látky aspoň o 30 – 50 °C. Dávkovaný objem je veľmi malý, záleží však na type kolóny [12, 14, 16, 17].

Kolóny

V prípade plynovej chromatografie sa za najviac používané kolóny považujú kolóny náplňové a kapilárne. Náplňovými kolónami sa rozumie do špirály stočená kovová alebo sklenená trubica s vnútorným priemerom 2 – 4 mm, dĺžkou 2 – 6 m a ich obsah tvoria častice pevnej stacionárnej fázy alebo nosiča s veľkosťou 30 – 350 μm pokryté filmom kvapalnej stacionárnej fázy. Kapilárne kolóny bývajú najčastejšie kremenné, ich vnútorný priemer dosahuje 50 – 350 μm a za účelom zvýšenia mechanickej odolnosti sú potiahnuté vrstvou polyimidu. Stacionárnou fázou je nanosená alebo chemicky naviazaná neprchavá kvapalina nachádzajúca sa na vnútornej stene kapiláry. V porovnaní s náplňovými kolónami dosahujú veľmi vysokú účinnosť, avšak nevýhodou je malé množstvo dávkovanej vzorky [12].

Detektory

Detektor priamo nadväzuje na kolónu, pričom musí byť neustále vyhrievaný, aby sa predišlo kondenzácii zložiek eluovaných z kolóny [14].

Detektory používané v GC možno všeobecne rozdeliť na univerzálne a selektívne [12, 14].

- *Tepelne vodivostný detektor (z angl. TCD = Thermal conductivity detector)*. Ide o najstaršie používaný univerzálny detektor. Výhodou nie je len univerzálnosť, ale aj široký lineárny dynamický rozsah, naopak najväčšou nevýhodou je dosť nízka citlivosť. Pozostáva z elementu, ktorý je vyhrievaný na konštantnej teplote (žhavené vlákno, termistor, tranzistor), umiestneného v termostate [12] a dvoch kanálikov. Každý kanálik je vybavený termoelementom, ktoré sú navzájom spojené do Wheastonovho mostíka. Nosný plyn idúci do injektora a kolóny je vedený cez jeden z kanálikov, pričom nosný plyn vystupujúci z kolóny ide cez druhý kanálik. Teplota vlákna závisí na tepelnej vodivosti prechádzajúceho plynu (hélium aj vodík majú vyššiu vodivosť ako dusík). Keď látka eluujúca z kolóny prechádza vláknom, vodivosť plynu sa znižuje a teplota vlákna sa zvyšuje (v prípade H_2 a He ako mobilnej fázy, u Ar a N_2 je to naopak). Tento nárast teploty odpovedá zmene v elektrickom odpore vlákna, čo registruje Wheastonov mostík, kedy je možné pozorovať signál detektoru [14].

-
- *Plameňovo ionizačný detektor (z angl. FID = Flame ionization detector)*. Patrí tiež medzi univerzálne a zároveň najčastejšie používané detektory. Aj napriek tomu, že si FID zachováva široký lineárny rozsah, jeho citlivosť je podstatne vyššia ako u TCD. Jeho hlavnou nevýhodou je nutnosť použitia zdroja vodíka a vzduchu [12]. Hlavnou súčasťou je horák vyhrievaný na 300 – 350 °C, kde sa nosný plyn prichádzajúci z kolóny mieša s vodíkom. Vzduch vstupuje do detekčnej časti cez oddelený kanálik, pričom sa prietoková rýchlosť nosného plynu, vodíka a vzduchu udržiava v pomere približne 1:1:10. Plameň je zahájený elektrickým výbojom a je udržiavaný v prebytku vzduchu. Hoci je vzduch dodávaný z oddeleného kanálíka, redukčná zóna sa nachádza vo vnútornej časti plameňa. Keď z kolóny vystúpi látka, vznikajú z nej ióny, ktoré generujú malý elektrický prúd. Tento prúd je priamo úmerný množstvu spálených látok. Prúd sa zosilí pomocou elektrometra [14].
 - *Detektor elektrónového záchytu (z angl. ECD = Electron capture detector)*. Predstaviteľ selektívnych detektorov, ktorý objavil James Lovelock v roku 1957 slúži najmä na analýzu organických zložiek, ktoré obsahujú skupiny zachytávajúce elektróny ako napríklad halogény, nitroskupiny či konjugované karbonylové skupiny. ECD pozostáva z vyhriatej kovovej cely s detekčným kanálom. Nosný plyn vychádzajúci z kolóny vstupuje do detektoru, kde sa mieša s reakčným plynom v prípade, že sa nedokáže ionizovať sám. Reakčným plynom je dusík, niekedy aj zmes vodíka a metánu. Ďalej detektor obsahuje kladne nabitú anódu, záporne nabitú katódu a zdroj β – žiarenia, čo môže byť ^3H alebo ^{63}Ni . Vzhľadom na viaceré praktické výhody a možnosti použitia vysokých teplôt je výhodnejšie pracovať s ^{63}Ni . Nosný (alebo reakčný) plyn je ionizovaný pomocou β – žiarenia s vysokou energiou. Ak je nosným plynom N_2 , výsledkom ionizácie budú katióny N_2^+ a elektróny. Keď do detektora príde analyt s vysokou elektrónovou afinitou, vstúpi do negatívnej zóny (na anódu) a vzniknú záporne nabitú ióny. Elektrický prúd sa znižuje a práve tento pokles je meraný množstvom analytov vstupujúcich do detektora [14].

2.2.3 Aplikácie GC

V počiatkových štádiách vývoja bola GC aplikovaná hlavne na analýzu plynov a pár prchavých látok. Postupným skúmaním sa GC rozšírila natoľko, že poskytuje široké uplatnenie vo viacerých oblastiach ako je analýza liekov, ropných produktov, pesticídov, potravín, environmentálna či klinická analýza. Ako analytický prístroj môže byť plynová chromatografia využitá na priamu separáciu a analýzu plynných vzoriek, kvapalných roztokov a prchavých pevných látok [18].

1. *Lieky.* Okrem kontrolovania kvality rôznych liečivých produktov, GC tiež analyzuje nové produkty a monitoruje ich metabolity v biologických systémoch.

2. *Environmentálna analýza.* Viacero chronických dýchacích ochorení ako astma, rakovina pľúc, dýchavičnosť či zápal priedušiek môžu byť výsledkom znečisteného vzduchu. Hoci vzorka vzduchu tvorí veľmi komplexnú zmes, GC ju veľmi ľahko dokáže rozanalyzovať. Prítomnosť pesticídov, herbicídov a insekticídov vo vzorkách vôd a pôd (pomocou „headspace“) je tiež častým predmetom analyzovania pomocou GC.

3. *Ropné produkty.* Firmy spracúvajúce ropu boli medzi prvými, ktoré sa zaslúžili o rozšírenie využitia plynovej chromatografie. Pomocou GC dokázali separovať a určiť viaceré zložky z ropných produktov. Takisto sa využíva na kontrolovanie kvality ropy a jej destilačných produktov.

4. *Klinická analýza.* Veľmi častá je analýza zložiek z biologických tekutín a to hlavne z krvi a moču ako napríklad masné kyseliny, steroidy, vitamíny, barbituráty či rôzne drogy. Verejnosti známe je stanovenie alkoholu v krvi.

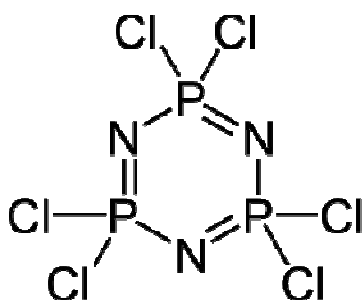
5. *Potraviny.* Určovanie antioxidantov a konzervantov v potravinách je ďalšou oblasťou analýz plynovou chromatografiou. Tiež sa aplikuje pri objektívnom zhodnotení chuti a voní napríklad z nápojov ako víno, pivo, ovocné džúsy, či sirupy, z mliečnych výrobkov, olejov, ale aj z rôznych dekompozičných produktov, kontaminantov a prímiesí [12, 16, 18].

2.3 Poly(cyklofosfazény)

2.3.1 Cyklofosfazény

Už v roku 1834 pripravili chemici Liebig a Wöhler malé množstvo cyklického triméru, hexachloro-cyklo-trifosfazénu $P_3N_3Cl_6$ ako výsledok reakcie chloridu fosforečného s plynným amoniakom. Všeobecne platí, že v prípade fosfazénov ide o zlúčeniny, ktoré obsahujú vo svojich molekulách zoskupenia $-N=P-$, pričom sa môžu pravidelne striedať na základe väzbových interakcií podobne ako v aromatických uhl'ovodíkoch a to vďaka tomu sa môžu tvoriť lineárne, polymérne alebo cyklické formy [19].

Základom cyklofosfazénov je usporiadanie dusíka a fosforu vo forme $-N=PX_2$, kde X = halogén, R, RNH, alebo RO (obr. 2.4). Tieto látky predstavujú z hľadiska chemických a fyzikálnych vlastností hraničnú oblasť medzi anorganickou a organickou chémiou. V 60. rokoch 20. storočia sa venovala veľká pozornosť syntéze organoderivátov cyklofosfazénov, hlavne náhradou atómov chlóru v molekule $P_3N_3Cl_6$ rôznymi substituentmi. V prípade polymérnych fosfazénov ide o veľmi podobnú prípravu ako u derivátov cyklických zlúčenín tohto druhu. V dôsledku jednoduchej nahraditeľnosti atómov chlóru v molekule hexachloro-cyklo-trifosfazénu možno v priebehu substitúcie vytvoriť nové polymérne reťazce fosfazénových jednotiek [20].



Obr. 2.4 Štruktúra cyklického fosfazénu

Využitie cyklofosfazénov sa pohybuje v oblasti prípravy rôznych polymérnych látok ako napr. hybridných cyklolineárnych a cyklomatrixových polymérov, extenderov polymérnych reťazcov, jadier dendrimérnych štruktúr, modifikátorov polymérov, nosičov protirakovinových liečív, retardérov horenia, nanokompozitov, nanovlákién,

adhezív. V súčasnej dobe svoje stanovisko zaujímajú na pracoviskách, ktorých predmetom výroby sú nové technické polyméry pre sieťovateľné kompozity ako sú polyurethany, polyestery, epoxidy, polymethakryláty, polyamidy [20].

2.3.2 Vlastnosti halogeno-cyklo-fosfazénov

Medzi najbežnejších zástupcov halogeno-cyklo-fosfazénov patrí hexachloro-cyklo-trifosfazén $P_3N_3Cl_6$. Fluórové a brómové analógy nedosahujú takej pozornosti. Dôvodom môže byť ich zložitejšia príprava.

$P_3N_3Cl_6$ predstavuje bielu kryštalickú látku látku dobre rozpustnú v nepolárnych a málo v polárnych rozpúšťadlách, na vzduchu pomerne stálu. Avšak niektoré jeho deriváty môžu mať na sebe naviazané namiesto atómov chlóru také substituenty, ktoré sa na vzduchu rozkladajú. V takom prípade je dôležité pracovať v inertnej atmosfére. Jej teplota topenia sa pohybuje v rozmedzí 113 – 114 °C a pri teplote 40 – 60 °C môže v prostredí vákua ľahko sublimovať [19].

V závislosti na substituentoch naviazaných na fosfore v molekule cyklofosfazénu dochádza k vytvoreniu rôznych konfigurácií. V prípade fluóru možno pozorovať vznik planárnej štruktúry molekuly $(NPF_2)_3$, pričom po naviazaní chlóru na fosfor sa molekula deformuje. Dôsledkom tejto odchýlky od planarity je vo veľkej miere dodatočné pôsobenie síl v kryštalovej mriežke. V snahe zachovať si veľkosť väzbových uhlov okolo optimálnej hodnoty 120° dochádza k častejšej deformácii u cyklov, ktoré majú vo svojej štruktúre osem substituentov $(NPX_2)_4$ v porovnaní s tými, ktoré majú substituentov šesť $(NPX_2)_3$. Výnimkou je opäť planárna molekula $(NPF_2)_3$ [21].

Na druhej strane, väzbové uhly N-P-N sú na substituentoch prakticky nezávislé. K odchýleniu od hodnoty 120° by došlo v prípade, že by boli na atóme fosforu naviazané objemné substituenty. Uhly P-N-P sú oveľa variabilnejšie – ich veľkosti sa pohybujú v rozmedzí 119 – 148° (v závislosti od planarity) [21].

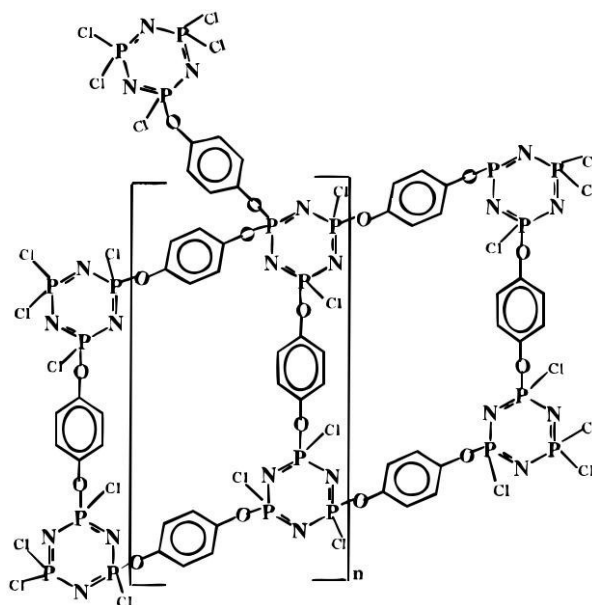
N základe rentgenových dát bola dokázaná prítomnosť delokalizovaného π -elektrónového systému fosfazénového cyklu. Ďalej bolo zistené, že dĺžka väzby P-N je kratšia ako u bežnej jednoduchej väzby. V prípade väzby P-X platí, že čím je X elektronegatívnejšie, tým bude väzba kratšia [19].

2.3.3 Elektrochemická syntéza PPBQ filmu

Do istej doby boli známe tri rôzne spôsoby syntézy poly(cyklo)fosfazénov [22]:

- Makromolekulárna substitúcia
- Substitúcia cyklických trimérov a tetramérov
- Priama syntéza organosilylfosfazénov cez kondenzáciu

Až neskôr sa poly(cyklo)fosfazény začali pripravovať elektrochemickou polymerizáciou ako kopolymér zložený z cyklického fosfazénového triméru $(\text{NPCl}_2)_3$ a benzochinónu (BQ). Očakávalo sa, že takto pripravený hybridný materiál bude vykazovať odlišné vlastnosti od čisto organických polymérov ako napríklad odolnosť voči organickým rozpúšťadlám či spomaľovanie horenia [23, 24].



Obr. 2.5 Štruktúra PPBQ filmu [25]

Polymerizácia pozostáva z dvoch krokov. Prvý, elektrochemický dej je založený na generovaní reaktívneho intermediátu, ktorým je radikálový anión benzochinónu $\text{BQ}^{\bullet-}$. Tento radikál následne podlieha druhému, chemickému kroku, v ktorom dochádza vďaka reaktivite P-Cl väzby k nukleofilnej substitúcii s atómom chóru na heteroatóme fosfazénu. Výsledkom je intermediát $\text{N}_3\text{P}_3\text{Cl}_5\text{BQ}^{\bullet}$, ktorý znova podlieha nukleofilnej substitúcii a reaguje s ďalším cyklom fosfazénu, čím vzniká $\text{N}_3\text{P}_3\text{Cl}_5\text{BQ N}_3\text{P}_3\text{Cl}_5$.

Postupným naväzovaním ďalších aniónov BQ^{•-} sa vytvára zosieťovaná 3D štruktúra (Obr. 2.5), ktorá bola neskôr určená pomocou metódy FTIR (z angl. *Fouriert transform infrared spectroscopy*) [26], AFM (z angl. *Atomic force microscopy*) [27] alebo XPS (z angl. *X – ray photoelectron spectroscopy*) [28]. Chemické zloženie takto pripraveného polymérneho filmu bolo potvrdené elementárnou mikroanalýzou [23, 24].

Z experimentálneho hľadiska polymerizácia prebiehala v roztoku acetonitrilu CH₃CN obsahujúcom hexachlorocyklotrifosfazen (NPCl₂)₃ a benzochinón (BQ) a Bu₄NBF₄ ako pomocný elektrolyt, ktorý bol použitý po rekryštalizácii z metanolu a deionizovanej vody. Polymérny film vznikol na platinovej alebo zlatej elektróde buď v prítomnosti cyklického elektródového potenciálu medzi 0 a -1,2 V v priebehu 30 minút alebo za konštantného potenciálu s hodnotou -1,0 V. Referentnou elektródou bola Ag/0,1M AgNO₃ v CH₃CN/0,1M Bu₄NBF₄ v CH₃CN. Všetky experimenty prebiehali pod suchým N₂. Biely polymérny film, ktorý sa vylúčil na povrchu elektródy bol opatrne umytý najprv v acetonitrile a potom v deionizovanej vode. Následným vysušením za pomoci dusíka sa polymerizácia ukončila.

Nepriama polymerizácia prípravy poly(cyklo)fosfazenových filmov môže v budúcnosti poskytnúť spoľahlivú cestu k syntéze technologicky zaujímavých materiálov [23, 24].

2.3.4 Vplyv na polymerizáciu

Parametre, ktoré najviac ovplyvňujú elektrochemickú syntézu PPBQ filmu sú hlavne voda (W), kyslík (O), katodický potenciál (U) a rôzne rozpúšťadlá.

Pomocou faktoriálnej analýzy boli zistené účinky pôsobení troch interakcií medzi parametrami WU, UG a WG a jednej interakcie medzi UGW. Následne boli výsledky týchto interakcií skúmané na dvoch rôznych úrovniach [24]:

- S prídavkom 5 vol % vody a bez tohto prídavku
- S kyslíkom a bez kyslíka
- Za konštantného katodického potenciálu v rozsahu od -0,24 do -1 alebo -2 V

Vplyv vody na polymerizáciu je daný hydrolyzou (NPCl₂)₃. Ak koncentrácia vody presiahne hodnotu 5 vol % v roztoku 0,01 M (NPCl₂)₃ v CH₃CN, polymerizácia PPBQ

nebude možná. Naopak v roztoku elektrolytu, kde voda dosahuje koncentráciu nižšiu ako 5 vol %, polymerizácia bude prebiehať, ale v dôsledku protonácie intermediátu BQ a odstupujúceho atómu Cl v $(\text{NPCl}_2)_3$ bude dosahovať menšiu účinnosť.

Analýza tiež ukazuje, že nárast potenciálu od -1 do -2 V bez prítomnosti vody a kyslíka v elektrolyte spôsobí, že polymerizácia filmu bude účinná. Dôvodom je vysoká koncentrácia intermediátov BQ a tiež rýchla reakcia s $(\text{NPCl}_2)_3$. Ak by reakcia prebiehala za vysokého potenciálu, v prítomnosti kyslíka a bez vody, výtazok polymerizácie by klesol približne o 80%.

Keďže PPBQ film vzniká na katóde, môže sa vytvárať aj na elektródach z rôznych materiálov [24].

3 Experimentálna časť

3.1 Chemikálie

- Pentán (98,0 %, Aldrich)
- Hexán ($\geq 97,0$ %, Sigma Aldrich)
- Heptán ($\geq 99,0$ %, Fluka Analytical)
- Oktán ($\geq 99,0$ %, Reachim)
- Nonán ($\geq 97,0$ %, Sigma Aldrich)
- Dekán ($\geq 97,0$ %, Sigma Aldrich)
- Acetón ($\geq 99,8$ %, Sigma Aldrich)
- Etanol ($\geq 99,0$ %, Fluka Analytical)
- 1-hexanol (98,0 %, Aldrich)
- Izopropylalkohol (p.a., Penta)
- Terc-butylalkohol (p.a., Penta)
- Dichlórmetán ($\geq 99,0$ %, Lachema)
- Polydimethylsiloxán (Carlo Erba, Taliansko; pre GC)
- Použité plyny (Linde Gas, Praha)
 - H₂ (99,9 %)
 - N₂ (99,999 %)
 - Vzduch (syntetický)

3.2 Inštrumentácia

- Plynový chromatograf GC – 2010 Gas Chromatography Shimadzu (Japonsko)
 - Kolóna – Rxi – 5Sil MS Chrompack, 28m x 0,25 mm x 0,25 μ m
 - Detektor – FID Schimadzu
 - Software – GC Solutions vision 241
- Piecka na čistenie striekačiek pre dávkovanie vzoriek v GC (Heated syringe cleaner) – Hamilton company (USA)

- Ultrazvuk – Elmasonic P (Nemecko)
- Termostat blokový – SBH 130 Stuart (Veľká Británia)
- Vortex – V-1 plus Biosan (Lotyšsko)
- Komerčné vlákno pre SPME – DVB-CAR-PDMS Supelco (USA)
- Mikrostriekačka – Hamilton 700 Fisher (USA)
- Sada 5 Pt drôtikov (dĺžka vlákna – 10,5 cm, potiahnutý povrch – 1 cm dĺžky, priemer vlákna – 0,35 mm, odhadovaná hrúbka materiálu (poskytnuté dr. Josowicz) – < 1 μm) v adaptéroch (vyrobené v dielňach chémie PrF UK), ktoré možno nasadiť do komerčného držiaku SPME vlákien (Supelco)

3.3 Pracovný postup

Pred začatím akejkoľvek analýzy boli nastavené všetky potrebné parametre plynového chromatografu (Tab. 3.1).

Tab. 3.1 Parametre GC

Parameter	Hodnota	Jednotka
Tlak	139	kPa
Lineárna prietoková rýchlosť	45	cm/s
Teplota nástriku	250	°C
Teplota detektora	320	°C
Teplota kolóny	40 – 200	°C
Celková doba teplotného programu	4,57	min
Rýchlosť vyhrievania kolóny	35	°C/min
Zber dát detektora	200	Hz
Prietoková rýchlosť H ₂	40	ml/min
Prietoková rýchlosť N ₂	30	ml/min
Prietoková rýchlosť vzduchu	400	ml/min

Zloženie použitých roztokov

- Roztok č.1 – pentán, hexán, heptán, oktán, nonán, dekán (vždy po 1 ml)
- Roztok č.2 – oktán, nonán, dekán (vždy po 1ml)

Komerčné vlákno

Ako prvé bolo použité komerčné vlákno typu DVB-CAR-PDMS, čím bol plynový

chromatograf funkčne overený.

Prvá analýza prebehla s čistým vláknom, to znamená bez ponechania vlákna nad roztokom analytov.

V prípade výskytu nečistôt bolo vlákno čistené vo výhrevnej piecke podľa predurčenej teploty a času.

Následne boli na jeho povrchu sorbované analyty z roztoku č.1 po dobu 5 min. Potom prebehlo dávkovanie desorbciou v injektore plynového chromatografu a po identifikácii šiestich pík, ktorým prislúchali retenčné časy začala analýza samotného poly(cyklo)fosfazénového vlákna č.1 až č.5.

Platinové vlákna pokryté poly(cyklo)fosfazénom

Päť platinových vlákien bolo dodaných dr. Mirou Josowicz z Atlanty, kde boli elektrochemicky potiahnuté poly(cyklo)fosfazénom.

Všeobecný popis samotnej prípravy tohto materiálu je uvedený v časti 2.3.3 a presný postup prípravy je publikovaný v prácach dr. Josowicz, *Novel electrosynthesis of poly(cyclo organophosphazenes)* [23] a *Synthesis and Characterization of electropolymerized Poly(cyclophosphazene – benzoquinone)* [24].

Poly(cyklo)fosfazénové vlákno bolo pred analýzou čistené vo výhrevnej piecke (doba trvania sa menila), aby sa prípadné analyty sorbovali rovno na jeho čistý povrch. Podobne ako u komerčného vlákna, aj tieto vlákna sorbovali analyty nad roztokom č.1, neskôr nad roztokom č.2.

Vlákna boli rovnako čistené v ultrazvukovej vani v prítomnosti pentánu za laboratórnej teploty po dobu 10 minút a tiež boli ponárané do roztoku stacionárnej fázy v jednej, dvoch či troch vrstvách.

Dodatočné pokrytie platinových vlákien

Pred samotným pokrytím vlákien boli pripravené oba roztoky stacionárnych fáz.

Polydimethylsiloxán I.

Pomocou analytických váh bolo navážené malé množstvo polydimethylsiloxánu

(PDMS), 0,0435 g, doplnené 500 μ l pentánu. Keďže rozpustenie v samotnom pentáne bolo obtiažne, bolo pridané 250 μ l toluénu. Nakoniec sa PDMS po trepaní na Vortexe rozpustil. Potom bola cez hustoty ($\rho_{\text{toluén}} = 0,8669$ g/ml, $\rho_{\text{pentán}} = 0,626$ g/ml) oboch rozpúšťadiel vypočítaná ich hmotnosť a aj výsledné hmotnostné percento stacionárnej fázy, čo bolo približne 8%.

Polydimethylsiloxán II.

Vzhľadom na dlhý časový interval, počas ktorého PDMS I. nebola používaná, bol pripravený roztok PDMS II. V tomto prípade jeho navážka predstavovala 0,0382 g. Použitým rozpúšťadlom bol hexán s objemom 1170 μ l. Rovnakým postupom ako v prípade prípravy PDMS I. bolo docielené jeho rozpustenie, následne prepočet cez hustotu ($\rho_{\text{hexán}} = 0,654$ g/ml) potvrdil približne 5 % roztok.

Pokrytie všetkých platinových vlákien prebiehalo vo vialke, v ktorej sa pomocou krúživého pohybu niekoľko sekúnd nanášala na povrch vlákna daná stacionárna fáza. Potom sa na niekoľko minút nechalo prítomné rozpúšťadlo odpariť.

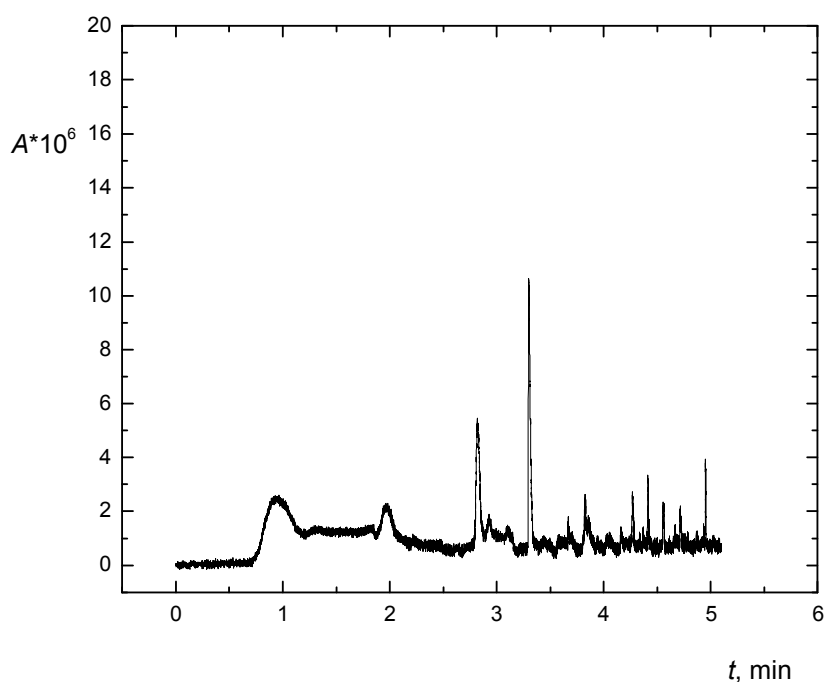
4 Výsledky a diskusia

Celkové testovanie začalo vláknom č.1 a skončilo vláknom č.5, avšak vzhľadom na ich negatívnu odozvu je uvádzaný len prípad vlákna č.3, ktorý v istom momente vykazoval určitú schopnosť na svojom povrchu sorbovať analyty.

Analýzou každého poly(cyklo)fosfazénového vlákna, pokrytého aj nepokrytého PDMS bol získaný chromatogram, na základe ktorého bol určený ďalší postup a ďalšie podmienky testovania.

Analýza komerčného vlákna

Najprv bolo komerčné vlákno otestované bez sorbovaných analytov, aby sa vylúčila prítomnosť nečistôt (Obr. 4.1).

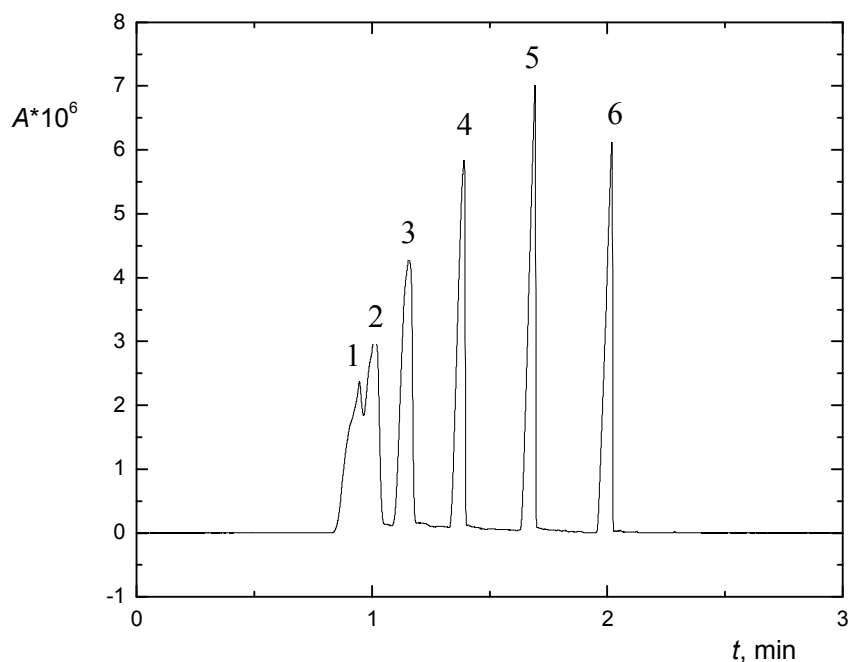


Obr. 4.1 Komerčné vlákno DVB-CAR-PDMS - bez sorbcie analytov

Ako sa ukázalo, vlákno na svojom povrchu obsahovalo isté nežiaduce zložky, preto ďalším krokom bolo jeho očistenie v peckve.

V priebehu druhej analýzy (obr. 4.2) bolo komerčné vlákno ponechané nad roztokom

č.1 a GC analýzou sa potvrdila prítomnosť očakávaných analytov v podobe šiestich píkov, ktorým odpovedali príslušné retenčné časy a plochy (Tab. 4.1).



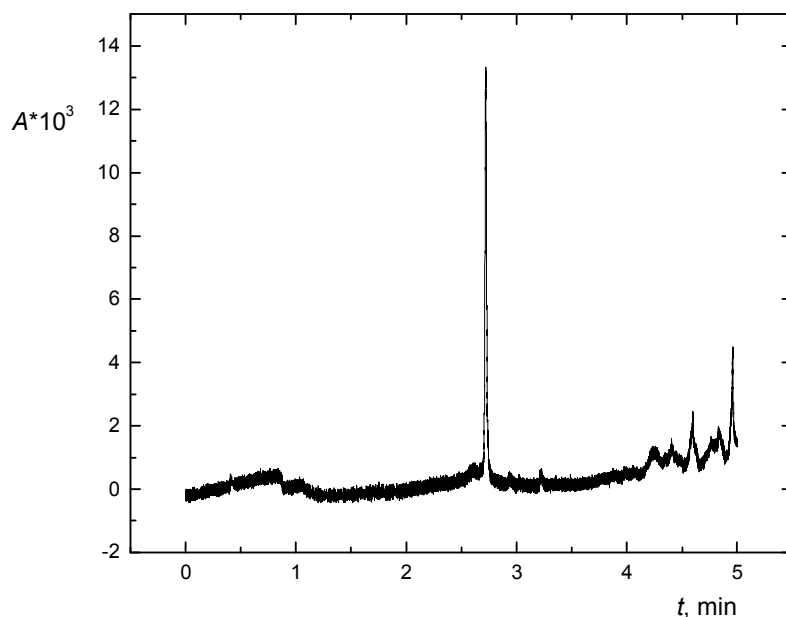
Obr. 4.2 Komerčné vlákno DVB-CAR-PDMS (experimentálne podmienky sú uvedené v Tab. 3.1) - po sorbcii analytov (identifikácia pík je uvedená v Tab. 4.1)

Tab. 4.1 Retenčné časy a plochy píkov použitých štandardov

Číslo píku	Štandard	t_R (min)	Plocha
1	Pentán	0,947	10 152 065
2	Hexán	1,012	11 286 964
3	Heptán	1,158	14 713 497
4	Oktán	1,388	13 059 566
5	Nonán	1,690	13 929 450
6	Dekán	2,017	12 258 478

Analýza poly(cyklo)fosfazénových vlákien č.1 – 5

Vlákno č. 3 bolo ponechané nad roztokom č.1 po dobu 5 min a GC analýzou nebola dokázaná prítomnosť žiadnych analytov (Obr. 4.3). Pík, ktorý sa zobrazil na chromatograme neodpovedal ani jednému z retenčných časov analytov roztoku č.1. Pravdepodobne išlo o nejakú nečistotu.



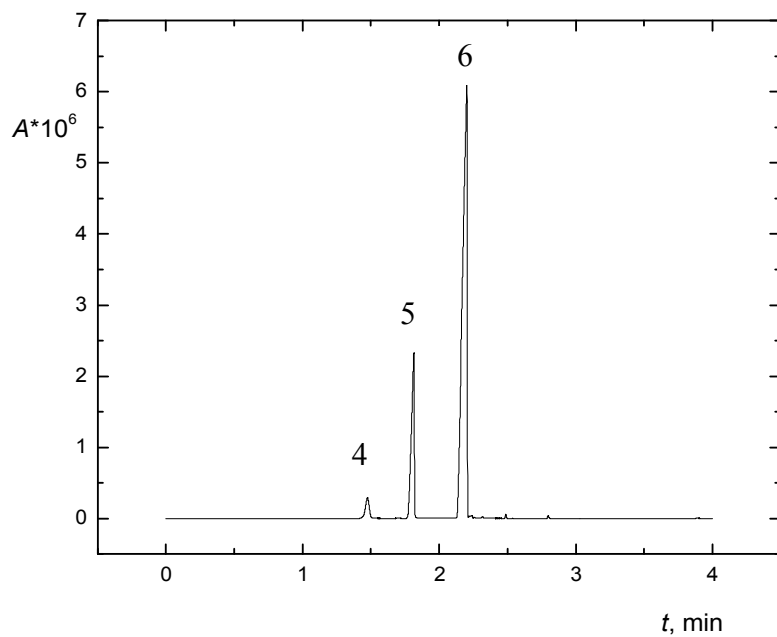
Obr. 4.3 Vlákno č. 3

Vlákno č.3 bolo pred ďalšou analýzou očistené v pecku a následne ponechané 3 minúty nad roztokom č.2. Opäť prebehla GC analýza, ktorej chromatogram potvrdil prítomnosť troch analytov (Obr. 4.4).

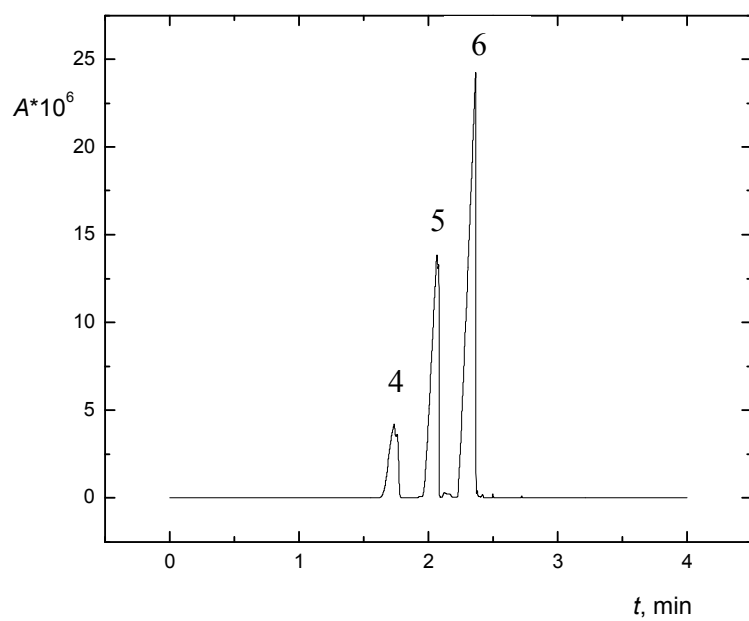
Aj napriek tomu, že poly(cyklo)fosfazén bol na platinových vláknach prítomný v podobe bieleho povlaku, nebol ako sorbent vybraných analytov dostačujúci. Naďalej bol však využívaný s funkciou efektívneho nosiča nepolárnej stacionárnej fázy PDMS. Keďže vzhľadom na vysoké povrchové napätie platinového vlákna nie je možné na jeho povrchu túto fázu udržať, úlohou poly(cyklo)fosfazénu je toto napätie znižovať, tým pevnejšie na svojom povrchu danú stacionárnu fázu viazať a tým umožňovať efektívnejšiu analýzu.

Adhéziu PDMS možno očakávať na základe prítomnosti čiastočne aromatického charakteru cyklofosfazénu a benzochinónu v štruktúre poly(cyklo)fosfazénu (Obr. 2.5).

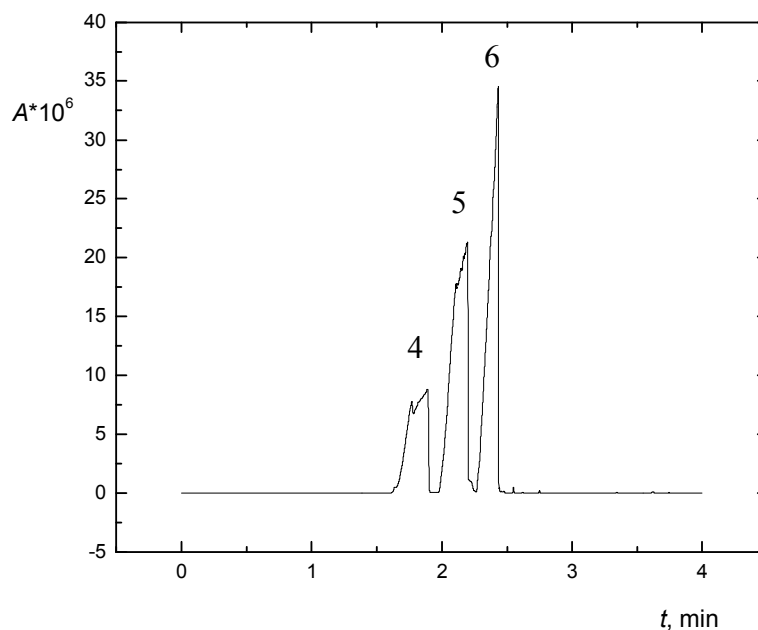
Vlákno č.3 bolo ponorené do roztoku PDMS I. (pokrytie 1x) s cieľom zvýšiť afinitu vlákna voči daným analytom. Výsledkom tejto analýzy bol chromatogram s tromi píkmi, ktoré odpovedali opäť analytom z roztoku č.2 (Obr. 4.5), potom sa postup nanášania PDMS I. zopakoval (pokrytie 2x) (Obr. 4.6).



Obr. 4.4 Vlákno č.3 bez pokrytia (identifikácia píkov je uvedená v Tab. 4.2)



Obr. 4.5 Vlákno č.3 pokryté 1x (identifikácia píkov je uvedená v Tab. 4.2)



Obr. 4.6 Vlákno č.3 pokryté 2x (identifikácia píkov je uvedená v Tab. 4.2)

Výsledkom týchto troch analýz (Obr. 4.4 – 4.6) boli píky s odpovedajúcimi plochami uvedenými v Tab. 4.2. Pripravená stacionárna fáza PDMS I. v týchto prípadoch ukázala zvýšenú afinitu voči analyzovaným uhl'ovodíkom, čo možno pozorovať vo forme narastajúcich plôch píkov jednotlivých analytov (plochy a výšky píkov na uvedených grafoch sú skreslené vplyvom rôznej škály osy y).

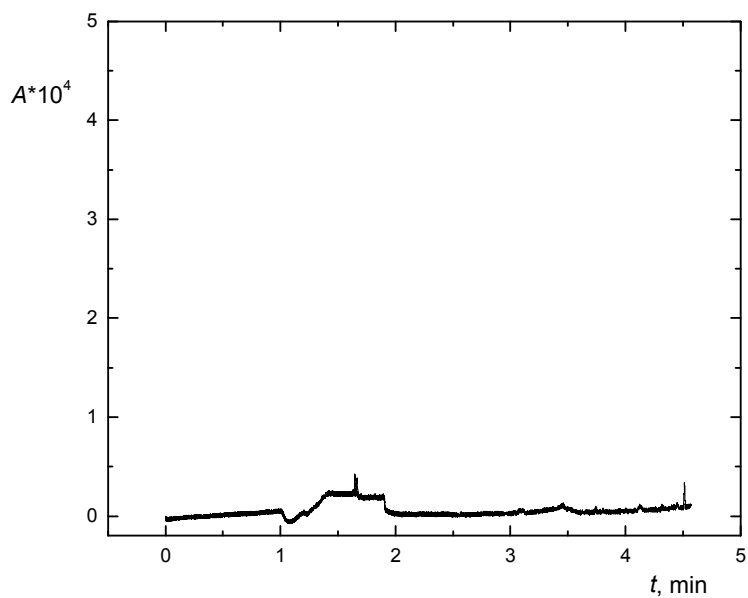
Tab. 4.2 Plochy píkov analytov v závislosti na množstve stacionárnej fázy

Analyt	Bez pokrytia	Pomer bez		Pomer pokrytie	
		1x	Pokrytie 1x	1x/pokrytie 2x	Pokrytie 2x
Oktán	580 000	33,6	19 500 000	4,5	87 820 000
Nonán	3 510 000	15,5	54 400 000	3,0	161 460 000
Dekán	14 450 000	6,9	99 510 000	1,6	161780 000

Pred ďalšou analýzou boli vlákna č.1 – 5 očistené v piecke.

Po príprave roztoku PDMS II. tieto vlákna opäť prešli pokrytím, po ktorom bola vykonaná analýza. Ani jedna z nich však nebola pozitívna. Uvedený je príklad vlákna č.3 (Obr. 4.7).

Dôvodom tohto negatívneho výsledku môže byť nadmerné očistenie vlákien od poly(cyklo)fosfazénu vplyvom vysokej teploty v piecke či poškodenie vlákien v ultrazvuku v dôsledku nedostatočnej mechanickej stability poly(cyklo)fosfazénu na platinovom vlákne.



Obr. 4.7 Vlákno č.3 po pokrytí PDMS II.

5 Záver

Z experimentálnej analýzy komerčného a neskôr aj piatich poly(cyklo)fosfazénových vlákien boli prostredníctvom plynovej chromatografie získané rôzne chromatogramy, na základe ktorých bolo možné určiť schopnosť týchto vlákien sorbovať na seba analyty.

Vlákno komerčné, ktoré malo na svojom povrchu divinylbenzén-carboxén-polydimethylsiloxánovú zmesnú stacionárnu fázu vykazovalo bezproblémovú sorbciu testovacích látok, výsledkom čoho bol chromatogram so šiestimi píkmi odpovedajúcimi šiestim uhl'ovodíkom (roztok č.1).

Všetky poly(cyklo)fosfazénové vlákna boli vyrobené rovnakým spôsobom, rovnako boli aj potiahnuté stacionárnou fázou na svojou povrchu. Aj napriek týmto rovnakým počiatočným podmienkam nevykazovali zhodujúce alebo aspoň podobné sorbčné schopnosti.

Každé vlákno bolo otestované najprv ponechaním nad roztokom šiestich uhl'ovodíkov (roztok č.1) podobne ako komerčné vlákno. Výsledkom nebola žiadna odozva.

Neskôr boli všetky vlákna očistené od analytov a ponechané nad roztokom troch uhl'ovodíkov (roztok č.2). Pozitívny výsledok sa ukázal v prípade vlákna č. 3.

Vzhľadom na negatívnu odozvu poly(cyklo)fosfazénového vlákna č.1,2,4 a 5 sa tento materiál neukázal ako dostatočne efektívny sorbent, no stále zachovával funkciu nosiča nepolárnej stacionárnej fázy PDMS. Jej udržanie na platinovom vlákne bolo umožnené vďaka zníženému povrchovému napätiu tohto vlákna vplyvom adhézie vyvolanej čiastočne aromatickým charakterom cyklofosfazénu a benzochinónu v štruktúre tohto poly(cyklo)fosfazénového filmu.

Po očistení od analytov boli vlákna niekoľkokrát prekryvané roztokom fázy PDMS I.. Aj v tomto prípade sa ako účinné ukázalo vlákno č.3, kde bola pozorovaná narastajúca plocha vplyvom pribúdajúceho množstva PDMS.

Po opätovnom očistení už ani vlákno č.3 nevykazovalo pozitívnu odozvu, dokonca ani po prekrytí novou fázou PDMS II. či po prečistení ultrazvukom.

Hoci všetky vlákna prešli rôznymi podmienkami testovania, očakávaný výsledok bol

poskytnutý len jedným z nich. Dôvodom môže byť poškodenie povrchu vlákien vplyvom teploty či opakovaného ultrazvukového čistenia, v priebehu ktorého mohlo dôjsť k narušeniu mechanickej stability poly(cyklo)fosfazénového filmu.

Vzhľadom na takýto výsledok neboli vykonávané žiadne ďalšie postupy spojené s ich optimalizáciou.

Poly(cyklo)fosfazén ako látka navrhovaná pre využitie v mikroextrakcii na pevnej fáze je týmto experimentom predkladaná ďalším štúdiám, v ktorých sa môže za pomoci iných laboratórnych podmienok ukázať ako jedna z účinných stacionárnych fáz.

6 Zoznam použitej literatúry

- [1] Horák T. a kol.
„Head – space analýzy v pivovarské analytice”
Kvasný prum. **58**, 2 - 5 (2012)
- [2] Kataoka, H., Lord, H. L., Pawliszyn, J.
„Applications of solid – phase microextraction in food analysis”
Journal of Chromatography, vol. 880, no. 1-2, pp. 35 – 62 (2000)
- [3] Prosen, H., Zupančič – Kralj, L.
„Solid-phase microextraction”
Trends in analytical chemistry, vol. 18, no. 4, (1999)
- [4] Pawliszyn, J.
Solid phase microextraction: Theory and practise.
1.vydanie. Waterloo: Wiley - VCH, 1997. ISBN 0-471-19034-9.
- [5] Sedláková, J., Matisová, E., Slezáčková, M.
„Mikroextrakcia na tuhej fáze a jej využitie v environmentálnej analýze”
Chem. Listy **92**, 633 – 642 (1998)
- [6] Poustka, J.
„Headspace, Purge&Trap” v sekcii „Izolační a separační metody”
VŠCHT Praha, ISM 2007

Dostupné z internetu:

<http://web.vscht.cz/~poustkaj/1%20seznam%20studijnych%20materialu%20ISM.htm>

[Prístup: 12.5.2016]

-
- [7] Straková, M., Matisová, E.
„Súčasný trendy v analýze organických látok vo vzorkách vôd s využitím HRGC a jej kombináciami s prekoncentračnými technikami”
Chem. Listy **91**, 330 - 341 (1997)
- [8] Štichová, L.
„HPLC analýza liečiv IV.” (diplomová práca)
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Hradec Králové 2012
- [9] Vas G., Vekey K.
„Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis”
Journal of mass spectrometry **39**, 233 – 254 (2004)
- [10] Procházková, D.
„Mikroextrakce na tuhou fázi a stanovení obsahu analytů”
Chem. Listy **96**, 827 - 852 (2002)
- [11] Churáček, J. a kol.
Analytická separace látek.
Praha: Nakladatelství technické literatury, 1990, s. 384, ISBN 80-03-00569-8.
- [12] Opekar, F. a kol.
Základní analytická chemie.
2. vydanie. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2010, s. 203, ISBN 978-80-246-1775-6.
- [13] Klouda, P.
Moderní analytické metody.
2. vydanie. Ostrava: Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-86369-07-2.

-
- [14]Lundanes, E., Reubsæet, L., Greibrokk, T.
Chromatography: Basic principles, sample preparations and related methods.
1. Vydanie. Weinheim: Wiley – VCH Verlag GmbH & Co, 2014. ISBN 978-3-527-33620-3.
- [15]Coufal, P.
„Plynová chromatografie” v sekcii „GC”.
UK Praha, 1996
- Dostupné z internetu:
<https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/gc.html>
[Prístup: 12.5.2016]
- [16]Lee, M., Yang, F., Bartle, K.
Open tubular column gas chromatography.
3.vydanie. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1984. ISBN 0-471-88024-8.
- [17]Poole, C., Schutte, S.
Contemporary practice of chromatography.
1.vydanie. New York: Elsevier science publishing company Inc., 1984. ISBN 0-444-424-10-5.
- [18]Grob, R.
Modern practice of gas chromatography.
3.vydanie. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1995. ISBN 0-471-59700-7.
- [19]Voznicová R.
„Syntéza a charakterizace nových fosfazenových derivátů” (disertační práce)
Masarykova univerzita v Brně, Brno 2009
- [20]Alberti, M.
„Fosfazeny”
Chem. listy **104**, 501- 510 (2010)

-
- [21] Allcock H. R.
Chemistry and applications of polyphosphazenes.
New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2003. ISBN 0-471-443-71-9.
- [22] Mark, J. E., Alcock, H. R., West, R.
Inorganic polymers.
London: Prentice – Hall, Ltd., 1992. ISBN 0-134-658-81-7.
- [23] Josowicz, M., Li, J., Exarhos, G. J.
„Novel electrosynthesis of poly(cyclo organophosphazenes)”
J. Electrochem. Soc., vol. 141, no. 12, (1994)
- [24] Josowicz, M., Li, J.
“Synthesis and Characterization of electropolymerized Poly(cyclophosphazene – benzoquinone)”
Chem. Mater., vol. 9, no. 6, (1997)
- [25] Josowicz, M., Li, J.
„Doping of Poly(cyclophosphazene-benzoquinone) Films with Polyiodide”
Chem. Mater., vol.9, no. 5, (1997)
- [26] Griffiths, P., Haseth, J.
Fourier Transform Infrared Spectrometry.
New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.2007. ISBN: 978-0-471-19404-0.
- [27] Eaton, P., West, P.
Atomic force microscopy.
New York: Oxford University Press.2010. ISBN 0-199-570-45-0.
- [28] Hollander, J, Jolly, W.
„X-ray photoelectron spectroscopy”
Acc. Chem. Res., 3(6),193–200 (1970)