

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra analytické chemie
Studijní obor Klinická a toxikologická analýza

**PŘÍPRAVA A TESTOVÁNÍ NOVÝCH VYSOCE
FLUOROVANÝCH CHLORMRAVENČANŮ JAKO
DERIVATIZAČNÍCH ČINIDEL PRO ANALÝZU
PERFLUOROVANÝCH KYSELIN**

**PREPARATION AND TESTING OF NEW
HIGHLY FLUORINATED CHLOROFORMATES
USED AS DERIVATIZING AGENTS FOR
ANALYSIS OF PERFLUORINATED ACIDS**

Bakalářská práce

Praha 2008

Tomáš Hložek

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně, pod vedením školitele RNDr. Radomíra Čabaly, Ph.D. a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

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

V Praze dne.....

.....

Podpis

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval mému školiteli RNDr. Radomíru Čabalovi, Ph.D. za jeho pomoc při shromažďování odborné literatury, za trpělivost a rady poskytnuté během měření a vypracovávání této práce. Velké díky také patří celé mé rodině, která mě po celou dobu studia podporovala. Dále bych chtěl poděkovat Terezce za psychickou podporu.

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM 0021620857.

1. ÚVOD	5
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	6
2.1 PLYNOVÁ CHROMATOGRAFIE.....	6
2.2 DERIVATIZACE V PLYNOVÉ CHROMATOGRAFII	8
2.2.1 Esterifikace.....	8
2.2.2 Silanizace	8
2.2.3 Esterifikace chlormravenčany.....	9
2.3 PERFLUOROVANÉ KYSELINY	11
2.4 SYNTÉZA FLUOROVANÝCH CHLORMRAVENČANŮ	12
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	13
3.1 CHEMIKÁLIE	13
3.2 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ.....	13
3.3 PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍCH ROZTOKŮ.....	14
3.4 PŘÍPRAVA 2,3,4,5,6-PENTAFLUORBENZYLCHLORMRAVENČANU	15
3.5 DERIVATIZACE.....	16
3.5.1 Derivatizace kyseliny oktanové a perfluoroktanové na isobutylester.....	16
3.5.2 Derivatizace kyseliny oktanové a perfluoroktanové na pentafluorobenzylester.....	16
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	17
4.1 ANALÝZA SYNTETIZOVANÝCH ČINIDEL	17
4.2 ANALÝZA DERIVÁTŮ KYSELINY OKTANOVÉ A PERFLUOROKTANOVÉ.....	22
4.2.1 Isobutylester kyseliny oktanové.....	22
4.2.2 Pentafluorobenzylester kyseliny oktanové.....	23
4.2.3 Isobutylester kyseliny perfluoroktanové.....	24
4.2.4 Pentafluorobenzylester kyseliny perfluoroktanové.....	24
5. SHRnutí A ZÁVĚR	27
6. SEZNAM ZKRATEK	28
7. POUŽITÁ LITERATURA.....	29

1. Úvod

Cílem této práce je syntéza vysoce fluorovaných chlormravenčanů pro derivatizaci mastných kyselin a jejich perfluorovaných analogů v plynové chromatografii. Perfluorované organické kyseliny patří mezi polutanty, kterým je v poslední době věnována zvýšená pozornost. V prostředí se vyskytují v koncentracích často pod 1 ng/l, což je činí obtížně detegovatelnými běžnými metodami typu GC-ECD, GC-MS nebo HPLC-UV-VIS. K jejich detekci se obecně používají citlivější, ale neporovnatelně dražší metody typu HPLC-MS-MS či GC-MS-MS. Aplikace vysoce fluorovaných chlormravenčanů má vést ke zvýšení citlivosti stanovení perfluorovaných kyselin tak, aby je mohly stanovovat běžně vybavené laboratoře.

2. Teoretická část

2.1 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je separační metoda, která k separaci plynů a par využívá dvě heterogenní fáze. Mobilní fází je zpravidla inertní plyn. Stacionární fází je nejčastěji kapalina zakotvená na inertním nosiči, méně často povrchově aktivní sorbent. Distribuci mezi fází stacionární a fází mobilní dosáhneme separací látek ve vzorku. Interakce molekuly plynu a stacionární fáze je realizována různými druhy mezimolekulárních sil vedoucích k sorpci a difuzi.

Retenční charakteristiky

Látky studované metodou GC lze kvalitativně charakterizovat tzv. retenčními charakteristikami. Základními retenčními charakteristikami jsou:

t_M – mrtvý retenční čas odpovídá průměrné době, kterou molekuly analytu stráví v mobilní fázi (u GC-ECD dávkováním vzduchu)

t_R – retenční čas je celková doba, po kterou molekuly analytu setrvávají v koloně; přesněji v měřícím systému od místa nástřiku do místa detekce

t_R' – redukovaný retenční čas odpovídá průměrné době, kterou stráví molekuly analytu ve stacionární fázi

$$t_R' = t_R - t_M$$

k – retenční faktor je poměr času, který stráví molekuly analytu ve stacionární fázi a času, který stráví v mobilní fázi, používá se pro obecné vyjádření retence a nezávisí na rozměrech kolony

$$k = t_R' / t_M$$

Detekce

Pro detekci se v plynové chromatografii využívají mnohé fyzikální a chemické vlastnosti separovaných látek a nosného plynu. Detektory mohou využívat vlastnosti ionizační, optické nebo elektrochemické a mnoho jiných. Detektory můžeme dále dělit na univerzální, selektivní a speciální. Selektivní detektory měří za konstantních experimentálních podmínek signál pouze určité skupiny látek. Nejdůležitějšími vlastnostmi, které se od detektorů vyžadují jsou: stabilita základní linie, rychlá odezva detektoru na změny složení mobilní fáze, stabilní signál a citlivost [1,2].

Při práci jsme používali pouze ECD, MS a proto jsou dále uvedeny stručné charakteristiky pouze těchto dvou detektorů.

Detektor elektronového záchytu

Principem detekce ECD je zachycování elektronů elektronegativními atomy, funkčními skupinami nebo molekulami. Přítomnost analytu se projeví poklesem ionizačního proudu. ECD je velmi selektivní zvláště k sloučeninám obsahujícím atomy halogenů, fosforu, síry, olova, k nitrosloučeninám a aromatickým uhlovodíkům. Jako nosného plynu se užívá dusíku, případně argonu s příměsí methanu, který potlačuje průběh nežádoucích reakcí v detektoru. Jeho citlivost závisí na elektronegativitě atomu a funkční skupině a na jejich procentuálním zastoupení v molekule [3].

Hmotnostní spektrometr

Hmotnostní spektrometr použitý jako strukturně selektivní detektor plynového chromatografu poskytuje informaci o výsledku separace komponent ve vzorku ve formě chromatogramu. Na rozdíl od jiných detektorů v GC jde o záznam nespojitý, hustota bodů je dána rychlostí skenování hmotnostního analyzátoru. Každému bodu na chromatogramu náleží hmotnostní spektrum charakterizující složení plynné směsi vstupující v daném čase do iontového zdroje. Pro strukturní charakterizaci úzkých zón látek eluovaných z kolony je nutno zvolit dostatečnou rychlost skenování, poskytující několik spekter během eluce zóny. Výhodné je použít rychle skenovatelných hmotnostních detektorů typu kvadrupólového filtru nebo iontové pasti. Důležitým experimentálním parametrem je zvolený hmotnostní rozsah. Současné kvadrupólové hmotnostní filtry a iontové pasti plně vyhovují nárokům GC s použitím kapilárních kolon a umožňují zvolit sken 0,1 s při spojitém hmotnostním rozsahu 35-500 m/z [4].

2.2 Derivatizace v plynové chromatografii

Plynovou chromatografií lze analyzovat pouze látky plynné a těkavé nebo látky, které lze definovaným způsobem převést do plynné fáze. Existuje množství polárních látek, které nelze přímo měřit, v takovém případě se použije derivatizační metody, tzn. chemické reakce analytu s příslušným derivatizačním činidlem. Tím dojde ke zvýšení (méně často snížení) jejich těkavosti a ke snížení polarit, protože mezimolekulární polární interakce jsou příčinou jejich nízké těkavosti. Mezi derivatizační reakce v GC lze zařadit esterifikace, silylace, a některé speciální reakce. Různé derivatizační reakce se hodí pro různé analyty, nelze určit zcela obecná pravidla derivatizace.

2.2.1 Esterifikace

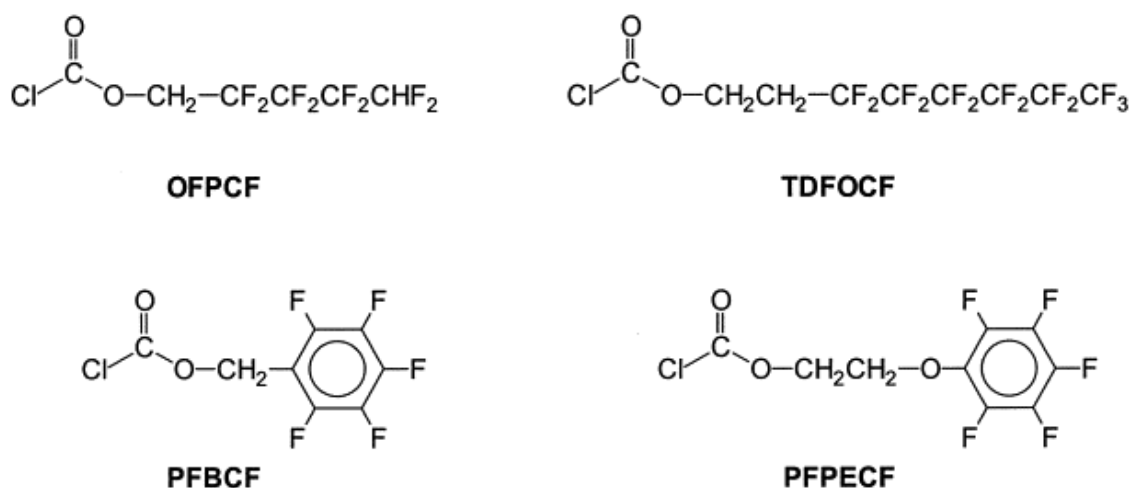
Obecně se esterifikací rozumí reakce alkoholu s kyselinou nebo jejím derivátem, např. anhydridem nebo amidem. Reakce příznivěji probíhá v kyselém prostředí, tedy za katalytického působení silné minerální kyseliny, např. kyseliny sírové. Stejně jako další derivatizační metody zvyšuje těkavost derivátů a dále brání například izomeraci nebo jiným efektům. Organické kyseliny jsou metodou GC ve většině případů analyzovány po předchozí esterifikaci. Pro mastné kyseliny se nejčastěji používá alkylace(methylace). Esterifikace se často provádí zahříváním s methanolem v přítomnosti kyselého katalyzátoru, např. HCl nebo BF₃. Pro lepší detekci v GC-ECD se místo methanolu používá trichlorethanol [5].

2.2.2 Silanizace

Silanizace, nejčastěji pak trialkylsilanizace, je nahrazení aktivního vodíku ve skupinách -OH, -NH₂, -NHR, -SH, -COOH za trialkylsilylovou skupinu. Nejstarší a nejpoužívanější je trimethylsilylová skupina (TMS). Je lehce připravitelná a zvyšuje těkavost, tepelnou stabilitu a GC symetrii původní sloučeniny. Nevýhodou je náchylnost k hydrolyze či solvolýze alkoholy. Další používané skupiny jsou dimethylsilylová(DMS), *terc*-butyldimethylsilylová, dimethylfenylsilylová, *terc*-butyldifenylsilylová, trifenylsilylová,(pentafluorofenyl)dimethylsilylová a jiné [6].

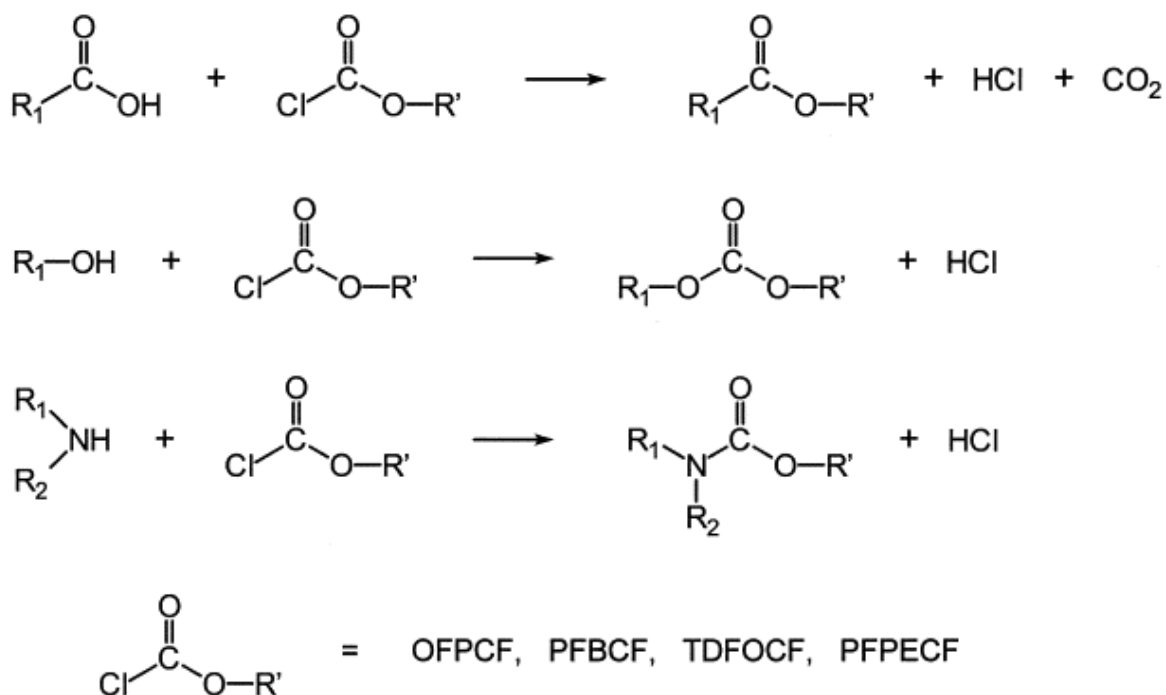
2.2.3 Esterifikace chlormravenčany

Tento druh esterifikace, který je podrobně zkoumán v posledních 10-15 letech, momentálně leží v popředí zájmu některých analytických chemiků. Chlormravenčany byly známy již na počátku 20.století v organické chemii jako zdroj takzvaných smíšených anhydridů, tyto však nebyly pro chromatografické účely dále studovány. Od poloviny století byl zkoumán potenciál chlormravenčanů jako derivatizačních činidel -NH₂ a -COOH skupin. Do popředí zájmu se dostaly díky snadné jedнокrokové derivatizaci derivátů karboxylových kyselin jako aminokyselin, hydroxykyselin a dikarboxylových kyselin [12]. V počátcích testování jejich derivatizačních vlastností se pozornost zaměřila na ty s nejjednoduššími alkyly, tedy methyl-, ethyl- a isobutylchlormravenčany [13]. Zvláštní skupinou chlormravenčanů jsou vysoce fluorované chlormravenčany, především 2,2,3,3,4,4,5,5-oktafluorpentylchlormravenčan (OFPCF), 3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-tridekafluoroktylchlormravenčan (TDFOCF), 2,3,4,5,6-pentafluorbenzylchlormravenčan (PFBCF), 2-(2,3,4,5,6-pentafluorfenoxy)ethylchlormravenčan (PFPECF) (Obrázek 1), jelikož významně snižují detekční limit derivatizovaných analytů pro GC-ECD a to až na fmoly.



Obrázek 1: Struktury vysoce fluorovaných chlormravenčanů (plné názvy viz Seznam zkratek)

Doposud nejsou komerčně dostupné, ale byly již publikovány postupy jejich syntézy (viz kap. 2.4). Chlormravenčany derivatizují karboxylové kyseliny na příslušné estery, alkoholy a fenoly na dialkyl estery kyseliny uhličitě a aminy na karbamidy. (viz Obrázek 2) [7,10].



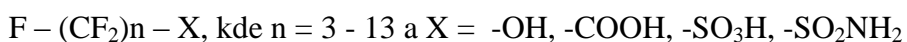
Obrázek 2: Schéma derivatizačních reakcí chlormravenčanů.

Dle studie [10] dosahuje nejlepších derivatizačních výsledků z hlediska všeobecné aplikovatelnosti na různé analyty OFPCF, zatímco PFBCF nachází specifické uplatnění v analýze aminoalkoholů. Výhodou provedené derivatizace chlormravenčany je rychlost, kdy celá reakce netrvá déle než deset minut. Navíc snadná syntéza, široká aplikovatelnost a nízká cena otevírá chlormravenčanům cestu k mnoha stále ještě neprobádaným způsobům jejich využití, např. v klinické či potravinářské chemii nebo k monitorování polutantů životního prostředí.

2.3 Perfluorované kyseliny

Perfluorované sloučeniny (PFC) jsou perzistentní organické látky, u kterých jsou všechny vodíky v alkylovém řetězci nahrazeny atomy fluoru. V životním prostředí se přirozeně nevyskytují, jsou potenciálně škodlivé a bioakumulativní. Mezi často zkoumané PFC patří skupina perfluorovaných kyselin (PFA), mezi které patří např. perfluorhexanová kyselina (PFHxA), perfluorheptanová kyselina (PFHpA) nebo perfluoroktanová kyselina (PFOA). Mezi PFC dále řadíme perfluoroktansulfonát (PFOS) a perfluoroktansulfonylamid (PFOSA).

Typická struktura PFA má lineární řetězec se 4 až 13 atomy uhlíku:



Perfluorované organické sloučeniny mají zcela odlišné fyzikální, chemické a biologické vlastnosti než jejich nefluorované analogy, což je zapříčiněno velkou elektronegativitou fluoru, který s uhlíkem tvoří silnou vysoce polarizovanou kovalentní vazbu (střední energie vazby C-F při 25 °C je 441 kJ/mol). Vzhledem k vysoké energii vazby jsou téměř všechny z organických fluorovaných sloučenin odolné vůči hydrolýze, fotolýze, biodegradaci a procesům v metabolismu. Perfluorované kyseliny jsou velmi silné, například nahrazením atomů vodíku u kyseliny oktanové za atomy fluoru na kyselinu perfluoroktanovou se sníží pK_a z 4,89 na 0,35.

PFC, nejčastěji ve formě alkylsulfonamidů a amidů, jsou využívány v mnoha průmyslových oblastech (např. v textilním průmyslu, papírenství, nebo v zemědělství). Dále se používají jako změkčovadla, v mazacích olejích, nátěrových hmotách, leštidlech a jako složky protipožárních pěn. Speciální hasící pěny obsahují některé perfluorované látky (konkrétně soli perfluoralkansulfonových kyselin), které podporují tvorbu vodní pěny (aqueous film forming foam, AFFF).

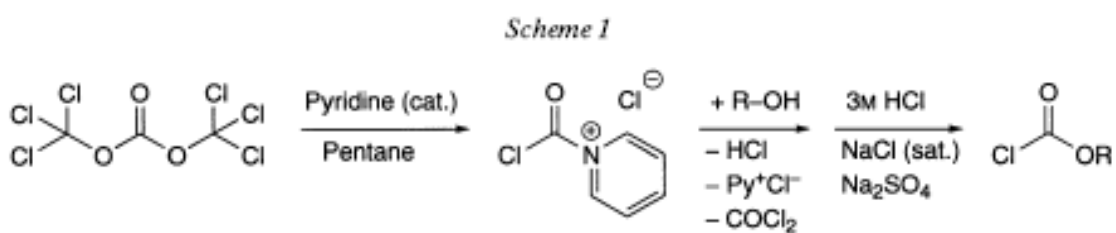
PFOA se používá jako pomocné činidlo při výrobě polytetrafluorethylenu (PTFE) známého spíše pod názvem Teflon. PTFE je také součástí různých laboratorních pomůcek, jako jsou např. SPE kolonky, těsnění a hadičky. PFOA pak může být přítomna ve stopových množstvích v těchto produktech.

Perfluorované látky se průmyslově vyrábějí 2 různými způsoby. Prvním z nich je proces elektrochemické fluorace, při němž dochází k nahrazení všech atomů vodíku v uhlovodíkovém řetězci atomy fluoru účinkem elektrického proudu. Je to celkem levná metoda, kterou lze získat směs převážně lineárních izomerů, rozvětvených izomerů (15

až 30 %), ale také nečistot s kratším řetězcem. Druhým důležitým výrobním procesem PFC je telomerizace, která vychází z reakce pentafluorjodethanu s tetrafluorethylenovými oligomery za vzniku směsi perfluoralkylderivátů [2,3].

2.4 Syntéza fluorovaných chlormravenčanu

Fluorované chlormravenčany jsou velmi reaktivní a nestabilní, stále ještě komerčně nedostupné, a proto je výhodné je připravovat v malých množstvích v pravidelných intervalech (optimálně dvouměsíčních). Naštěstí je jejich syntéza v dnešní době rychlá, nenákladná a bezriziková s vysokými výtěžky požadovaného chlormravenčanu. Původní syntéza fluorovaných chlormravenčanu dle [8,10] byla z bezpečnostního hlediska rizikovou záležitostí, protože v ní figurovala práce s plyným fosgenem. Dalším rizikovým faktorem byla destilace reakční směsi, kdy opět hrozil únik fosgenu. Nahrazení plynného fosgenu krystalickým bis(trichlormethyl)uhličitanem (Trifosgen) vedlo k významnému snížení rizika, stejně tak jako nahrazení tříhrdlé reakční baňky vialkou se septem [9]. Nutnost destilace byla odstraněna výběrem vhodnějšího rozpouštědla, pentanu, jak pro rozklad pevného Trifosgenu, tak pro vlastní syntézu chlormravenčanu z příslušného alkyl- či aryl-alkoholu [7].



Obrázek 3: Schéma syntézy chlormravenčanu z Trifosgenu za katalýzy pyridinem.

3. Experimentální část

3.1 Chemikálie

Použitými chemikáliemi byl hexan (99%, Baker Analyzed, Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holandsko), acetonitril (p.a., Lichrosolv, Merck, Darmstadt, Německo), aceton, isobutylalkohol (oba p.a., Lach.-Ner, s.r.o., Neratovice, Česká republika), pyridin (99%), chlormravenčan isobutylnatý (98%, oba Aldrich, Steinheim, Německo), 2,3,4,5,6-pentafluorbenzylalkohol (98%, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo), DCC (>99,0% ,Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo),

3.2 Přístrojové vybavení

Analýzy byly prováděny na plynovém chromatografu PU 4600, (Unicam Analytical Systems, York Street, Cambridge, CB 12PX, Velká Británie) s detektorem elektronového záchytu (ECD). Nosným plynem byl dusík (4.7, Linde Technoplyn). Většina měření byla uskutečněna na nízko polární koloně SPB-5 (Supelco, Bellefonte, USA o délce 15 m, vnitřním průměru 0,25 mm a tloušťce filmu 0,25 μm , 5 % difenyl, 95 % dimethylpolysiloxan). Sběr dat a zpracování výsledků bylo provedeno v programu CSW 1.7 (DataApex s.r.o., Jinonice, Česká republika). Dále bylo měřeno na plynovém chromatografu s hmotnostním spektrometrem GCMS-GP5050A, (Shimadzu Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japonsko) s kolonou SPB-35 (Supelco, Bellefonte, USA, o délce 30 m, vnitřním průměru 0,25 mm a tloušťce filmu 1 μm , 35 % difenyl, 65 % dimethylpolysiloxan). Nosným plynem bylo helium (6.0, Linde). K dispozici byl hmotnostní spektrometr s EI ionizací (energie 70 eV).

Ke sběru dat sloužil program LabSolution (GCMSsolution 1.2, Shimadzu). K interpretaci hmotnostních spekter byla použita knihovna spekter NIST 05 (NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, National Institute of Standards and Technology, USA). Reakční směs byla externě chlazená na digitálním termostatu (SBH130DC, Stuart, Barloworld Scientific, Staffordshire, Velká Británie) připojeném

hadicemi k dvouplášťové elektrochemické skleněné nádobce. Reakční směs byla míchána na elektrické míchače (Heidolph MR 3001, Heidolph, Německo)(viz foto). Vzorky byly vytřepávány na třepače (Vortexgenie 2, Scientific Industries, Hampshire, Velká Británie) a promíchávány v ultrazvukové lázni (Sonorex RK 100, Bandelin, Barlen, Německo). K pipetování sloužily automatické pipety 1-5 ml, 100-1000 μ l a 10-100 μ l (všechny Biohit, Helsinky, Finsko), 100 μ l (Hamilton, Reno, USA) a 5 μ l (Plastomed, Polsko). K dávkování do plynového chromatografu byla používána 5 μ l stříkačka (Hamilton, Reno, USA).



3.3 Příprava zásobních roztoků

Byly připraveny zásobní roztoky kyseliny oktanové a perfluoroktanové. Bylo naváženo přibližně 100 mg přesně oktanové kyseliny (OA) na analytických vahách v odměrce a doplněno na 10 ml acetonitrilem. Tím byl získán zásobní roztok o koncentraci 10 mg/ml oktanové kyseliny, tedy 10 000 ppm. Pro derivatizace byl zásobní roztok ředěn na 0,5 mg/ml, tedy na 500 ppm. Pro derivatizaci kyseliny

perfluoroktanové byl použit již hotový roztok o koncentraci 10 mg/ml perfluoroktanové kyseliny, který byl příslušně ředěn.

3.4 Příprava 2,3,4,5,6-pentafluorbenzylchlormravenčanu

Příprava 2,3,4,5,6-pentafluorbenzylchlormravenčanu (PFBCF) byla provedena dvěma různými postupy a to 1. a 2. šarže dle [modifikovaná 7] a 3.šarže dle [7].

1.šarže

Bylo naváženo 1,0560 g Trifosgenu, který byl rozpuštěn v 11 ml n-pentanu v chlazené elektrochemické cele. Tato reakční směs byla po celou dobu přípravy chlazená na 0°C. Bylo přidáno 160 µl pyridinu a reakční směs byla poté jednu hodinu míchána pomocí elektrické míchačky. Vznikající plyn byl odváděn do roztoku uhličitanu sodného o koncentraci 1 mol/l. Poté bylo rozpuštěno 396 mg 2,3,4,5,6-pentafluorbenzylalkoholu v 8 ml n-pentanu, přičemž roztok byl následně rozdělen na čtyři stejné 2 ml podíly, které se postupně ve dvacetiminutových intervalech přidávaly k reakční směsi. Celá reakce se nechala probíhat přes noc. Druhý den byla směs extrahována 5 ml kyseliny chlorovodíkové o koncentraci 3 mol/l a 5 ml nasyceného roztoku chloridu sodného.

2.šarže

Příprava PFBCF byla provedena postupem jako u 1.šarže s tím, že místo n-pentanu byl použit jako rozpouštědlo aceton o objemu 5ml v reakční směsi a 8 ml v roztoku alkoholu. Směs nebyla druhý den extrahována.

3.šarže

Příprava PFBCF byla provedena jako u 1.šarže s tím, že reakční směs byla připravena ve 20 ml vialce se septem. Vialka byla umístěna v elektrochemické cele naplněné denaturovaným ethanolem. Vznikající plyn byl před každým přidavkem alkoholu odebírán stříkačkou a toutéž stříkačkou byl i aplikován do reakční směsi.

3.5 Derivatizace

3.5.1 Derivatizace kyseliny oktanové a perfluoroktanové na isobutylester

Derivatizace byla provedena dle [11] ve skleněných vialkách o objemu 2 ml pro OA a polypropylenových vialkách o objemu 2 ml pro PFOA. Reakční médium bylo připraveno o následujícím složení: 20 µl roztoku příslušné kyseliny v acetonitrilu, 168 µl acetonitrilu, 8 µl isobutylalkoholu, 4 µl pyridinu a 10 µl chlormravenčanu isobutylnatého jako reakčního činidla. Směs byla míchána přibližně 20 s v ultrazvukové lázni a poté nechána v klidu po dobu 10 minut. Po přidavku 200 µl hexanu byla celá směs 1 minutu protřepávána na třepačce, poté byla odebrána horní hexanová fáze do čisté 500 µl vialky .

3.5.2 Derivatizace kyseliny oktanové a perfluoroktanové na pentafluorbenzylester

Derivatizace chlormravenčanem byla provedena dvěma různými postupy a to dle [11] a dle [7].

1.postup dle [11]

Derivatizace byla provedena ve skleněných vialkách o objemu 2 ml pro OA a polypropylenových vialkách o objemu 2 ml pro PFOA. Reakční médium bylo připraveno o následujícím složení: 20 µl roztoku příslušné kyseliny v acetonitrilu, 168 µl acetonitrilu, 4 µl pyridinu a 18 µl připraveného PFBCF jako reakčního činidla. Směs byla míchána přibližně 20 s v ultrazvukové lázni a poté nechána v klidu po dobu 10 minut. Po přidavku 200 µl hexanu byla celá směs 1 minutu protřepána na třepačce, poté byla odebrána horní hexanová fáze do čisté 500 µl vialky .

2.postup dle [7]

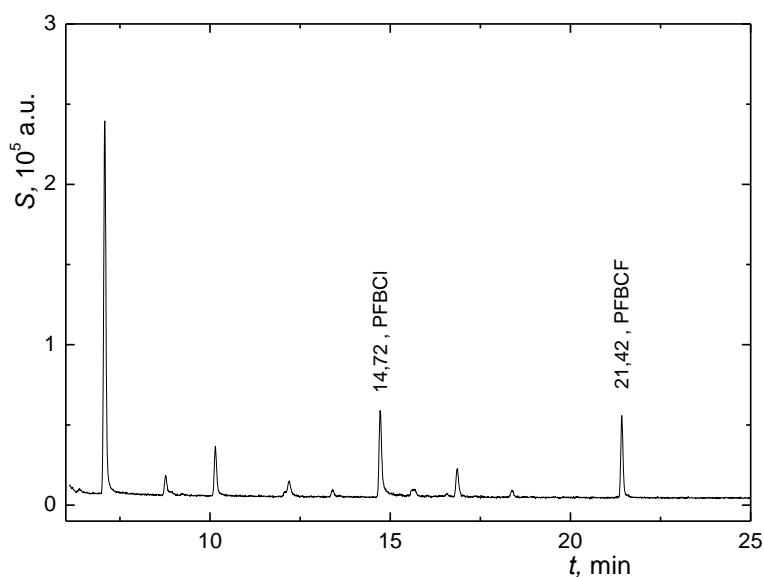
Derivatizace byla provedena ve skleněných vialkách o objemu 10 ml pro obě kyseliny. Reakční médium bylo připraveno o následujícím složení: 2 ml roztoku příslušné kyseliny v acetonitrilu, 150 μ l 3M NaOH, 150 μ l roztoku PFBCF jako reakčního činidla, 3 μ l nasyceného roztoku DCC v pyridinu (400g/l) pro zvýšení výtěžku. Směs byla míchána přibližně 20 s v ultrazvukové lázni a poté nechána v klidu po dobu 10 minut. Po přidavku 600 μ l hexanu byla celá směs 1 minutu protřepávána na třepačce, poté byla odebrána horní hexanová fáze do čisté 500 μ l vialky .

4. Výsledky a diskuze

4.1 Analýza syntetizovaných činidel

Analýza metodou GC-MS v režimu scan

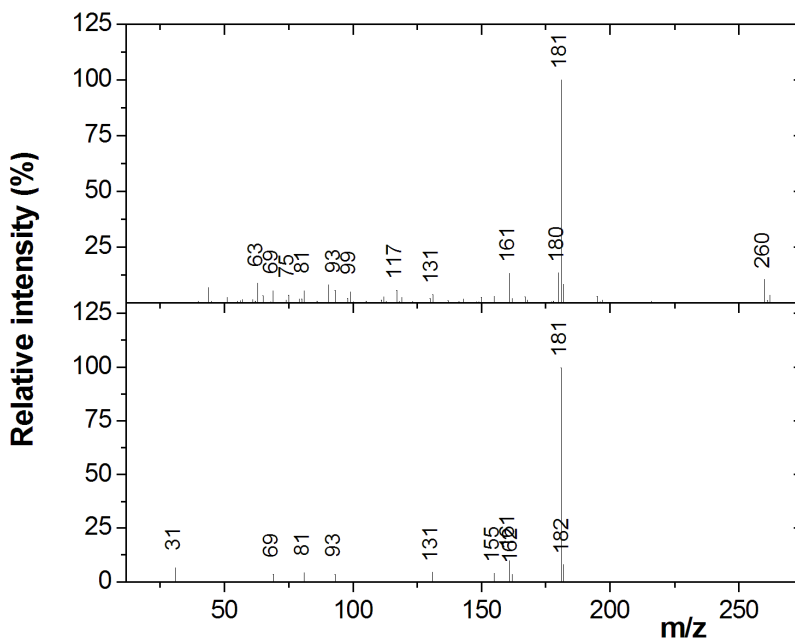
Byla provedena analýza v GC-MS v režimu scan z důvodu identifikace složek v reakční směsi (viz. Obr. 4).



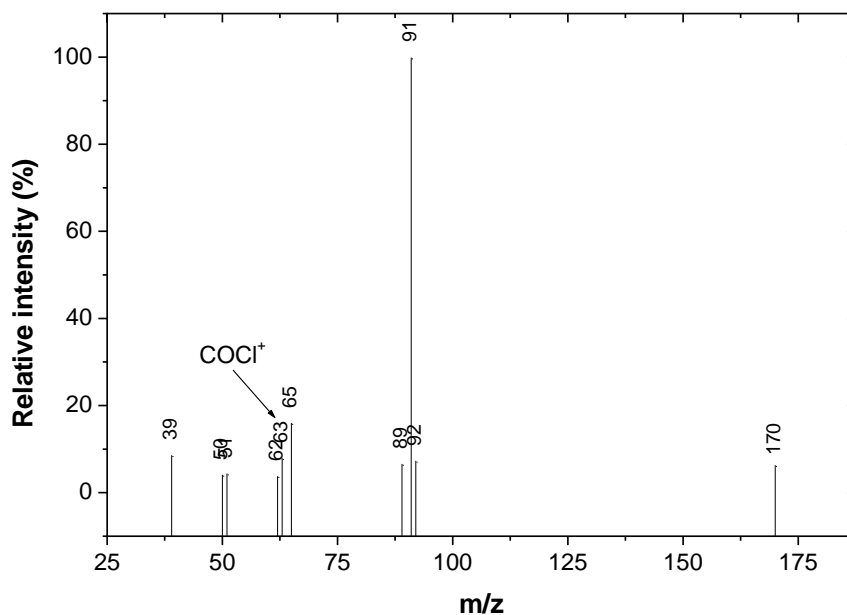
Obrázek 4: Chromatogram GC-MS analýzy reakční směsi 1. šarže, scan 40-560 m/z, 1000 m/z/s. Teplotní program: 60 °C (5 min) do 170 °C (10 min) při 10 °C/min, kolona SPB-35, dávkovaný objem 1 μ l, teplota injektoru 250 °C, teplota detektoru 250 °C.

Byla provedena analýza hmotnostních spekter nejvyšších píků za pomoci knihovny spekter NIST (National Institute of Standards and Technology). Pík v $t_R = 21,42$ min byl knihovnou NIST identifikován jako pentafluorbenzylbromid (PFBBr) s $M_r = 260$, jelikož spektrum syntetizovaného PFBCF není v knihovně NIST obsaženo a dále mají téměř identickou M_r ($M_{r,PFBBr} = 259,926$, $M_{r,PFBCF} = 259,926$; pozn. všechny M_r uváděné v této práci jsou monoizotopické). Srovnání MS spektra PFBBr z knihovny NIST a naměřeného spektra PFBCF je na obr. 5. Vzhledem k tomu že při syntéze nebylo použito bromu ani jeho sloučenin, lze PFBBr s velkou pravděpodobností vyloučit. Porovnáním naměřeného hmotnostního spektra a spektra z knihovny NIST pro benzylchlormravenčan byl nalezen specifický fragment o m/z 63, který odpovídá fragmentu COCl^+ , kterýžto nemůže pocházet z bromidu, ale pouze z chlormravenčanu (viz. Obr. 6). Jde tedy s vysokou pravděpodobností o PFBCF.

Pík v $t_R = 14,72$ min byl identifikován s vysokou pravděpodobností jako PFBCl, který může vznikat buď jako vedlejší produkt při syntéze nebo při nástřiku dekarboxylací PFBCF. Ostatní píky patří látkám z použitého rozpouštědla (vyšší uhlovodíky z hexanu) nebo pomocným látkám použitým při syntéze (pyridin).



Obrázek 5: Hmotové spektrum PFBBr (dole) z knihovny NIST 05 a naměřené GC-MS hmotové spektrum PFBCF (nahore).



Obrázek 6: Hmotové spektrum benzylchloroakrylátu z knihovny NIST 05.

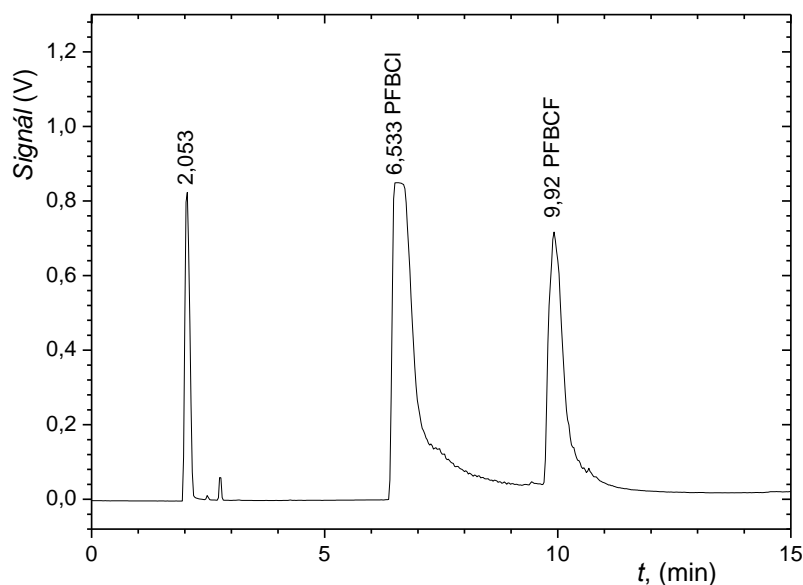
Stejně analýzy byly provedeny i pro šarže 2 a 3, které poskytnuly píky se stejnými spektry, ale obsahovaly více nečistot.

Analýza metodou ECD

Byla provedena analýza na GC-ECD z důvodu identifikace složek v reakční směsi.

Přímým srovnáním s GC-MS vidíme, že citlivost je rozdílná, ale nebyla z časových důvodů blíže studována. Podrobnější studium srovnání citlivosti obou metod bude naplní další práce. Navíc byly použity kolony o různé délce, tloušťce filmu a mírně rozdílné stacionární fáze, přesto lze předpokládat že retenční pořadí látek v obou kolonách bude stejné.

Jak je z obrázku 7 patrné, ECD má vyšší citlivosti než GC-MS ve scan modu. X1. Jako PFBCF byl identifikován peak o $t_R = 9,92$ min a jako PFBCI byl identifikován peak o $t_R = 6,53$ min, identifikace ostatních peaků nebyla provedena. Analýza vzorku šarže 2 a 3 potvrdila, že vzorky obsahují více nečistot.



Obrázek 7: Chromatogram GC-ECD analýzy reakční směsi 1. šarže, teplotní program: 60 °C (5 min) do 200 °C (10 min) při 10 °C/min, kolona SPB-5, dávkovaný objem 1 µl, teplota injektoru 250 °C, teplota detektoru 250 °C.

NMR

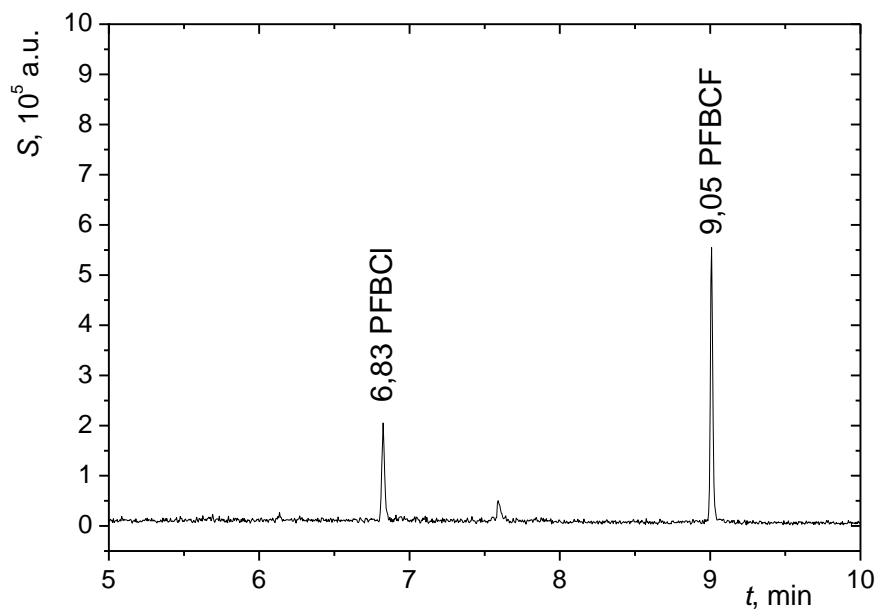
Připravené šarže 1 a 2 byly analyzovány na katedře organické chemie Mgr. Hybelbauerovou metodou nukleární magnetické rezonance (NMR). Dle její analýzy naměřených spekter a chemických posunů a porovnáním s publikovaným spektrem [14] byla označena jako šarže s vyšším výtěžkem šarže číslo 1, což bylo následně dokázáno analýzou kyselin derivatizovaných touto šarží (viz dále). U šarže č. 2 byla identifikace PFBCF ztížena přítomností nečistot.

Spektra PFBCF 1. šarže: ^1H NMR spektrum (400 MHz, CDCl_3) δ 5,42 (2H, bt, $J=1,6\text{Hz}$), ^{13}C NMR spektrum (400 MHz, CDCl_3) δ 150,46 144,23 m, 141,61 m, 140,01 m, 107,00, 59,30 ^{19}F NMR spektrum (400 MHz, CDCl_3) δ -141,25 (2F, m), -150,19 (1F, tt), -160,82 (2F, m).

GC-NCI-MS

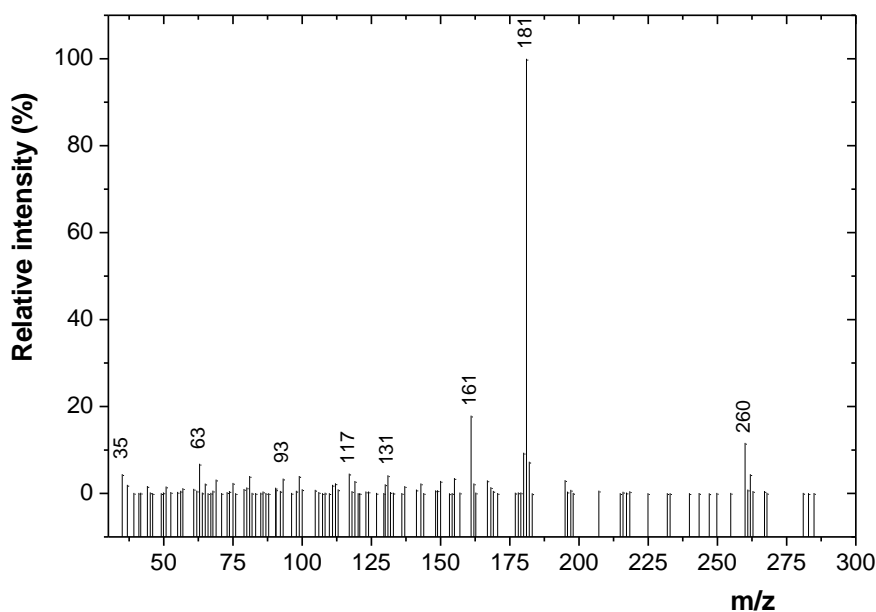
Jako další metoda identifikace PFBCF byla zvolena metoda GC-NCI-MS, kterou laskavě provedl pan dr. Štícha z katedry organické chemie PřF UK v Praze. Na obr. 8 je

zobrazen chromatogram šarže 1. a jeho srovnáním s obr. 4 je patrné, že chemická ionizace v negativním módu poskytuje chromatogram s menším počtem peaků. Důvodem je vysoká selektivita ionizačního procesu pro halogenované látky.



Obrázek 8: Chromatogram GC-NCI-MS analýzy reakční směsi 1. šarže, DB-5MS 15 m, 0,25 mm, 0,25 μ m.

Na obr. 9 je uvedeno NCI-MS spektrum PFBCF, které je velmi podobné naměřenému EI-MS spektru (viz obr. 5).



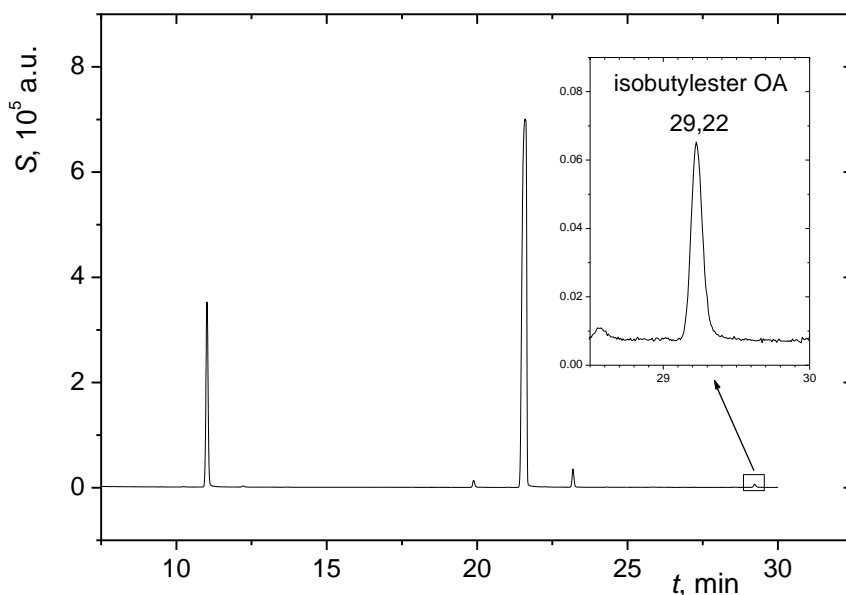
Obrázek 9: NCI hmotové spektrum PFBCF.

4.2 Analýza derivátů kyseliny oktanové a perfluoroktanové

Aby bylo možné provést srovnání syntetizovaného derivatizačního činidla pro různé substráty, byly provedeny derivatizace jak OA tak i PFOA s IBCF a PFBCF.

4.2.1 Isobutylester kyseliny oktanové

Na začátku byla provedena derivatizace OA s IBCF, aby byla ověřena funkčnost derivatizačního procesu a použité instrumentace (Obr. 8). Je zřejmé, že analýzu na ECD nelze použít, protože ECD neposkytuje dostatečný signál. Analýza na GC-MS prokázala čtyři peaky. Peak v t_R 29,22 min byl srovnáním s NIST databází identifikován jako isobutylester OA. Lze předpokládat, že derivát PFOA bude mít kratší t_R , protože zavedení halogenových jednotek do molekuly obecně zvyšuje těkavost.



Obrázek 10: Chromatogram GC-MS analýzy isobutylesteru OA, experimentální podmínky jako u obr. 4.

Tím že byl identifikován isobutylester OA bylo potvrzeno, že je instrumentace v pořádku a derivatizační postup lze použít. V dalším kroku bylo přistoupeno k derivatizaci OA s PFBCF, protože z předešlé práce [11] je zřejmé, že reaktivita perfluorovaných analogů mastných kyselin je odlišná.

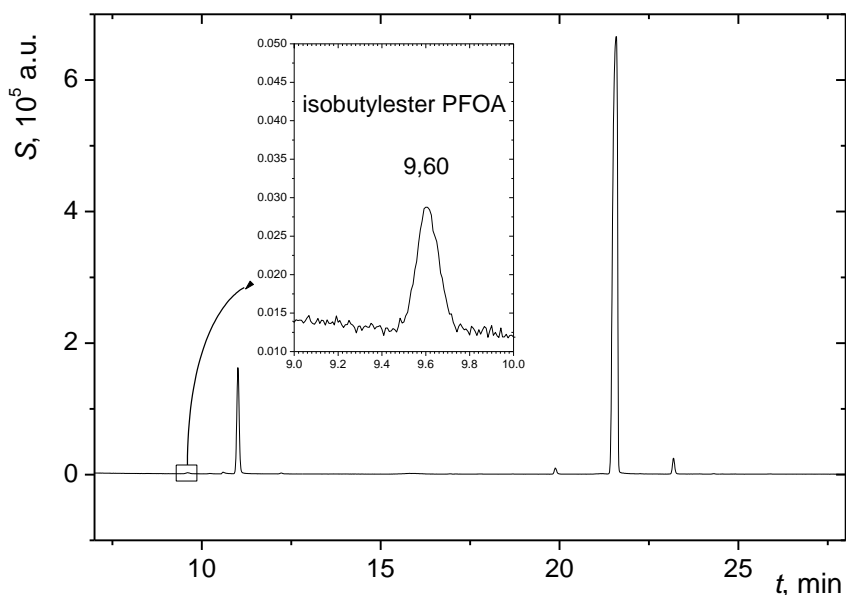
4.2.2 Pentafluorbenzylester kyseliny oktanové

Jelikož derivát mastné kyseliny obsahuje halogeny, je možná analýza jak na GC-ECD tak na GC-MS. Jelikož se retenční čas pentafluorbenzylesteru OA nalézá mimo časový úsek analýzy (byl větší než 35 min), nebyla tato sloučenina v chromatogramu nalezena a identifikována. Chromatogramy z GC-ECD byly relativně komplikované s velkým počtem středních a drobných peaků (včetně negativních), což velmi ztěžovalo orientaci a identifikaci peaků. Derivatizace byly provedeny dle 1. i 2. postupu.

4.2.3 Isobutylester kyseliny perfluoroktanové

Pro úplnost byla rovněž provedena derivatizace PFOA na isobutylester, i když tyto deriváty podrobně studovala práce [11]. Peak v $t_R = 9,60$ (viz. obr. 9) byl identifikován jako isobutylester PFOA pomocí NIST knihovny.

Srovnáním isobutylesterů OA a PFOA je vidět, že dojde ke zkrácení t_R z 29,22 min pro isobutylester OA na 9,60 min pro isobutylester PFOA. Tento posuv je důkazem, že úplným nahrazením vodíku fluory v molekule mastné kyseliny dojde k dramatickému zkrácení t_R za stejných experimentálních podmínek. Pro analytické využití z toho vyplývá zkrácení času analýzy při stanovení PFOA, ovšem může to vést také ke koeluci s případnými nečistotami, které běžně eluují na začátku analýzy.

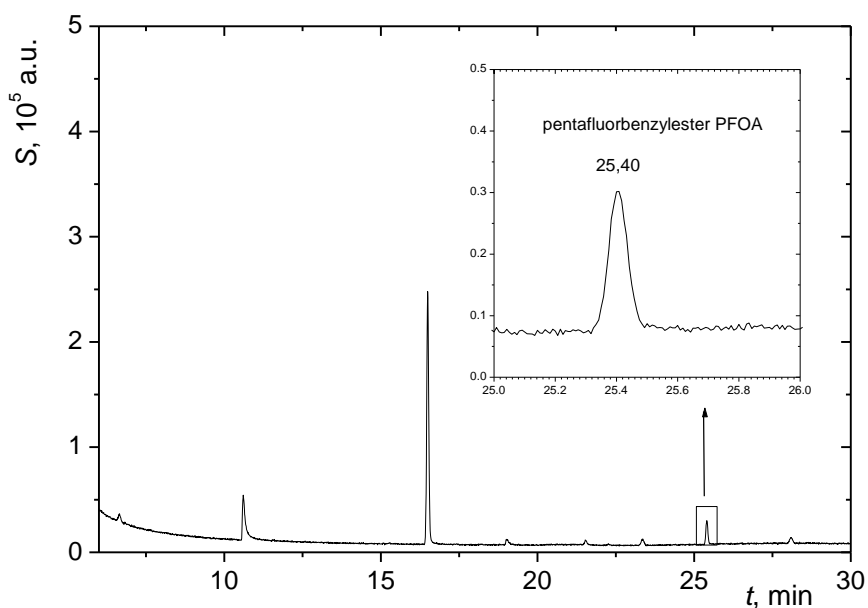


Obrázek 11: Chromatogram GC-MS analýzy isobutylesteru PFOA, experimentální podmínky jako u obr. 4.

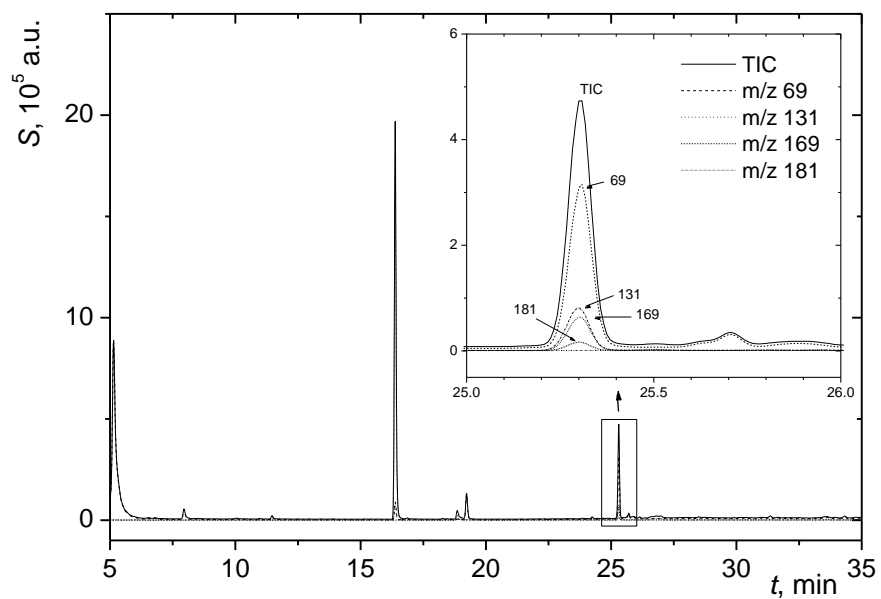
4.2.4 Pentafluorbenzylester kyseliny perfluoroktanové

Pro ověření možnosti derivatizace perfluorovaných mastných kyselin PFBCF byla provedena derivatizace PFOA dle 2. postupu [7], protože první postup poskytoval velmi nízké výtěžky. Příklad analýzy pentafluorbenzylesteru PFOA je uveden na obr. 10. Peak v $t_R 25,4$ min vykazoval v MS spektru fragmenty odpovídající jak pentafluorbenzylu

(např. m/z 181), tak i fragmenty odpovídající PFOA (např. m/z 169), a proto byl identifikován jako pentafluorbenzylester PFOA (NIST odpovídající MS spektrum neobsahuje). Ze srovnání t_R pentafluorbenzylesteru OA a PFOA vyplynulo, že nahrazením isobutylu pentafluorbenzylem dojde k dramatickému zvýšení retenčního času z 9,60 min na 25,40 min, což má za následek prodloužení doby analýzy PFOA. Velkou výhodou této metody derivatizace je, že zavedení vysoce fluorované molekuly pentafluorbenzylu do molekuly esteru vede ke značnému zvýšení jeho M_r , což zvětší jeho odstup od molekulových hmot běžných nečistot a vedlejších produktů reakce. To má za následek zlepšení poměru signálu k šumu, což se projeví snížením limitů detekce a stanovitelnosti. Srovnáním vložených obrázků v obr.12 a 13 je vidět, že měření v GC-MS SIM módu vede ke značné redukci šumu oproti scan módu. Pro případné zkrácení doby analýzy pentafluorbenzylesteru PFOA lze použít vhodnější teplotní program GC měření.



Obrázek 12: Chromatogram GC-MS analýzy pentafluorbenzylesteru PFOA 1. šarže, experimentální podmínky jako u obr. 4.



Obrázek 13: GC-MS chromatogram pentafluorbenzylesteru PFOA v SIM módu, podmínky měření viz obr. 4.

5. Shrnutí a závěr

1. Byly syntetizovány PFBCF dle publikovaných metod za použití dvou rozpouštědel. Celkem byly připraveny tři šarže, dvě v pentanu a jedna v acetonu.
2. Syntetizovaný PFBCF byl identifikován metodami GC-MS, GC-NCI-MS a NMR. Všechny použité metody prokázaly přítomnost PFBCF.
3. Připravený PFBCF byl použit pro derivatizaci OA a PFOA. Byly využity dva derivatizační postupy, přičemž postup dle [7] se ukázal vhodnějším pro PFOA.
4. Lze konstatovat, že GC-ECD je citlivější než GC-MS ve scan modu. Srovnání citlivosti GC-ECD a GC-MS v sim modu nebylo z časových důvodů provedeno a bude předmětem další práce.

6. Seznam zkratek

DCC	– N,N'-dicyklohexylcarbodiimid
GC-ECD	– plynová chromatografie s detektorem elektronového záchytu
GC-MS	– plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
GC-NCI-MS	– plynová chromatografie s hmotnostní detekcí a negativní chemickou ionizací
GC-MS-MS	– plynová chromatografie s dvojitým hmotnostním detektorem
IBCF	– isobutylchlormravenčan
NMR	– nukleární magnetická rezonance
NIST	– National Institute of Standards and Technology
OA	– oktanová kyselina
PFC	– perfluorovaná sloučenina
PFA	– perfluorkarboxylová kyselina
PFDS	– perfluordekansulfonát
PFHpA	– perfluorheptanová kyselina
PFHxA	– perfluorhexanová kyselina
PFHxS	– perfluorhexansulfonát
PFOA	– perfluoroktanová kyselina
PFOS	– perfluoroktansulfonát
PFOSA	– perfluoroktansulfonamid
PFOA	– perfluoroktanová kyselina
PFBCF	– 2,3,4,5,6-pentafluorbenzylchlormravenčan
PFBCl	– 2,3,4,5,6-pentafluorbenzylchlorid
PFBBr	– 2,3,4,5,6-pentafluorbenzylbromid
tM	– mrtvý čas mobilní fáze
tR	– retenční čas
tR'	– redukovaný retenční čas
Trifosgen	– bis(trichlormethyl)uhličitán

7. Použitá literatura

- [1] Krištof M.
Analýza vybraných lipofilních látek v potravinových vzorcích
Diplomová práce, Chemický ústav, Univerzita Komenského v Bratislavě (2008)
- [2] Maradová D.
Prekoncentrace a stanovení perfluorovaných organických kyselin metodou plynové chromatografie
Diplomová práce, Katedra analytické chemie UK(2008)
- [3] Churáček J. a kolektiv
Analytická separace látek
Praha, SNTL (1990)
- [4] Štulík K. a kolektiv
Analytické separační metody
Praha, Nakladatelství Karolinum (2005)
- [5] Eder K.
GC analysis of fatty acids methyl esters
J. Chromatogr. ., 671,113 (1995)
- [6] van Look G., Simchen G., Heberle J.
Silylating Agents
Fluka Chemical Corp., ISBN 3-905616-13-7
- [7] Vincenti M., Ghiglione N., Valsania M. C., Davit P., Richardson S.D.
Synthesis of highly fluorinated chloroformates and their use as derivatizing agents for hydrophilic compounds and drinking-water-disinfection by-products
Helvetica Chimica Acta Vol. 87(2004)
- [8] Maurino V.,Minero C.,Pelizzetti E.,Angelino S.,Vincenti M.
Ultratrace determination of highly polar hydrophilic compounds by 2,2,3,3,4,4,5,5-octafluoropentyl chloroformate-mediated derivatization directly in water
J. Am. Soc. Mass Spectrom. 1999,10,1328

- [9] Abe I.,Fujimoto N.,Nishiyama T.,Terada K.,Nakahara T.
Rapid analysis of amino acid enantiomers by chiral-phase capillary gas chromatography
J. Chromatogr.,A 1996,722, 221
- [10] Vincenti M.,Biazzi S. , Ghiglione N., Valsania M ,Richardson S.D.
Comparison of Highly-Fluorinated Chloroformates as Direct Aqueous Sample Derivatizing Agents for Hydrophilic Analytes and Drinking-Water Disinfection By-Products
J. Am. Soc. Mass Spectrom. 16.6,2005,803-813
- [11] Dufková V.
Stanovení perfluorovaných polutantů metodou GC a GC-MS
Diplomová práce, Katedra analytické chemie UK(2007)
- [12] Hušek
Chloroformates in gas chromatography as general purpose derivatizing agents
J. Chromatogr. B,717 (1998) 57-91
- [13] Hušek
Improved procedure for the derivatization and gas chromatographic determination of hydroxycarboxylic acids treated with chloroformates
J. Chromatogr. ., 630,429 (1993)
- [14] Lee J.M., Norton S. J.
Pyrethroid-like Carbamates Having insecticidal Activity
J. Agric. Food Chem. 1990, 38, 273-278