

UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra analytické chemie

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Karolína BLECHOVÁ

**PŘÍPRAVA NOVÝCH POLYMERNÍCH VLÁKEN
PRO HEADSPACE GC ANALÝZY**

**PREPARATION OF NEW POLYMERIC FIBERS
FOR HEADSPACE GC ANALYZES**

Diplomová práce

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

Praha 2017

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.

V Praze dne 18. 5. 2017

.....

podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému školiteli doc. RNDr. Radomíru Čabalovi, Dr., RNDr. Janu Fischerovi, Ph.D. a Mgr. Miroslavě Bursové za trpělivost a rady poskytnuté během měření a vypracování této práce. Dále pak rodičům za umožnění studia a podporu poskytovanou během studií.

Abstrakt

Tématem této diplomové práce byla příprava vláken s novou polymerní fází na bázi polycyklofosfazenů pro headspace mikroextrakci na pevné fázi s následnou separací na plynovém chromatografu.

Na povrch platinových drátků byla pomocí elektrochemické polymerizace deponována vrstva poly(cyklofosfazen-benzochinonu). Charakteristika polymerní vrstvy byla ověřena pomocí infračervené spektroskopie.

Nový polymerní materiál byl využit jako stacionární fáze pro headspace mikroextrakci na pevné fázi. Pro testování selektivity filmu byly zvoleny dva odlišné modelové roztoky, směs uhlovodíků v pentanu a alkoholů ve vodě. Bylo zjištěno, že testovaná směs uhlovodíků se na film extrahuje lépe, než modelová směs alkoholů.

Extrakce vzorku se směsí alkoholů byla optimalizována pomocí experimentálního designu, který umožňuje určit faktory a jejich kombinace, které mají na zkoumanou odpověď nejvýznamnější vliv. Program Minitab 16 vyhodnotil konečná optima pro jednotlivé alkoholy i pro součet absolutních ploch píků celé směsi. Separace modelových látek byla provedena pomocí plynového chromatografu s plamenově ionizačním a hmotnostním detektorem.

Klíčová slova

elektrochemická polymerizace, poly(cyklofosfazen-benzochinonový) film, mikroextrakce na pevné fázi, plynová chromatografie

Abstract

The topic of this thesis was the preparation of fibers with new polymeric cyclophosphazene phase for a headspace microextraction on a solid phase followed by a separation on a gas chromatograph.

The surface of platinum wires was covered by a layer of poly (cyclo) phosphazene-benzoquinone using electrochemical polymerization. The characteristic of the polymer layer was subsequently verified by the infrared spectroscopy.

The new polymeric material was used as a stationary phase a for solid-phase headspace microextraction. Two different model solutions, a mixture of hydrocarbons in pentane and alcohols in water, were selected to test the selectivity of the film. It has been found that the films are extracting better hydrocarbons than alcohols.

The extraction of the alcohol mixture sample was optimized by the experimental design, which makes it possible to determine the factors and their combinations, which have the greatest influence on the investigated response. A Minitab 16 program evaluated the final optima for individual alcohols as well as for the sum of the absolute areas of the whole mixture. A separation of model analytes was performed using a gas chromatograph with flame ionization and mass detector.

Keywords

electrochemical polymerization, poly (cyclo) phosphazene-benzoquinone film, solid phase microextraction, gas chromatography

Obsah

Abstrakt	4
Abstract.....	5
Obsah.....	6
Seznam zkratk a symbolů	8
1 Úvod	9
2 Teoretická část.....	10
2.1 Cyklické fosfazený	10
2.1.1 Hexachlorocyklotrifosfazen	11
2.2 Elektrochemická syntéza PPBQ filmu.....	12
2.3 Mikroextrakce na pevné fázi (SPME).....	14
2.3.1 Zařízení pro SPME.....	15
2.3.2 Fyzikálně – chemický princip metody SPME	16
2.3.3 Optimalizace SPME	17
2.4 Optimalizace	19
3 Experimentální část	23
3.1 Použité chemikálie	23
3.2 Použité přístroje	23
3.3 Čištění platinových drátků	25
3.4 PPBQ film - příprava	25
3.5 Kondicionace vlákna.....	26
3.6 Headspace extrakce vzorků	26
3.7 Experimentální podmínky GC separace	26
4 Výsledky a diskuze.....	28
4.1 Elektrochemická syntéza PPBQ filmu.....	28
4.2 Charakteristika PPBQ filmu pomocí infračervené spektroskopie	33
4.3 Aplikace PPBQ filmu	35
4.3.1 Extrakce uhlovodíků	35
4.3.2 Extrakce alkoholů.....	38

4.4. Optimalizace extrakčních podmínek pro alkoholy	40
4.4.1 Výběr faktorů a odpovědí.....	40
4.4.2 Screening.....	40
4.4.3 Modelování.....	43
4.4.4 Optimalizace.....	46
5 Závěr.....	48
Použité zdroje	49

Seznam zkratk a symbolů

ANOVA	analýza rozptylu
BQ	benzochinon
DOE	experimentální design (Design of Experiment)
CCD	central composite design
fcCCD	face centered Central Composite Design
FID	plamenově ionizační detektor
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GC-MS	plynový chromatograf s hmotnostním spektrometrickým detektorem
OFAT	jednofaktorová optimalizace (One Factor at Time)
PPBQ	poly(cyklofosfazenbenzochinon)
SPME	mikroextrakce na pevné fázi
TBATFB	tetrabutylamonium tetrafluoroborát
TIC	Total Ion Current

1 Úvod

Trendem posledních let je vývoj nových prekoncentračních metod a technik, které se používají pro extrakci analytů z odlišných matric. Jednou z nich je metoda mikroextrakce na pevné fázi (SPME). Tato metoda je jednoduchá, vysoce citlivá, přesná a správná sorpčně-desorpční technika sloužící k zakoncentrování analytu, kterou v r. 1989 vyvinul Janusz Pawliszyn se svým kolektivem¹. Po dobu extrakce jsou analyty ze vzorku sorbované přímo na vlákno, které je potaženo vrstvou chemicky vázané stacionární fáze. Tato izolační technika je kombinací extrakce a prekoncentrace v jednom kroku, zároveň je možná i následná separace analytů pomocí plynové chromatografie s plamenově ionizační (GC-FID) nebo hmotnostní (MS) detekcí, kapalinové chromatografie, či kapilární elektroforézy.

Pro SPME existuje omezené množství komerčních stacionárních fází, proto je kladen důraz na vývoj polymerů, které mají vhodné chemické a fyzikální vlastnosti. V rámci hledání nového vysoko chemicky a termálně stabilního materiálu byl objeven polymer, který Dr. Mira Josowicz ve spolupráci se svými kolegy studovala². Pomocí elektrochemické syntézy vyvinuli novou anorganicko - organickou hybridní sloučeninu poly(cyklofosfazenbenzochinon) (PPBQ), která byla připravena amperometrickou depozicí z hexachlorocyklotrifosfazenu a benzochinonu přímo na povrch platinové elektrody.

Cílem této práce je vytvořit PPBQ film na povrchu diskové platinové elektrody a porovnat jej s výsledky dr. Josowicz. Dalším cílem je elektrochemická depozice PPBQ filmu na povrchu platinového drátku, který by měl být využit jako stacionární fáze pro SPME metodu. PPBQ polymer bude charakterizován pomocí infračervené spektroskopie. V průběhu experimentů bude ověřováno, jakou selektivitu má nově připravený PPBQ film a zda je schopný sorbovat různé druhy analytů. Na závěr bude provedena optimalizace procesu extrakce směsi alkoholů ve vodě.

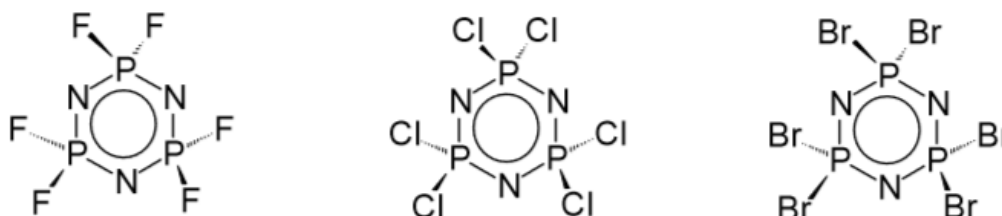
2 Teoretická část

2.1 Cyklické fosfazeny

Tyto látky představují hraniční oblast mezi anorganickou a organickou chemií z hlediska chemických a fyzikálních vlastností. Společnou charakteristikou těchto sloučenin je vazebné uskupení dusíku a fosforu ve formě $-N=PX_2$, kde $X = \text{halogen}$ (obr. 2.1.1)^{2,3}.

Aplikace fosfazenových sloučenin, vzhledem ke snadné nahraditelnosti atomů halogenů v molekulách jejich prekurzorů, je velmi bohatá. Využívají se v přípravě různých polymerních látek jako např. hybridních cyklolínárních polymerů, modifikátorů polymerů, nosičů protirakovinových léčiv, retardérů hoření, nanokompozitů, nanovláken a adheziv. V současné době jsou studovány na pracovištích, která se zabývají výrobou nových technických polymerů pro síťovatelné kompozity, např. polyuretany, polyestery, epoxidy, polymethakryláty a polyamidy⁴.

Fosfazeny byly poprvé syntetizovány v roce 1834 chemiky Liebiegem a Wöhlerem, kterým se podařilo připravit malé množství cyklického trimeru hexachlorocyklotrifosfazenu $P_3N_3Cl_6$ reakcí chloridu fosforečného s chloridem amonným, resp. plynným amoniakem. Ostatní halogenocyklofosfazeny byly připraveny až o mnoho let později. Cyklické bromofosfazeny je možné získat reakcí bromidu fosforitého s bromidem amonným. Oproti tomu analogy s fluorem takto jednoduše získat nelze, ty se připravují fluorací odpovídajících chloroderivátů⁵.



Obr. 2.1.1 Strukturní vzorce hexafluorocyklotrifosfazenu ($P_3N_3F_6$), hexachlorocyklotrifosfazenu ($P_3N_3Cl_6$) a hexabromocyklotrifosfazenu ($P_3N_3Br_6$).

V druhé polovině 60. let 20. století prodělala chemie těchto látek velký rozvoj, pozornost se soustředila na syntézu organických derivátů cyklofosfazenů, a to především na výměnu atomů chlóru v molekule $P_3N_3Cl_6$ za jiné substituenty. V důsledku snadné nahraditelnosti atomů chlóru v molekule hexachlorocyklotrifosfazenu v průběhu nukleofilní substituce je možné připravit nové polymerní řetězce fosfazenových jednotek^{6,7}.

2.1.1 Hexachlorocyklotrifosfazen

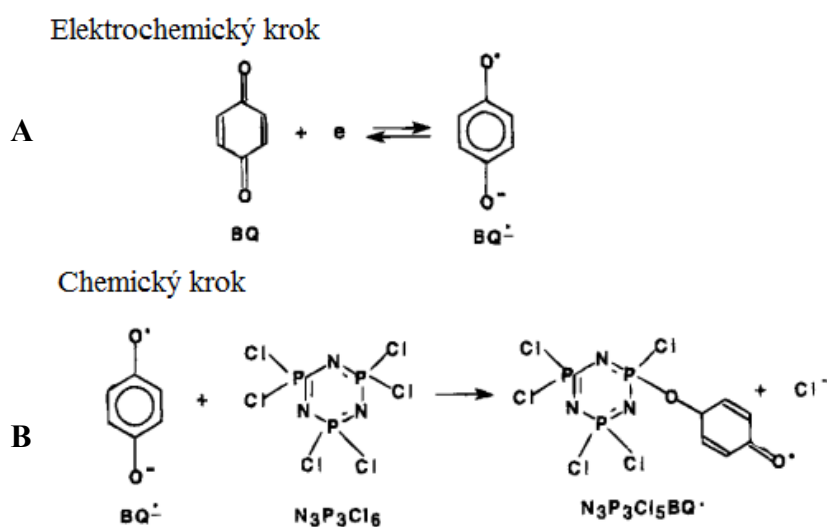
Mezi nejběžnější zástupce halogenocyklofosfazenových sloučenin se řadí hexachlorocyklotrifosfazen $P_3N_3Cl_6$. Tato látka je bílá krystalická sloučenina, která se dobře rozpouští v nepolárních nebo málo polárních rozpouštědlech, na vzduchu je stálá, avšak její deriváty, které mají navázané jiné substituenty místo chlóru, se mohou na vzduchu rozkládat. Teplota tání této sloučeniny se pohybuje v rozmezí 113-114 °C, při teplotě 40-60 °C může v prostředí vakua snadno sublimovat^{8,10}. Hexachlorocyklotrifosfazen je komerčně dostupný a využívá se jako prekurzor pro přípravu dalších organických a anorganických substitučních derivátů fosfazenů, technických polymerů pro síťovatelné kompozity, např. polyurethany, polyestery, epoxidy, polymethakryláty a polyamidy^{4,9}.

Až doposud byly vyvinuty tři odlišné chemické postupy pro syntézu polyfosfazenů: makromolekulární substituce, substituce cyklických trimerů a tetramerů a přímá syntéza organosilylfosfazenů pomocí kondenzace. Až později se anorganicko-organické polymerní kopolymery začaly připravovat elektrochemickou polymerací z cyklického fosfazenového trimeru $(NPCl_2)_3$ a benzochinonu (BQ)².

2.2 Elektrochemická syntéza PPBQ filmu

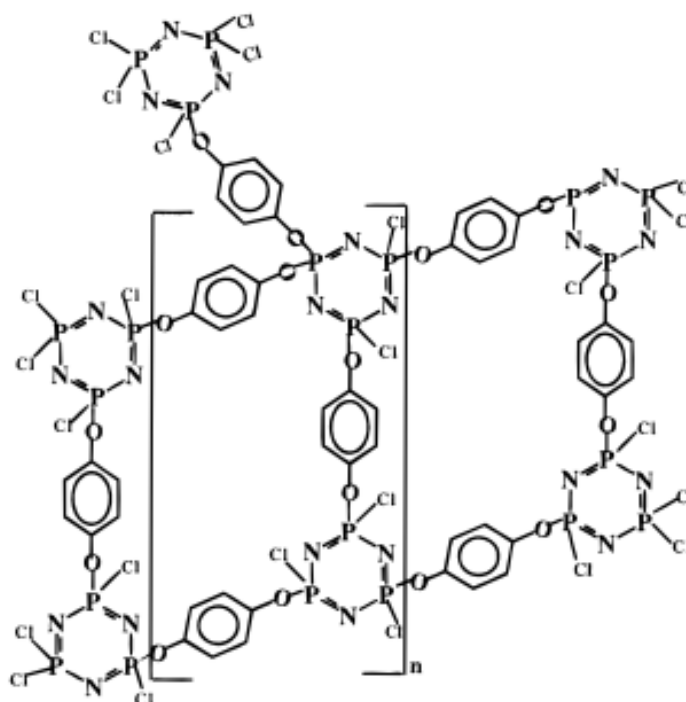
Elektrochemickou syntézu (depozice PPBQ filmu) lze provést např. pomocí amperometrie za konstantního potenciálu¹⁰. Vlastní depozice PPBQ je založena na polymerizaci vyvinutou potenciostatickou metodou v tříelektrodovém uspořádání^{2,11}.

Tento způsob polymerace je složen ze dvou různých kroků. U prvního, elektrochemického děje dochází k reverzibilní generaci reaktivního intermediátu, kterým je radikálový anion benzochinonu $BQ^{\cdot-}$ (Obr. 2.2.1 A). Tento radikál podléhá druhému, chemickému kroku, ve kterém dochází k nukleofilní substituci, díky reaktivitě vazby P-Cl, s atomem chloru na heteroatomu fosfazenu. Vzniká intermediát $N_3P_3Cl_5BQ^{\cdot}$, který podléhá další nukleofilní substituci a reaguje s dalším $N_3P_3Cl_6$, čímž vzniká $N_3P_3Cl_5BQ$ $N_3P_3Cl_5$ (Obr. 2.2.1 B). Postupným navazováním dalších anionů $BQ^{\cdot-}$ vzniká zesíťovaná trojrozměrná struktura PPBQ filmu, která byla později určena pomocí infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR)^{2,11,12}.



Obr. 2.2.1 Elektrochemický děj (A) - tvorba radikálového aniontu benzochinonu. Chemický děj (B) - postupné navazování molekuly hexachlorocyclotriphosphazenu. (upraveno dle²).

Elektrochemická syntéza poly(cyklofosfazenbenzochinonového) (PPBQ) filmu přímo na povrchu elektrody má schopnost ovlivnit strukturní, kompoziční a morfologické vlastnosti v trojrozměrně zesíťované vrstvě. Skelet polymeru je tvořen kruhy z benzochinonových a hexachlorocyklotrifosfazenových jednotek. Propojení mezi anorganickou a organickou molekulou je tvořeno vazbou -O- (Obr. 2.2.2). PPBQ film je amorfní, chemicky inertní, elektricky nevodivý, nehořlavý a porézní a představuje velkou intramolekulární bariéru pro přenos náboje. Tloušťku a porozitu PPBQ filmu lze ovlivnit podmínkami elektrochemické depozice¹¹.



Obr. 2.2.2 Schéma ideální struktury poly(cyklofosfazenbenzochinonového) (PPBQ) filmu (upraveno dle¹¹).

2.3 Mikroextrakce na pevné fázi (SPME)

Mikroextrakce na pevné fázi (SPME) je jednoduchá sorpčně-desorpční technika zakoncentrování analytu, kterou v r. 1989 vyvinul Janusz Pawliszyn se svými kolegy¹. Je to extrakční metoda, která se používá na extrakci organických látek, např. ze životního prostředí (vody, vzduchu, půdy, písku a kalu), výfukových plynů z dieslových motorů a kondenzátu cigaretového kouře^{13,14}.

Technika je kombinací extrakce a prekoncentrace v jednom kroku. Po dobu extrakce jsou analyty ze vzorku sorbovány přímo na křemenné vlákno, které je potaženo vrstvou chemicky vázané stacionární fáze. Nedochozí přitom k úplné, vyčerpávající extrakci, ale k ustálení rozdělovací rovnováhy analytu mezi matricí vzorku a stacionární fází vlákna. Počet molekul, které přejdou do stacionární fáze je přímo úměrný rozdělovacímu koeficientu, objemu stacionární fáze a koncentraci analytu ve vzorku^{1,15}. Vlákno je potom zavedeno do vyhřátého injektoru plynového chromatografu (GC), kde jsou analyty termicky desorbovány a následně analyzovány¹⁶.

Na základě různých typů vzorkování lze metodu SPME rozdělit na přímou („direct sampling“), headspace a membránovou extrakční techniku. U přímého vzorkování je vlákno ponořeno do roztoku s analyty, které jsou transportovány z matrice přímo do extrakční fáze. U vzorkování headspace je vlákno v plynné fázi nad kapalným nebo pevným povrchem vzorku. Vlákno je tedy chráněno před kontaminací netěkavými složkami z roztoku. Extrakční časy mohou být zkráceny, jestliže jsou zkoumané analyty extrahovány z headspace módu oproti přímé extrakci, protože difúze analytů v plynné fázi je vyšší než u vodné fáze^{1,17}. Posledním typem extrakce u SPME je membránová extrakce, která je vhodná pro stanovení látek, které jsou méně těkavé a nedají se určit v headspace systému. Hlavním účelem je ochrana vlákna před poškozením^{18,19}.

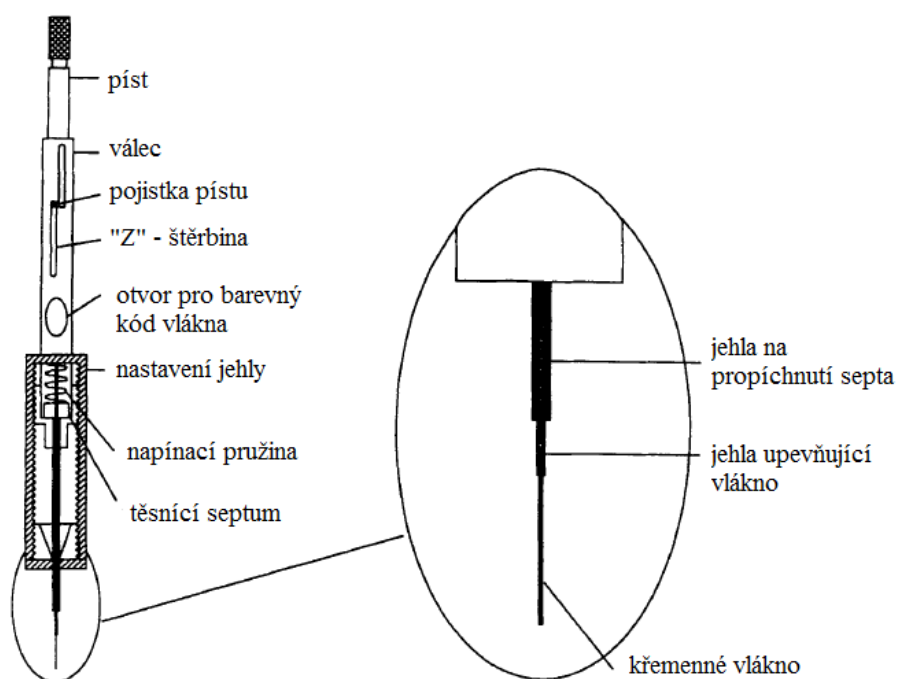
Hlavními výhodami metody SPME jsou rychlost, jednoduchost, vysoká citlivost, přesnost, správnost a schopnost pracovat s malými objemy vzorku. Nevýhodou této metody je nízká schopnost zachytit velmi malé molekuly, protože u těchto sloučenin dochází k rychlému dosažení rovnováhy a mají zároveň nízkou distribuční konstantu¹⁵.

2.3.1 Zařízení pro SPME

Pro účely SPME se dnes používají komerčně dostupná zařízení ve formě mikrostříkaček. Vlákno, které je pokryté stacionární fází v délce 1 cm, je spojeno s ocelovým pístem a je umístěno uvnitř duté ocelové jehly, která ho chrání před mechanickým poškozením.

Vlákno je nejprve zasunuto do jehly, pomocí které je propíchnuto septum v zátce vialky se vzorkem. Stlačením ocelového pístu je vlákno vysunuto buď přímo do kapalného vzorku, nebo těsně nad hladinu vzorku, kde je analyt sorbován na stacionární fázi pokrývající vlákno. Po skončení extrakce je vlákno zasunuto zpět do jehly, která je vytažena z vialky.

K desorpci analytů dochází ve vyhřátém injektoru plynového chromatografu, do kterého je jehla vpíchnuta a vlákno vysunuto, poté může dojít k separaci analytů na koloně¹⁸.



Obr. 2.3.1 Schéma SPME vzorkovače Supelco (upraveno dle¹⁵).

2.3.2 Fyzikálně – chemický princip metody SPME

Pro přímé vzorkování SPME je množství analytů sorbovaného na vlákno až do ustálení rovnováhy ve velkém objemu vzorku je lineárně závislé na koncentraci analytu v kapalně fázi a je vyjádřené následující rovnicí (2.1),

$$n = K_{fS} \cdot V_f \cdot C_0 \quad (2.1)$$

kde n - látkové množství analytu sorbovaného na stacionární fázi, K_{fS} - rozdělovací konstanta analytu mezi polymerní vrstvou a kapalnou fází, V_f - objem polymerní vrstvy, c_0 - počáteční koncentrace analytu ve vzorku.

Množství analytu sorbovaného na polymerní vrstvu z roztoku vzorku s malým objemem vyjadřuje následující vztah (2.2),

$$n = \frac{K_{fS} \cdot V_f \cdot V_S \cdot C_0}{K_{fS} \cdot V_f + V_S} \quad (2.2)$$

kde V_S - objem vzorku. Látkové množství extrahovaného analytu je tedy závislé na koncentraci analytu ve vzorku a na typu a tloušťce polymeru na vlákne. Množství sorbovaného analytu závisí také na distribuční konstantě a tedy i na teplotě. Celková doba extrakce je určována podle analytu s nejvyšší distribuční konstantou, kdy distribuční konstanta obvykle narůstá s rostoucí molekulovou hmotností a bodem varu analytu¹⁴.

Pro headspace vzorkování platí následující rovnice (2.3),

$$n = \frac{K_{fS} \cdot V_f \cdot V_S \cdot C_0}{K_{fS} \cdot V_f + K_{hS} \cdot V_h + V_S} \quad (2.3)$$

kde V_h - objem headspace prostoru, K_{hs} - rozdělovací konstanta analytu mezi polymerní vrstvou a headspace prostorem. Z tohoto vztahu vyplývá, že množství extrahovaného analytu je závislé na umístění vlákna v systému. Vlákno může být umístěno v headspace prostoru, nebo přímo v kapalném vzorku, pokud je objem polymerní vrstvy, headspace prostor a objem vzorku konstantní^{1,15}.

2.3.3 Optimalizace SPME

SPME metoda umožňuje dosáhnout vysoké přesnosti a správnosti při zachování konstantních podmínek. Shodnost výsledků a spolehlivost detekce při nízkých koncentracích je ovlivněna celou řadou faktorů např. tloušťkou filmu, čistotou povrchu elektrody, způsobem vzorkování, teplotou vzorku, mícháním apod. U metody SPME je důležité dodržovat vždy stejný čas extrakce, teplotu vzorku, aktivní plochu elektrody při headspace SPME²⁰.

Doba extrakce

U vzorkování je doba extrakce velmi kritickým faktorem. Závisí především na umístění vlákna ve vialce, na molekulové hmotnosti extrahovaných sloučenin a zároveň na typu použitého vlákna. Dobu extrakce je možno zkrátit, pokud jsou analyzovány vzorky s nízkou molekulární hmotností, při použití vlákna se slabší vrstvou polymeru nebo vyšší koncentrací analytů^{20,21,22}.

Teplota headspace extrakce

Důležitým faktorem pro optimalizaci je i teplota při headspace extrakci. Při zvýšené teplotě mohou analyty ze vzorku snadněji přecházet do vlákna. Distribuční konstanta může poklesnout, což má za následek snížení množství extrahovaného analytu na stacionární fázi^{21,22}.

Rychlost míchání vzorku

Rychlost míchání vzorku zkracuje a zlepšuje extrakci hlavně u sloučenin s vyšší molekulovou hmotností. Míchání musí být konstantní, protože v případě změn se snižuje přesnost stanovení²³.

Objem vzorku

V závislosti na velikosti extrakční nádoby je objem vzorku dalším faktorem vhodným k optimalizaci. Jelikož metoda SPME může pracovat s malými objemy, je zbytečné volit velké objemy vzorku s analyty^{22,23}.

Teplota / čas kondicionace

Teplota a čas kondicionace závisí na druhu analytů ve vzorku a jejich bodu varu. Smyslem kondicionace je zabránění přenosu analytů mezi jednotlivými analýzami (tzv. carry-over). Teplotní a časový rozsah kondicionace je volen tak, aby stacionární fáze nebyla poškozena a zůstala funkční²⁰.

2.4 Optimalizace

Optimalizace je v analytické chemii chápána jako souhrnné označení různých postupů pro nalezení experimentálních podmínek, jejichž použitím je získána maximální nebo jiná požadovaná odpověď. Optimalizací se rozumí zlepšování výkonnosti systému, procesu nebo produktu k dosažení maximálních výsledků.

Z důvodu neexistujícího, nepřesně popisujícího nebo neustáleného českého názvosloví bylo pro popis optimalizací použito původní anglické názvosloví, případně běžně užívané triviální termíny.

One Factor at Time (OFAT)

Jedná se o metodu optimalizace, při které se mění pouze jeden z experimentálních faktorů v čase za předpokladu, že ostatní faktory zůstávají konstantní. Sleduje se tak vliv pouze jednoho faktoru na odpověď. Mezi hlavní nevýhody tohoto typu optimalizace patří vyřazení možného vlivu vzájemných interakcí mezi faktory. Další nevýhodou je finanční a časová náročnost. Z těchto důvodů se v posledních letech začaly využívat složitější vícerozměrné statistické metody^{24,25}.

Vícerozměrné statistické metody

Vícerozměrné statistické metody jsou založeny na efektivním navrhování experimentů, z nichž lze získat objektivní a ucelené závěry o sledovaných veličinách. Oproti OFAT se mění více faktorů během jediného kroku optimalizace a výsledky těchto postupů jsou zpracovány formou matematické funkce. Vícerozměrné statistické metody jsou často používány v laboratorní praxi pro optimalizaci přípravy vzorků či chromatografickou separaci.

V rámci statistických metod se používají odborné termíny jako např.:

Experimentální design – soubor experimentů, definovaný maticí různých úrovní studovaných faktorů.

Faktor – je experimentální proměnná, kterou lze měnit nezávisle na ostatních, např. tlak, teplota, čas, koncentrace.

Úroveň faktoru – vybraný rozsah hodnot, který vymezuje oblast, v níž je odpověď hledána.

Odpověď – veličina, pomocí které vyjadřujeme výsledky experimentů. Nejčastěji se jako odpověď používá signál, vyjádřený jako napětí, elektrický proud, absorbance.

Experimentální prostor – prostor, který je vymezený úrovněmi faktorů. V této oblasti se nachází požadovaná odpověď.

Experimentální design (DOE) patří mezi nejčastěji používané vícerozměrné statistické metody. Základním principem DOE je použití minimální série plánovaných experimentů s cílem získat optimální odpověď systému, přičemž po provedení požadované série experimentů lze hledat optimum jak pro jednotlivé analyty, tak pro jejich kombinace²⁶.

DOE se dělí na čtyři hlavní kroky:

1. Výběr odpovědí a faktorů

Před provedením DOE je třeba zvolit odpověď (odpovědi), která nejlépe charakterizuje daný účel. Pro analytické účely se volí nejčastěji signál (u chromatografických metod např. plocha píků apod.).

Zkoumané faktory by měly být voleny na základě technických a experimentálních možností příslušné metody. Během optimalizace jsou testovány faktory, které mohou být popsány kvantitativně (čas, teplota, koncentrace činidla, tlak, pH) nebo kvalitativně (druh chemikálie, způsob provedení). U těchto faktorů je před začátkem určen rozsah hodnot, který definuje experimentální prostor.

2. Screening

Hlavním cílem screeningu je snížení počtu zkoumaných faktorů a zjištění, zda mají statisticky významný vliv na odpověď. K tomuto účelu je třeba vytvořit plán experimentu, který stanovuje počet a pořadí měření a podmínky, za kterých se jednotlivá měření uskuteční.

Plán experimentu je tvořen pomocí různých faktoriálních designů. Jedním z nich je úplný faktoriální design (Full Factorial Design), který spočívá v měření všech kombinací úrovní všech faktorů. Nevýhodou tohoto designu je velký počet měření. Počet všech experimentů roste exponenciálně s počtem sledovaných faktorů. Dvouúrovňový úplný faktoriální design obsahuje 2^k měření (číslo 2 v mocnině značí vyšší a nižší hodnotu faktoru, kódované hodnoty (+1) a (-1), k označuje počet zkoumaných faktorů), a proto se ke snížení počtu experimentů používá frakční faktoriální design. Vliv faktorů na zkoumanou odpověď se hodnotí pomocí analýzy rozptylu (ANOVA), statistický význam je určen p-hodnotou, na hladině významnosti obvykle 95 %.

3. Modelování

Oproti screeningu, který pracuje pouze s dvouúrovňovými faktoriálními designy, modelování umožňuje matematický popis zahrnující i vzájemné interakce mezi faktory viz rovnice (2.4). Jednou z používaných metod pro polynomické modelování je Central Composite Design (CCD), který kombinuje několik přístupů: dvouúrovňový úplný faktoriální návrh, dále design počítající s centrálním bodem 0 nacházejícím se mezi -1 a +1 hodnotami faktorů a tzv. alfa body ($\pm\alpha$), které umožňují charakterizaci případného kvadratického zakřivení. V CCD je vyžadováno pět úrovní každého faktoru ($-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$). V rámci CCD existuje face-centered Central Composite Design (fcCCD), ve kterém jsou α body ± 1 . Tento typ designu vyžaduje jen tři úrovně každého faktoru (-1, 0, +1).

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^k \beta_{ij} x_i x_j \quad (2.4)$$

kde y - odpověď, β - koeficient a X_{ij} - faktor.

4. Optimalizace

Posledním krokem experimentálního designu je nalezení konkrétních hodnot jednotlivých faktorů, aby bylo dosaženo cílené odpovědi, tzn. minimální, maximální či libovolná konkrétní hodnota hledané odpovědi. Jednou z nejčastěji používaných metod je tzv. desirability funkce (popis funkce je mimo rozsah a téma této diplomové práce). Obsáhlejší informace týkající se experimentálního designu jsou uvedeny v příslušné literatuře^{27,28,29}.

3 Experimentální část

3.1 Použité chemikálie

Pro přípravu poly(cyklo)fosfazen-benzochinonového (PPBQ) filmu byly použity benzochinon (BQ, ≥ 98 %, Sigma Aldrich), hexachlorofosfazen ($(\text{NPCl}_2)_3$, 99,0 %, Sigma Aldrich), tetrabutylamonium tetrafluoroborát (TBATFB, 99,0 %, Sigma Aldrich) jako základní elektrolyt a acetonitril (CH_3CN , $\geq 99,9$ %, Sigma Aldrich) jako rozpouštědlo.

Pro headspace extrakci byly použity dvě směsi analytů. První směsí byly uhlovodíky, které obsahovaly pentan (98 %, Aldrich), heptan ($\geq 99,0$ %, Fluka Analytical), oktan ($\geq 99,0$ %, Reachim) a toluen (99,0 %, Lachema a.s.). Druhou skupinou analytů byly alkoholy: butanol ($\geq 99,9$ %, Merck), amylalkohol (99,0 %, Lachema a.s.), hexanol (98,0 %), oktanol (99,9 %, Fischer) a nonanol ($\geq 95,0$ %, Sigma Aldrich). Dále pak byla použita deionizovaná voda (Milli Q Plus, Millipore, USA).

Helium (99,9992 %), dusík (99,999 %), vodík (99,99 %) a stlačený vzduch pro plynovou chromatografii byly čerpány z tlakových lahví (Linde, ČR).

3.2 Použité přístroje

V dílnách Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy byla podle komerční předlohy SPME vlákna vyrobena sada pěti platinových drátků k SPME použití. Všechny drátky byly 10,5 cm dlouhé, jejich průměr činil 0,35 mm, každý drátek bylo možné nasadit do komerčního držáku SPME vláken (Supelco Park, USA) (Obr. 3.2.1).

K elektrochemické depozici PPBQ filmu byl použit přístroj Eco - Tribo Polarograf se softwarem Polar 5.1. (Polaro-Sensors, ČR). Jako pomocná elektroda byla použita platinová elektroda, referentní elektrodou byla stříbrná $\text{Ag}/0,1 \text{ M AgNO}_3$ v CH_3CN , pro optimalizaci přípravy PPBQ filmu byla jako pracovní elektroda použita platinová disková elektroda s průměrem 2,0 mm, pro měření infračervených spekter vyloučeného filmu byl použit jako pracovní elektroda platinový plíšek o ploše 10 mm^2 . Poté byl celý proces přípravy PPBQ filmu aplikován na sadu pěti platinových drátků s aktivní délkou 15 mm o průměru 0,35 mm, které byly zapojeny jako pracovní elektrody.



Obr. 3.2.1 Rozložený SPME vzorkovač (A - tělo stříkačky, B - krycí část těla stříkačky, C - dutá jehla na ochranu drátku, D - platinový drátek s kovovou podložkou, teflonovým septem se silikonovou vrstvou a pružinou. Mosazný díl na konci drátku fixuje drát ve vzorkovači, E - matice k zašroubování SPME vzorkovače).

PPBQ film, který byl vytvořen na platinovém drátku byl čištěn kondicionováním za sníženého tlaku ve vyhřáté pídce pro SPME (Hamilton, USA), která byla připojena na membránovou pumpu (KNF 711) a regulátor teploty. Při headspace extrakci byla použita magnetická míchačka MR 3001 (Heidolph, Německo).

Pro separační účely byly použity: plynový chromatograf GC-2010 Gas Chromatograph (Shimadzu, Japonsko) s plamenově ionizačním detektorem (FID) a plynový chromatograf s hmotnostní detekcí GCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu, Japonsko). V obou GC měřeních byla použita shodná nepolární kolona SLB5-ms (5% difenyl, 95% dimethyl polysiloxan) s rozměry 30 m x 0,25 mm s tloušťkou stacionární fáze 0,25 μm (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

Měření infračervených spekter probíhalo na FTIR (infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací) spektrometru Nicolet 6700 (Thermo Scientific) vybaveným mikroskopickým příslušenstvím InspectIR Plus (Spectra-Tech) v rozsahu 600-4000 cm^{-1} a s rozlišením 4 cm^{-1} za použití Happ-Genzelovy apodizace. Vzorky byly studovány reflexně-absorpční technikou (průměr měřené plochy cca 200 μm) přímo na platinové elektrodě.

K vytvoření mikrofotografie PPBQ filmu byl použit mikroskop (Handheld Digital Microscope Powered by a 2.0 USB Cable, Celestron, USA) s programem Digital Microscope suite 2.0. K pipetování analytů sloužily automatické pipety (všechny Biohit, Finsko). Pro rozpuštění pevných látek byla použita ultrazvuková lázeň (Elmasonic P, Německo).

3.3 Čištění platinových drátků

Před depozicí nového PPBQ filmu bylo nutné celou sadu platinových drátků vyčistit. Metodou čištění bylo zvoleno mechanické obroušení filmu pomocí brusného papíru (hrubost 3000 zrn na cm^2) a následné doleštění pomocí leštící soupravy pro pevnolátkové polarografické elektrody (Al_2O_3 , 0,5 μm velikost částic, ED spol. s.r.o., ČR). Všechny drátky byly na závěr opláchnuty v acetonitrilu. Tento postup byl opakován, dokud nebylo dosaženo vizuálně čistého povrchu elektrod.

3.4 PPBQ film - příprava

Film PPBQ byl připraven polymerizací v tříelektrodevém systému potenciostatickou amperometrií. Vyleštěný a očištěný platinový drátek byl použit jako pracovní elektroda (ponořen v elektrolytu 15 mm).

Jako základní elektrolyt byl použit 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ TBATFB, který byl rozpuštěn v acetonitrilu. Pro depozici PPBQ filmu tento roztok ještě obsahoval 0,01 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (NPCl_2)₃, 0,01 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ BQ. Před začátkem měření byl roztok zbaven kyslíku probubláváním dusíkem po dobu pěti minut. Všechna měření byla prováděna za laboratorní teploty (20-23 °C).

Pro ověření redukčního potenciálu byla nejprve použita cyklická voltametrie, kde byl nastaven potenciálový rozsah od -50 do -1200 mV a rychlost skenu 100 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Depozice PPBQ filmu byla prováděna pomocí amperometrie, kde byl nastaven konstantní potenciál -1000 mV po dobu 10 min pro optimalizaci filmu na diskové platinové elektrodě, následně byl proces aplikován na sadu pěti platinových drátků za konstantního potenciálu -1000 mV po dobu 5 min.

Na pracovní elektrodě se vytvořil bílý polymerní film, který byl nejprve opatrně opláchnut acetonitrem, poté deionizovanou vodou a následně osušen pod proudem dusíku po dobu 1 minuty.

3.5 Kondicionace vlákna

Před vlastní headspace extrakcí a k čištění mezi jednotlivými extrakcemi byl drátek vždy opatrně zasunut do SPME pícky, která byla připojena na vakuové čerpadlo a regulátor teploty. Rozmezí teplot podle optimalizace bylo nastaveno od 165-200 °C a na různé časové intervaly 10-60 minut, aby nedocházelo k přenosu analytů mezi jednotlivými analýzami.

3.6 Headspace extrakce vzorků

Byly připraveny dvě směsi modelových roztoků, každý analyt měl koncentraci 0,1 % (v/v). První směsí byly uhlovodíky (toluen, oktan, heptan a pentan jako rozpouštědlo). Druhou skupinou látek byly alkoholy (butanol, pentanol, hexanol, oktanol a nonanol, zde jako rozpouštědlo byla použita deionizovaná voda).

Do vialky o objemu 4 ml byl pipetován modelový roztok směsi analytů o různém objemu podle optimalizace 0,5-2,0 ml vzorku. Do roztoku bylo přidáno magnetické míchadlo a vialka byla uzavřena septem (silikon/teflon). Rychlost míchání byla nastavena dle optimalizace od 0 do 1250 rpm.

Princip extrakce spočíval v expozici vlákna s polymerem v prostoru nad roztokem. Čas extrakce se pohyboval od 10 do 30 minut. Po extrakci byl drátek zasunut zpět do jehly a přenesen do injektoru GC chromatografu.

3.7 Experimentální podmínky GC separace

Pro GC-FID analýzy byl použit dusík jako nosný plyn s lineární průtokovou rychlostí $30 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ při tlaku 407,0 kPa. Teplota injektoru byla nastavena na 165 °C a detektoru 300 °C. Teplotní program byl nastaven na 40 °C (3 min), 10 °C/min do 150 °C (5 min).

Doba jedné analýzy činila 19 min. Desorpční čas platinového drátku v injektoru byl 30 s.

Nosným plynem pro GC-MS analýzy bylo helium a jeho lineární průtoková rychlost byla $30 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$, při tlaku 66,0 kPa. Teplota injektoru byla nastavena na 165 °C, teplota transfer line 250 °C a iontového zdroje 200 °C. Teplotní program byl nastaven na 40 °C (3 min), 10 °C/min do 165 °C (5 min). Doba jedné analýzy činila 20,5 min. Desorpční čas platinového drátku v injektoru byl 30 s.

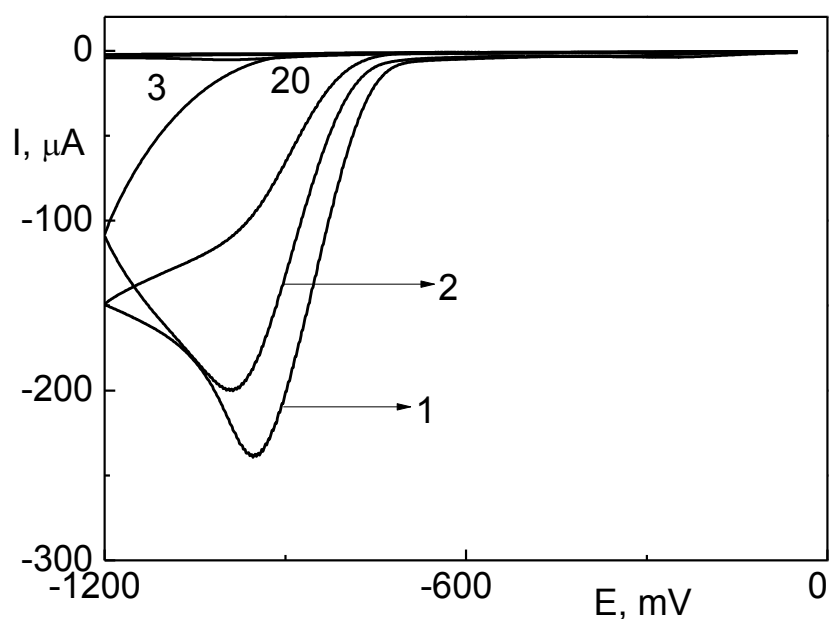
Všechny analýzy byly měřeny ve splitless módu (30 s). Dávkování bylo prováděno ručně pomocí SPME držáku.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Elektrochemická syntéza PPBQ filmu

Přesný postup přípravy PPBQ filmu vychází z publikovaných článků dr. Josowicz, se kterými byly porovnávány výsledky cyklické voltametrie a amperometrie pro depozici PPBQ filmu^{2,11}.

Na Obr. 4.1.1 jsou zobrazeny cyklické voltamogramy, měřené v polymerační směsi na platinové diskové elektrodě.



Obr. 4.1.1 Cyklické voltamogramy během elektropolymerizace $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ BQ a $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ $(\text{NPCl}_2)_3$ v roztoku $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Bu_4NBF_4 v CH_3CN na platinové diskové elektrodě (Ø 2,00 mm). Rychlost skenu $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Elektroodový potenciál nastaven od -50 do -1200 mV. Referentní elektroda $\text{Ag}/0,1\text{M AgNO}_3$ v $\text{CH}_3\text{CN}/0,1\text{M Bu}_4\text{NBF}_4$ v CH_3CN a pomocná platinová elektroda. Nastaveno na 20 cyklů, zobrazen 1.; 2.; 3.; a 20.

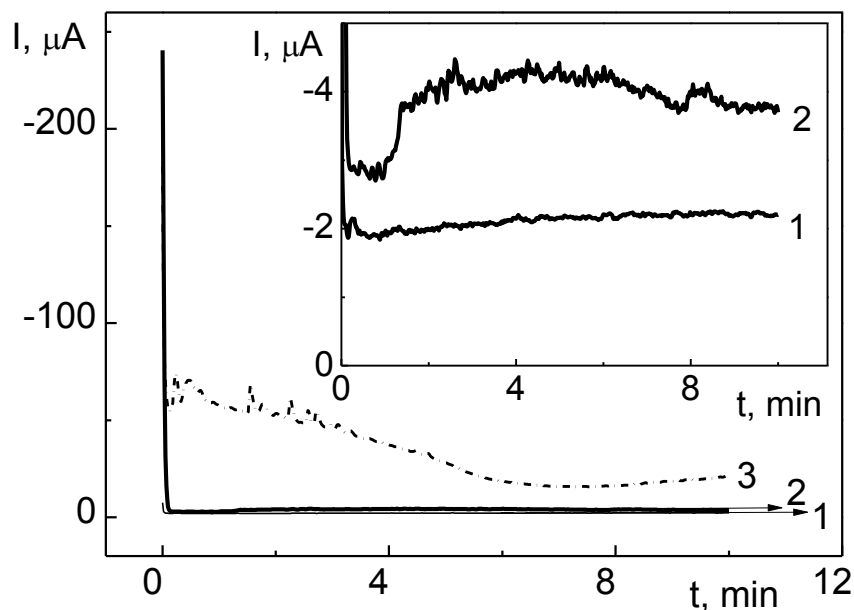
Na prvním skenu pozorujeme, že generování BQ^- na povrchu elektrody během zvyšování záporného potenciálu není ovlivněno přítomností $(NPCl_2)_3$ v roztoku. Na rozdíl od článku dr. Josowicz² nebyl pozorován oxidační pík, což mohlo být způsobeno větším pokrytím filmu na povrchu diskové platinové elektrody. Absence oxidačního píku BQ^- dokazuje, že dominantní je vznik $N_3P_3Cl_5BQN_3P_3Cl_5$. Tvorbou polymerního filmu je omezený přístup BQ k elektroaktivnímu povrchu elektrody. Postupný pokles redukčního píku u rostoucího počtu cyklů signalizuje snížení míry elektropolymerizace. Limitního difuzního proudu bylo dosaženo při potenciálu -950 mV, proto byl zvolen potenciál -1000 mV pro amperometrickou depozici PPBQ filmu.

Po vyjmutí elektrody z roztoku pozorujeme bílý matný PPBQ film na povrchu diskové platinové elektrody (Obr. 4.1.2).



Obr. 4.1.2 Mikrofotografie platinové diskové elektrody (\varnothing 2,00 mm), povrch elektrody pokryt PPBQ filmem (bílá část), část filmu odstraněna až na platinový povrch elektrody (tmavá část). Zvětšení 150x.

Amperometrická depozice PPBQ filmu byla navržena v souladu s článkem dr. Josowicz². Amperometrické záznamy byly provedeny za konstantního potenciálu -1000 mV po dobu 10 min na diskové platinové elektrodě (Ø 2,00 mm) v prostředí jak základního elektrolytu $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Bu}_4\text{NBF}_4$ v acetonitrilu, tak i $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ BQ}$ a směsi $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ BQ}$ a $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} (\text{NPCI}_2)_3$ v acetonitrilu (Obr. 4.1.3).



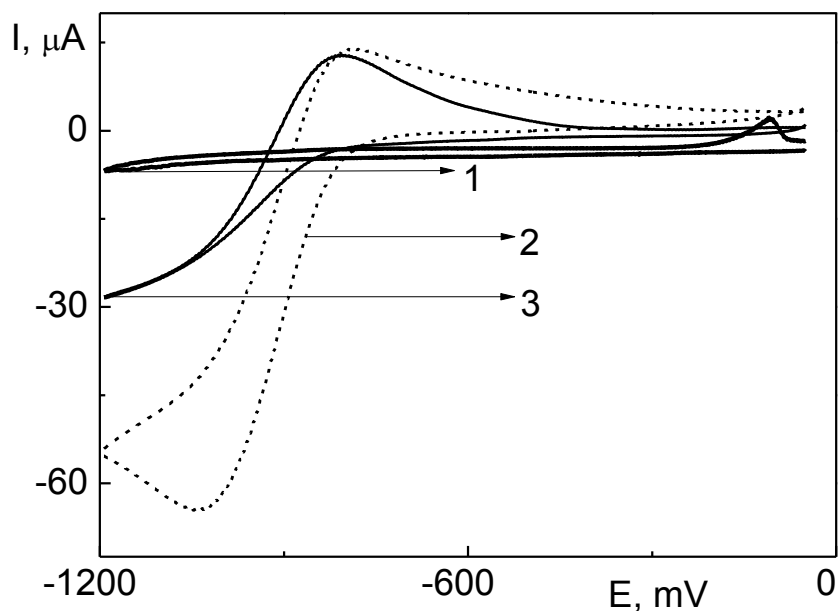
Obr. 4.1.3 Amperometrický záznam na platinové diskové elektrodě (Ø 2,00 mm) v roztoku základního elektrolytu $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Bu}_4\text{NBF}_4$ v CH_3CN (1). $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ BQ}$ (3), během elektropolymerizace $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ BQ}$ a $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} (\text{NPCI}_2)_3$ (2). Vložený graf je přiblížený záznam základního elektrolytu a směsi látek BQ a $(\text{NPCI}_2)_3$. Nastaven konstantní potenciál -1000 mV po dobu 10 min. Referentní elektroda Ag/0,1M AgNO_3 v CH_3CN /0,1M Bu_4NBF_4 v CH_3CN a pomocná platinová elektroda.

Při vložení konstantního potenciálu -1000 mV v roztoku základního elektrolytu $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Bu}_4\text{NBF}_4$ v acetonitrilu (křivka 1 v Obr. 4.1.3) nedocházelo k elektrochemické reakci. Při amperometrickém záznamu $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ BQ}$ (křivka 3 v Obr. 4.1.3) docházelo k redukci po celou dobu měření a pokles jeho signálu je daný poklesem koncentrace v okolí elektrody, roztok nebyl po dobu měření míchán. U amperometrického záznamu polymerační směsi látek $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ BQ}$ a $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} (\text{NPCl}_2)_3$ (křivka 2 v Obr. 4.1.3) docházelo k vylučování PPBQ filmu a tím k poklesu vodivosti na povrchu diskové platinové elektrody, proto byly proudy nižší než u amperometrického záznamu $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ BQ}$ (3).

Z rozdílů ploch pod křivkou u amperometrických záznamů základního elektrolytu $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Bu}_4\text{NBF}_4$ v acetonitrilu a směsi látek $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ BQ}$ a $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} (\text{NPCl}_2)_3$ byl spočítán prošlý náboj 1,55 C, který odpovídá náboji využitému na tvorbu PPBQ filmu. Množství zredukovaného BQ bylo vypočítáno podle Faradayova zákona na 0,0017 g (molární hmotnost BQ 108,09 mol/g, Faradayova konstanta $9,6487\cdot 10^4 \text{ C}$, jednoelektronová reakce², prošlý náboj 1,55 C). Jedná se o 1,6 % úbytek látkového množství BQ během jedné elektrochemické depozice PPBQ filmu v 10 ml objemu roztoku, plocha elektrody ($\varnothing 2,00 \text{ mm}$) $3,14 \text{ mm}^2$ po dobu 10 min.

Vlastní elektrochemická depozice PPBQ filmu byla následně aplikována na platinové drátky (aktivní délka 15 mm, $\varnothing 0,35 \text{ mm}$) s plochou $16,6 \text{ mm}^2$ po dobu 5 min za stejných podmínek. Prošlý náboj byl 4,02 C a odpovídá náboji využitému na tvorbu PPBQ filmu na jednom platinovém drátku. Množství zredukovaného BQ bylo vypočítáno podle Faradayova zákona na 0,0045 g. Jedná se o 4,2 % úbytek látkového množství BQ během jedné elektrochemické depozice PPBQ filmu. Tyto hodnoty jsou srovnatelné s hodnotami vypočítanými pro diskovou platinovou elektrodu, protože aktivní plocha platinového drátku je přibližně 5x větší než plocha diskové platinové elektrody a zároveň se o polovinu snížila doba depozice PPBQ filmu na platinových drátcích. Výsledky jsou tedy přibližně 2,5x vyšší.

Po vyloučení PPBQ filmu na diskové platinové elektrodě byl změřen cyklický voltamogram. Při srovnání s cyklickými voltamogramy na vyleštěné elektrodě (Obr. 4.2.4) je patrný výrazný pokles signálu BQ, který je způsoben přítomností PPBQ filmu na povrchu elektrody.



Obr. 4.1.4 Cyklické voltamogramy $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ BQ na platinové diskové elektrodě ($\text{Ø } 2,00 \text{ mm}$) v roztoku $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Bu_4NBF_4 v CH_3CN před (2) a po amperometrickém vyloučení polymerního filmu (3), základní elektrolyt (1). Rychlost scanu $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Elektrodový potenciál nastaven od -50 do -1200 mV . Referentní elektroda $\text{Ag}/0,1\text{M AgNO}_3$ v $\text{CH}_3\text{CN}/0,1\text{M Bu}_4\text{NBF}_4$ v CH_3CN a pomocná platinová elektroda.

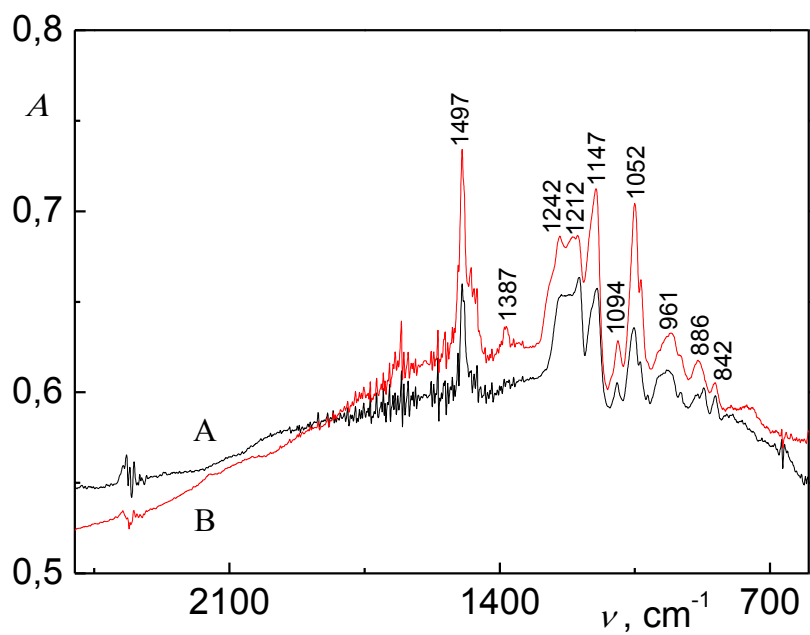
4.2 Charakteristika PPBQ filmu pomocí infračervené spektroskopie

Pro získání infračervených spekter bylo nutné deponovat PPBQ film na planární nosič, z tohoto důvodu byl použit platinový plíšek s plochou 10 mm^2 , která je řádově srovnatelná s plochou platinových drátků. Amperometrická depozice v roztoku základního elektrolytu $0,1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ Bu}_4\text{NBF}_4$ v acetonitrilu a směsi $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} \text{ BQ}$ a $0,01 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1} (\text{NPCl}_2)_3$ probíhala za shodných podmínek (nastaven konstantní potenciál - 1000 mV po dobu 5 min).

Na Obr. 4.2.1 pozorujeme záznamy reflexních infračervených spekter, kde byl nejprve na platinový plíšek amperometricky deponován PPBQ film (A), poté byla ve stejném roztoku deponována celá sada pěti platinových drátků a následně na očištěném platinovém plíšku proběhla opět depozice PPBQ filmu (B).

Při porovnání spekter před (A) a po (B) vyloučení PPBQ filmů na sadě pěti platinových drátků pozorujeme, že se celkový charakter vibračních spekter nezměnil, určité rozdíly jsou patrné v relativních intenzitách pásů v oblasti ($1335\text{-}1400 \text{ cm}^{-1}$), což může být způsobeno rozdílnou morfologií povrchu elektrody. Ve spektru (B) se objevuje i slabý pás ($1188\text{-}1212 \text{ cm}^{-1}$), který by mohl naznačovat určité redoxní změny v polymeru. Charaktery vibračních pásů ale zůstávají v principu shodné.

FTIR měření poskytl i charakterizaci PPBQ filmu. Pozorovaná infračervená spektra odpovídají předchozí studii¹². Ve spektrech jsou patrné projevy vibrací, které charakterizují fosfazeny, hydrochinony a vazby -P-O- a -P-Cl- . Cyklofosfazeny mají typické pásy ve dvou oblastech: $1150\text{-}1450 \text{ cm}^{-1}$, což je vazba P-N-P (asymetrické kruhy) a $700\text{-}950 \text{ cm}^{-1}$, což odpovídá P-N-P (symetrické části). Absorpce okolo 1500 cm^{-1} charakterizuje vazbu C-O ($\text{O-C}_6\text{H}_4\text{-O}$), což odpovídá hydrochinonové struktuře, která je zabudovaná do polymerního řetězce PPBQ filmu.



Obr. 4.2.1 Infračervená spektra před (A) a po (B) vyloučení PPBQ filmů na sadě pěti platinových drátků na platinovém plíšku. Průměr měřené plochy cca 200 μm , přímo na platinovém plíšku. Podmínky amperometrické depozice shodné jako u Obr. 4.1.3.

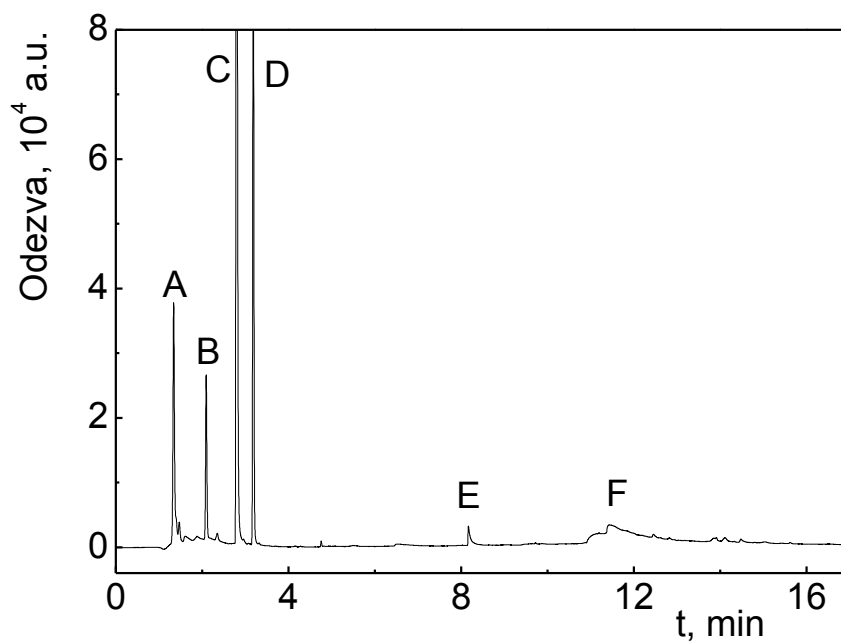
4. 3 Aplikace PPBQ filmu

4.3.1 Extrakce uhlovodíků

Pro ověření extrakční účinnosti PPBQ filmu byla vybrána modelová směs uhlovodíků (heptan, toluen a oktan, viz 3.6 Headspace extrakce vzorků) v pentanu. Uhlovodíky byly vybrány jako zástupci nepolárních sloučenin a slouží k ověření selektivity stacionární fáze.

Vzorkování probíhalo za podmínek: teplota headspace 25 °C, doba headspace 20 min, objem vzorku 1 ml, rychlost míchání 0 rpm, teplota kondicionace filmu 165 °C, čas kondicionace 20 min.

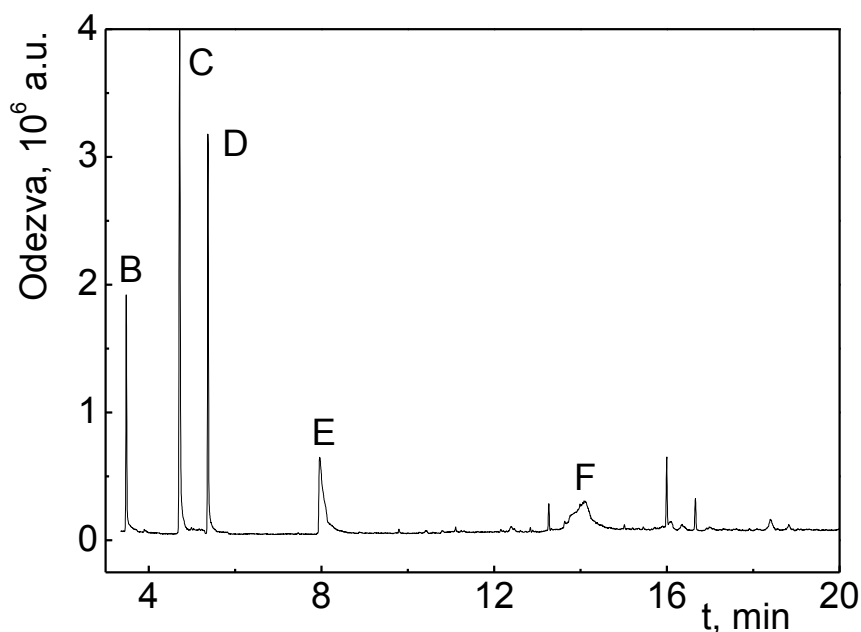
Směs uhlovodíků po sorpci na film byla nejprve změřena na plynovém chromatografu s plamenově ionizačním detektorem (FID). Na chromatogramu (Obr. 4.3.1) jsou zkoumané analyty i neznámé látky, proto byl použit pro identifikaci neznámých sloučenin plynový chromatograf s hmotnostní detekcí (GC-MS). Chromatografické podmínky separace byly v obou případech téměř shodné.



Obr. 4.3.1.1 Chromatogram měřený na GC-FID (A - pentan, B - heptan, C - toluen, D - oktan, E a F - neznámé píky). Splitless mód (30 s), teplotní program: 40 °C (3 min), 10 °C/min do 150 °C (5 min). Doba jedné analýzy 19 min. Desorpční čas platinového drátku v injektoru 30 s. Vzorkování: teplota headspace 25 °C, doba headspace 20 min, objem vzorku 1 ml, rychlost míchání 0 rpm, teplota kondicionace 165 °C, čas kondicionace 20 min.

Na chromatogramu (Obr. 4.3.2), který byl měřen pomocí GC-MS, byly identifikovány píky E a F, které odpovídají BQ a TBATFB. Tyto látky nebylo možné odstranit ani opláchnutím čerstvě vyrobeného PPBQ filmu v acetonitrilu ani kondicionováním za vysokých teplot a za sníženého tlaku. Pík A - pentan není v chromatogramu uveden, protože byl použit jako rozpouštědlo.

Odezvy uhlovodíků byly dostatečné při plamenově ionizační i při hmotnostní detekci, proto nebylo třeba optimalizovat extrakční podmínky.



Obr. 4.3.1.2 TIC chromatogram (B - heptan, C - toluen, D - oktan, E - BQ a F - TBATFB) měřený na GC-MS. Splitless mód (30 s), teplotní program: 40 °C (3 min), 10 °C/min do 165 °C (5 min). Doba jedné analýzy 20,5 min. Cut off time nastaven na 3,25 min. Desorpční čas platinového drátku v injektoru 30 s. Vzorování: teplota headspace 25 °C, doba headspace 20 min, objem vzorku 1 ml, rychlost míchání 0 rpm, teplota kondicionace 165 °C, čas kondicionace 20 min.

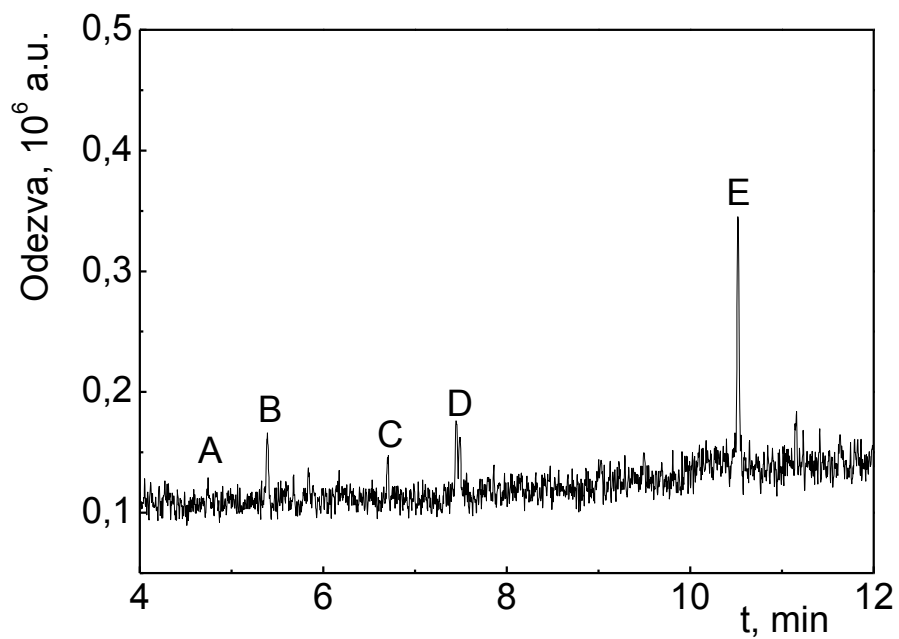
4.3.2 Extrakce alkoholů

Vlastnosti PPBQ filmu byly dále testovány pomocí headspace SPME extrakce na modelové směsi alkoholů rozpuštěných ve vodě (butanol, pentanol, hexanol, oktanol a nonanol, viz 3.6 Headspace extrakce vzorků).

Směs alkoholů rozpuštěných ve vodě představuje komplexnější matici oproti směsi čistých uhlovodíků. Alkoholy jsou polární sloučeniny, které slouží k dalšímu ověření selektivity nové stacionární fáze (PPBQ filmu).

Vzorkování probíhalo za podmínek: teplota headspace 25 °C, doba headspace 20 min, objem vzorku 1 ml, rychlost míchání 0 rpm, teplota kondicionace 165 °C, čas kondicionace 20 min. Alkoholy zakoncentrované na SPME vlákne byly následně změřeny pomocí GC-MS Splitless mód (30 s), teplotní program: 40 °C (3 min), 10 °C/min do 165 °C (5 min). Doba jedné analýzy 20,5 min. Desorpční čas platinového drátku v injektoru 30 s).

Chromatogram je uveden na Obrázku 4.3.3. Bylo zjištěno, že odezvy alkoholů na PPBQ filmu byly nižší než odezvy uhlovodíků, proto bylo nutné extrakční proces optimalizovat.



Obr. 4.3.2.1 TIC chromatogram alkoholů (A - butanol, B - heptanol, C - hexanol, D - oktanol, E - nonanol). Splitless mód (30 s), teplotní program: 40 °C (3 min), 10 °C/min do 165 °C (5 min). Doba jedné analýzy 20,5 min. Desorpční čas platinového drátku v injektoru 30 s. Vzorování: teplota headspace 25 °C, doba headspace 20 min, objem vzorku 1 ml, rychlost míchání 0 rpm, teplota kondicionace 165 °C, čas kondicionace 20 min.

4.4. Optimalizace extrakčních podmínek pro alkoholy

4.4.1 Výběr faktorů a odpovědí

Jako odpovědi byly zvoleny absolutní plochy píky vybraných alkoholů (butanol, pentanol, hexanol, oktanol a nonanol) i jejich celkový součet.

Zvolené optimalizované faktory byly teplota headspace, rychlost míchání, doba headspace, objem vzorku, čas kondicionace a teplota kondicionace (Tab. 4.4.1). Tyto faktory i jejich rozsahy byly zvoleny na základě předchozích zkušeností (viz 4.3.2 Extrakce alkoholů).

Tab. 4.4.1 Vybrané faktory pro optimalizaci SPME podmínek a jejich úrovně

Faktor	Označení	Úroveň faktoru		
		-1	0	1
Headspace teplota (°C)	A	25	52,5	80
Rychlost míchání (rpm)	B	0	625	1250
Doba headspace (min)	C	10	20	30
Objem vzorku (ml)	D	0,5	1,25	2
Čas kondicionace (min)	E	10	35	60
Teplota kondicionace (°C)	F	200	225	250

4.4.2 Screening

Hlavní podstatou screeningu je určení, které faktory a jejich případné vzájemné interakce mají na hledanou odpověď statisticky významný vliv. K tomuto účelu byl zvolen frakční faktorový design²⁵. Ke každému z vybraných faktorů byly zvoleny dvě úrovně hodnot: nižší (-1) a vyšší (+1). Všechny zkoumané faktory a jejich úrovně jsou v Tab. 4.4.1. Na základě těchto faktorů byl ve statistickém programu navržen plán experimentů, podle něhož bylo provedeno 8 měření (Tab. 4.4.2).

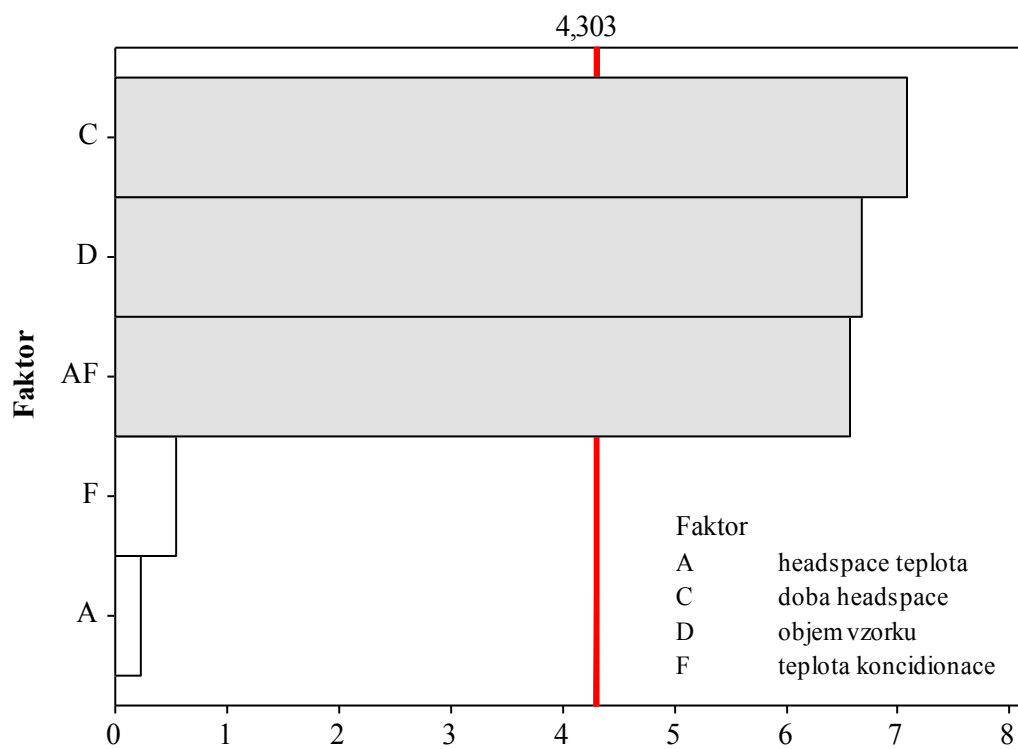
Tab. 4.4.2 Plán experimentů navržený statistickým programem podle frakčního faktorového designu.

Měření	Headspace teplota (°C)	Rychlost míchání (rpm)	Doba headspace (min)	Objem vzorku (ml)	Čas kondicion. (min)	Teplota kondicion. (°C)
1	80	0	30	0,5	60	200
2	80	1250	30	2	60	250
3	25	0	30	2	10	200
4	25	1250	10	0,5	60	200
5	25	1250	30	0,5	10	250
6	80	0	10	0,5	10	250
7	80	1250	10	2	10	200
8	25	0	10	2	60	250

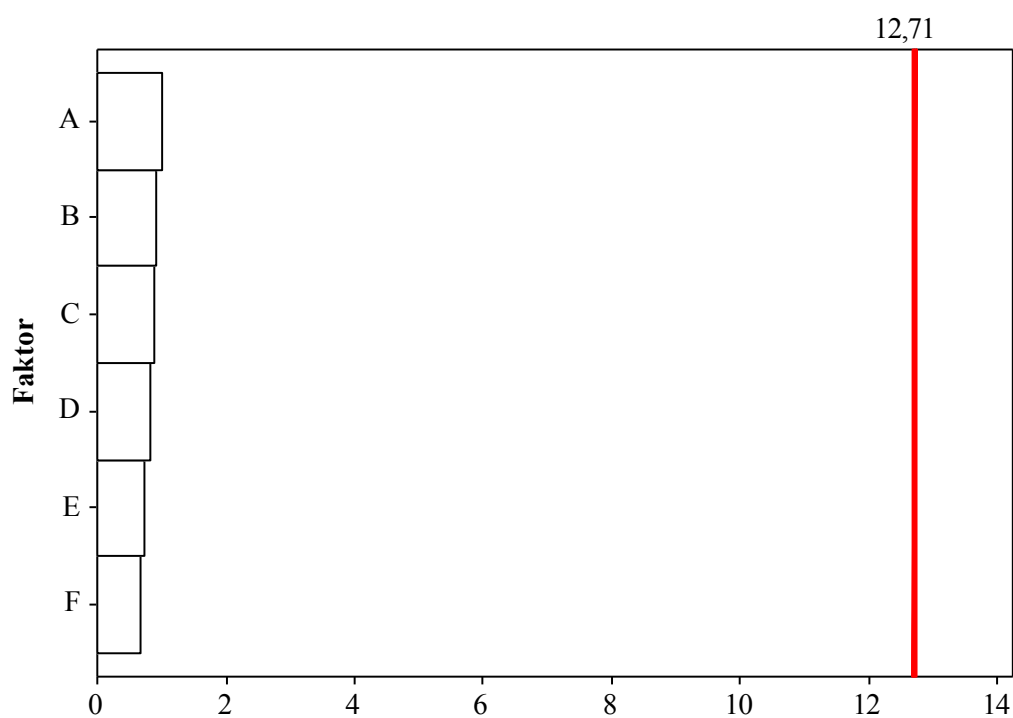
Po změření celého plánu experimentů bylo v programu Minitab 16 provedeno statistické vyhodnocení dle ANOVA metody (analýza rozptylu), kde byly pomocí t-testu stanoveny hlavní efekty (statisticky významné faktory) s 95 % pravděpodobností. Pro jasnější představu o vlivu faktorů na zkoumané odpovědi pro jednotlivé analyty i pro součet jejich ploch byly ve statistickém programu vytvořeny Paretovy grafy, kde na ose *x* jsou uvedeny standardizované efekty a na ose *y* jsou vyneseny faktory.

Test statistické významnosti efektů na základě frakčního faktorového designu ukázal, že největší vliv na odpověď u absolutní plochy pro butanol měla doba headspace, objem vzorku a interakce headspace teploty a teploty kondicionace (Obr. 4.4.1).

Z Paretových grafů pro ostatní alkoholy i pro součet všech ploch analytů (Obr. 4.4.2) vyplývá, že žádná odpověď nebyla statisticky významná.



Obr. 4.4.1 Paretův graf pro absolutní plochu butanolu. Svislá čára v grafu definuje 95 % hladinu významnosti.



Obr. 4.4.2 Paretův graf pro součet absolutních ploch (butanol, pentanol, hexanol, oktanol, nonanol). Svislá čára v grafu definuje 95 % hladinu významnosti.

4.4.3 Modelování

Modelování bylo provedeno pomocí face centered Central Composite Designu (fcCCD), který byl vytvořen v programu Minitab 16²⁹. K plánu experimentu vytvořených frakčním faktorovým designem bylo přidáno dalších 12 měření (Tab. 4.4.3)

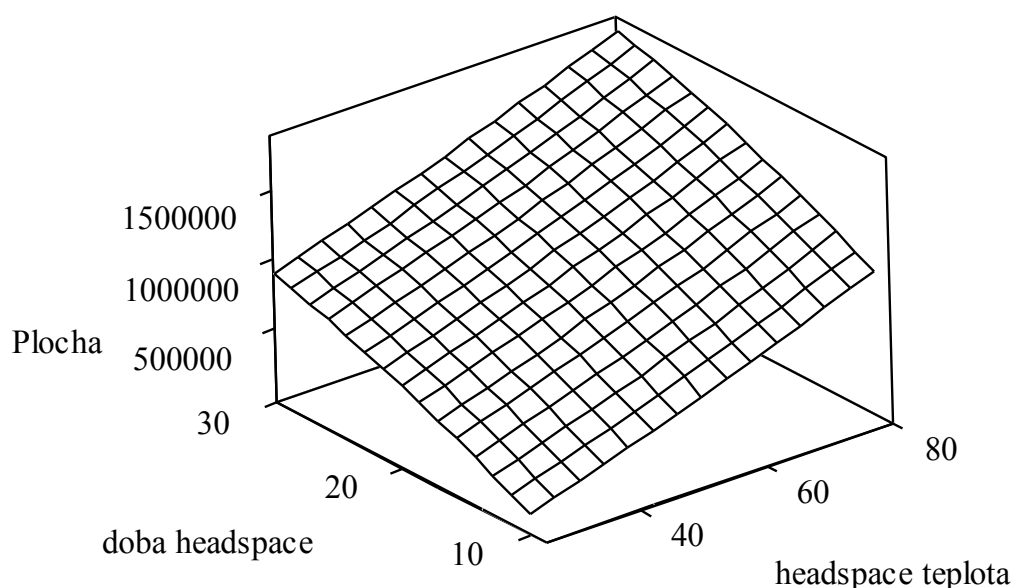
Tab. 4.4.3 Plán experimentů vytvořený statistickým programem Minitab 16 podle fcCCD.

Měření	Headspace teplota (°C)	Rychlost míchání (rpm)	Doba headspace (min)	Objem vzorku (ml)	Čas kondicion. (min)	Teplota kondicion. (°C)
1	80	0	10	0,5	10	250
2	25	0	10	2	60	250
3	80	0	30	0,5	60	200
4	25	1250	10	0,5	60	200
5	25	0	30	2	10	200
6	25	1250	30	0,5	10	250
7	80	1250	30	2	60	250
8	80	1250	10	2	10	200
9	25	625	20	1,25	35	225
10	80	625	20	1,25	35	225
11	52,5	0	20	1,25	35	225
12	52,5	1250	20	1,25	35	225
13	52,5	625	10	1,25	35	225
14	52,5	625	30	1,25	35	225
15	52,5	625	20	0,5	35	225
16	52,5	625	20	2	35	225
17	52,5	625	20	1,25	10	225
18	52,5	625	20	1,25	60	225
19	52,5	625	20	1,25	35	200
20	52,5	625	20	1,25	35	250

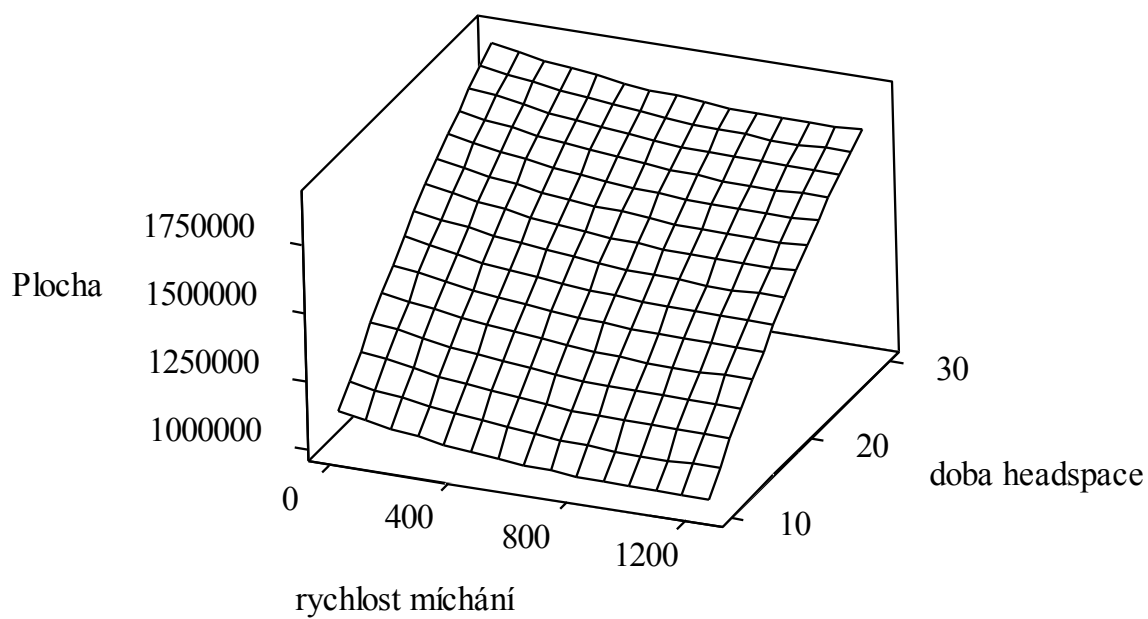
Po vyhodnocení metodou ANOVA byly z programu Minitab 16 získány matematické rovnice, které popisují komplexní závislosti jednotlivých odpovědí (absolutní plochy píků analytů, celkový součet ploch) na vybraných faktorech.

Na základě těchto rovnic Minitab 16 vytvořil trojrozměrné grafy, které znázorňují závislosti zkoumané odpovědi (absolutní plochy píků) na vybraných faktorech. Na osách x a y jsou uvedeny faktory, na ose z je hledaná odpověď za podmínky, kdy jsou ostatní faktory konstantní. Jsou uvedeny jen dva vybrané 3D grafy.

Obrázek 4.4.3 zobrazuje závislost odpovědi (absolutní plochy píku butanolu) na době headspace a headspace teplotě. S rostoucí teplotou a rostoucí dobou headspace je možné pozorovat nárůst plochy píku. Z Obrázku 4.4.4 je patrné, že se zvyšující se rychlostí míchání a vyšší dobou headspace roste odpověď (absolutní plocha píku).



Obr. 4.4.3 Graf závislosti odpovědi u butanolu (absolutní plocha píku) na headspace teplotě a době headspace. Ostatní faktory za optimálních podmínek: rychlost míchání 1250 rpm, objem vzorku 2 ml, čas kondicionace 37 min, teplota kondicionace 250 °C.



Obr. 4.4.4 Graf závislosti odpovědi u butanolu (absolutní plocha píku) na rychlosti míchání a době headspace. Ostatní faktory za optimálních podmínek: teplota headspace 80°C, objem vzorku 2 ml, čas kondicionace 37 min, teplota kondicionace 250°C.

4.4.4 Optimalizace

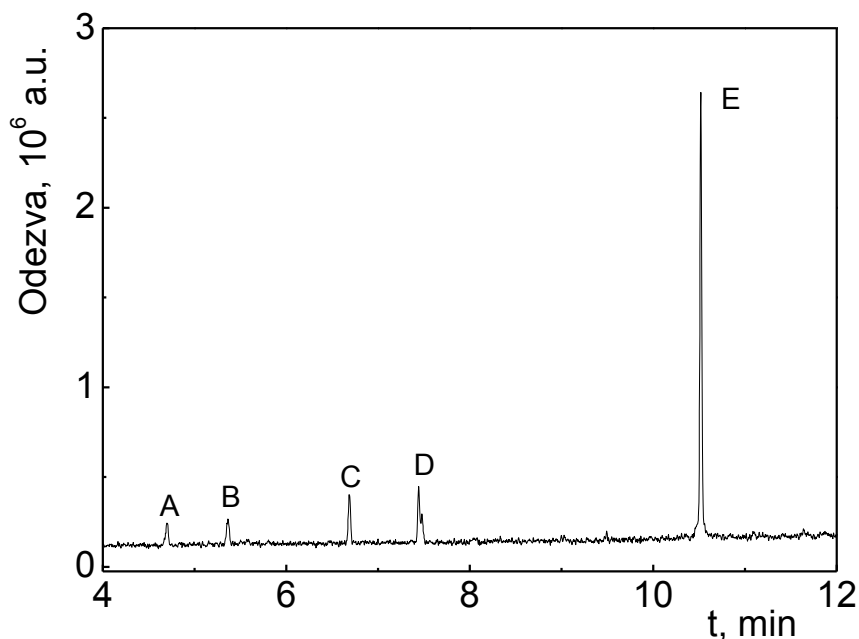
Po nalezení matematických rovnic byla v programu Minitab 16 provedena vlastní optimalizace. Pomocí statistické funkce desirability byly nalezeny optimální podmínky pro získání absolutních ploch píků pro jednotlivé analyty i pro součet jejich absolutních ploch (Tab. 4.4.4). Z výsledných optimálních hodnot vyplývá, že extrakční podmínky pro butanol vyžadují nižší teplotu headspace a kondicionace oproti ostatním alkoholům. Optimální podmínky u ostatních alkoholů jsou podobné.

Tab. 4.4.4 Optimální hodnoty zjištěné z programu Minitab 16 pro maximální odpovědi pro absolutní plochy analytů i pro součet jejich ploch.

Faktor	butanol	pentanol	hexanol	oktanol	nonanol	součet ploch
Headspace teplota (°C)	25	80	80	80	80	80
Rychlost míchání (rpm)	0	1250	0	1250	1250	1250
Doba headspace (min)	30	30	30	30	30	30
Objem vzorku (ml)	2	0,5	2	2	0,5	2
Čas kondicionace (min)	30	36	40	35	35	37
Teplota kondicionace (°C)	200	250	250	250	250	250

Pro následnou optimální extrakci směsi alkoholů byly zvoleny hodnoty pro součet ploch, protože nejlépe zahrnují celý modelový roztok. Na Obrázku 4.4.5 je zobrazen výsledný chromatogram za optimalizovaných podmínek pro přípravu vzorku pomocí SPME pro součet absolutních ploch všech alkoholů, které jsou: teplota headspace 80 °C, rychlost míchání 1250 rpm, doba headspace 30 min, objem vzorku 2 ml, čas kondicionace 37 min a teplota kondicionace 250 °C.

U Obr. 4.3.3 (viz 4.3.2 Extrakce alkoholů), kde je zobrazen chromatogram za neoptimalizovaných extrakčních podmínek (teplota headspace 25 °C, doba headspace 20 min, objem vzorku 1 ml, rychlost míchání 0 rpm, teplota kondicionace 165 °C, čas kondicionace 20 min) byly sečteny absolutní plochy všech píků alkoholů, které jsou přibližně 7x nižší než součet všech absolutních ploch píků za optimalizovaných podmínek vzorkování. Díky optimalizaci extrakčních podmínek se tedy absolutní plochy píků modelové směsi alkoholů sedminásobně zvýšily.



Obr. 4.4.5 TIC chromatogram alkoholů (A - butanol, B - heptanol, C - hexanol, D - oktanol, E - nonanol). Splitless mód (30 s), teplotní program: 40 °C (3 min), 10 °C/min do 165 °C (5 min). Doba jedné analýzy 20,5 min. Desorpční čas platinového drátku v injektoru 30 s. Vzorkování za optimalizovaných podmínek pro součet ploch: teplota headspace 80 °C, doba headspace 30 min, objem vzorku 2 ml, rychlost míchání 1250 rpm, teplota kondicionace 250 °C, čas kondicionace 37 min.

Pro hrubé srovnání selektivity PPBQ filmu byly sečteny absolutní plochy všech píků u modelové směsi uhlovodíků za podmínek vzorkování (teplota headspace 25 °C, doba headspace 20 min, objem vzorku 1 ml, rychlost míchání 0 rpm, teplota kondicionace 165 °C, čas kondicionace 20 min) a absolutní plochy píků u modelové směsi alkoholů za optimalizovaných extrakčních podmínek (teplota headspace 80 °C, doba headspace 30 min, objem vzorku 2 ml rychlost míchání 1250 rpm, teplota kondicionace 250 °C a čas kondicionace 37 min). Sumy absolutních ploch byly vyděleny počtem analytů, aby byl výpočet uveden na průměr absolutní plochy jednoho píku, kdy bylo zjištěno, že modelová směs uhlovodíků má přibližně 54x vyšší selektivitu na PPBQ stacionární fázi než modelová směs alkoholů po optimalizaci. Z toho vyplývá, že nová PPBQ stacionární fáze má vyšší selektivitu vůči uhlovodíkům než k alkoholům.

5 Závěr

V této diplomové práci byla elektrochemicky připravena nová stacionární fáze (PPBQ film) pro headspace SPME. Pro ověření vhodného potenciálu pro depozici byla nejprve použita cyklická voltametrie. Depozice PPBQ filmu byla prováděna pomocí amperometrie, kde byl nastaven konstantní potenciál -1000 mV po dobu 5 min. Příprava filmu byla nejprve optimalizována na diskové platinové elektrodě. PPBQ film byl následně připravován na sadě platinových drátků vhodných pro SPME vzorkování.

Charakter PPBQ filmu byl ověřen pomocí infračervené spektroskopie, kde bylo potvrzeno, že v naměřených spektrech jsou patrné vibrační frekvence, které popisují fosfazený, hydrochinony a vazby $-P-O-$ a $-P-Cl-$.

Pro ověření selektivity PPBQ filmu byla vybrána modelová směs uhlovodíků (heptan, toluen a oktan) v pentanu, která byla analyzována na GC-FID. Z výsledných chromatogramů nebylo možné identifikovat jiné neznámé sloučeniny, proto byl dále používán GC-MS. Pomocí MS detektoru byly určeny struktury neznámých látek, které odpovídají BQ a TBATFB. Tyto látky nebylo možné odstranit ani kondicionováním vlákna za vysokých teplot a za sníženého tlaku, ani opláchnutím v acetonitrilu.

Pro testování selektivity stacionární fáze byl zvolen modelový roztok alkoholů rozpuštěných ve vodě (butanol, pentanol, hexanol, oktanol a nonanol). Extrakční příprava vzorku byla optimalizována pomocí faktorového designu. Pro požadovanou odpověď (absolutní plocha) pro butanol měl statisticky významný vliv: doba headspace extrakce, objem vzorku a interakce faktorů teploty headspace a teploty kondicionace. Pro ostatní alkoholy, ani pro součet ploch směsi alkoholů nebyl žádný z faktorů statisticky významný. Program Minitab 16 vyhodnotil optimální parametry pro jednotlivé alkoholy i pro součet absolutních ploch celé směsi.

Další výzkum by se měl zaměřit na validaci celé metodiky zahrnující nejen extrakční postup ale i separační proces na GC-MS. Selektivita stacionární fáze PPBQ filmu by měla být dále testována na větším počtu modelových analytů.

Použité zdroje

1. Pawliszyn, J.: Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. *Anal. Chem.* **62**, 2145-2148 (1990).
2. Josowicz, M.; Li, J.; Exarhos, G. J.: Novel Electrosynthesis of Poly(cyclo organophosphazenes). *J. Electrochem. Soc.* **141**, (1994).
3. Keshav, K.; Singh, N.; Elias, A. J.: Synthesis and Reactions of Ethynylferrocene Derived Fluoro and Chlorocyclotriphosphazenes. *Inorg.Chem.* **49**, (2010).
4. Nair, L. S.; Bhattacharyya, S.; Bender, J. D.; Greish, Y. E.; Brown, P. W.; Allcock, H. R.; Laurencin, C. T.: Fabrication and Optimization of Methylphenoxy Substituted Polyphosphazene Nanofibers for Biomedical Applications. *Biomacromolecules* **5**, 2212-2220 (2004).
5. Allcock, H. R.: *Chemistry and Applications of Poly-phosphazenes*. J. Wiley, Hoboken, New Jersey 2003.
6. Uslu, A.; Balç, C. M.; Yuksel, F.; Ozcan; E.; Dural, S.; Beşli, S.: The investigation of thermosensitive properties of phosphazene derivatives bearing amino acid ester groups. *Journal of Molecular Structure* **1136**, 90-99 (2017).
7. Caliceti, P.; Veronese, F. M.; Lora, S.: Polyphosphazene microspheres for insulin delivery. *International Journal of Pharmaceutics* **21**, 57-65 (2000).
8. Sethuraman, S.; Nair, L. S.; El-Amin, S.; Nguyen, M. T.; Singh, A.; Krogman, N.; Greish, Y. E.; Allcock, H. R.; Brown, P. W.; Laurencin, C.: Mechanical properties and osteocompatibility of novel biodegradable alanine based polyphosphazenes: Side group effects. *Acta Biomaterialia* **6**, 1931-1937 (2010).

9. Gleria, M.; Po, R.; Giannotta, G.; Fiocca, L.; Bertani, R.; Fambri, L.; Mantia, F. P.; Scaffaro, R.: Cyklofosfazenes as Polymer Modifiers. *Macromolecular Symposia* **196**, 249-270 (2003).
10. Harvey, D.: *Modern Analytical Chemistry*. 1. vyd. Boston: McGraw-Hill 2000.
11. Josowicz, M.; Li, J.; Windisch, Ch. F.: Doping of Poly(cyklofosfazene-benzoquinone) Films with polyiodide. *Chem. Mater.* **9**, 1285-1291 (1997).
12. Josowicz, M.; Li, J.: Synthesis and Characterization of electropolymerized Poly(cyklofosfazene –benzoquinone). *Chem. Mater.* **9**, 1451-1462 (1997).
13. Webster, R. L.; Mete, J. B.; Rawson, P. M.; Evans, D. J.; Marriott, P. J.: Oxidised compounds in aviation fuels using Nafion fibre solid phase microextraction. *Fuel* **197**, 226-231 (2017).
14. Pragst, F.: Application of solid - phase microextraction in analytical toxicology. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **388**, 1393-1414 (2007).
15. Eisert, R.; and Pawliszyn J.: New Trends in Solid-Phase Microextraction. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **27(2)**, 103-135 (1997).
16. 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).
17. Zhang, Z.; Pawliszyn, J.: Headspace solid- phase microextraction. *Analytical Chemistry* **65**, 1843-1852 (1993).

18. Levermore, D. M.; Josowicz, M.; Rees, W. S.; Janata, J.: Headspace Analysis of Engine Oil by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **73**, 1361-1365 (2001).
19. Risticvic, S.; Niri, V. H.; Vuckovic, D.; Pawliszyn, J.: Recent developments in solid-phase microextraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **393**, 781-795 (2009).
20. Buchholz, K. D.; Pawliszyn, J.: Optimization of Solid-Phase Microextraction Conditions for Determination of Phenols. *Anal. Chem.* **66**, 160-167 (1994).
21. Ghavidel, F.; Shahtaheri, S. J.; Torabbeigi, M.; Froushani, A. R.: Optimization of Solid Phase Microextraction Procedure for Determination of Paraquat Using Reduction Process. *Journal of Analytical Chemistry* **71**, 648-652 (2016).
22. D'Agostino, M. F.; Sanz, J.; Sanz, M. L.; Giuffrè, A. M.; Sicari, V.; Soria, A. C.: Optimization of a Solid-Phase Microextraction method for the Gas Chromatography–Mass Spectrometry analysis of blackberry (*Rubus ulmifolius* Schott) fruit volatiles. *Food Chemistry* **187**, 10-17 (2015).
23. Tankiewicz, M.; Morrison, C.; Biziuk, M.: Application and optimization of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) coupled with gas chromatography–flame-ionization detector (GC–FID) to determine products of the petroleum industry in aqueous samples. *Microchemical Journal* **108**, 117-123 (2013).
24. Ryan, T. P.: *Modern Experimental Design*. Hoboken, John Wiley & Sons 2007.
25. Leardi, R.: Experimental design in chemistry: A tutorial. *Analytica Chimica Acta* **625**, 161-172 (2009).

26. Hibbert, D. B.: Experimental design in chromatography: A tutorial review. *Journal of Chromatography B* **910**, 2-13 (2012).
27. Bezerra, M. A.; Santelli, R. E.; Oliveira, E. P.; Villar, L. S.; Escaleira, L. A.: Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* **76**, 965-977 (2008).
28. Costa, N. R.; Pereira, Z. L.: Multiple response optimization: a global criterion-based method. *Journal of chemometrics* **24**, 333- 342 (2010).
29. Myers, R. H.; Montgomery, D. C.; Anderson-Cook, C. M.: *Response Surface Methodology: Process and Product Optimization Using Designed Experiment*. 3. vyd. Hoboken, John Wiley & Sons 2009.