



ČESKÉ VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V PRAZE

FAKULTA BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ
Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva

**Nové možnosti přípravy vzorků obsahující bojové chemické
látky a jejich degradační produkty pro GC/MS analýzu**

**New Approaches to Sample Preparation of Chemical Warfare
Agents and Related Degradation Products for GC/MS Analysis**

Diplomová práce

Studijní program: Civilní nouzové plánování

Autor diplomové práce: Bc. Adam Bosák

Vedoucí diplomové práce: Ing. Martin Urban

Konzultantka diplomové práce: Ing. Petra Kadlec Linhartová

Kladno 2022



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

I. OSOBNÍ A STUDIJNÍ ÚDAJE

Příjmení: **Bosák** Jméno: **Adam** Osobní číslo: **503688**
Fakulta: **Fakulta biomedicínského inženýrství**
Garantující katedra: **Katedra zdravotnických oborů a ochrany obyvatelstva**
Studijní program: **Civilní nouzové plánování**

II. ÚDAJE K DIPLOMOVÉ PRÁCI

Název diplomové práce:

Nové možnosti přípravy vzorků obsahující bojové chemické látky a jejich degradační produkty pro GC/MS analýzu

Název diplomové práce anglicky:

New Approaches to Sample Preparation of Chemical Warfare Agents and Related Degradation Products for GC/MS Analysis

Pokyny pro vypracování:

Předmětem diplomové práce bude experimentální studium nových možností přípravy vzorků, které obsahují zejména bojové chemické látky a jejich degradační produkty (cílové analyty). Teoretická část se bude zabývat obecnou charakteristikou cílových analytů a současným stavem problematiky přípravy vzorků pro GC/MS analýzu jak z pohledu klasických a pokročilých přístupů, tak z hlediska nových extrakčních a separačních metod a technik, včetně dostupné instrumentace. Rovněž budou popsány i možnosti derivatizace a použití derivatizačních činidel pro polární analyty. V praktické části bude proveden experimentální výzkum nových extrakčních metod a technik za použití reálných vzorků obsahující cílové analyty s cílem zhodnotit jejich efektivitu a případně optimalizovat extrakční nebo analytické charakteristiky. Pozornost bude zaměřena zejména na možnosti použití vysokokapacitní sorpční extrakce a další inovované techniky založené na principu mikroextrakce tuhou fází. Výstupem práce budou doporučené pracovní postupy přípravy vzorků s následnou analytickou koncovkou pomocí GC/MS analýzy a jejich začlenění do akreditovaných metodik Laboratoře toxických látek SÚJCHBO, v.v.i.

Seznam doporučené literatury:

- [1] VANNINEN, Paula, Recommended Operating Procedures for Analysis in the Verification of Chemical Disarmament, University of Helsinki, 2017, ISBN 978-951-51-3916-0
- [2] VALDEZ, Carlos A., Roald N. LEIF, Saphon HOK and Bradley R. HART, Analysis of chemical warfare agents by gas chromatography-mass spectrometry: methods for their direct detection and derivatization approaches for the analysis of their degradation products, 2018, Reviews in Analytical Chemistry, 37(1), 2191-0189
- [3] GUPTA, Ramesh, Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents, ed. 3, Academic Press, 2020, 1318 s., ISBN 9780128190906

Jméno a příjmení vedoucí(ho) diplomové práce:

Ing. Martin Urban

Jméno a příjmení konzultanta(ky) diplomové práce:

Ing. Petra Kadlec Linhartová

Datum zadání diplomové práce: **04.10.2021**

Platnost zadání diplomové práce: **22.09.2023**

doc. Mgr. Zdeněk Hon, Ph.D.
vedoucí katedry

prof. MUDr. Jozef Rosina, Ph.D., MBA
děkan

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci s názvem **Nové možnosti přípravy vzorků obsahující bojové chemické látky a jejich degradační produkty pro GC/MS analýzu** vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů, které uvádím v seznamu bibliografických odkazů.

Nemám závažný důvod proti užití tohoto školního díla ve smyslu § 60 zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů.

V Kladně dne 12.05.2022



.....
Bc. Adam Bosák

PODĚKOVÁNÍ

Touto cestou bych rád poděkoval vedoucímu práce, Ing. Martinu Urbanovi, který je zároveň mým vedoucím v rámci Odboru chemické ochrany SÚJCHBO, v.v.i., za rady a odborné připomínky zejména při provádění experimentálního výzkumu, a to nejen při zpracovávání této diplomové práce.

Nemalé poděkování rovněž patří mé konzultantce, blízké a dlouholeté kolegyni, Ing. Petře Kadlec Linhartové, za její podporu, cenné rady a diskuze o věcech vážných i nevážných, a v neposlední řadě vedoucí Laboratoře toxických látek, Ing. Markétě Weisheitelové, Ph.D., za její profesní, materiální a technickou podporu, bez které by nebylo možné experimentální práce a studie provádět.

A celkově všem, kteří mne v průběhu studia podporovali.

ABSTRAKT

Tématem diplomové práce je zhodnocení efektivity a využitelnosti inovovaných extrakčních a separačních technik pro přípravu vzorků obsahující bojové chemické látky anebo související chemické látky v podobě degradačních produktů. Příprava vzorků pro GC/MS analýzu je kritickým krokem celého analytického procesu, proto je snaha o vylepšování starších přístupů nebo vytváření nových technik, které budou citlivější, bezpečnější, přesnější, ekologičtější a pohodlnější.

Teoretická část práce představuje problematiku chemických zbraní a bojových chemických látek z kategorie nervově paralytických a zpuchýřujících látek. Pozornost je také věnována významným degradačním mechanismům a produktům, jejichž vlastnosti mohou hrát důležitou roli v procesu přípravy vzorků. Pozornost je rovněž věnována klasickým i moderním technikám pro přípravu vzorků, včetně moderní instrumentace pro automatizaci a GC/MS analýzu.

Praktická část práce se zabývá experimentálním studiem efektivity tří vybraných technik. První z nich, podporovaná kapalinová extrakce (SLE), se vyznačuje schopností efektivně extrahovat nepolární organické látky za neutrálních nebo alkalických podmínek rychle a jednoduše. Experimenty ukázaly dobré extrakční charakteristiky pro nervově paralytické látky a organofosforové insekticidy. Druhá z technik, vysokokapacitní sorpční extrakce (HCSE), se díky vyššímu objemu sorbentu oproti klasické technice SPME vyznačuje vyšší citlivostí a robustností. Bylo ověřeno použití techniky HCSE na rychlé stanovení bojových chemických látek v pevných nebo kapalných vzorcích. Poslední technikou, sorpční extrakce za použití míchadla (SBSE), bylo testováno na možnost ponoření do vodného vzorku, kde by probíhala extrakce už v průběhu cesty vzorku do laboratoře.

Výstupem práce je doplnění akreditovaných metodik a pracovních postupů k využití technik z experimentálního studia pro přípravu vzorků v laboratoři.

Klíčová slova

GC/MS; chemické odzbrojení; chemické zbraně; bojové chemické látky; příprava vzorků; analytická chemie; sorpční extrakce

ABSTRACT

Presented Master's thesis focuses on the evaluation of the efficiency and usability of innovative extraction and separation techniques for the preparation of samples containing chemical warfare agents or related toxic chemicals like degradation products. Sample preparation for GC/MS analysis is a critical step in the entire analytical process, so there is an effort to improve older approaches or create new techniques that will be more sensitive, safer, more accurate, greener, and more convenient.

The theoretical part of the work presents the issue of chemical weapons and chemical warfare agents from the category of nerve and blister agents. Attention is also paid to important degradation mechanisms and products. Their properties may play an important role in the sample preparation and analytical process. This part also covers classical and modern techniques for sample preparation, including modern instrumentation for sample automation.

The experimental part of the work dealt with an experimental study of the effectiveness of three selected techniques. The first of these, Supported Liquid Extraction (SLE), is characterized by the ability to efficiently extract non-polar organic CWC-related Toxic chemicals under neutral or alkaline conditions from aqueous samples quickly and easily. Experiments have shown good extraction characteristics for nerve agents and organophosphorus insecticides. Second technique, High-capacity Sorption Extraction (HCSE) is characterized by higher sensitivity and robustness compared to conventional SPME techniques thanks to the higher volume of different types of sorbents. The use of a technique for the rapid determination of chemical warfare agents in solid or liquid samples was verified. The latest technique, Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE), was tested for the possibility of immersion to the aqueous sample before sample's journey to the laboratory due to efficient extraction and rapid analysis after arrival.

Keywords

GC/MS; chemical disarmament; chemical weapons; chemical warfare agents; sample preparation; analytical chemistry; sorptive extraction

Obsah

1	ÚVOD.....	9
2	CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY.....	11
3	PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU	12
3.1	Úvod do problematiky chemických zbraní	12
3.2	Vymezení a charakteristika sledovaných analytů	14
3.2.1	Nervově paralytické látky.....	15
3.2.2	Zpuchýřující látky	20
3.2.3	Degradační produkty vybraných stanovených látek.....	23
3.3	Možnosti přípravy vzorků pro analýzu	29
3.3.1	Typy vzorků pro analýzu.....	31
3.3.2	Klasické techniky extrakce.....	32
3.3.3	Mikroextrakční techniky založené na SPE	35
3.3.4	Instrumentace pro automatickou přípravu vzorků.....	42
3.4	Derivatizace vzorků pro GC/MS analýzu	45
3.5	Analytická instrumentace.....	47
4	METODIKA.....	48
4.1	Použité chemikálie	48
4.2	Analytická instrumentace.....	49
4.3	Ostatní laboratorní přístroje a pomůcky	51
4.4	Bezpečnost a ochrana zdraví při práci	52
4.5	Pracovní postupy	53
4.5.1	Experimentální studium LLE/SLE	53
4.5.2	Experimentální studium HCSE	55
4.5.3	Experimentální studium SBSE.....	57

5	VÝSLEDKY.....	58
5.1	Výsledky experimentálního studia LLE/SLE.....	58
5.2	Výsledky experimentálního studia HCSE.....	70
5.3	Výsledky experimentálního studia SBSE	76
6	DISKUZE.....	78
6.1	Shrnutí experimentálního studia LLE/SLE.....	78
6.2	Shrnutí experimentálního studia HCSE.....	83
6.3	Výsledky experimentálního studia SBSE	85
6.4	Výstupy práce	87
7	ZÁVĚR	88
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	89
9	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	91
10	SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ	96
11	SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK.....	98
12	SEZNAM PŘÍLOH	99

1 ÚVOD

„Working together for a world free of chemical weapons.“

Motto Organizace pro zákaz chemických zbraní

I přes neutuchající snahu mezinárodního společenství omezit a eliminovat možné nasazení chemických zbraní pro účely zakázané *Úmluvou o zákazu chemických zbraní*, která pro své smluvní státy vešla v platnost v roce 1997, jsme i na počátku 21. století svědky jejich aktivní přítomnosti.

Vyšetřování použití chemických zbraní v Sýrii a Iráku, vražda Kim Čong-nama, otrava Sergeje Skripala a Alexeje Navalného prostřednictvím látek čtvrté generace nebo aktuální prohlášení o použití chemických zbraní během ruské agrese na Ukrajině na začátku roku 2022 – to jsou jen některé příklady toho, proč je i pro Českou republiku připravenost na mimořádné události související s domnělým nebo ověřeným použitím chemických zbraní stále aktuální.

Řešení takových mimořádných událostí je vždy určitou výzvou, neboť při tom dochází k nasazení sil a prostředků v prostředí, které může být kontaminované extrémně toxickými látkami, jež byly přímo navrženy k usmrcení nebo zneschopnění osob, a to s sebou nese zvýšené požadavky na použití specifických složek integrovaného záchranného systému, jejich odbornost, použité ochranné prostředky, možnosti detekce a identifikace nebo dekontaminaci.

V dnešní době je díky technologickému vývoji v oblasti detekčních a identifikačních technik možné přímo v místě zásahu (nebezpečné zóně) provádět detekci plynů a par pomocí technik na principu spektrometrie pohyblivosti iontů (IMS) nebo plamenové fotometrie, jejich stanovení pomocí hmotnostní spektrometrie za „vysokého tlaku“ (HPMS), nebo identifikaci čistých pevných a kapalných látek technikami na principu molekulové spektrometrie, kam mohou být zařazeny široce používané Infračervené (FTIR) nebo Ramanovy spektrometry.

Jiná situace ovšem nastává, když se v místě nachází pouze stopová množství toxických chemických látek, došlo k jejich absorpci do materiálu (zejména složky životního prostředí nebo jiného materiálu), případně původní toxické chemické látky vlivem environmentálních vlivů zcela degradovaly a je přínosné provést alespoň identifikaci jejich degradačních – rozkladných produktů.

Takové aktivity již zpravidla vyžadují odběr vzorků, jejich zpracování a přípravu před vlastní analýzou instrumentálními technikami. Za určitý zlatý standard pro identifikaci tohoto spektra látek je považována analytická instrumentace na principu plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS). Tuto techniku je možné použít nejen ve stacionárních, ale i v mobilních analytických laboratořích.

Jako odborný pracovník Laboratoře toxických látek (LTL) Státního ústavu jaderné, chemické a biologické ochrany, v.v.i., (dále jen „SÚJCHBO, v.v.i.“) se problematikou odběru vzorků, jejich přípravy a následné analýzy pomocí GC/MS dlouhodobě věnuji. V rámci svých výzkumných aktivit se zaměřuji na extrakční a separační techniky, které by mohly být využity na nově zaváděné instrumentaci. Touto oblastí se rovněž zabývám ve své diplomové práci, která si dává za cíl zhodnotit použitelnost nových možností přípravy vzorků jak z pohledu nových nebo inovovaných extrakčních a separačních metod, tak z pohledu nového přístrojového vybavení.

Ačkoliv je v názvu práce operováno s pojmem „bojová chemická látka“, tento všeobecně používaný termín, diskutovaný zejména ve vojenské terminologii, je *de iure* pojmem nepřesným. Ve své podstatě vystihuje historicky ustálený přehled vojensky významných látek nejvíce využívaných pro chemické zbraně. Pro účely názvu je však nejvýstižnější.

V diplomové práci samotné bude využita terminologie vymezená pro účely zákona, který do českého právního systému implementuje Úmluvu o zákazu chemických zbraní, a dále pak terminologie užívaná pro potřeby činnosti Organizace pro zákaz chemických zbraní (OPCW), při které v současnosti působím jako stálý člen Validáční skupiny pro aktualizaci Centrální analytické databáze OPCW, která svou činností spadá pod Laboratoř OPCW, respektive Technický sekretariát OPCW.

2 CÍLE PRÁCE A HYPOTÉZY

Cílem diplomové práce bylo, na základě experimentálního studia, zhodnotit efektivitu a využití nových nebo inovovaných extrakčních a separačních technik v návaznosti na novou instrumentaci Laboratoře toxických látek SÚJCHBO, v.v.i., které by mohly vhodně rozšířit zavedené pracovní postupy přípravy vzorků obsahující toxické chemické látky a jejich degradační produkty s následnou analytickou koncovkou pomocí GC/MS analýzy, včetně jejich případného začlenění do souboru akreditovaných metodik Centrální laboratoře SÚJCHBO, v.v.i.

Experimentální výzkum probíhal v těchto dílčích částech:

- zhodnocení využitelnosti vakuového koncentrátoru Genevac EZ-2 pro přípravu vodných vzorků obsahující polární sledované analyty;
- experimentální studium přípravy vodných vzorků obsahující sledované analyty technikou podporované kapalinové extrakce (SLE);
- experimentální studium použití vysokokapacitní sorpční extrakce (HCSE);
- zhodnocení využitelnosti míchadel pro sorpční extrakci (SBSE) při odběru a následné přípravě kapalných vzorků.

Pro účely diplomové práce byly stanoveny následující hypotézy:

- H1:** Využitelnost a efektivita použití vakuového koncentrátoru Genevac EZ-2 je srovnatelná s rotační vakuovou odparkou.
- H2:** Příprava vodných vzorků technikou podporované kapalinové extrakce (SLE) je vhodná náhrada klasické techniky extrakce kapalina-kapalina (LLE).
- H3:** Předpokládejme, že příprava vzorků s využitím techniky vysokokapacitní sorpční extrakce (HCSE) je uplatnitelná v podmínkách analytické laboratoře LTL SÚJCHBO, v.v.i.
- H4:** Předpokládejme, že příprava vzorků s využitím techniky SBSE je uplatnitelná v polních i stacionárních podmínkách analytické laboratoře LTL SÚJCHBO, v.v.i.

3 PŘEHLED SOUČASNÉHO STAVU

3.1 Úvod do problematiky chemických zbraní

Problematika chemických zbraní je mezinárodně ukotvena v rámci **Úmluvy o zákazu vývoje, výroby, hromadění zásob a použití chemických zbraní a o jejich zničení**, zkráceně „*Úmluva o zákazu chemických zbraní*“ (dále jen „Úmluva“ nebo „CWC“). K podpisu byla otevřena 13. ledna 1993, v účinnost pro své smluvní státy vešla 29. dubna 1997. Na prosazování a kontrolu dodržování dohlíží **Organizace pro zákaz chemických zbraní** (OPCW) se sídlem v Haagu. Hlavním cílem OPCW je dosáhnout světa trvale bez chemických zbraní a přispět tak k mezinárodní bezpečnosti a stabilitě, úplnému chemickému odzbrojení a globálnímu hospodářskému rozvoji. Za své intenzivní úsilí o eliminaci chemických zbraní byla OPCW v roce 2013 oceněna Nobelovou cenou za mír (Mumy et al., 2019).

Přijetím Úmluvy se smluvní stát zavázal nikdy za žádných okolností (OPCW, 1997):

- a) *„nevyvíjet, nevyrábět, jinak nenabývat, nehromadit ani nepřechovávat chemické zbraně ani přímo nebo nepřímo nikomu chemické zbraně nepřevádět;*
- b) *nepoužít chemické zbraně;*
- c) *neprovádět žádné vojenské přípravy k použití chemických zbraní;*
- d) *žádným způsobem nikomu nepomáhat, ani jej nevyzývat či nepodněcovat k provádění jakékoli činnosti zakázané smluvnímu státu na základě Úmluvy.“*

Česká republika implementovala Úmluvu do znění zákona č. 19/1997 Sb., o některých opatřeních souvisejících se zákazem chemických zbraní, aktuálně ve znění zákona č. 336/2020 Sb. (dále také jen „zákon“).

Pro účely tohoto zákona se **chemickými zbraněmi** rozumí:

1. *„toxická chemická látka a její prekurzor, vyjma těch, které jsou určeny pro nezakázaný účel a jejichž druh a množství odpovídají tomuto účelu;*
2. *munice nebo prostředek určený k usmrcení nebo způsobení jiné újmy na zdraví člověka nebo zvířete anebo k poškození rostlin nebo ekosystémů toxickým působením toxických chemických látek uvedených v bodu 1., které by se uvolnily v důsledku použití této munice nebo tohoto prostředku, nebo*
3. *vybavení zvláště navržené k použití v přímé souvislosti s použitím munice nebo prostředku uvedených v bodu 2“ (Česko, 1997).*

Toxická chemická látka je definována jako „*jakákoli chemická látka, která může svým chemickým působením na životní procesy způsobit smrt, dočasné zneschopnění nebo trvalou újmu na zdraví lidem nebo zvířatům anebo zničení rostlin*“ (Česko, 1997).

Prekurzorem se pak rozumí „*jakákoli chemicky reagující látka, která se účastní kteréhokoli stadia výroby toxické chemické látky*“ (Česko, 1997).

Pro účely provádění Úmluvy jsou toxické chemické látky a jejich prekurzory, které podléhají kontrolním opatřením, uvedeny v celkem třech seznamech chemických látek v příloze Úmluvy. Ve smyslu zákona jde o tzv. **stanovené látky** a nakládání s nimi se řídí zákonem stanovenými podmínkami. Jedná se o **látky seznamu 1**, **látky seznamu 2** a **látky seznamu 3**. Každý seznam je následně rozdělen na část **A. Toxické látky** a část **B. Prekurzory**.

V předkládané diplomové práci budou toxické chemické látky a jejich prekurzory, případně některé degradační produkty, všeobecně označovány jako „chemické látky související s CWC“ (z ang. „*CWC-Related chemicals*“).

Chemické látky související s CWC jsou do jednotlivých seznamů zařazovány na základě „Zásad pro seznamy chemických látek“ uvedených v Úmluvě, přičemž je bráno v úvahu splnění specifických kritérií, které reflektují např. nebezpečnost chemické látky nebo míru potenciálu ohrožovat účel a cíl Úmluvy (OPCW, 1997).

Pro zjednodušení lze uvést, že pokud je toxická chemická látka, případně její prekurzor v případě binárních zbraní, použita pro účely zakázané Úmluvou, jedná se o použití chemické zbraně. Úmluva nicméně připouští, že toxické chemické látky nebo její prekurzory mohou být v souladu s Článkem VI. Úmluvy vyvíjeny, vyráběny, jinak nabývány nebo používány pro **činnosti nezakázané Úmluvou**, které jsou uvedeny v Úmluvě, respektive v zákoně (OPCW, 1997).

V České republice je možné nakládat s látkami seznamu 1 jen na základě licence udělené Státním úřadem pro jadernou bezpečnost, a to pouze k výzkumným, zdravotnickým, farmaceutickým nebo ochranným účelům (Česko, 1997).

3.2 Vymezení a charakteristika sledovaných analytů

Za skupinu sledovaných (cílových) analytů jsou v souvislosti s předkládanou prací považovány vybrané skupiny toxických chemických látek a jejich některé významné degradační produkty.

Pozornost je zaměřena zejména na nejvýznamnější zástupce **toxických chemických látek seznamu 1**, které OPCW (1997) popisuje jako chemické látky, které byly vyvíjeny, vyráběny, hromaděny nebo použity jako chemická zbraň a zároveň jiným způsobem ohrožují účel a cíl Úmluvy vzhledem k vysokému potenciálu svého použití pro činnosti zakázané. Na základě svých toxikologických vlastností jsou zpravidla kategorizovány jako nervově paralytické a zpuchýřující látky. Ostatní skupiny látek seznamu 1, jako např. toxiny, karbamáty nebo prekurzory seznamu 1, nebudou v rámci diplomové práce diskutovány.

Degradační produkty, tvořící druhou část sledovaných analytů, mohou být obecně rozděleny na dvě základní skupiny:

- a) chemické látky, na které je současně nahlíženo jako na prekurzory toxických chemických látek a jsou zpravidla stanoveny jako látky seznamu 2 a seznamu 3, část B. Prekurzory (jako příklad může být uveden Thiodiglykol – degradační produkt sulfidického yperitu, který je zároveň jeho prekurzorem a je stanoven jako látka seznamu 2B13);
- b) chemické látky vznikající degradačním procesem toxické chemické látky, ale nejsou stanoveny seznamy v příloze Úmluvy. Ty jsou pro potřeby Centrální analytické databáze OPCW, pokud je jejich zařazení do této databáze účelné, označovány jako „Nestanovené degradační produkty“ (*Non-Scheduled Degradation Products* – NDP).

V případě těchto látek bude experimentální výzkum zaměřen na vybrané degradační produkty použitých nervově paralytických a zpuchýřujících látek.

Souhrnný přehled sledovaných analytů použitých při experimentální části diplomové práce je součástí podkapitoly *4.1 Použité chemikálie*.

3.2.1 Nervově paralytické látky

Nervově paralytické látky (NPL) se na základě svých chemických, fyzikálních a toxikologických vlastností řadí mezi jednu z nevýznamnějších kategorií toxických chemických látek. Jejich značná významnost může být doložena i tím, že když se Halámek a Kobliha (2011) snažili ve svém referátu generalizovat jednotlivé etapy vývoje chemických zbraní, NPL zaujímaly stěžejní téma druhé až čtvrté (poslední) generace vývoje chemických zbraní.

Ačkoliv Patočka (2010) uvádí, že první experimenty se syntézou organofosforových sloučeniny sahají už do druhé poloviny 18. století, jejich novodobější historie je spjata spíše až s obdobím 30. let 20. století, kdy Německo navázalo na dřívější výzkumy dialkylfosforfluoridátů a při vývoji nových syntetických insekticidů byly objeveny do té doby neznámé látky, které se následně staly základem NPL.

Chemicky se jedná o organické sloučeniny fosforu, pro které je charakteristická vysoká toxicita vůči savcům (Patočka, 2004). V literatuře se často setkáváme i se zjednodušeným výrazem „organofosfáty“, nicméně toto označení není některými autory považováno za přesné, neboť, jak popisuje např. Liška a Středa (2015), větší část NPL je strukturně odvozena od kyseliny fosfonové, konkrétně pak nejčastěji od kyseliny methylfosfonové (odtud *organofosfonáty*), ale výjimkou je tabun, který je funkčním derivátem kyseliny fosforečné (odtud *organofosfáty*).

Mechanismus účinku je založen na silné schopnosti inhibice acetylcholinesterázy – enzymu, který rozkládá cholinergní neurotransmitter acetylcholin v periferním i centrálním nervovém systému. Tím je narušen přenos nervového vzruchu, který vede ke generalizaci specifických klinických příznaků (Young a Watson, 2020).

Nervově paralytické látky se všeobecně dělí do čtyř základních podskupin, jak uvádí například Mukherjee a Gupta (2020), na:

- a. **látky série „G“**, kterou tvoří například tabun, sarin nebo soman;
- b. **látky série „V“**, kterou představuje látka „VX“ nebo její ruský analog „VR“;
- c. **látky série „GV“** s nejvýznamnějším představitelem látkou „GP“; a
- d. **látky série „A“**, tvořené zástupci bojových chemických látek 4. generace.

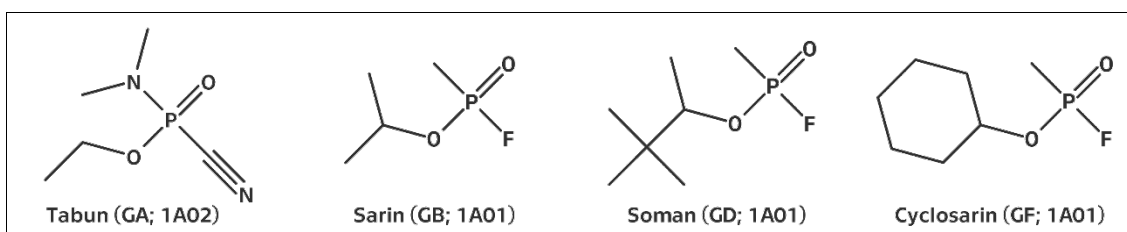
Toto dělení nejenže vhodně reflektuje jejich historický vývoj, ale také příhodně ohraničuje skupiny látek s velmi podobnými vlastnostmi.

a. Nervově paralytické látky série „G“

Skupina látek série G je obecně tvořena fosfonofluoridáty a fosforamidokyanidáty, které jsou zařazeny v seznamech 1A01 a 1A02 Úmluvy. Nejvýznamnější zástupci jsou uvedeni v Tabulce 1. Jejich struktury jsou pak vyobrazeny na Obrázku 1.

Tabulka 1 - Přehled významných zástupců NPL série G

Chemický název (OPCW, 2022)	Synonymum	CAS	Seznam
Isopropyl methylfosfonofluoridate	Sarin (GB; R-35)	107-44-8	1A01
Pinacolyl methylfosfonofluoridate	Soman (GD; R-55)	96-64-0	
Cyclohexyl methylfosfonofluoridate	Cyclosarin (GF)	329-99-7	
Ethyl N,N-dimethylphosphoramidocyanidate	Tabun (GA)	77-81-6	1A02



Obrázek 1 – Struktury významných zástupců NPL série G

Zdroj: OPCW Handbook on Chemicals (OPCW, 2022), upraveno v ACD/ChemSketch v.2021.2.1

Látky série G jsou v čistém stavu bezbarvé kapaliny, bez výraznějšího zápachu (Young a Watson, 2020). V praxi se setkáváme s různou úrovní zbarvení. Často se jedná o přechody od čiré, přes jantarovou až po hnědou barvu. To je obvykle způsobeno degradačními procesy (vznik rozkladných produktů) při skladování nebo přítomností nečistot. Případný zápach je v literatuře popisován různě, většinou také v závislosti na čistotě látky, jako slabě ovocný – GB, GA; ovocný až kafrový – GD (Black, 2016; Henderson et al., 2019).

Obecně se vyznačují vysokou těkavostí. Sarin je brán za nejtěkavější, jeho volatilita dosahuje až 22 000 mg/m³ (25 °C), těkavost pak klesá v řadě GB > GD > GF > GA. Díky své těkavosti jsou považovány za neperzistentní látky s nejpravděpodobnější expoziční cestou přes dýchací cesty (vysoké expoziční riziko v přítomnosti výparů). Celkově mají schopnost pronikat všemi branami vstupu (Young a Watson, 2020).

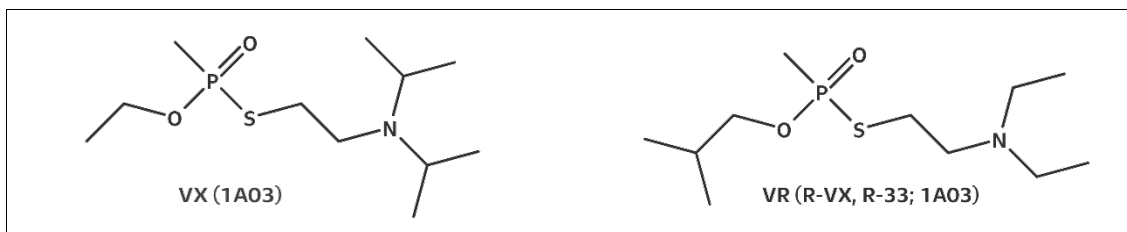
Rozpustnost ve vodě závisí na dané látce; sarin je s vodou mísitelný ve všech poměrech, ostatní významné látky série G jsou špatně rozpustné ve vodě (GA ~7 %, GD ~2 %, GF ~2 % při 20 °C). NPL jsou velmi dobře rozpustné v organických rozpouštědlech. Z fyzikálních vlastností lze ještě jmenovat podstatný bod varu, který u sarinu dosahuje 158 °C, u somanu 198 °C, tabunu 246 °C a cyklosarinu 239 °C (Henderson et al., 2019).

b. Nervově paralytické látky série „V“

Skupina látek série V je obecně tvořena alkylfosfonothioáty, které jsou zařazeny v seznamu 1A03 Úmluvy. Nejvýznamnější zástupci jsou uvedeni v Tabulce 2. Struktury jsou zobrazeny na Obrázku 2.

Tabulka 2 – Přehled významných zástupců NPL série V

Chemický název (OPCW, 2022)	Syn.	CAS	Seznam
Ethyl S-2-diisopropylaminoethyl methylphosphonothiolate	VX	50782-69-9	1A03
Isobutyl S-2-diethylaminoethyl methylphosphonothiolate	VR; R-33	159939-87-4	
Butyl S-2-diethylaminoethyl methylphosphonothiolate	C-VX	468712-10-9	



Obrázek 2 – Struktury významných zástupců NPL série V

Zdroj: OPCW Handbook on Chemicals (OPCW, 2022), upraveno v ACD/ChemSketch v.2021.2.1

Látky série V jsou v čistém stavu bezbarvé, lehce olejovité kapaliny, pravděpodobně bez výrazného zápachu (Young a Watson, 2020).

V praxi je typické jantarové zbarvení. Pro všechny tři nejznámější představitele látek série V, tedy „americkou“ látku VX, „ruskou“ recepturu R-33 (VR, R-VX) nebo „čínskou“ verzi látky (C-VX), jsou charakteristické velmi podobné vlastnosti. Ve své podstatě jde o izomery (Rembovskiy et al., 2020).

Charakteristickou vlastností je velmi nízká těkavost. Látka VX dosahuje maximální koncentrace par (oproti látkám série G) pouhých $\sim 10,5 \text{ mg/m}^3$ ($25 \text{ }^\circ\text{C}$), což je přibližně 2000x méně než u GB. Na tomto základě jsou považovány za perzistentní látky s nejpravděpodobnější expoziční cestou přes kůži (Young a Watson, 2020). Typická je také schopnost dlouhodobé kontaminace prostředí (povrchy, složky životního prostředí apod.). Látka VX byla v podstatě přímo navržena pro vyvolání perkutánní intoxikace při extrémně nízkých dávkách. V případě nasazení v podobě aerosolu, případně při akumulaci výparů, se zvyšuje riziko inhalační intoxikace, která je považována za akutněji účinnější než u sarinu nebo dalších látek série G. Celkově se látky série V vyznačují vyšší toxicitou, zejména při již zmíněné perkutánní intoxikaci (Henderson et al., 2015; Black, 2016; Young a Watson, 2020).

Z pohledu rozpustnosti jsou špatně rozpustné ve vodě (látka VX $\sim 3,6 \%$ při $20 \text{ }^\circ\text{C}$), naopak dobře rozpustné v organických rozpouštědlech. Hydrolyza za normálních podmínek probíhá zpravidla pomaleji, oproti látkám série G (Black, 2016).

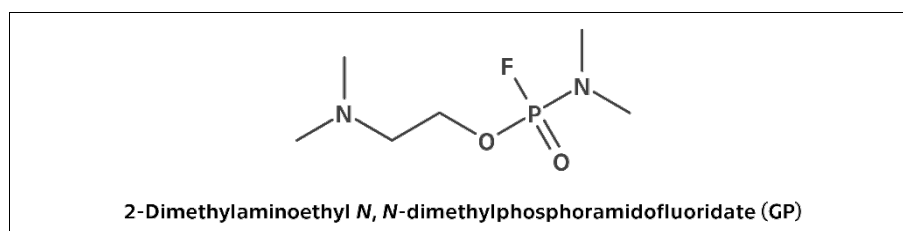
c. Nervově paralytické látky série „GV“

Nepříliš zmiňovaná skupina látek série GV je známa především v kontextu programů vývoje binárních chemických zbraní, které si dávaly za cíl navrhnout nejen vhodné NPL pro binární použití, ale také vytvořit odpovídající zbraňové systémy.

Vedle známých binárních receptur sarinu („GB-2“) a látky VX („VX-2“), americký program binárních zbraní zahrnoval také zavedení látky obecně označované „IVA“ („*Intermediate volatility agent*“ – Látka se střední těkavostí). Výzkum probíhal od konce 70. let 20. století a pokračoval v 80. letech vývojem vhodné raketové hlavičky (XM135 BCW) určené pro salvové raketomety (Murphey, 2004). Cílem výzkumu bylo vytvořit zbraňový systém pro rozptýlení polostálé NPL, která způsobí okamžité ztráty, případně přinutí protivníka k přijetí ochranných opatření, a v cílové oblasti zůstane účinná jen v řádu hodin, než se rozloží (DoD, 1990).

Právě skupina látek se střední těkavostí, které Halámek a Koblíha (2011) označují jako chemické zbraně třetí generace, tedy binární NPL se zvýšenou těkavostí, tvoří určité reálné pomezí mezi látkami série G a V (odtud označení „GV“), jak z pohledu stálosti, tak i například toxicity. Řeší zejména nedostatečnou perzistenci sarinu a zároveň malou těkavost látky VX.

Předpokládanou látkou se střední těkavostí byla látka „GP“ (v návaznosti na americké vojenské kódování), chemicky 2-Dimethylaminoethyl- (dimethylfosforamido) fluoridát. Za normálních podmínek jde o bezbarvou kapalinu s těkavostí 527 mg/m³ (25 °C), což přibližně odpovídá cyklosarinu. Má ovšem výrazně vyšší toxicitu, která se navíc vyznačuje rychlou dealkylací fosforylované acetylcholinesterázy, podobně jako u GD. Oproti látce VX dokáže snadněji pronikat textilními bariérami na povrch těla (Black, 2016; Matoušek a Linhart, 2005). Splňovala také požadavek na rychlý rozklad, neboť se v závislosti na teplotě (obvykle v řádech hodin) přeměňuje na tuhý netoxický produkt (Halámek a Koblíha, 2011). Bližší informace o vlastnostech představil např. Mašek et al. (2015), toxikologickými vlastnostmi se zabývali také Bajgar (1993) nebo Fusek a Bajgar (1994). Strukturu látky GP popisuje Obrázek 3.



Obrázek 3 – Struktura látky GP

Zdroj: Matoušek a Linhart (2005), upraveno v ACD/ChemSketch v.2021.2.1

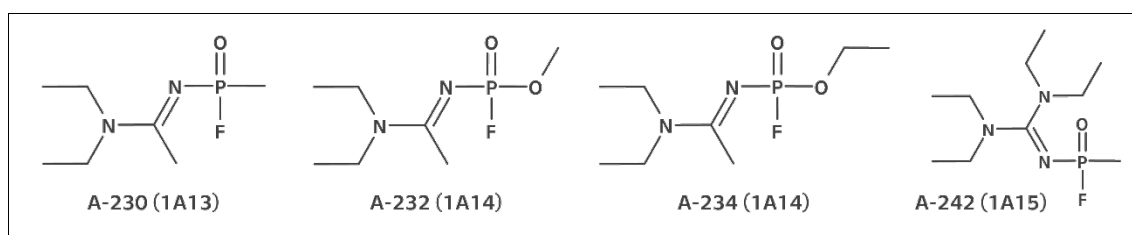
d. Nervově paralytické látky série „A“

Pitschmann (2014) uvádí, že na americký výzkum chemických látek třetí generace a celkově vývoj binárních chemických zbraní reagoval v 70. letech Sovětský svaz zahájením vlastního rozsáhlého výzkumu nových chemických zbraní čtvrté generace, a to zejména v rámci výzkumného projektu „Foliant“, který vedl k vývoji a testování nových látek v rámci programu „Novičok“. Poslední generaci chemických zbraní souhrnně popisují např. Halámek a Koblíha (2008) nebo Franca et al. (2019).

Jako látky série A jsou v odborné literatuře nejčastěji označovány binární nervově paralytické látky se zvýšenou toxicitou a těkavostí, vzniklé právě na základě výše zmíněných výzkumů. Je možné se setkat i s obecným označením „novičoky“, zejména v souvislosti s událostmi posledních let, toto označení však nemůže být považováno za přesné. Anglo-americká literatura často používá zkratku „FGAs“ (z ang. *Fourth Generation Agents* – látky čtvrté generace).

V dnešní době je na tuto skupinu látek zaměřena určitá pozornost v různých vědeckovýzkumných aspektech, jako jsou možnosti detekce a identifikace, odolnost ochranných prostředků, možnosti dekontaminace nebo stanovení toxikologických ukazatelů, včetně jejich reakce na současnou antidotní terapii při léčbě intoxikace.

Ačkoliv se stále vedou spory o strukturu látek, byly po diskuzích v rámci OPCW tyto látky v roce 2020 zařazeny na seznam 1 Úmluvy do skupin 1A13–1A15 (OPCW, 1997). Struktury některých významných zástupců jsou zobrazeny na Obrázku 4.



Obrázek 4 – Struktury významných zástupců NPL série A

Zdroj: OPCW Handbook on Chemicals (OPCW, 2022), upraveno v ACD/ChemSketch v.2021.2.1

3.2.2 Zpuchýřující látky

Zpuchýřující látky jsou vnímány za nejvýznamnější kategorii chemických zbraní první generace. Nejenže byly pro své jedinečné schopnosti používány již v počátcích novodobé historie chemické války, jejich použitelnost přetrvává do současnosti. Schopnost pronikání kapek nebo par sulfidického yperitu, čelního představitele této skupiny, je i v dnešní době jedním z nejdůležitějších ukazatelů odolnosti ochranných materiálů vůči toxickým chemickým látkám, neboť tyto látky snadno penetrují.

Všeobecně se jedná o málo těkavé a chemicky stálé látky vyznačující se vysokou perzistencí, které jsou charakteristické svým specifickým zničujícím efektem na tkáň. Vznik dlouhodobě přetrvávajících zánětlivých procesů na pokožce vedoucí ke tvorbě puchýřů a následným nekrotickým změnám, je typický při zasažení kapalinou (Young a Bast, 2020). Velice senzitivní jsou i dýchací cesty nebo oči, a to především při zasažení výpary. V případě inhalační intoxikace může docházet až k nekrotickým zánětům horních cest dýchacích (Patočka, 2004). Do organismu jsou schopny pronikat všemi branami vstupu. V závislosti na expozici mohou být účinky lokální nebo systémové. Celkově je toxický efekt komplexní, založený zejména na jejich cytotoxicitě.

Podrobnější poznatky z oblasti toxikologie zpuchýřujících látek ve smyslu jejich kinetiky a dynamiky předkládá např. Jenner (2016) nebo Young a Bast (2020).

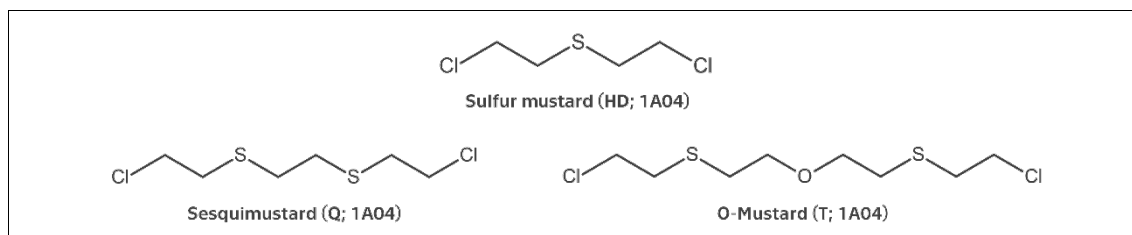
V návaznosti na seznam 1 Úmluvy mohou být zpuchýřující látky obecně rozděleny do tří skupin – **sírné yperity** (1A04), **lewisity** (1A05) a **dusíkové yperity** (1A06). Významné zástupce skupiny shrnuje Tabulka 3.

Tabulka 3 – Přehled významných zástupců zpuchýřujících látek

Chemický název (OPCW, 2022)	Synonymum	CAS	Seznam
Bis(2-chlorethyl)sulfid	Sulfidický yperit (HD)	505-60-2	1A04
1,2-Bis[(2-chlorethyl)sulfanyl]ethan	Seskviyperit (Q)	3563-36-8	
Bis{2-[(2-chlorethyl)sulfanyl]ethyl}ether	Kyslíkový yperit (T)	63918-89-8	
Dichlor(2-chlorovinyl)arsan	α -Lewisit (L-1)	541-25-3	1A05
Bis(2-chlorethyl)ethylamin	Dusíkový yperit HN-1	538-07-8	1A06
Bis(2-chlorethyl)methylamin	Dusíkový yperit HN-2	51-75-2	
Tris(2-chlorethyl)amin	Dusíkový yperit HN-3	555-77-1	

Nejvýznamnějším představitelem je sulfidický (též *sírný*) yperit, často označovaný také jako destilovaný yperit (HD). V čistém stavu se jedná o bezbarvou olejovitou kapalinu. Technický produkt má žluté až žlutohnědé zbarvení s charakteristickým zápachem, který je způsoben zejména nečistotami (Matoušek a Linhart, 2005). Sulfidický yperit je velmi špatně rozpustný ve vodě (ve které po rozpuštění rychle hydrolyzuje), dobře se rozpouští v organických rozpouštědlech.

Díky olejovité konzistenci, velmi špatné rozpustnosti ve vodě a nízké těkavosti je sulfidický yperit jako vysoce perzistentní látka předurčen především k vytváření dlouhodobé kontaminace (Young a Bast, 2020). Určitým nedostatkem je jeho vysoký bod tuhnutí (~14,5 °C), který omezuje použití v chladných a mrazivých podmínkách. Tato nevýhoda vedla k jeho používání ve směsích. Také jeho analogy – seskviyperit (Q) a kyslíkový yperit (T) byly určeny zejména pro směsi se sulfidickým yperit. Směs „HQ“ pro zvýšení perzistence, směs „HT“ pro horké klimatické podmínky. Kyslíkový yperit je často přítomen ve vzorcích sulfidického yperitu jako nečistota (Black, 2016). Strukturu HD a souvisejících „yperitů“ zobrazuje Obrázek 5.

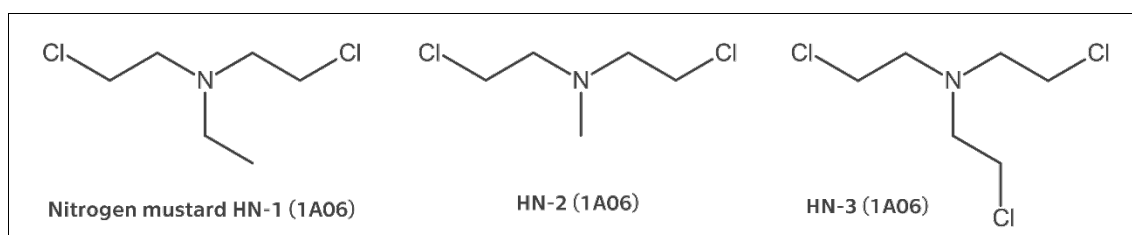


Obrázek 5 – Struktura HD a jeho analogů

Zdroj: OPCW Handbook on Chemicals (OPCW, 2022), upraveno v ACD/ChemSketch v.2021.2.1

Ze skupiny dusíkových yperitů je nejvíce diskutovaný především HN-3, který ze všech tří látek vynikal především stabilitou při skladování. Celkově je pro skupinu typická vyšší stálost v terénu, pomalejší hydrolyza a větší odolnost proti působení dekontaminačních činidel oproti sulfidickému yperitu. Dusíkový yperit HN-3 je v čistém stavu bezbarvá olejovitá kapalina s málo patrným aminovým zápachem. Termicky je nestabilní, což může být v některých typech chemické munice limitující (Matoušek a Linhart, 2005). Vedle dusíkového yperitu HN-3 byl pro vojenské účely navržen ještě dusíkový yperit HN-2. Třetí zástupce, HN-1, byl podle dostupné literatury původně vyvinut pro farmaceutické účely, kde se využívá zejména alkylační potenciál zpuchýřujících látek (Young a Bast, 2020).

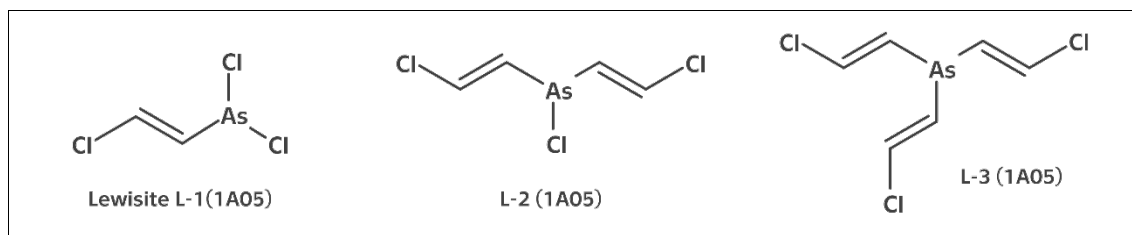
Články Chena et al. (2018) nebo Lehmana a Wennerberga (2021) naznačují, že terapeutickému potenciálu molekul na bázi dusíkových yperitů je stále věnována určitá pozornost. Strukturu dusíkových yperitů zobrazuje Obrázek 6.



Obrázek 6 – Struktura dusíkových yperitů

Zdroj: OPCW Handbook on Chemicals (OPCW, 2022), upraveno v ACD/ChemSketch v.2021.2.1

Poslední zájmovou skupinou z kategorie zpuchýřujících látek jsou tzv. Lewisity. Kromě svých zpuchýřujících vlastností se jejich nebezpečnost projevuje rovněž přítomností arsenu. Významu dosáhl především *dichlor(2-chlorovinyl)arsan* (nejčastěji označovaný jako Lewisit, L-2 nebo α -lewisit). Analogy L-2 a L-3 jsou brány spíše jako nečistoty. Jejich struktury jsou představeny na Obrázku 7.



Obrázek 7 – Struktura Lewisitu a jeho analogů

Zdroj: OPCW Handbook on Chemicals (OPCW, 2022), upraveno v ACD/ChemSketch v.2021.2.1

Lewisit je v čisté podobě bezbarvá kapalina bez výraznějšího zápachu. Přítomnost analogů, zejména pak L-3, způsobuje charakteristický pronikavý muškátový zápach. Typická je také častá změna zbarvení na žluto-hnědou až hnědou barvu (Black, 2016). Toxikologicky je skupina lewisitů příbuzná s tím rozdílem, že v případě zasažení pokožky lewisitem dochází k okamžitému podráždění (chybí doba latence).

Existence velmi účinného antidota limitovala vojenské použití lewisitu. Našel však své uplatnění při tvorbě směsí se sulfidickým yperitem (směs „HL“), ve které byl snížen bod tuhnutí HD pro použití v chladných podmínkách. Nejnižší bod tuhnutí (až -25 °C) dosahovala tzv. eutektická směs (37:63 hm. % yperitu k lewisitu).

3.2.3 Degradací produkty vybraných stanovených látek

Toxické chemické látky, ať už v průběhu skladování, tak v případě použití, podléhají na základě svých chemických vlastností degradačním, jinak též rozkladným procesům. Za nejzákladnější, a v některých případech i nejdůležitější chemickou reakci způsobující degradaci toxických chemických látek je považována hydrolyza, obecně rozkladná reakce působením vody (Matoušek a Linhart, 2005).

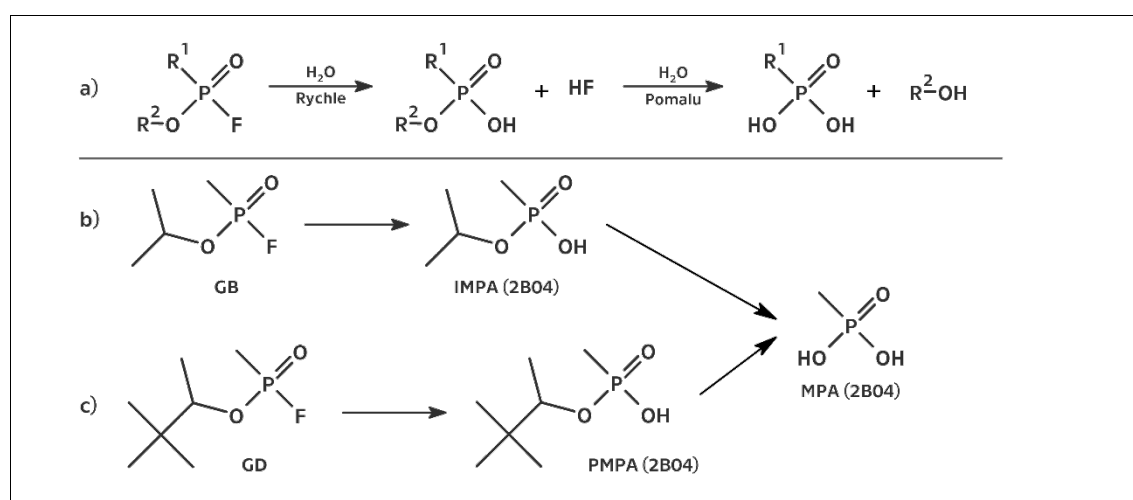
Prakticky všechny toxické chemické látky s vodou reagují různou rychlostí. Velmi záleží také na vlastnostech daného prostředí, zejména ve smyslu acidity a alkality. Například alkalická hydrolyza je považována za významnou dekontaminační reakci. V životním prostředí, vzhledem k všudypřítomné vlhkosti, ale také i v organismu zasaženého člověka, vznikají zpravidla polární hydrolyzní produkty, z nichž většina má relativně nízkou toxicitu. Jako určitou výjimku lze uvést např. některé rozkladné produkty lewisitu L-1 nebo látky VX, které stále mohou vykazovat vysokou toxicitu. Jak již bylo uvedeno dříve, degradační produkty mohou být současně i prekurzorem dané toxické chemické látky (Black et al., 2017).

Degradační produkty jsou obecně považovány za důležité analytické markery při vyšetřování domnělého nebo uskutečněného použití chemické zbraně, případně jiných verifikačních mechanismů v souladu s Úmluvou, protože mohou poskytovat mnohem stálejší a trvalejší indikátor dřívější přítomnosti toxické chemické látky, než stanovená látka primárního použití nebo výroby (Vanninen, 2011).

V následující části budou uvedeny obecné degradační mechanismy ve vztahu k vybraným skupinám látek seznamu 1 Úmluvy, případně vybraným zástupcům. Vzhledem k tomu, že analytická činnost ve vztahu k toxickým chemickým látkám souvisejících s Úmluvou je z velké části zaměřena i na jejich degradační produkty, a to zejména díky skutečnostem uvedeným v předchozím odstavci, je této skupině látek rovněž věnována určitá pozornost v rámci experimentální části této práce.

Degradační produkty skupiny 1A01

Primárními produkty hydrolýzy *alkyl alkylfosfonofluoridů* jsou jejich příslušné *alkyl alkylfosfonáty* (alternativně také *alkyl alkylfosfonové kyseliny*). Přednostně se rychle a selektivně štěpí vazba *P-F* s vytěsněním fluoridu, který reaguje za vzniku fluorovodíku. V následném kroku dochází ke vzniku *alkylfosfonové kyseliny* se ztrátou příslušného alkoholu (Black et al., 2017). Obecné degradační schéma látek skupiny 1A01 je zobrazeno na Obrázku 8, část a).



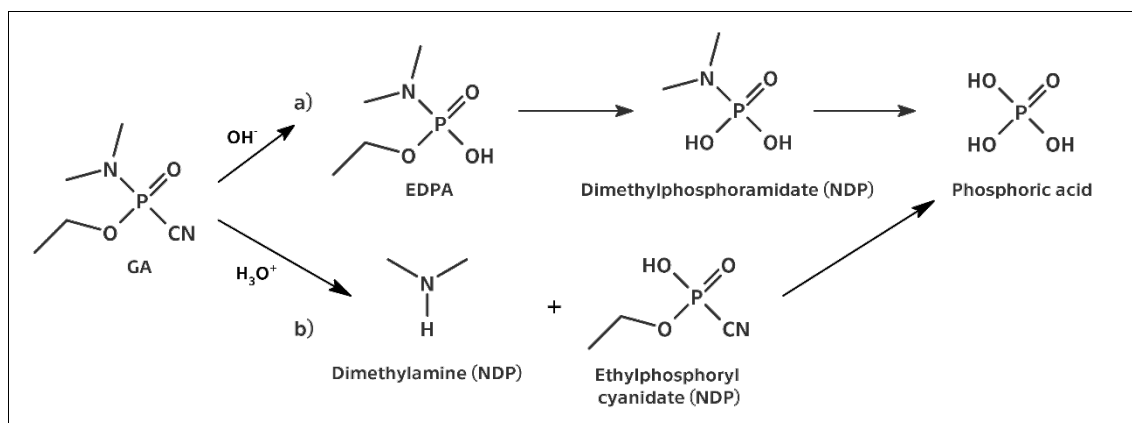
Obrázek 8 - Degradační schémata látek skupiny 1A01

Zdroj: Munro et al. (1999), Black et al. (2017); upraveno v ACD/ChemSketch v.2021.2.1

Obrázek 8 rovněž ukazuje příklady hydrolyzy u sarinu (b) a somanu (c), při které v prvním kroku pozorujeme hydrolyzu GB na *isopropyl methylfosfonát* (IMPA), respektive GD na *pinakolyl methylfosfonát* (PMPA). Následně jsou pak příslušné methylfosfonáty pomalu hydrolyzovány na *methylfosfonovou kyselinu* (MPA) a jednotlivé alkoholy, *isopropylalkohol* (IPA) a *pinakolyl alkohol* (Munro et al., 1999).

Degradační produkty skupiny 1A02

Vznik rozkladných produktů hydrolyzy látek skupiny 1A02, modelově tabunu (GA), může probíhat dvěma různými způsoby, a to štěpením na vazbě *P-N* nebo *P-CN*, v závislosti na pH. Schéma je znázorněno na Obrázku 9.



Obrázek 9 - Degradační schéma tabunu (GA)

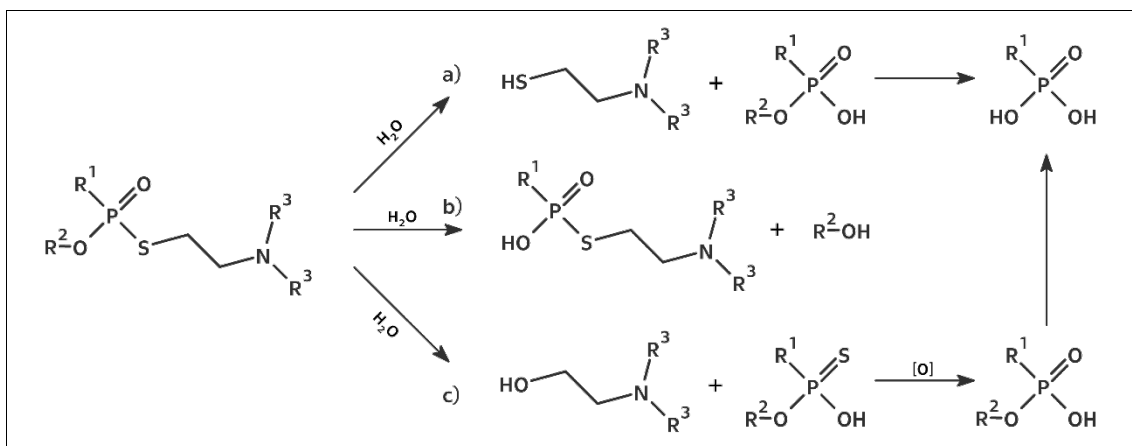
Zdroj: Munro (1999), Black et al. (2017); upraveno v ACD/ChemSketch v.2021.2.1

Základní degradační cestou (a) tabunu, která převládá za neutrálních a alkalických podmínek, je hydrolyza na *ethyl-N,N-dimethylfosforamidát* (EDPA) a kyanovodík. Počáteční reakce je poměrně rychlá, následná hydrolyza na *N,N-dimethylfosforamidát* a poté na kyselinu fosforečnou je mnohem pomalejší. Za kyselých podmínek (b) dochází k hydrolyze na *ethylfosforylkyanidát* a *dimethylamin*. Finálním produktem obou cest je kyselina fosforečná (Munro et al., 1999; Kroening et al., 2011).

Degradační produkty skupiny 1A03

V případě *alkyl S-2-dialkylaminoethyl alkylfosfonothiolátů*, je hydrolyza více komplexní a může probíhat až třemi různými způsoby, a to cestou štěpení na vazbě *P-S*, *P-O* nebo *S-C*, v závislosti na pH, teplotě, koncentraci apod. (Black et al., 2017).

Degradační schéma látek skupiny 1A03 je znázorněno na Obrázku 10. Ve vodném roztoku při hodnotách $\text{pH} \leq 7$ převažuje štěpení vazby P-S (a), při kterém vzniká *2-(dialkylamino)ethanethiol* a *alkyl alkylfosfonát*, který stejně jako u skupiny látek seznamu 1A01 následně hydrolyzuje na *alkylfosfonovou kyselinu*. Při hodnotách $\text{pH} > 7$ se objevuje štěpení P-S vazby, ale začíná být rovněž pozorovatelné štěpení vazby P-O (b), což vede ke tvorbě *S-2-Dialkylaminoethyl methylfosfonothiolátu* a příslušného alkoholu (Groenewold, 2010).

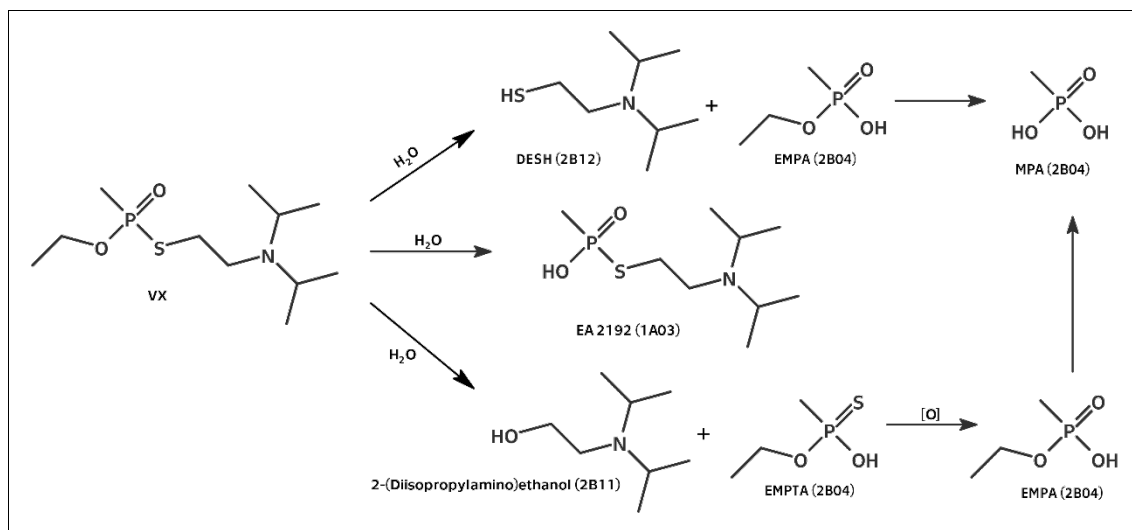


Obrázek 10 - Degradační schémata látek skupiny 1A03

Zdroj: Munro (1999), Black et al. (2017); upraveno v ACD/ChemSketch v.2021.2.1

Za určitých podmínek je také pozorováno štěpení S-C vazby (c), která vede ke vzniku *kyseliny O-alkyl-alkylfosfonothiové* a *N,N-Dialkylaminoethanolu* (Munro et al., 1999). *Kyselina O-alkyl-alkylfosfonothiová* může být oxidačními procesy přeměněna na *alkyl alkylfosfonát*, který následně hydrolyzuje do *alkylfosfonové kyseliny*.

Na Obrázku 11 je představeno degradační schéma látky VX. Jako významné degradační produkty mohou být uvedeny *2-(Diisopropylamino) ethanethiol* (DESH) a *ethyl methylfosfonát* (EMPA) pocházející ze štěpení P-O vazby. DESH často v životním prostředí oxiduje na disulfid. Štěpením vazby P-S vzniká *S-(2-Diisopropylaminoethyl) methylphosphonothioate* (EA 2192), který je považován za toxickou látku seznamu 1A03 a stále si zachovává relativně vysokou toxicitu. Následkem štěpení S-C vazby vzniká *2-(Diisopropylamino)ethanol* a *O-Ethyl methylfosfonothiová kyselina* (EMPTA). EMPTA může být oxidována na EMPA, který je následně pomalu hydrolyzován na MPA (Munro et al., 1999; Groenewold, 2010; Black et al., 2017).



Obrázek 11 - Degradční schéma tabunu látky VX

Zdroj: Munro (1999), Black et al. (2017); upraveno v ACD/ChemSketch v.2021.2.1

Experimentálně byly v minulosti zkoumány i různé variability v poměru větvení degradace vazeb P-S:P-O při hydrolyze látky VX. Touto problematikou a celkově rozsáhlým chemismem látky VX se zabýval například Yang (1998).

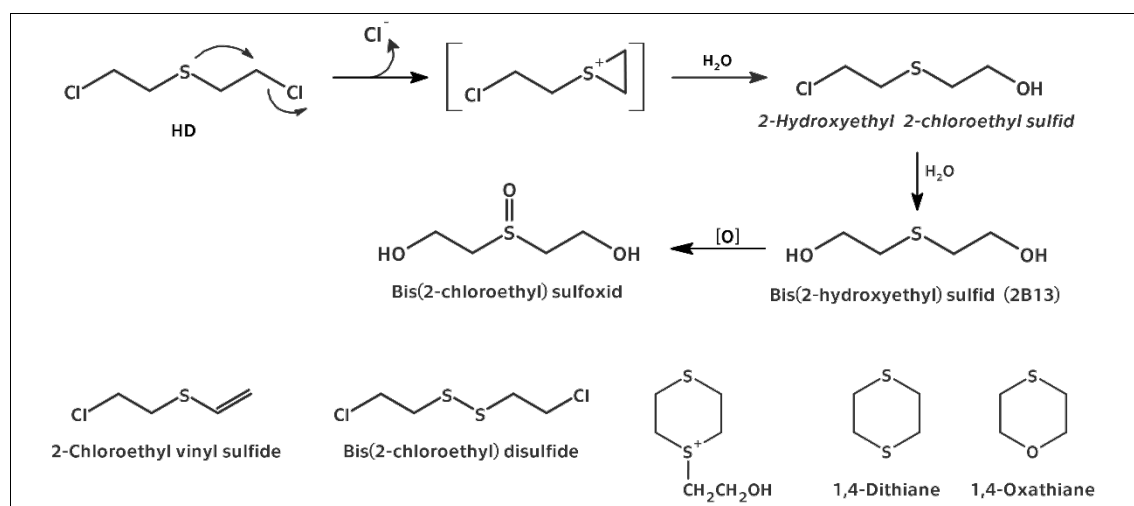
Degradační produkty skupiny 1A04

Degradační mechanismus sulfidického yperitu (HD) a celkově jeho osud v životním prostředí je velice komplexní, proto bude pozornost zaměřena pouze na vybrané aspekty. Velmi ucelený přehled nabízí např. Munro et al. (1999), komplexněji se problematikou zabývá Kurucz (2016).

Sulfidický yperit (HD) v normálních podmínkách degraduje převážně hydrolyzou štěpením vazby C-Cl za tvorby karbokationu, který se stabilizuje cyklizací. Následná reakce vede přes 2-Hydroxyethyl 2-chloroethyl sulfid („Hemisulfur mustard“) ke tvorbě Bis(2-hydroxyethyl) sulfidu (Thiodiglykol, TDG). Thiodiglykol může podléhat oxidaci na Bis(2-chloroethyl) sulfoxid a pomaleji pak na Bis(2-chloroethyl) sulfon. V životním prostředí má oxidace tendenci se zastavit u sulfoxidu, tvorba sulfonu je typická spíše při kontaktu s oxidačními dekontaminačními činidly. V závislosti na chemických podmínkách a koncentraci mohou být v prostředí produkovány některé složitější oligomerní produkty prostřednictvím sulfoniových meziproduktů vytvořených z intermolekulárních reakcí mezi HD a TDG (Munro et al., 1999; ; Black et al., 2017).

Ve vzorcích životního prostředí jsou často také identifikovány cyklické sloučeniny, jako např. 1,4-Dithian nebo 1,4-Oxathian, dále pak například 2-Chloroethyl vinyl sulfid, bis(2-chloroethyl) disulfid nebo degradační produkty analogů sulfidického yperitu, které jsou zpravidla považovány za nečistoty z výroby HD.

Popsané základní degradační schéma sulfidického yperitu a některé další vybrané degradační produkty často přítomné ve vzorcích jsou zobrazeny na Obrázku 12.

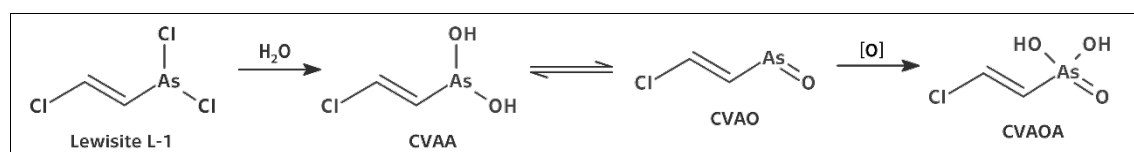


Obrázek 12 – Základní degradační schéma HD a další vybrané produkty

Zdroj: Munro (1999), Black et al. (2017); upraveno v ACD/ChemSketch v.2021.2.1

Degradační produkty skupiny 1A05

U nejvýznamnějšího zástupce, Lewisitu L-1, je hydrolyza poměrně rychlá. Důsledkem štěpení vazby $\text{As}-\text{Cl}$ vzniká ve vodě rozpustná kyselina 2-chlorovinyl arsenitá (CVAA), která může reverzibilně polymerovat. CVAA existuje v určitém rovnovážném stavu se vznikajícím oxidem 2-chlorovinyl arsenitým (CVAO; tzv. „Lewisite oxid“). V samostatné reakční části může CVAO dále oxidovat na kyselinu 2-chlorovinylarsonovou (CVAOA). Lewisit 2 degraduje analogicky (Munro et al., 1999). Uvedené degradační schéma Lewisitu 1 je zobrazeno na Obrázku 13.

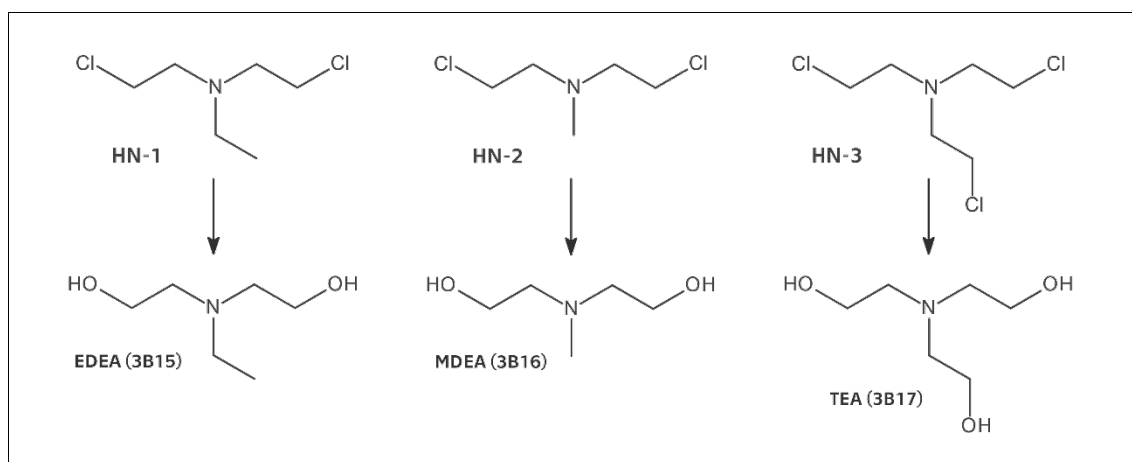


Obrázek 13 – Degradační schéma Lewisitu 1

Zdroj: Munro (1999), Black et al. (2017); upraveno v ACD/ChemSketch v.2021.2.1

Degradační produkty skupiny 1A06

Dusíkové yperity v životním prostředí podléhají hydrolyze predominantně za vzniku odpovídajících ethanolaminů. V případě HN-1 se jedná o *N-Ethyldiethanolamin* (EDEA), respektive *N-Methyldiethanolamin* (MDEA) v případě HN-2. Za nejvýraznější výsledný degradační produkt HN-3 je považován *Triethanolamin* (TEA). Výsledné *ethanolaminy* jsou rovněž považovány za prekurzory stanovené seznamy 3B15–17 přílohy Úmluvy (Munro et al., 1999; Valdez et al., 2018). Základní degradační cesta dusíkových yperitů je představena na Obrázku 14.



Obrázek 14 – Základní degradační cesta dusíkových yperitů

Zdroj: Munro (1999), Black et al. (2017); upraveno v ACD/ChemSketch v.2021.2.1

3.3 Možnosti přípravy vzorků pro analýzu

Úvodem je vhodné zmínit, že problematika přípravy vzorků pro vlastní analýzu instrumentálními technikami je velmi rozsáhlou oblastí, která značně přesahuje rozsah předkládané práce. V následující podkapitole proto bude poukázáno pouze na extrakční techniky a související instrumentaci, u kterých se předpokládá jejich použití pro oblast analýzy sledovaných analytů.

Vlastní analytický proces se obecně skládá z několika dílčích kroků, který začíná odběrem (vzorkováním) nebo jiným získáním vzorku, který je v následném kroku zpracováván a připravován pro vlastní měření na základě výběru vhodné metody. Výsledkem měření je pak analytický signál, který je pro účely získání analytického výsledku vyhodnocen a vhodně interpretován (Skoog et al., 2014).

Vzhledem k tomu, že příprava vzorku ovlivňuje téměř všechny pozdější kroky analytického procesu, je považována za nejdůležitější a zároveň nejkritičtější část celého procesu, zejména v ohledu náchylnosti na vznik chyby. Také se jedná o část časově nejnáročnější. Nováková a Vlčková (2009) popisují, že příprava vzorku může zabrat až 80 % celkového času analýzy. Samotný výběr metody se odvíjí nejen od komplexnosti zpracovávané matrice nebo souboru cílových analytů v návaznosti na jejich předpokládanou koncentraci, ale také od zvolené analytické instrumentace, u které je nutné počítat s možnou limitací pro některé typy analytů.

Pro účely analýzy toxických chemických látek, jejich prekurzorů a degradačních produktů souvisejících s Úmluvou byl již v minulosti vytvořen soubor doporučených pracovních postupů (z ang. „*Recommended Operating Procedures*“ – ROPs), který byl testován a validován v rámci celé řady mezinárodních mezilaboratorních porovnávacích zkoušek a následných zkoušek odborné způsobilosti designovaných laboratoří OPCW (Mesilaakso, 2005).

Jako určitou výchozí monografií v této oblasti je považována tzv. „Modrá kniha“ (z ang. „*Blue Book*“), celým názvem **Doporučené pracovní postupy pro analýzu při ověřování chemického odzbrojení**, kterou pravidelně aktualizuje a vydává Finský institut pro verifikaci plnění Úmluvy o zákazu chemických zbraní (VERIFIN). Nové metody a postupy pro analýzu jsou zpravidla zahrnuty po jejich důkladném ověření v rámci zkoušek způsobilosti v rámci OPCW. Tyto doporučené pracovní postupy jsou v praxi podle možností přejímány do pracovních postupů jednotlivých laboratoří zabývajících se analýzou sledovaných toxických chemických látek.

Pro potřeby analytické činnosti Laboratoře toxických látek SÚJCHBO, v.v.i., byl zaveden soubor čtyř základních metodik (zkoušek), akreditovaných Českým institutem pro akreditaci (ČIA), které vychází nejen z výše zmíněných doporučených pracovních postupů, ale také z pracovních postupů OPCW prováděných v rámci on-site a off-site analýzy. Právě poslední aktualizace těchto postupů v roce 2017, a také nová instrumentace, se stala základem pro experimentální studium několika nově navržených postupů jako součást předkládané diplomové práce.

3.3.1 Typy vzorků pro analýzu

Vzorky s předpokládanou nebo potvrzenou přítomností chemických látek sledovaných v souvislosti s Úmluvou lze všeobecně rozdělit do následujících kategorií:

- a. vzorek z munice, zařízení nebo jejich úlomků (předpoklad čisté nebo vysoce koncentrované toxické chemické látky);
- b. vzorek ze složky životního prostředí (voda, půda, vegetace, vzduch apod.);
- c. umělé materiály (oděvy, povrchy, barvy, stavební materiál, pryž, polymery);
- d. biomedicínské vzorky (krev, moč apod.).

V reálné praxi se setkáváme s širokou škálou primárních matric, kterou mohou tvořit pevné a kapalné organické látky, voda a jiné vodné roztoky, vzduch, pevné látky (stěry a ostatní umělé materiály), půda a sedimenty či sorpční materiály. Matrice zpravidla udává výběr vhodné metody přípravy vzorků pro danou analytickou techniku. U některých vzorků je možné využít přímou extrakci, případně některou z bezpřípravových technik, u jiných je nutné použít konvenční nebo pokročilé techniky extrakce.

Z pohledu přípravy vzorku je důraz samozřejmě zaměřen nejen na oblast extrakce a izolace sledovaného analytu ze vzorku, ale na celkový proces úpravy vzorku, do kterého lze rovněž zahrnout např. proces homogenizace, stabilizace, zakoncentrování nebo přečištění. Neméně důležité je i případné uchovávání (konzervace) vzorku při delší časové prodlevě před zpracováním a analýzou nebo v případě dlouhodobého skladování (Mitra a Brukh, 2003).

V následující části budou představeny základní metody extrakce analytů, které by mohly být pouze pro přehlednost rozděleny na techniky **klasické** (konvenční) a **pokročilé** (především mikroextrakce založené na odpovídajících klasických technikách), vyznačující se například zkrácením času potřebného pro přípravu vzorku, menším množstvím zpracovávaného vzorku a menší nebo nulovou spotřebou rozpouštědla, snížením počtu kroků samotného extrakčního procesu, které je velmi žádoucí zejména s ohledem na to, že s větším množstvím kroků se zvyšuje šance na ztrátu analytů (především pokud jsou ve stopovém množství) nebo na vznik křížové kontaminace. Závěrem bude zmíněna používaná instrumentace pro automatizaci přípravy vzorku.

3.3.2 Klasické techniky extrakce

V rámci klasických (též konvenčních) technik extrakce mohou být diskutovány především základní techniky jako je extrakce vzorku kapalinou, extrakce vzorku pevnou fází nebo statický headspace. Jedná se o jedny z nejrozšířenějších technik přípravy vzorků, které jsou dobře zavedené, optimalizované a mohou být účelně použity jak ve stacionárních, tak mobilních (rozmístitelných) laboratořích.

Extrakce vzorku kapalinou (rozpouštědlem)

Extrakce vzorku kapalinou (rozpouštědlem), jako jedna z vůbec prvních technik přípravy vzorků v analytické chemii, je stále považována za nejpoužívanější izolační a separační techniku (Pawliszyn, 2010). Ve svém principu je založena na převedení analytu z alikvotní nebo celé části pevného nebo kapalného vzorku do vhodného rozpouštědla, při kterém je využita rozdílná rozpustnost látek. Volba rozpouštědla závisí zpravidla na polaritě cílového analytu. Vzhledem k tomu, že vzorky sledovaných analytů jsou jak nepolární (většinou toxické chemické látky), tak i polární povahy (většinou prekurzory a degradační produkty), používají se obvykle vícekrokové extrakce nejdříve nepolárním a následně polárním rozpouštědlem (Pragney a Saradhi, 2012). Podle výchozí matrice může být extrakce rozpouštědlem ve svém základu rozdělena na extrakci kapalina-kapalina (LLE, z ang. „*Liquid-Liquid Extraction*“) a extrakci kapalina-pevná látka (LSE, z ang. „*Liquid-Solid Extraction*“).

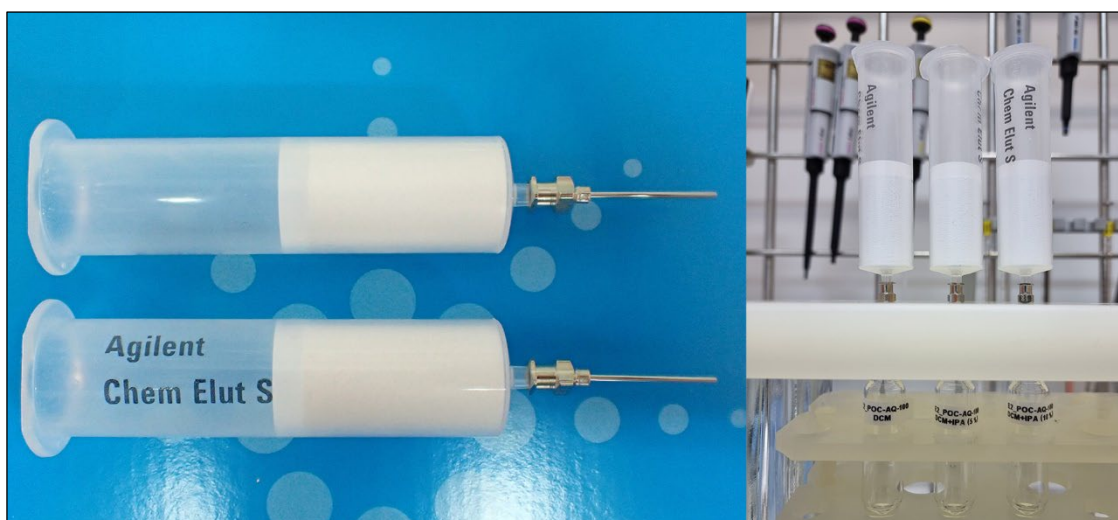
Extrakce kapalina-kapalina (LLE) je nejpoužívanější technikou pro vodné vzorky (voda z životního prostředí, vodné odpadní nebo dekontaminační roztoky apod.). Pro extrakci sledovaných nepolárních a středně polárních látek je nejčastěji používán dichlormethan (DCM) nebo jiné vhodné nepolární rozpouštědlo, zpravidla za použití objemového poměru jedna ku dvěma (1:2) ve prospěch vodného vzorku. Extrakce je často podpořena třepáním pomocí třepáček nebo míchaček, aby byl zabezpečen dobrý kontakt mezi oběma fázemi (Kuitunen, 2006). Výsledný extrakt je možné použít přímo k analýze, případně může být dále zpracováván, např. pro přečištění nebo zakoncentrování.

LLE je možné rovněž použít k účinné eliminaci uhlovodíků z organické kapaliny, které je využívána především pro dosažení menšího počtu interferujících píků při plynové chromatografii (Pragney a Saradhi, 2012).

Pokročilé (moderní) techniky **mikroextrakce v kapalné fázi** (LPME, z ang. „Liquid Phase Microextraction“) jsou výsledkem poměrně nedávného vývoje přípravy vzorků, kde byl tradiční princip extrakce kapalina-kapalina (LLE) miniaturizován výrazným snížením poměru akceptoru k donoru. Extrakce běžně probíhá do objemu několika mikrolitrů (μL) rozpouštědla nemísitelného s vodou (akceptorová fáze) ponořeného do vodného vzorku obsahujícího analyty (fáze donoru). Metody LPME mají potenciál integrovat extrakci analytu, prekoncentraci a zavedení vzorku do analytické instrumentace v jediném kroku. Lze je rozdělit do tří hlavních kategorií: SDME – mikroextrakce na jedinou kapku, HF-LPME – mikroextrakce dutými vlákny a DLLME – disperzní mikroextrakce kapalina–kapalina (Sarafraz-Yazdi a Amiri, 2010; Kim et al., 2015).

Podporovaná kapalinová extrakce (SLE/SSLE)

Technika podporované kapalinové extrakce (SLE, z ang. „*Supported liquid extraction*“), v literatuře rovněž nazývaná jako „pevnou látkou podporovaná kapalinová extrakce“ (SSLE, z ang. „*Solid-Supported liquid extraction*“), je v mnoha ohledech považována za určitou alternativu k LLE. Ve své podstatě z ní vychází a její princip je založena na imobilizaci vzorku na inertním nosiči. Nosným médiem je nejčastěji chemicky inertní křemelina s vysokou povrchovou plochou, případně nově také syntetický sorbent, které slouží jako stacionární fáze pro kapalný vzorek (Majors, 2012). Matrice musí být na vodné bázi, aby umožnila samotnou absorpci do pevného nosiče. Médiem během extrakčního procesu prochází nemísitelné organické rozpouštědlo a cílový analyt se eluuje na základě své zvýšené afinity k novému rozpouštědлу, přičemž všechny nečistoty a některé interferující látky zůstávají na pevném nosiči (Majors, 2010). Jako příklad lze uvést komerční SLE patrony Chem Elut S (Agilent; Obrázek 15), které využívají syntetický sorbent a byly využity pro experimentální studium této techniky. Pro aplikaci techniky je možné využít příslušenství pro metodu extrakce na pevné fázi (SPE). Pro prostup rozpouštědla během extrakce je nejčastěji využívána gravitace, proto není nutně vyžadováno použití např. vývěvy pro vytvoření podtlaku k podpoření průchodu rozpouštědla sorbentem. Pro některé typy vzorků je však využití podtlaku v aplikačních listech doporučováno.



Obrázek 15 - SLE patrona Chem Elut S (vlevo) a příklad použití (vpravo)

Zdroj: vlastní

V odborné literatuře není použití této techniky v souvislosti s přípravou vzorků chemických látek souvisejících s Úmluvou příliš zmiňováno. Často je jako na výchozí práci poukazováno na experimenty Kanaujia et al. (2008), kteří se pokusili techniku SLE optimalizovat pro extrakci toxických chemických látek (GB, L-3, HD) a některé související látky. Její využití zmiňují i Kuitunen et al. (2017) v aktualizovaných doporučených postupech pro přípravu vodných vzorků. Z tohoto důvodu byla této technice věnováno experimentální studium v návaznosti na možné rozšíření používaných zkušebních metodik.

Extrakce vzorku tuhou fází (SPE)

Velmi populární a široce používanou technikou, která se taktéž řadí mezi techniky tradiční, je extrakce na tuhou (pevnou) fázi (SPE, z ang. „Solid-phase extraction“), jejíž princip je obecně založen na sorpci analytů z kapalného vzorku na vhodném sorbentu. Zadržené analyty jsou poté eluovány malým množstvím rozpouštědla. V tomto kroku je analyt nejen izolován, ale obvykle dochází k jeho obohacení (zakoncentrování). Technika je široce používána pro svou jednoduchost, spolehlivost a minimální podíl možných interferencí během analýzy. Pro účinnou izolaci sledovaných analytů jsou používány různé druhy fází sorbentu (nepolární reverzní nebo smíšené fáze, reverzní hydrofobní fáze, normální hydrofilní fáze či iontově výměnná fáze).

Extrakce na tuhou je díky svým vlastnostem a výhodám často používána v oblasti přípravy vzorků chemických látek souvisejících s CWC.

Vzhledem k tomu, že je technika dobře a účelně zavedena a je také široce diskutována v odborné literatuře, včetně použití nových nebo inovovaných sorbentů pro záchyt specifického spektra látek, nebude technice věnována pozornost.

3.3.3 Mikroextrakční techniky založené na SPE

Zřejmě nejznámější a nejpoužívanější mikroextrakční technikou, která ve svém nejjednodušším principu vychází z extrakce na tuhou fázi, je sorpčně/desorpční technika **mikroextrakce na tuhou fázi** (SPME, z ang. „*Solid-Phase Microextraction*“). Tato technika se od svého vzniku v 90. letech 20. století stala nenahraditelnou součástí přípravy vzorků s rozsáhlým rozpětím jak použitelných matric a analytů, tak šířkou možných aplikací. Dala by se označit jako stále moderní, ale dnes už více klasická technika pro přípravu vzorků.

Techniky mikroextrakce byly vyvinuty tak, aby řešily možnost snížení spotřeby používaného rozpouštědla, velikosti extrakčního zařízení a za účelem schopnosti tohoto přístupu usnadnit rychlou a pohodlnou přípravu vzorků, a to jak v laboratoři, tak na místě (odběru, zásahu, vyšetřování apod.). Technika SPME také minimalizuje dopad na vzorkovaný systém (Pawliszyn, 2012).

Princip použití SPME spočívá ve vystavení tenké extrakční fázi (sorpčního média), která je rozptýlena na pevném nosiči, přímo matrici vzorku po předem definovanou dobu. Jakmile je extrakční fáze vystavena matrici vzorku, začne okamžitě transport analytů z matrice do této sorpční vrstvy. Extrakce se považuje za dokončenou, když koncentrace analytu dosáhne distribuční rovnováhy mezi matricí vzorku a extrakční fází, což znamená, že za časovým bodem rovnováhy zůstává množství analytu konstantní a nemění se s dalším prodloužením doby extrakce (Pawliszyn, 2010).




Pro extrakční fázi byla navržena různá konstrukční uspořádání, nicméně nejúspěšnější a také nejpoužívanější je použití sorpčního vlákna. Nejčastěji se jedná o křemenné vlákno s chemicky modifikovaným polymerním povrchem, které je považováno za stacionární fázi. Určité nevýhody tohoto uspořádání se snaží omezit modifikace, které byly vyvinuty zejména v posledních letech.

Technika je závislá na mnoha faktorech. Distribuční konstanta a tloušťka vrstvy polymeru například ovlivňují množství adsorbovaného vzorku. Dalším faktorem je samotná doba extrakce. Selektivita extrakčního procesu může být ovlivněna typem polymeru, který pokrývá pevný nosič. Vliv na extrakci má také využití vysolovacího efektu, zvolené pH, teplota nebo mechanické promíchávání (Wells, 2003).

Za nejrozšířenější metody vzorkování pro techniku SPME jsou považovány HS-SPME (z ang. „*Headspace SPME*“), kdy se vzorkuje plynná fáze, tzv. parní prostor nad vzorkem, a DI-SPME (z ang. „*Direct Immersion SPME*“), kdy se vzorkuje kapalná fáze a sorpční materiál je přímo ponořen ve vzorku. Sorpční materiál je zpravidla zaváděn do nástřikového prostoru plynového chromatografu (GC), kde dochází k termální desorpci analytu a jeho zavedení do chromatografické kolony. Toto použití může být jak manuální, tak plně automatizované. Samostatným krokem je pak rekondicionace sorpčního materiálu. Sorpční materiál ovšem může být zaveden taktéž do rozpouštědla, ve kterém dochází k eluci analytu.

Komerčně jsou dostupné SPME vlákna s různými polymery (absorbenty i adsorbenty) v různých objemech, případně jejich kombinacemi. Pro účely analýzy chemických látek souvisejících s CWC jsou pro extrakční aplikace nejčastěji používány dva typy vláken: 65 μm Polydimethylsiloxane/Divinylbenzene (PDMS/DVB) vlákno, které bylo vyhodnoceno jako nejúčinnější při extrakci toxických chemických látek, zatímco vlákno 75 μm Carboxen/Polydimethylsiloxane (CAR/PDMS) je používáno převážně pro extrakci degradačních produktů. Nepolární analyty jsou zpravidla extrahovány bez předchozí úpravy vlákna. V případě analýzy polárních látek je vlákno nejdříve vystaveno derivatizačnímu činidlu během tzv. in-situ derivatizace. Pro SPME s in-situ derivatizací za kyselých podmínek je CAR/PDMS vlákno nejprve kondicionováno MTBSTFA, při alkalických podmínkách se používá BSTFA (Vanninen, 2017).

Určité nevýhody použití vláken, jako je například malý objem polymerního sorbentu nebo křehkost samotného vlákna, vedly ke vzniku „vláken“ nové generace, které jsou označovány jako SPME Arrow. Křemelinové vlákno bylo nahrazeno pevnějším (kovovým) nosičem, což umožnilo zvýšení množství polymeru a zároveň snížilo náchylnost k poškození. Porovnání SPME vlákna a SPME Arrow je na Obrázku 16. Větší objem polymeru a sorpční plocha vedou k rychlejší a citlivější extrakci.

		Sorption phase surface	Sorption phase volume
a		62.8 mm ²	11.8 µL
b		44.0 mm ²	3.8 µL
c		9.4 mm ²	0.6 µL

Obrázek 16 – Porovnání SPME Arrow (a, b) a SPME vlákna (c)

Zdroj: CTC Analytics AG, PAL3 Smart SPME Arrow Brochure

Sorpční extrakce na míchadle (SBSE)

Jedním z původně uvažovaných konstrukčních uspořádání pro SPME bylo uložení sorpčního média na míchadle. V současnosti se takové uspořádání využívá jakožto alternativní varianta technické realizace SPME pro **sorpční extrakci na míchadle** (SBSE, z ang. „*Stir Bar Sorptive Extraction*“). Ve své podstatě se jedná o skleněnou míchací tyčinku (s magnetem uvnitř), která je potažena polymerním sorbentem.

Jednoduchý princip použití spočívá ve vložení míchadla do vodného roztoku a jeho míchání na magnetickém míchadle. Po extrakci je vyjmuto, případně ošetřeno od nečistot z vodné matrice, a zavedeno do vhodného modulu, kde probíhá termální desorpce. Teoreticky je možné i zavedení do vhodného rozpouštědla. Technika samotná byla komercializována společností Gerstel (DE) pod označením Twister®. Povrch a objem extrakční fáze je podstatně vyšší než u SPME vlákna. Je tedy možné extrahovat větší množství analytu a zvýšit celkovou citlivost. Nevýhodou je komerčně omezený výběr polymerních povlaků. To snižuje univerzálnost metody zejména pro polární látky (Terzic, 2014).

Míchadla Twister jsou komerčně dostupné pouze ve dvou provedeních, s různými délkami a objemy sorbentu. Jedno provedení používá PDMS, zatímco druhé PDMS/Ethylenglycol (EG) kopolymer na inertní kovové mřížce používané pro mechanickou stabilizaci.

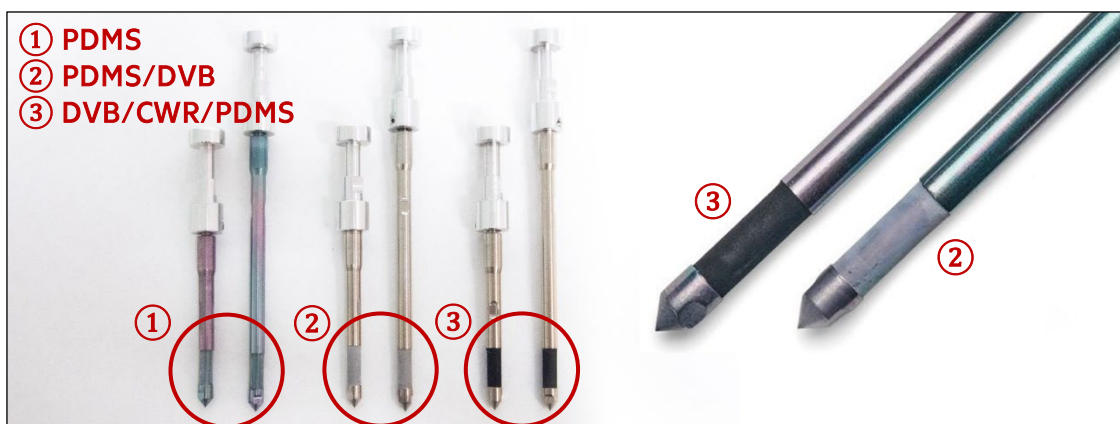
Obrázek 17 představuje (vlevo) možné použití míchadel Twister v DI-SBSE i HS-SBSE provedení a (vpravo) liner s oběma typy míchadel před desorpčí v termodesorpční jednotce TDU-2 (Gerstel) s kryostaticky chlazeným nástřikovým systémem.



Obrázek 17 – Použití SBSE míchadel Twister®
Zdroj: vlastní

Vysokokapacitní sorpční extrakce (HCSE)

Zajímavou inovací na poli technik vycházejících z SPME, která navazuje na vývoj kovových tyčinek potažených PDMS (označovaných jako SPE-tD™), přinesla před několika lety společnost Markes (UK) pod označením HiSorb™ a je používána pro tzv. **vysokokapacitní sorpční extrakci** (HCSE, z ang. „*High-capacity sorptive extraction*“). Ve své podstatě se jedná o kovovou sondu (Obrázek 18, vlevo), na které je nanesen prstenec sorpčního materiálu (detail na Obrázku 18, vpravo). Sorbentu je objemově podstatně více než např. u míchadla pro SBSE nebo inovovaných SPME Arrow. To má zajistit vyšší citlivost, konstrukční provedení pak mnohem větší robustnost celého systému.



Obrázek 18 – HiSorb sondy pro vysokokapacitní sorpční extrakci
Zdroj: vlastní

K dispozici jsou kovové sondy se třemi různými sorbenty (PDMS, PDMS/DVB a DVB/CWR/PDMS) ve dvou provedeních: krátká verze sondy je používána zejména pro headspace aplikace (HS-HCSE), případně pro ponoření do vzorku při použití 10mL vialek, zatímco standardní sonda je používána pro přímé ponoření (DI-HCSE). Možnosti použití představuje Obrázek 19.



Obrázek 19 – Příklady použití HiSorb™ sond

Zdroj: vlastní

Ačkoliv je teoreticky možné provést manuální vzorkování s následnou termální extrakcí v dutých trubičkách určených pro termodesorpční systémy (Obrázek 20), Markes (UK) tuto techniku plně automatizoval v modulární platformě CENTRI.



Obrázek 20 – Možnost použití HiSorb™ sondy v TD trubičce

Zdroj: vlastní

Vzhledem k tomu, že se jedná o poměrně novou inovaci, která je teprve průběžně zkoumána a zaváděna, nejsou prozatím v odborné literatuře k dispozici bližší data. Nicméně se počet možných aplikací stále zvětšuje. Z tohoto důvodu bylo v rámci práce provedeno základní experimentální studium možné použitelnosti této techniky. Touto technikou se Laboratoř toxických látek SÚJCHBO, v.v.i., ve spolupráci s britskou firmou Markes, zabývá i v rámci experimentálního vývoje.

Jako další možné inovované mikroextrakční techniky lze ještě dále uvést například **mikroextrakci na tenké vrstvě** (TF-SPME), která je v principu shodná jako předchozí techniky s tím rozdílem, že sorbent je naimpregnovaný na tenké vrstvě uhlíkové síťoviny. Techniku lze použít jak pro vzorkování parního prostoru (HS-), tak pro přímé ponoření do vzorku (DI-). Použití je znázorněno na Obrázku 21, kde je možné vidět PDMS/DVB pásek pro TF-SPME dodávaný firmou Markes.

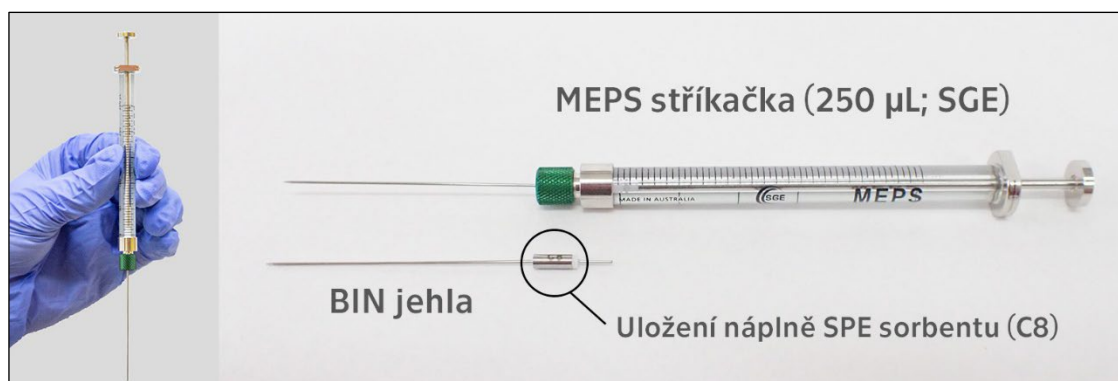


Obrázek 21 – Použití PDMS/DVB pásku pro techniku TF-SPME

Zdroj: vlastní

V souvislosti s inovovanými technikami lze závěrem rovněž zmínit velmi používanou techniku **mikroextrakce na pevný sorbent** (MEPS, z ang. „*Micro Extraction by Packed Sorbent*“), která ve svém principu vychází z metody extrakce na pevnou fázi (SPE). Na rozdíl od SPE ovšem MEPS pracuje s mnohem nižším objemem vzorku (10–500 μ l), má významně nižší nároky na dobu extrakce, objem rozpouštědel a extrakci lze provádět manuálním, poloautomatickým i automatickým způsobem.

Základ pro metodu MEPS je zobrazen na Obrázku 22 a skládá se z modifikované mikrostříkačky a BIN jehly („Barrel Insert and Needle“), která obsahuje zabudovanou SPE fázi – pevný sorbent.



Obrázek 22 – Manuální provedení pro techniku MEPS
Zdroj: vlastní

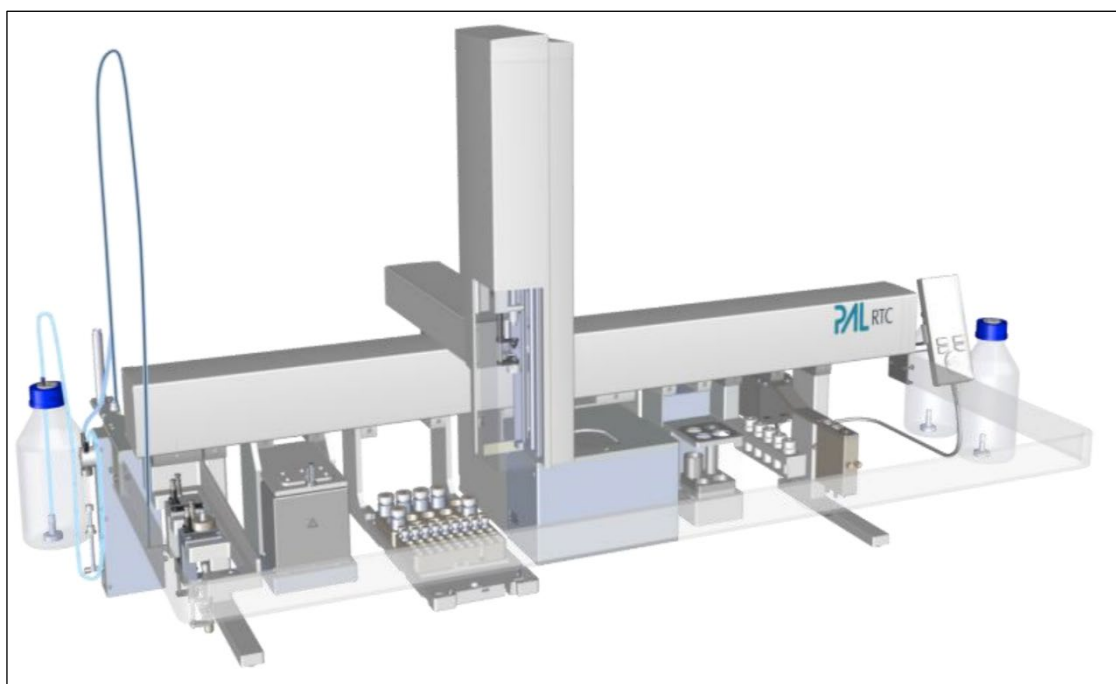
BIN jehly se dodávají s různými SPE fázemi. Rozměry lože sorbentu zajišťují, že separační schopnost sorbentu je identická s konvenční SPE. MEPS využívá separaci pomocí reverzní fáze, normální fáze, směšného módu či iontové výměny. Výhodou metody MEPS je její možná částečná nebo úplná automatizace. Obrázek 23 ukazuje poloautomatické provedení, které využívá digitální analytický dávkovač eVol® XR (SGE), pro který existují speciální XCHANGE MEPS mikrostříkačky (SGE).



Obrázek 23 – Poloautomatické provedení techniky MEPS
Zdroj: vlastní

3.3.4 Instrumentace pro automatickou přípravu vzorků

Jednou z výhod pokročilých (moderních) technik přípravy vzorků je jejich možná plná automatizace, která může zásadním způsobem urychlit proces přípravy vzorku pro analýzu a zásadně omezit možné negativní vlivy při manuální přípravě (například chybu vnesenou operátorem). V současné době je možné plně automatizovat i proces klasické techniky extrakce kapalina-kapalina. Touto možností se v souvislosti s přípravou vzorků chemických látek souvisejících s CWC zabývali Althoff et al. (2019). Jejich návrh technického uspořádání, který je zobrazen na Obrázku 24, zahrnuje použití TriPlus™ RSH SMART autosampleru, který je připojen na analytický systém GC-FID-MS/MS a využívá mimo jiné novou generaci ovládacího softwaru s editorem skriptů k automatizaci všech nezbytných kroků přípravy a následného zavedení vzorků pro analýzu.



Obrázek 24 – Příklad možné automatizace techniky LLE

Zdroj: Althoff et al. (2019)

Pro automatizaci pokročilých mikroextrakčních technik jsou nejčastěji využívány běžně dostupná ramena autosamplerů jako pevná součást analytické instrumentace. Komerčně jsou velmi dobře dostupné, včetně jejich případných modifikací pro danou konkrétní techniku. Jako určitou novinku a inovaci v oblasti komplexní možnosti přípravy vzorků bude představen modulární platforma „CENTRI“.

Modulární systém pro automatické vzorkování a prekoncentraci vzorku CENTRI vychází z dlouholetých zkušeností firmy Markes v oblasti termální desorpce a díky svému technickému a konstrukčnímu uspořádání dokáže kombinovat více metod extrakce cílových analytů v jediné platformě. Na Obrázku 25 je zobrazena modulární platforma Centri (vpravo) v kombinaci s analytickým systémem 8890 GC/5977B MSD (Agilent), které jsou využívány v Laboratoři toxických látek SÚJCHBO, v.v.i.

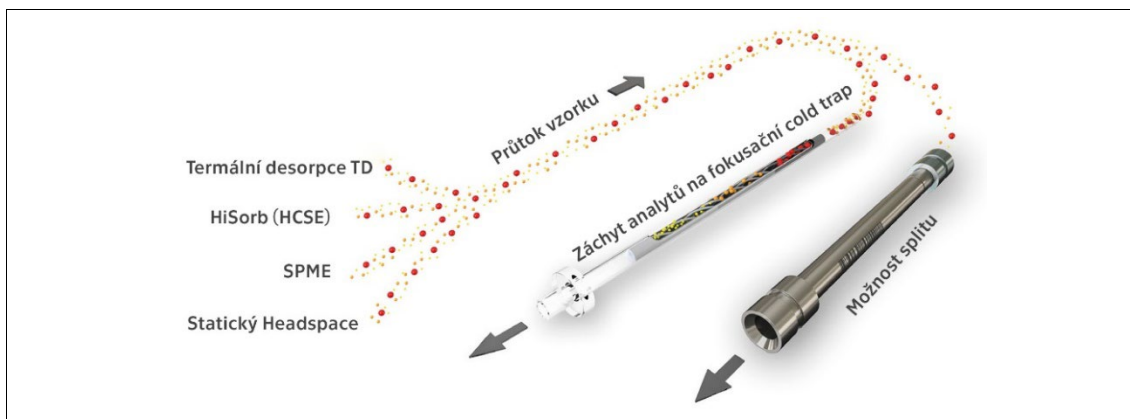


*Obrázek 25 – Platforma CENTRI (vpravo) v kombinaci s GC/MS (vlevo)
Zdroj: vlastní*

Základní součástí platformy CENTRI je modul pro termální desorpci sorpčních (odběrových) trubiček. Platforma je dále rozšířena o modul pro Headspace (přímé vzorkování těkavých analytů z parního prostoru nad vzorkem), modul pro SPME a modul pro HiSorb. Jako součást platformy může být instalována jednotka pro automatické přidávání interního standardu, které zefektivní kvantitativní aplikace.

Zařízení umožňuje u všech svých modulů použití elektricky chlazeného fokusačního trapu, který je značně použitelný pro prekoncentraci cílového analytu ze vzorku. Unikátní je rovněž schopnost tzv. rekolekce vzorku, které je využitelné pro opakovanou analýzu téhož vzorku a nachází své uplatnění při možnosti vytvoření zálohy plynného vzorku zpět na sorpční (odběrovou) trubičku.

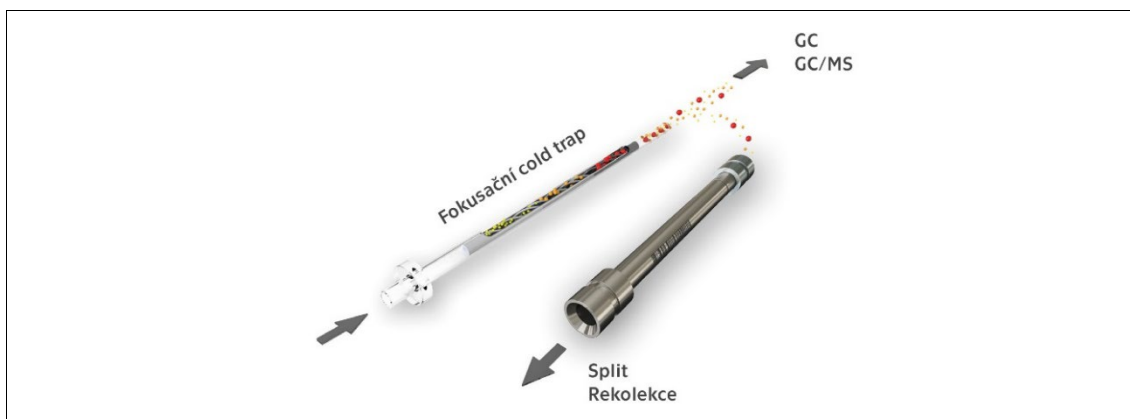
Obrázek 26 naznačuje princip záchytu analytu z různých extrakčních technik na elektricky chlazený fokusační trap, který může obsahovat různé druhy sorbentů podle povahy cílových analytů.



Obrázek 26 – První fáze procesu – fokusace analytu na Cold trap

Zdroj: Poskytnuto firmou Markes

Ve druhé kroku, jak znázorňuje Obrázku 27, je díky extrémně rychlému zahřátí fokusačního cold trapu analyt ze sopčného materiálu desorbován a proudem nosného plynu vnesen do analytického systému, např. GC/MS. V některých aplikacích je žádoucí provést tzv. dělení vzorku („splitování“), stejného principu je využito i v rekolekčním mechanismu s tím rozdílem, že místo do výpustného ventilu je část vzorku zavedena do sorpční trubičky, která je využívána pro termodesorpční modul.



Obrázek 27 – Druhá fáze procesu – desorpce analytu z Cold trapu

Zdroj: Poskytnuto firmou Markes

3.4 Derivatizace vzorků pro GC/MS analýzu

V souvislosti s používáním analytické techniky GC/MS je nutné také zmínit možnosti derivatizace vzorků, která je v tomto případě důležitou součástí přípravy vzorku pro GC/MS analýzu.

Hlavním požadavkem pro derivatizaci je primárně analýza polárních látek ze skupiny prekurzorů nebo degradačních produktů toxických chemických látek seznamu 1. Tyto analyty jsou zpravidla málo těkavé, mohou být teplotně nestálé (rozkládají při vysokých teplotách požadovaných pro GC) nebo mají jiné vlastnosti z pohledu chromatografie, které způsobující například chvostování píků nebo nízký detekční limit (Valdez et al., 2018). Z tohoto důvodu je žádoucí provést předúpravu analytu před vlastním měřením. Derivatizační techniky ve svém principu využívají specifické chemické reakce k přeměně analytu před vlastní chromatografické separaci analytů (předkolonová derivatizace), v některých případech až po ní (postkolonová derivatizace) před vstupem látky do detektoru.

Smyslem derivatizačního kroku je docílit kvalitativně nových vlastností separovaných látek, které umožní separaci, usnadní identifikaci nebo zvýší citlivost vlastní detekce (Moldoveanu, 2019). Derivatizace se také používá ke snížení reaktivity určitých analytů. Typickým příkladem je lewisit L-1, u kterého v průběhu chromatografické separace dochází k interakci s povlakem kolony nebo jinými volnými nukleofilními místy v analytickém systému (Black a Muir, 2003).

Na druhou stranu, derivatizace však může být zároveň i hlavním zdrojem chyb kvantitativní chromatografické analýzy. Spolu s požadovaným analytem mohou být z matrice extrahovány další látky, včetně vody, tyto látky pak mohou potlačit derivatizaci či reagovat s derivatizačním činidlem a vytvářet komplexní pozadí. Při derivatizacích polárních látek je tak často zapotřebí odpařit vzorek do sucha, což je kromě časové náročnosti také častým zdrojem chyb analýzy (Black a Muir, 2003).

Mezi běžně používané techniky derivatizace lze jmenovat **silylaci**, jejíž principem je působení silylačního činidla na sloučeniny obsahující polární skupinu s aktivním vodíkem. Nejčastějšími reakcemi jsou za použití trimethylsilylačního činidla, kdy je aktivní vodík v polární skupině látky nahrazen trimethylsilylovou skupinou $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$.

Další technikou je **alkylace**, při které dochází k výměně aktivního vodíku za alifatickou, popřípadě alifaticko-aromatickou skupinu, a to zejména u organických látek obsahujících funkční skupinu $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}$, $-\text{SH}$ nebo $-\text{SO}_3\text{H}$. Produkty alkylace jsou zpravidla méně polární než původní látka a vzniklé deriváty jsou relativně stabilní.

Využívaná je rovněž **acylaci**, u níž dochází k výměně aktivního vodíku polární skupiny za skupinu acylovou. Acylace je určitou alternativou k silylacím využívanou pro vysoce polární sloučeniny.

Celkový přehled derivatizačních činidel používaných při analýze chemických látek souvisejících s CWC představuje například Black et al. (2017) nebo Valdez et al. (2018). Jmenovat lze *N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide* (BSTFA) nebo *N-methyl-N-(tert-butyldimethylsilyl) trifluoroacetamide* (MTBSFA) nejčastěji používané jako silylační činidla. Častým methylačním činidlem je *trimethylphenylammonium hydroxide* (TMPAH), který se využívá pro tzv. tepelně asistovanou methylaci, kdy k samotné reakci analytu a činidla dochází až v horkém nástřikovém portu plynového chromatografu. TMPAH je rovněž uplatnitelný pro tzv. sekvenční derivatizaci, kdy je vzorek nejdříve methylován a následně silylován (Black et al. (2017)). V případě derivatizace lewisitů (zejména L-1, ale také případně L-2) byl po dlouhou dobu používán převážně *3,4-Dimercaptotoluene* (DMT). V dnešní době je od něj průběžně upouštěno z toho důvodu, že může převádět lewisit L-2 na derivát lewisitu L-1. Není tak možné s určitostí potvrdit původní analyt ve vzorku. Místo DMT je úspěšně používán například *1-Butanethiol* (BuSH).

3.5 Analytická instrumentace

V závěru teoretické části je účelné se rovněž ve zkratce zmínit o analytické technice, která byla použita v průběhu experimentální práce.

Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií využívající elektronovou ionizaci (GC/EI-MS) je široce používanou analytickou technikou, která může být použitelná ve stacionárních, tak i vhodných polních podmínkách. Technika vhodně kombinuje separační metodu pro oddělení jednotlivých analytů v chromatografické koloně (GC) a detekční systém v podobě citlivého hmotnostního detektoru (MS). Moderní analytický systém GC/EI-MS je zobrazen na Obrázku 25 (vlevo).

Princip použití obecně spočívá v tom, že analyzovaný vzorek (analyt extrahovaný do vhodného organického rozpouštědla) je v kapalně podobě manuálně nebo automaticky aplikován do lineru zahřátého nástřikového prostoru plynového chromatografu (nástřiková technika DFVI – Bleskově se vypařující přímý nástřik), ve kterém dochází vlivem vysoké teploty k rychlému zplynění vzorku a jeho vnesení do chromatografické kolony pomocí proudu nosného plynu. Analytický vzorek může být do chromatografické kolony zaveden i v plynné podobě, například při použití termodesorpčního systému nebo jinou metodou využívající mikroextrakční techniky.

Na chromatografické kapilární koloně dochází k separaci jednotlivých složek (analytů) na základě svých fyzikálně-chemických vlastností. Proud nosného plynu, který obsahuje separované analyty, je z kolony veden do detektoru (MS).

Analyty jsou pomocí iontového zdroje hmotnostního spektrometru ionizovány technikou elektronové ionizace (EI, dříve také „elektronový impakt“), při které dochází k fragmentaci analytu a vzniku nabitých částic – iontů. Fragmenty (ionty) jsou v plynné fázi za vysokého vakua rozděleny v kvadrupólovém hmotnostním analyzátoru podle poměru hmotnosti a náboje (m/z). Rozdělené ionty jsou následně detekovány v MS detektoru, kde je pomocí hmotnostního spektra zaznamenána intenzita iontů v závislosti na m/z .

Výsledná hmotnostní spektra jsou zpravidla zpracovávána ve specializovaných spektrometrických softwarech, kde jsou na základě automatických algoritmů porovnávána se spektry v knihovnách a analytických spektrálních databázích.

4 METODIKA

Kapitola popisuje použité chemikálie, laboratorní přístroje a pomůcky, analytickou instrumentaci a pracovní postupy vztahující se k jednotlivým dílčím experimentům.

4.1 Použité chemikálie

V Tabulce 4 jsou uvedeny toxické chemické látky, prekurzory a nestanovené sledované látky použité v experimentální části. Tabulka 5 následně shrnuje ostatní chemikálie.

Tabulka 4 - Použité toxické chemické látky

Chemický název (OPCW Handbook on Chemicals, 2022):		CAS číslo:
Toxické chemické látky seznamu 1A		
Isopropyl methylphosphonofluoridate (GB; 1A01)		107-44-8
Pinacolyl methylphosphonofluoridate (GD; 1A01)		96-64-0
Ethyl S-2-diisopropylaminoethyl methylphosphonothiolate (VX; 1A03)		50782-69-9
Isobutyl S-2-diethylaminoethyl methylphosphonothiolate (VR; 1A03)		159939-87-4
Butyl S-2-diethylaminoethyl methylphosphonothiolate (C-VX; 1A03)		468712-10-9
Ethyl (1-(diethylamino)ethylidene) phosphoramidofluoridate (A-234; 1A14)		2387496-06-0
Bis(2-chloroethyl)sulfide (HD; 1A04)		505-60-2
Prekurzory seznamu 2B a 3B		
	Výrobce:	CAS číslo:
Cyclohexyl methyl methylphosphonate (99%; 2B04)	Abcr GmbH	7040-52-0
Diisopropyl methylphosphonate (DIMP; 97%; 2B04)	Abcr GmbH	1445-75-6
Ethyl methylphosphonate (EMPA; 98%; 2B04)	Abcr GmbH	1832-53-7
Isopropyl methylphosphonate (IMPA; 95%; 2B04)	TRC	1832-54-8
2-(N,N-Diisopropylamino)ethanol (DIAOH; 99%; 2B11)	Sigma-Aldrich	96-80-0
Bis(2-hydroxyethyl)sulfide (TDG; 99%; 2B13)	Sigma-Aldrich	111-48-8
N-Ethyldiethanolamine (EDEA; 98%; 3B15)	Sigma-Aldrich	139-87-7
Nestanovené chemické látky		
Diisopropyl fluorophosphate (DFP; 99%; N.S.)	Sigma-Aldrich	55-91-4
2-Chloroethyl 2-hydroxyethyl sulfide (95%; N.S.)	Enamine	693-30-1
Malathion (PESTANAL®, analytical standard)	Sigma-Aldrich	121-75-5
Paraoxon-methyl (PESTANAL®, analytical standard)	Sigma-Aldrich	950-35-6

Čistoty toxických chemických látek seznamu 1 byly stanoveny analyticky v průběhu experimentální části metodou srovnání velikosti plochy dominantního píku v celkovém GC chromatogramu a sumou ploch všech ostatních nalezených analytů. Čistota se pohybovala ≥ 95 %. Standardy látek seznamu 1 dodal VVÚ, s.p. (CZ) a Vojenský útvar 1042 Čereňany (SK).

Tabulka 5 – Ostatní použité chemikálie

Chemický název:	Výrobce:	CAS číslo:
Dichlormethan (DCM; HPLC grade, ≥ 99.9 %)	Sigma-Aldrich	75-09-2
Hexan (HEX; GC grade, ≥ 97.0 %)	Sigma-Aldrich	110-54-3
Isopropylalkohol (IPA; p.a., min. 99,8 %)	Penta	67-63-0
Acetonitril (ACN; GC grade)	Merck Millipore	75-05-08
Tetrahydrofuran (THF; ≥ 99.9 %)	Merck Millipore	109-99-9
Voda pro chromatografii (LC-MS Grade) LiChrosolv®	Merck Millipore	7732-18-5
<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA; pro GC derivatizaci, ≥ 99.0 %)	Sigma-Aldrich	7732-18-5
Perfluorotributylamine (PFTBA; MS Grade 100 %)	SynQuest Labs	311-89-7
OPCW QC Testovací směs	-	-
Síran sodný, bezvodý (p.a.)	Penta	7757-82-6

4.2 Analytická instrumentace

Pro měření byl použit GC/MS analytický systém **8890 GC – 5977B MSD Inert plus** (Agilent Technologies, USA) v kombinaci s modulární platformou **CENTRI SCP/SAP** (Markes International Ltd.; UK) – viz Obrázek 25.

Kontrola výkonosti analytického systému byla pravidelně prováděna pomocí:

- a. automatického ladění MS detektoru pomocí GCMS ladícího standardu (PFTBA);
- b. vyhodnocení výsledků ladění;
- c. provedení kontroly kvality systému pomocí kontrolního referenčního vzorku „OPCW QC testovací směsi“ v případě kapalných vzorků a GCMS Standardu pro ověření účinnosti HCSE/SPME na platformě CENTRI.

Základní parametry GC při kapalném nástřiku (Front Inlet):

Parametry kolony:	HP-5MS Ultra Inert (5%-phenyl)-methylpolysiloxane O.D. = 0,32 mm; I.D. = 0,25 mm; F.T. = 0,25 µm L= 2 x 15 m (PCM Connection)
Základní metoda:	„CW_Basic_SSL-GCMS“
Teplotní program GC:	40 °C (60 s); 10 °C/min do 280 °C; 280 °C (300s)
Teplota nástřiku:	250 °C
Nástřik vzorku:	1 µl v režimu Splitless
Průtok kolonou:	1,2 ml/min
MSD Transfer Line:	280 °C
Mobilní fáze:	Helium 5.0

Základní parametry GC při zavádění vzorku z platformy CENTRI (Back Inlet):

Parametry kolony:	HP-5MS Ultra Inert (5%-phenyl)-methylpolysiloxane O.D. = 0,32 mm; I.D. = 0,25 mm; F.T. = 0,25 µm L= 1 x 30 m
Základní metoda:	„CW_Basic_HCSE-GCMS“
Teplotní program GC:	„OPCW“ – 40 °C (60 s); 10 °C/min do 280 °C; 280 °C (300s)
Průtok kolonou:	1 ml/min
MSD Transfer Line:	280 °C
Mobilní fáze:	Helium 5.0

Parametry hmotnostního spektrometru:

EI Energy:	70 eV
Mass range (m/z):	45–500
Teplota MS Source:	230 °C
Teplota MS Quad:	150 °C
Acquisition Mode:	Full Scan nebo SIM

Vyhodnocení kvalitativních analytických dat bylo realizováno pomocí softwaru Agilent MassHunter Qualitative Analysis (v.10.0), Agilent MassHunter Unknowns Analysis (v.10.0), NIST Mass Spectral Search Program (v.2.4) a AMDIS (v2.73).

Program AMDIS (z ang. „*Automatic Mass spectral Deconvolution and Identification System*“) byl používán z důvodu jeho aplikace v průběhu analytických činností pro potřeby OPCW. Byl vyvinut v 90. letech k rychlému porovnání každé složky (analytu) ve vygenerovaném analytickém datovém souboru s knihovnou chemických látek souvisejících s CWC a interpretovat pouze ty složky, které se s knihovnou shodují. Od roku 1997 je AMDIS formálně přijat k použití v kontrolním procesu chemického odzbrojování. Jako hlavní knihovna je používána on-site verze Centrální analytické databáze OPCW („e-OCAD“), která je průběžně doplňována o nové látky na základě jejich schválení Validační skupinou spadající pod činnost Laboratoře OPCW a přijetím na zasedání Výkonné rady OPCW.

Identifikace sledovaných látek byla prováděna metodou komparace naměřených hmotnostních spekter s definovanou knihovnou hmotnostních spekter. Byla použita knihovna OCAD (v23_2021) a NIST Mass Spectral Database (NIST20; verze 2020).

Během procesu vyhodnocování a interpretace dat byla využita integrace, která se používá k výpočtu plochy píku a získání např. výšky píku nebo retenčního času, a dále dekonvoluce, což je čistě matematický proces oddělení společně eluovaných analytů a vytvoření čistého spektra pro každý analyt. V praxi se používá pro svůj potenciál například odhalit dva nebo více analytů ukrytých v jednom píku.

4.3 Ostatní laboratorní přístroje a pomůcky

Pro odpařování kapalných (zejména vodných) vzorků byla použita nově zaváděná instrumentace – vakuový odstředivý koncentrátor Genevac EZ-2 (SP Industries, Inc). Odpařování a řízené zakoncentrování kapalných organických vzorků probíhalo na koncentrátoru LabEva (MIUlab), při kterém byl využit ohřev vzorku a odfoukávání rozpouštědla proudem inertního plynu (dusík 5.0). Tento koncentrátor byl použit rovněž pro samostatný ohřev vzorku v průběhu derivatizačního procesu, neboť jeho topná deska byla vytvořena přímo pro potřeby vzorkovnic používaných v laboratoři.

Pro odměřování, respektive odvažování standardů a chemikálií byly využity laboratorní analytické váhy Explorer Semi-Micro EX125 (Ohaus), jednokanálové manuální pipety Finnpiquette F1-ClipTip (Thermo Fisher Scientific), digitální analytický dávkovač eVol® XR se stříkačkami XCHANGE (SGE Analytical Science) a skleněné plynotěsné mikrostříkačky (SGE Analytical Science).

Při experimentálním studiu použitelnost podporované kapalinové extrakce byly použity SLE patrony Chem Elut S (Agilent Technologies, USA). V průběhu testování vysokokapacitní sorpční extrakce pak HiSorb sondy H1-AXAAC a H1-AXABC (PDMS), H3-XXAAC a H3-XXABC (PDMS/DVB), H4-XXAAC a H4-XXABC (PDMS/ CWR/DVB), které dodala firma Markes (UK). Pro testování techniky SBSE byly využity míchadla Twister (délka 10 mm, vrstva 1 mm;) se sorbentem PDMS. V platformě CENTRI byl instalován fokusační cold trap U-T10CW-2S „Chemical Weapons“ (Markes, UK).

Promíchávání a intenzivní protřepávání vzorku bylo realizováno prostřednictvím vícepoziční třepačky Multi Reax a univerzální třepačky typu „vortex“ Reax Control. Obě třepačky dodala firma Heidolph. Sonifikace vzorků probíhala v laboratorní ultrazvukové vaně K-3LE (KRAINTEK CZECH, s.r.o.).

V případě přípravy vodných vzorků byl pro stanovení pH využit bezdrátový pH metr edge blu* s HALO elektrodou HI13302 (Hanna Instruments). V průběhu experimentální práce byla provedena pěti bodová kalibrace pufrů výrobcem.

4.4 Bezpečnost a ochrana zdraví při práci

V souvislosti s extrémní rizikovostí sledovaných analytů, které jsou z pohledu nebezpečí pro zdraví klasifikovány zejména jako látky vykazující akutní toxicitu, byla v průběhu experimentální práce dodržována veškerá ustanovení zásad BOZP v souladu s interními směrnicemi a platnými dokumenty SÚJCHBO, v.v.i, a zavedená bezpečnostní a ochranná opatření předepsaná Provozním řádem Laboratoře toxických látek SÚJCHBO, v.v.i.

Pracovní prostory (zejména digestoře) a související prostory byly nepřetržitě monitorovány prostřednictvím IMS detektoru ChemProX (EnviroNics Oy) v režimu „CWA High Sensitive“ s akustickým a vizuálním alarmem. V případě prací, které jsou z pohledu zavedených SOP laboratoře vyhodnoceny jako vysoce rizikové, byly používány adekvátní osobní ochranné prostředky.

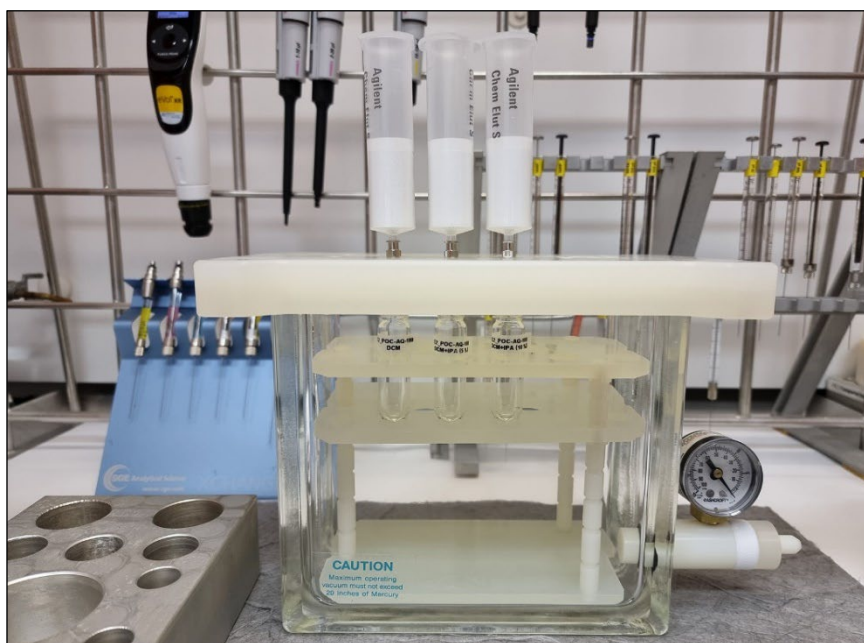
Kontaminovaný odpad byl likvidován v nádobách s vhodným dekontaminačním činidlem, který byl připravován v souladu s Provozním řádem LTL a předem připraven v pracovních prostorách. V případě potřeby byly v dosahu prostředky pro provedení okamžité dekontaminace povrchu a eliminaci zdroje kontaminace.

4.5 Pracovní postupy

Podkapitola představuje pracovní postupy pro přípravu vzorků, které byly využity v jednotlivých experimentálních studiích.

4.5.1 Experimentální studium LLE/SLE

Pro experimentální studium využitelnosti podporované kapalinové extrakce (SLE) oproti technice extrakce kapalina-kapalina byla nejprve připravena aparatura pro provádění techniky SPE, která může být vhodně využita i pro techniku SLE. Do manifoldu byly umístěny odpovídající držáky, do kterých byly vloženy 8mL extrakční vialky E-Z s vysokou výtěžností (Wheaton) pro záchyt extraktu a nádoba byla přikryta. Připravené SLE patry Chem Elut S byly opatřeny nerezovou jehlou pro eliminaci vzniku křížové kontaminace a zasunuty skrz víko manifoldu. Připravená aparatura je zobrazena na Obrázku 28.



Obrázek 28 – Připravená aparatura pro provedení techniky SLE

Zdroj: vlastní výzkum

Pro extrakci bylo použito 5 mL vodného roztoku (analyty a jejich koncentrace viz níže). Po aplikaci vzorku do byla patrona ponechána v klidu 10–15 minut z důvodu pronikání vodného vzorku do sorbentu a jeho absorpci. Následně bylo použito 10 mL (2x 5 mL) zvoleného organického rozpouštědla nemísitelného s vodou, kterým byl sorbent propláchnut celkem dvakrát.

V rámci **dílčího experimentu 1A** byl nejprve zkoumán vliv použitého organického rozpouštědla na dosažení kvalitativního analytického výsledku. Pro experiment byly připraveny rozpouštědla: 1) DCM, 2) DCM s 5% přídavkem IPA a 3) DCM s 10% přídavkem IPA. Vodný vzorek (E1A_POC-AQ-S) byl připraven postupným ředěním zásobního roztoku analytů v acetonitrilu (ACN) do koncentrací 10, 50 a 100 ng/μL s následujícími analyty:

- Cyclohexyl methyl methylphosphonate (2B04);
- Diisopropyl methylphosphonate (2B04);
- 2-(*N,N*-Diisopropylamino)ethanol (2B11);
- Bis(2-hydroxyethyl)sulfide (2B13);
- *N*-Ethyldiethanolamine (3B15);
- Diisopropyl fluorophosphate (N.S.);
- Paraoxon-methyl (N.S.).

Po optimalizaci metody byl v rámci **dílčího experimentu 1B** proces vyzkoušen na vzorky obsahující toxické chemické látky seznamu 1 v koncentracích 5, 25 a 50 ng/μL. Vodné vzorky obsahovaly:

- **E1B_01-AQ-S**: látku VX (1A03);
- **E1B_02-AQ-S**: látku A-234 (1A14).

Při přípravách vzorku byl vždy použit blank vzorek E1B_03-AQ-B.

Poslední fází, **dílčím experimentem 1C**, byla příprava neznámého vodného vzorku **E1C_01-AQ-S**, včetně jeho blanku E1C_02-AQ-B. Vzorek pocházel z intralaboratorního porovnání akreditovaných zkoušek, které bylo uskutečněno v dubnu 2022 v rámci sledování výkonnosti laboratoře v souladu s ČSN EN ISO/IEC 17025:2018.

4.5.2 Experimentální studium HCSE

Při experimentálním studiu zaměřeném na využití vysokokapacitní sorpční extrakce (HCSE) použitím HiSorb sond s různými druhy sorbentů na automatické platformě CENTRI byly prováděny dva dílčí experimenty.

Pro průběh **dílčího experimentu 2A** bylo do 20mL krimpovací vialky se septem pro použití HiSorb sond připraveno 15 mL vodného vzorku o koncentraci sledovaných analytů 100 ng/mL. V jednotlivých vzorcích byly následující analyty:

- **E2A_01-AQ-S:** látka A-234 (1A14);
- **E2A_02-AQ-S:** látka VX, VR a C-VX (1A03);
- **E2A_03-AQ-S:** Malathion a Paraoxon-methyl (N.S.).

Pro extrakci byly použity inertní sondy se standardní délkou a sorbentem PDMS a PDMS/DVB s využitím metody přímého ponoření do vzoru (DI-HCSE). Extrakce sond probíhala při teplotě 50 °C po dobu 15, 30 nebo 60 min. s pomalým agitováním (do 200 ot./min.). Následná desorpce HiSorb sondy v injektoru CENTRI probíhala po dobu 5 min. při teplotě 260 °C, záchyt na fokusační trap při teplotě 0 °C a průtoku 30 mL/min., následná desorpce trapu při teplotě 280 °C po dobu 5 min. bez splitu.

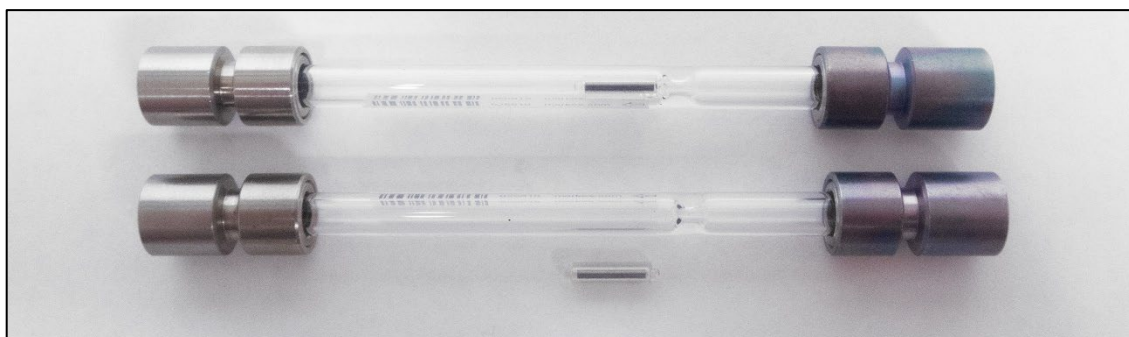
Dílčí experiment 2B byl zaměřen na vzorkování metodou headspace (HS-HCSE). Do 20mL krimpovací vialky se septem pro použití HiSorb sond bylo připraveno 5 g písčitého materiálu s různou zrnitostí. Vzorky **E2B_01-SD-S** obsahovaly HD (1A04) v koncentraci 100 ng/g.

Pro extrakci byly použity inertní sondy s krátkou délkou a sorbentem PDMS/DVB a DVB/CWR/PDMS s využitím metody headspace (HS-HCSE). Kondicionace vzorku probíhala po dobu 5 min. při teplotě 35 °C, extrakce pak 5, 15 a 30 min. Následná desorpce HiSorb sondy v injektoru CENTRI po dobu 5 min. při teplotě 260 °C, záchyt na fokusační trap při teplotě 0 °C a průtoku 30 mL/min., následná desorpce trapu při teplotě 280 °C po dobu 5 min. bez splitu.

HiSorb sondy byly po každém měření rekondicionovány po dobu 15-30 min. při teplotě 260-280 °C. V každé sérii a sekvenci měření byl pro kontrolu přidán blank vzorek. Pravidelně byl rekondicionován a analyticky kontrolován i fokusační trap.

4.5.3 Experimentální studium SBSE

Pro experimentální studium dalšího možného využití sorpční extrakce na míchadle byly připraveny reálné vodné vzorky (50 mL, povrchová voda, lokalita Lazský potok), do kterých byly přidány sledované analyty o koncentraci 100 µg/L. Do vzorkovnic bylo přidáno míchadlo Twister® (délka 10 mm, vrstva 1 mm PDMS) a ve vzorku ponecháno při velmi mírném míchání (do 100 ot./min.) po dobu 30, 180 a 360 min. Po uplynutí stanovené doby bylo míchadlo vyjmuto, opláchnuto destilovanou vodou a vloženo do prázdné skleněné trubičky Markes (Obrázek 30) pro termodesorpční modul CENTRI.



Obrázek 30 – Uvažované použití SBSE míchadla Twister®

Zdroj: vlastní výzkum

Míchadlo bylo v TD modulu desorbováno při teplotě 280 °C po dobu 5 minut. Záchyt na fokusační trap při teplotě 0 °C a průtoku 30 mL/min., následná desorpce trapu při teplotě 280 °C po dobu 5 min. bez splitu. Pro kontaminaci vodných vzorků byly použity následující analyty:

- **E3_01-AQ-S:** Soman (1A01);
- **E3_02-AQ-S:** Látka VX (1A03);
- **E3_03-AQ-S:** Látka A-234 (1A14).

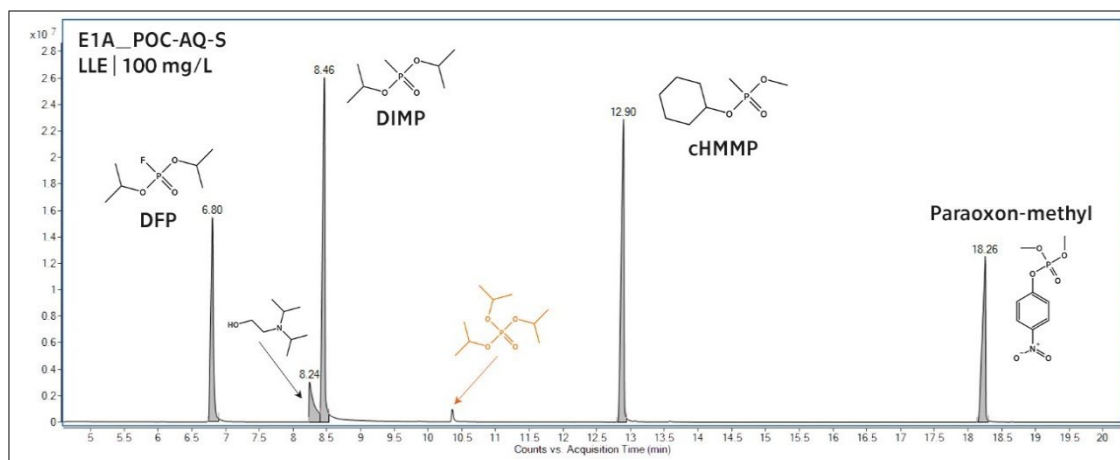
5 VÝSLEDKY

V úvodu je vhodné zmínit, že experimentální studium bylo zaměřeno na zhodnocení jejich možného použití v podmínkách analytického pracoviště Laboratoře toxických látek SÚJCHBO, v.v.i. Toto pracoviště je v rámci své činnosti určeno na poskytování technické a analytické podpory SÚJB nebo složkám IZS s cílem potvrdit nebo vyvrátit přítomnosti zákonem stanovených toxických chemických látek. Analytické výsledky proto budou interpretovány z pohledu kvalitativní analýzy, tedy ověření, zda je za definovaných podmínek laboratoř schopna použitím technik zabezpečit spolehlivou identifikaci sledovaného analytu. Výsledky tedy nebudou zaměřeny na zjištění citlivosti, reprodukovatelnost nebo specifické extrakční charakteristiky. Této oblasti je věnovaná pozornost v samostatné kapitole experimentálního vývoje v rámci bezpečnostního výzkumu ve prospěch bezpečnostních složek státu.

5.1 Výsledky experimentálního studia LLE/SLE

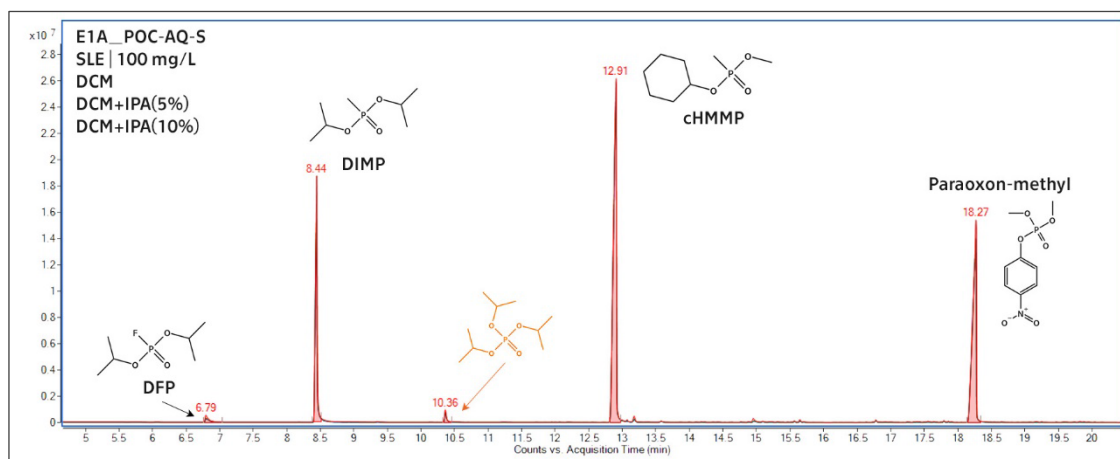
V průběhu **dílčího experimentu 1A** byla pozornost zaměřena na možnost identifikace sledovaného analytu při použití dané techniky. Sledován byl rovněž vliv přídavku polárního rozpouštědla na případný zisk polárnějších látek v případě techniky SLE. Výsledky jsou rozděleny podle koncentrace a dále na organickou část pro přímou analýzu pomocí GC/MS a derivatizovanou část pro následnou GC/MS analýzu.

Chromatografická spektra vzorku **E1A_POC-AQ-S-100 (koncentrace 100 mg/L)** jsou zobrazena na Obrázku 31 pro techniku LLE, respektive Obrázku 32 pro techniku SLE.



Obrázek 31 – GC Spektrum vzorku E1A_POC-AQ-S-100 | LLE

Zdroj: vlastní výzkum



Obrázek 32 – GC Spektrum vzorku E1A_POC-AQ-S-100 | SLE

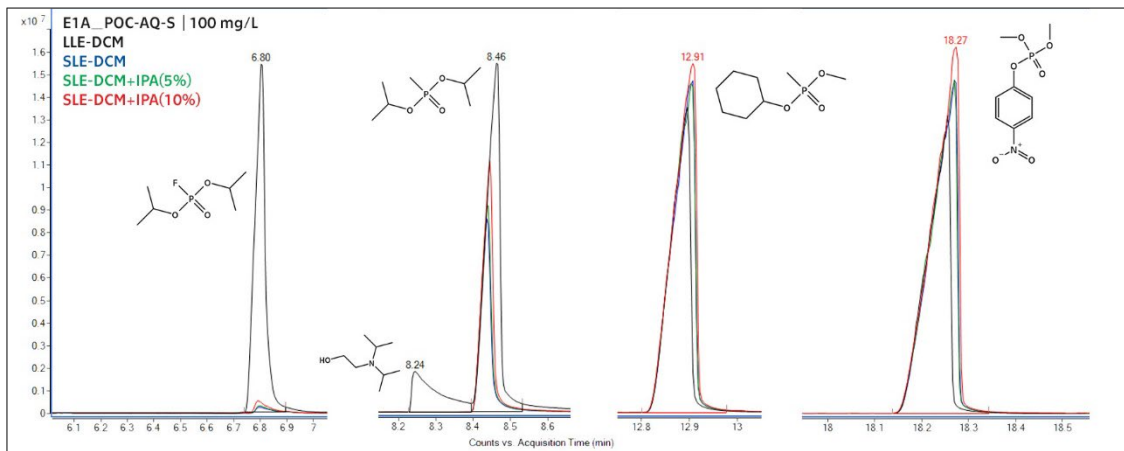
Zdroj: vlastní výzkum

Identifikace jednotlivých analytů ze vzorků je součástí Tabulky 6.

Tabulka 6 – Identifikované analyty – vzorek 100 mg/L

RT	Chemický název analytu	Algoritmus	Skóre (Lib)	Lib/DB
Technika LLE 100 mg/L DCM				
6.80	Diisopropyl fluorophosphate	Integrace	93.97	NIST20
8.24	2-(N,N-Diisopropylamino)ethanol		96.87	OCADv23
8.46	Diisopropyl methylphosphonate		97.02	OCADv23
12.90	Cyclohexyl methyl methylphosphonate		97.63	OCADv23
18.26	Paraoxon methyl		93.05	NIST20
Technika SLE 100 mg/L DCM				
6.80	Diisopropyl fluorophosphate	Integrace	95.15	NIST20
8.44	Diisopropyl methylphosphonate		97.85	OCADv23
12.91	Cyclohexyl methyl methylphosphonate		97.53	OCADv23
18.27	Paraoxon methyl		92.85	NIST20
Technika SLE 100 mg/L DCM+IPA (5%)				
6.80	Diisopropyl fluorophosphate	Integrace	94.68	NIST20
8.44	Diisopropyl methylphosphonate		97.47	OCADv23
12.90	Cyclohexyl methyl methylphosphonate		97.58	OCADv23
18.27	Paraoxon methyl		92.85	NIST20
Technika LLE 100 mg/L DCM+IPA (10%)				
6.79	Diisopropyl fluorophosphate	Integrace	94.45	NIST20
8.44	Diisopropyl methylphosphonate		97.48	OCADv23
12.91	Cyclohexyl methyl methylphosphonate		97.4	OCADv23
18.27	Paraoxon methyl		93.06	NIST20

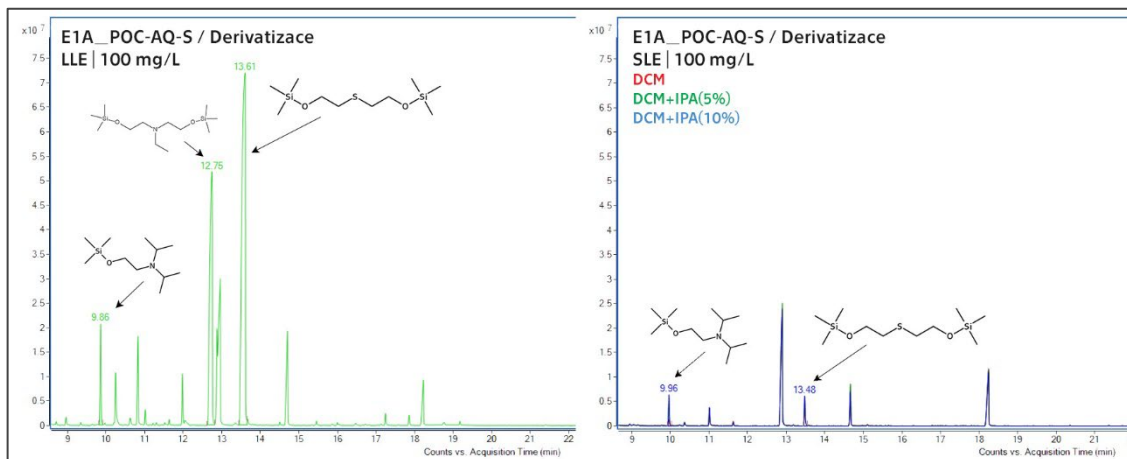
Porovnání výsledných chromatografických spekter z měření obou technik přípravy vzorků je znázorněno na Obrázku 33.



Obrázek 33 – Porovnání GC spekter z analýz obou technik (100 mg/L)

Zdroj: vlastní výzkum

Chromatografická spektra derivatizovaných vzorků (koncentrace 100 mg/L) jsou z techniky LLE (vlevo) a techniky SLE (vpravo) zobrazeny na Obrázku 34. Zvýrazněny jsou pouze sledované polární analyty. Analyty, které již byly identifikovány v Tabulce 6, nebudou v derivatizovaných vzorcích zohledňovány. Intenzity výšky píků zůstaly pro komparaci zachovány ve stejných poměrech.



Obrázek 34 – GC Spektra derivatizovaných vzorků (100 mg/L)

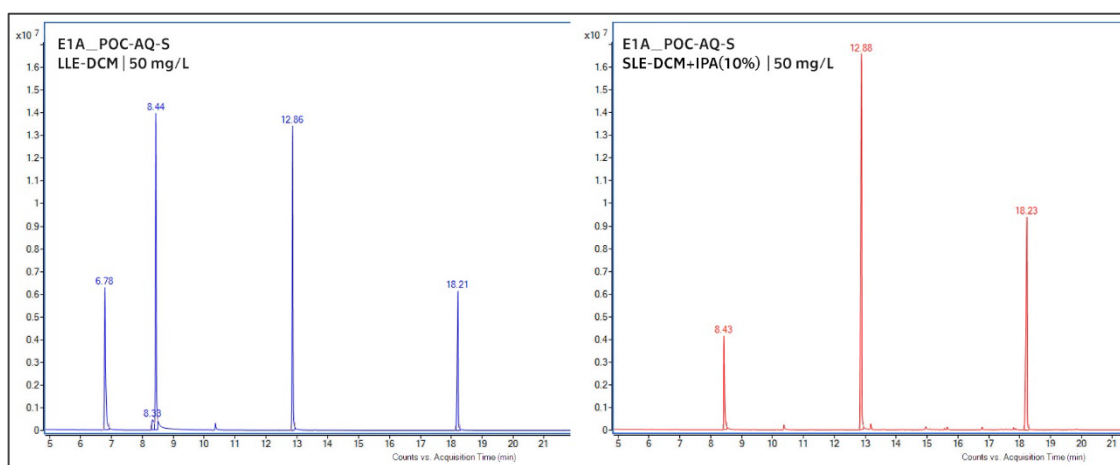
Zdroj: vlastní výzkum

Identifikace derivatizovaných analytů ze vzorků je součástí Tabulky 7.

Tabulka 7 – Identifikované derivatizované analyty – vzorek 100 mg/L

RT	Chemický název analytu	Algoritmus	Skóre (Lib)	Lib/DB
Technika LLE 100 mg/L DCM – Derivatizace BSTFA				
9.86	2-(N,N-Diisopropylamino)ethanol, trimethylsilyl ether	Integrace	93.38	OCADv23
12.75	N-Ethyl-N,N-bis(2-trimethylsilyloxyethyl)amine		96.64	OCADv23
13.48	Bis(2-trimethylsilyloxyethyl)sulfide		98.12	OCADv23
Technika SLE 100 mg/L DCM – Derivatizace BSTFA				
9.96	2-(N,N-Diisopropylamino)ethanol, trimethylsilyl ether	Integrace	90.69	OCADv23
13.48	Bis(2-trimethylsilyloxyethyl)sulfide		97.07	OCADv23
Technika SLE 100 mg/L DCM+IPA (5%) – Derivatizace BSTFA				
9.96	2-(N,N-Diisopropylamino)ethanol, trimethylsilyl ether	Integrace	91.27	OCADv23
13.48	Bis(2-trimethylsilyloxyethyl)sulfide		96.78	OCADv23
Technika LLE 100 mg/L DCM+IPA (10%) – Derivatizace BSTFA				
9.96	2-(N,N-Diisopropylamino)ethanol, trimethylsilyl ether	Integrace	94.45	OCADv23
13.48	Bis(2-trimethylsilyloxyethyl)sulfide		96.76	OCADv23

Experimentální práce dále pokračovala se vzorky **E1A_POC-AQ-S-50 (koncentrace 50 mg/L)**. Srovnání chromatografických spekter z měření analytických vzorků z obou technik přípravy je na Obrázku 35. Identifikace jednotlivých analytů ze vzorků je součástí Tabulka 8 – Identifikované analyty – vzorek 50 mg/L.



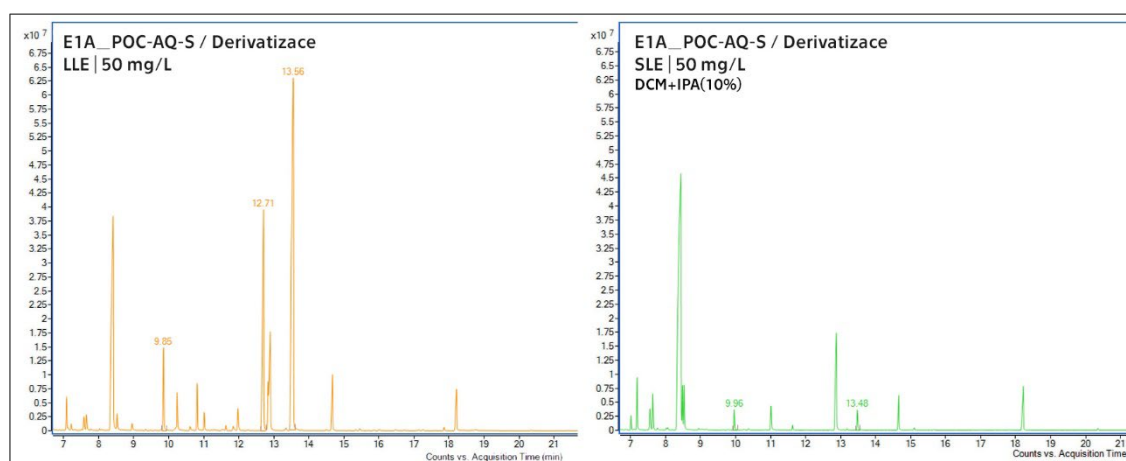
Obrázek 35 – GC Spektra vzorku E1A_POC-AQ-S-50 | LLE (vlevo), SLE (vpravo)

Zdroj: vlastní výzkum

Tabulka 8 – Identifikované analyty – vzorek 50 mg/L

RT	Chemický název analytu	Algoritmus	Skóre (Lib)	Lib/DB
Technika LLE 50 mg/L DCM				
6.78	Diisopropyl fluorophosphate	Integrace	94.11	NIST20
8.33	2-(N,N-Diisopropylamino)ethanol		96.23	OCADv23
8.44	Diisopropyl methylphosphonate		96.85	OCADv23
12.86	Cyclohexyl methyl methylphosphonate		97.62	OCADv23
18.21	Paraoxon methyl		92.80	NIST20
Technika SLE 50 mg/L DCM				
8.43	Diisopropyl methylphosphonate	Integrace	97.17	NIST20
12.88	Cyclohexyl methyl methylphosphonate		97.59	OCADv23
18.24	Paraoxon methyl		92.83	NIST20
Technika SLE 50 mg/L DCM+IPA (5%)				
8.43	Diisopropyl methylphosphonate	Integrace	97.21	NIST20
12.88	Cyclohexyl methyl methylphosphonate		97.59	OCADv23
18.24	Paraoxon methyl		92.85	NIST20
Technika LLE 50 mg/L DCM+IPA (10%)				
8.43	Diisopropyl methylphosphonate	Integrace	97.24	OCADv23
12.88	Cyclohexyl methyl methylphosphonate		97.59	OCADv23
18.23	Paraoxon methyl		92.83	NIST20

Po derivatizačním procesu byly vzorky podrobeny analýze. Obrázek 36 představuje chromatografická spektra z obou testovaných technik. Přehled identifikovaných analytů ve vzorcích udává Tabulka 9.



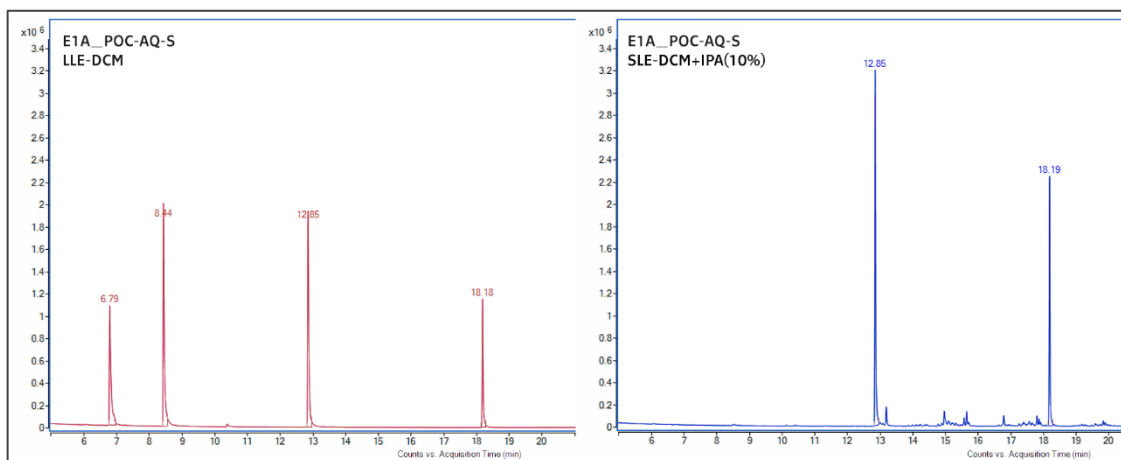
Obrázek 36 – GC Spektra derivatizovaných vzorků (50 mg/L)

Zdroj: vlastní výzkum

Tabulka 9 – Identifikované derivatizované analyty – vzorek 50 mg/L

RT	Chemický název analytu	Algoritmus	Skóre (Lib)	Lib/DB
Technika LLE 50 mg/L DCM – Derivatizace BSTFA				
9.85	2-(N,N-Diisopropylamino)ethanol, trimethylsilyl ether	Integrace	91.05	OCADv23
12.71	N-Ethyl-N,N-bis(2-trimethylsilyloxyethyl)amine		95.42	OCADv23
13.56	Bis(2-trimethylsilyloxyethyl)sulfide		98.08	OCADv23
Technika SLE 50 mg/L DCM – Derivatizace BSTFA				
9.96	2-(N,N-Diisopropylamino)ethanol, trimethylsilyl ether	Integrace	90.69	OCADv23
13.48	Bis(2-trimethylsilyloxyethyl)sulfide		97.07	OCADv23
Technika SLE 50 mg/L DCM+IPA (5%) – Derivatizace BSTFA				
9.96	2-(N,N-Diisopropylamino)ethanol, trimethylsilyl ether	Integrace	91.27	OCADv23
13.48	Bis(2-trimethylsilyloxyethyl)sulfide		96.78	OCADv23
Technika LLE 50 mg/L DCM+IPA (10%) – Derivatizace BSTFA				
9.96	2-(N,N-Diisopropylamino)ethanol, trimethylsilyl ether	Integrace	94.45	OCADv23
13.48	Bis(2-trimethylsilyloxyethyl)sulfide		96.76	OCADv23

Posledním krokem dílčího experimentu 1A bylo zpracovávání vodného vzorku **E1A_POC-AQ-S-10 (koncentrace 10 mg/L)**. Srovnání chromatografických spekter z měření analytických vzorků z obou technik přípravy je na Obrázku 37. Identifikace jednotlivých analytů ze vzorků je součástí Tabulky 10.



Obrázek 37 – GC Spektra vzorku E1A_POC-AQ-S-10 | LLE (vlevo), SLE (vpravo)

Zdroj: vlastní výzkum

Tabulka 10 – Identifikované analyty – vzorek 10 mg/L

RT	Chemický název analytu / kód	Algoritmus	Skóre (Lib)	Lib/DB
Technika LLE 10 mg/L DCM				
6.79	Diisopropyl fluorophosphate	Integrace	94.14	NIST20
8.44	Diisopropyl methylphosphonate		97.17	OCADv23
12.85	Cyclohexyl methyl methylphosphonate		97.55	OCADv23
18.18	Paraoxon methyl		91.28	NIST20
Technika SLE 10 mg/L DCM				
12.85	Cyclohexyl methyl methylphosphonate	Integrace	97.65	OCADv23
18.18	Paraoxon methyl		92.92	NIST20
Technika SLE 10 mg/L DCM+IPA (5%)				
12.85	Cyclohexyl methyl methylphosphonate	Integrace	97.47	OCADv23
18.18	Paraoxon methyl		92.63	NIST20
Technika LLE 10 mg/L DCM+IPA (10%)				
12.85	Cyclohexyl methyl methylphosphonate	Integrace	97.53	OCADv23
18.18	Paraoxon methyl		92.94	NIST20

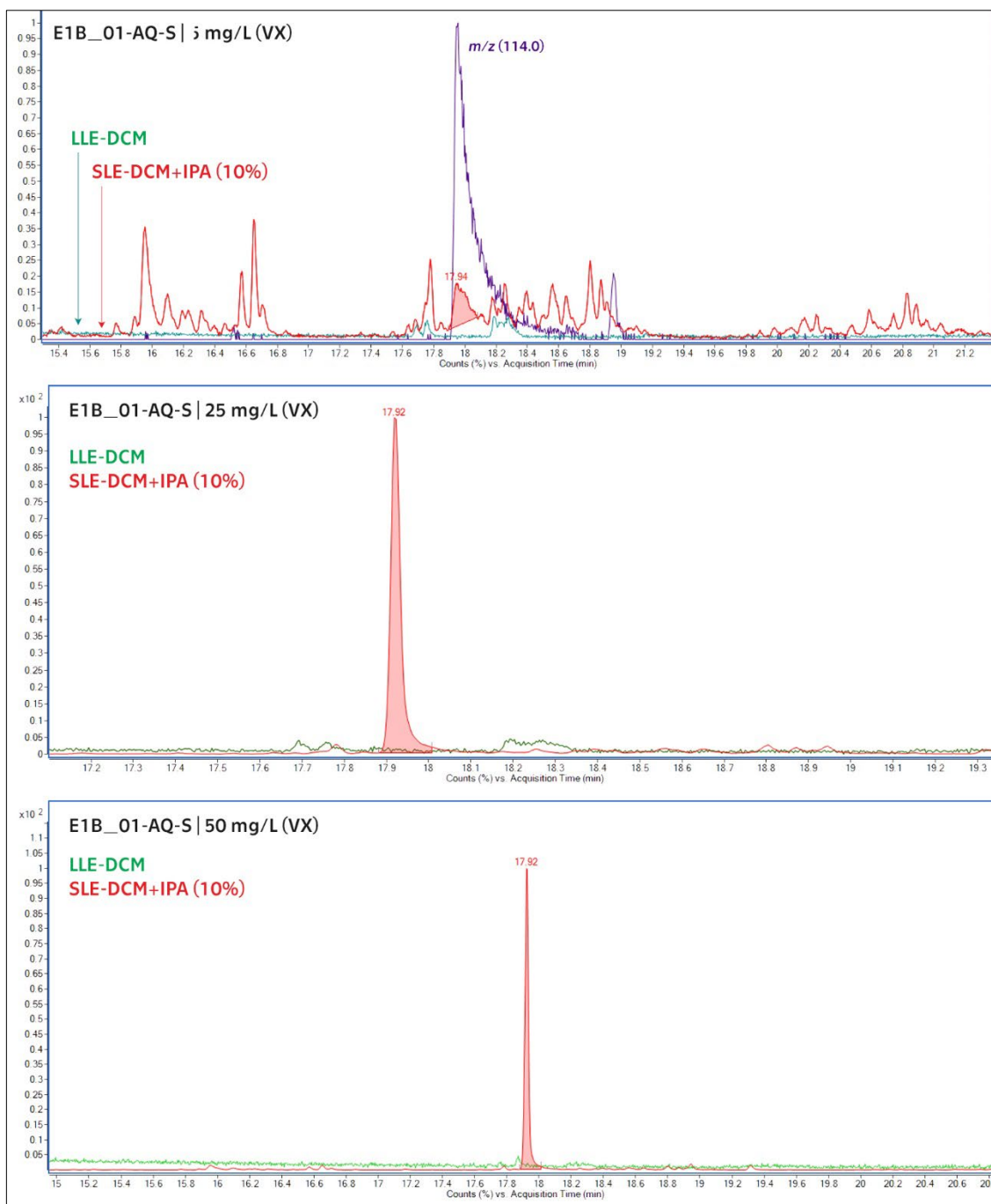
Pro úplnost bude uvedeno chromatografické spektrum vzorku po derivatizaci, v tomto případě pouze pro vzorek zpracovávaný technikou LLE. Vzorky z techniky SLE neposkytovaly analyticky relevantní data. Přehled nalezených analytů uvádí Tabulka 11.

Tabulka 11 – Identifikovaný derivatizovaný analyt – vzorek 10 mg/L

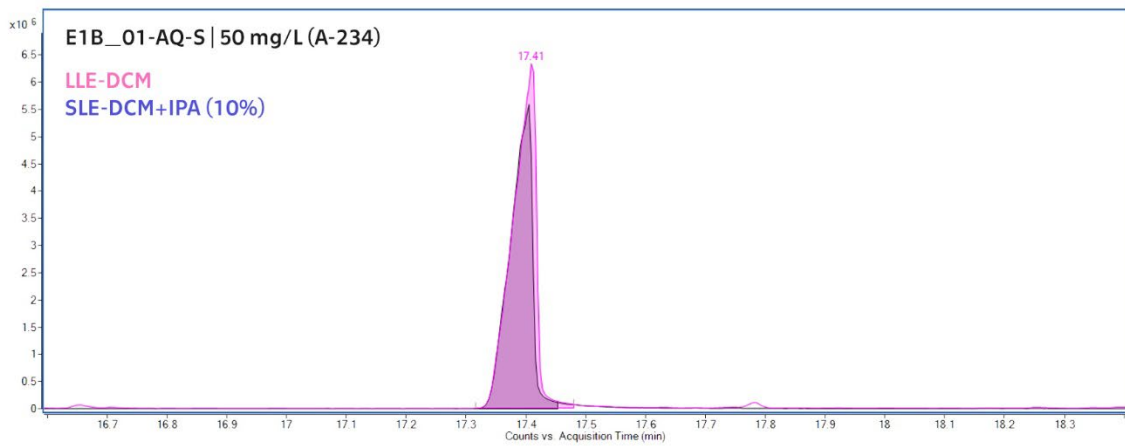
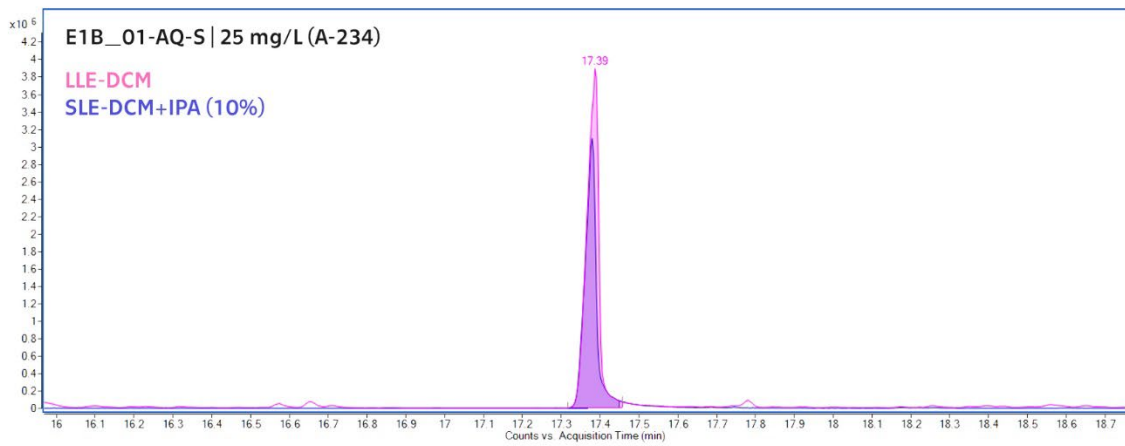
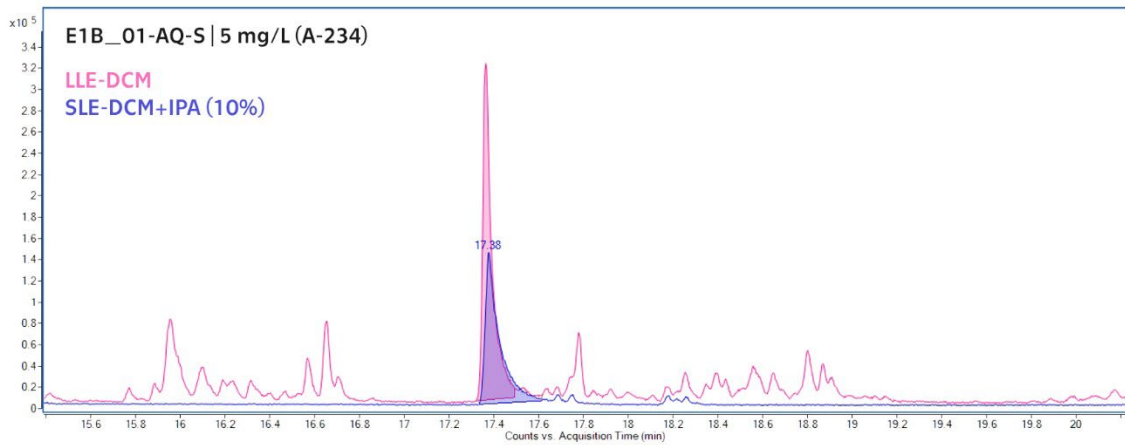
RT	Chemický název analytu / kód	Algoritmus	Skóre (Lib)	Lib/DB
Technika LLE 10 mg/L DCM – Derivatizace BSTFA				
13.47	Bis(2-trimethylsilyloxyethyl)sulfide	Dekonvoluce	97.06	OCADv23

V průběhu **dílčího experimentu 1B** byly připraveny vodné vzorky o koncentracích 5, 25 a 50 mg/L. Každý vzorek byl připraven celkem třikrát, všechny analytické vzorky byly měřeny třikrát. Během přípravy vzorků nebyly využity derivatizační kroky.

Chromatografická spektra jednotlivých analýz pro oba typy vzorků a obě techniky přípravy vzorků jsou představeny na Obrázku 38 a 39. Tabulka 12 následně shrnuje úspěšnost identifikace jednotlivých analytů.



Obrázek 38 – GC Spektra z měření vzorku s látkou VX
Zdroj: vlastní výzkum



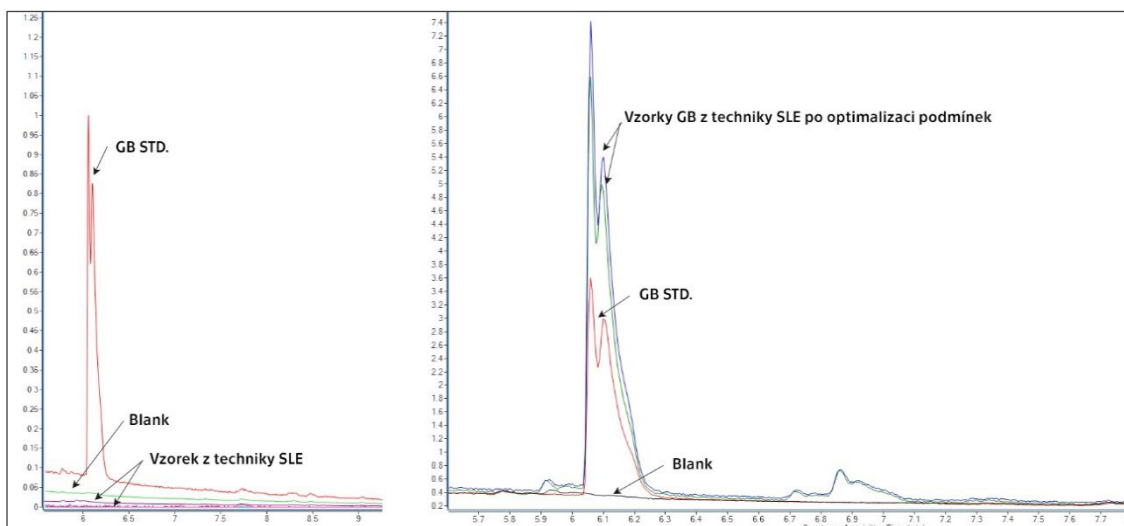
Obrázek 39 – GC Spektra z měření vzorku s látkou A-234
Zdroj: vlastní výzkum

Tabulka 12 – Souhrnný přehled identifikovaných analytů

Látka VX (1A03)	RT	Algoritmus	Skóre (Lib)	Lib/DB
5 mg/L				
LLE – DCM	-	-	NE	-
SLE – DCM + IPA (10%)	17.94	Dekonvoluce	83.64	OCADv23
25 mg/L				
LLE – DCM	-	-	NE	-
SLE – DCM + IPA (10%)	17.92	Dekonvoluce	95.46	OCADv23
50 mg/L				
LLE – DCM	-	-	NE	-
SLE – DCM + IPA (10%)	17.92	Integrace	95.51	OCADv23
Látka A-234 (1A14)				
5 mg/L				
LLE – DCM	17.38	Integrace	92.6	OCADv23
SLE – DCM + IPA (10%)	17.36	Integrace	95.74	OCADv23
25 mg/L				
LLE – DCM	17.38	Integrace	96.41	OCADv23
SLE – DCM + IPA (10%)	17.39	Integrace	95.88	OCADv23
50 mg/L				
LLE – DCM	17.41	Integrace	96.43	OCADv23
SLE – DCM + IPA (10%)	17.41	Integrace	96.64	OCADv23

V průběhu experimentů byl pouze pro zajímavost připraven vodný vzorek obsahující sarin. Po jeho zpracování nicméně nevykazoval přítomnost ve vzorcích z procesu přípravy technikou SLE jak v režimu „Full scan“, tak v módu SIM (m/z 99; 125).

Jak zobrazuje Obrázek 40 (vlevo), nebyl detekován žádný signál na předpokládaném retenčním čase sarinu, který byl zjištěn pomocí analýzy standardu. Pozornost tedy byla krátkodobě zaměřena na možné příčiny ve vztahu k postupu, sorbentu i průběhu odpařování. Celkový proces se nakonec podařilo optimalizovat a po opakovaném experimentu byl sarin kvalitativně analyzován (Obrázek 40, vpravo).



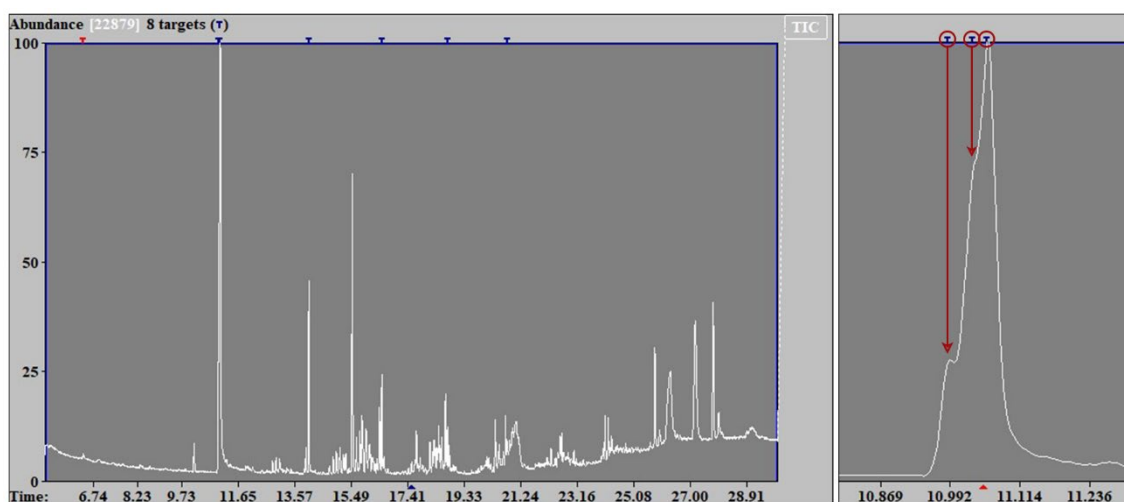
Obrázek 40 – GC Spektra z měření vodného vzorku s látkou GB

Zdroj: vlastní výzkum

Navržený postup pro použití techniky SLE byl prakticky odzkoušen jako součást **dílčího experimentu 1C** také na neznámém vzorku **LTL-A035-10-PT**.

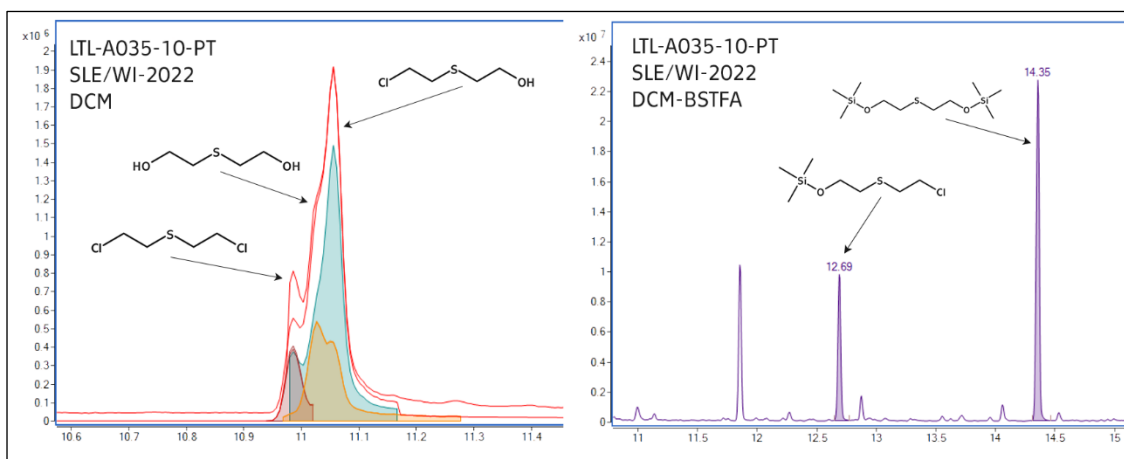
Pro ověření byly použity dvě SLE patроны Chem Elut S. Z extraktu z první patроны byl odebrán 1 mL vzorku pro okamžitou analýzu, zbytek byl vysušen a rekonstituován do 250 μ L DCM. Extrakt z druhé patроны byl po vysušení derivatizován.

Automatická dekonvoluce a vyhodnocení programem AMDIS naznačovala, že by vzorek mohl obsahovat více analytů s velmi podobnými charakteristikami. AMDIS Spektrum je zobrazeno na Obrázku 41, dekonvoluci píku v programu MassHunter upřesňuje Obrázek 42.



Obrázek 41 – Spektrum neznámého vzorku v programu AMDIS

Zdroj: vlastní výzkum

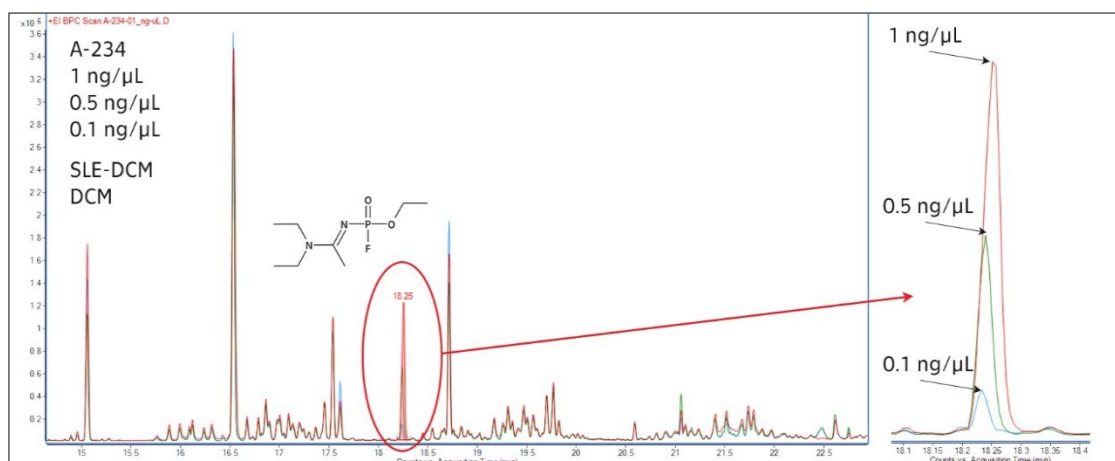


Obrázek 42 – Dekonvoluce píku (vlevo) a derivatizované analyty (vpravo)

Zdroj: vlastní výzkum

V neznámém vzorku byla ze skupiny sledovaných látek jednoznačně potvrzena přítomnost sulfidického yperitu [Bis(2-chloroethyl)sulfid], thiodiglykolu a jeho 2TMS derivátu (Bis(2-trimethylsiloxyethyl)sulfid). Ostatní detekované látky tvoří skupinu nestanovených degradačních produktů (NDP) vztahující se k HD.

Nad rámec uvažované práce byly provedeny ještě dodatečné experimenty s využitím vzorků pitné vody kontaminovaných látkou A-234 v nízkých koncentracích 0,1; 0,5 a 1 ng/μL. Výsledná spektra a komparace píků je představena na Obrázku 43.



Obrázek 43 – Komparace spekter analytických píků A-234 v různých koncentracích

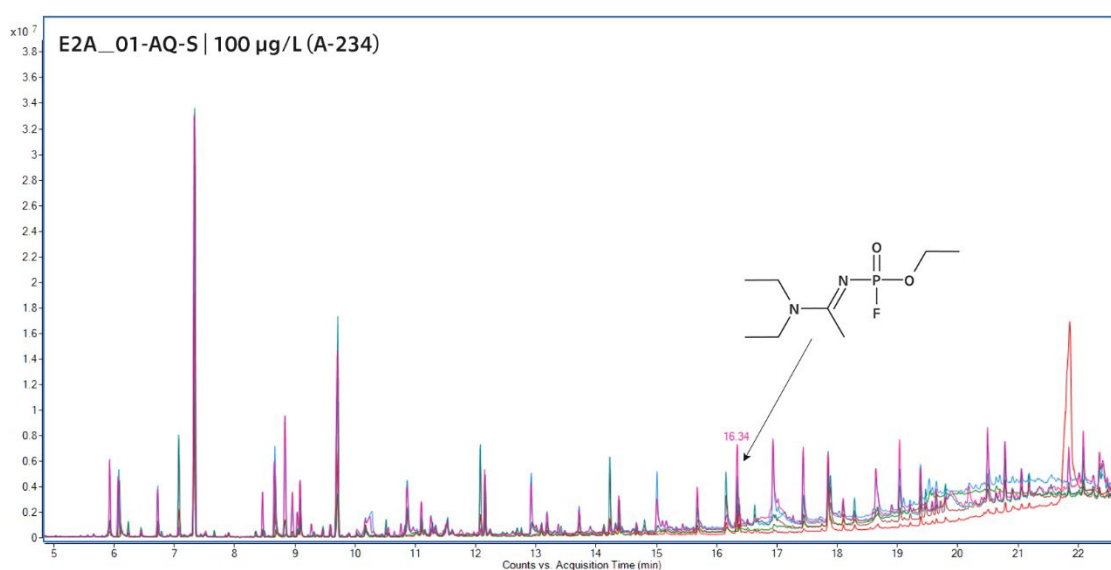
Zdroj: vlastní výzkum

Výsledná interpretace analytických signálů identifikovala látku A-234 v porovnání s knihovnou OCADv23 ve shodě 96.97 % (1 ng/μL), 93.26 % (0.5 ng/μL), respektive 90.43 % (0.1 ng/μL). Jednoznačná identifikace analytu byla provedena měřením analytického standardu látky A-234.

5.2 Výsledky experimentálního studia HCSE

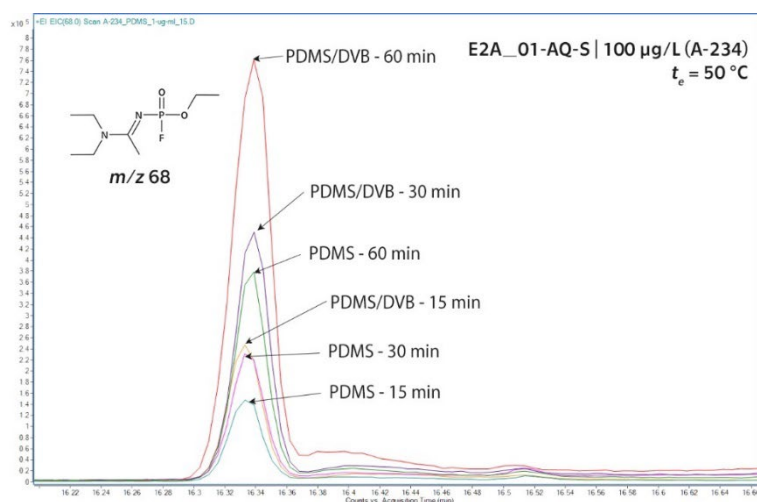
Dílčí experiment 2A se zaměřoval na vodné vzorky a jejich vzorkování metodou přímého ponoření HiSorb sondy do vzorku (DI-HCSE). Studována byla intenzita (výška) píku sledovaného analytu v závislosti na změně extrakčních podmínek (doby extrakce) s využitím sond se sorbenty PDMS a PDMS/DVB.

Chromatografická spektra z analýz vzorku **E2A_01-AQ-S (A-234)** jsou zobrazena na Obrázku 44. Obrázek 45 znázorňuje srovnání intenzity píků v závislosti na době extrakce a použitém sorbentu. Pro přehlednost je využit nejintenzivnější pík m/z 68.



Obrázek 44 – GC spektra z analýz vzorku E2A_01-AQ-S (A-234)

Zdroj: vlastní výzkum



Obrázek 45 – Ukázka srovnání intenzity píků v závislosti na podmínkách (A-234)

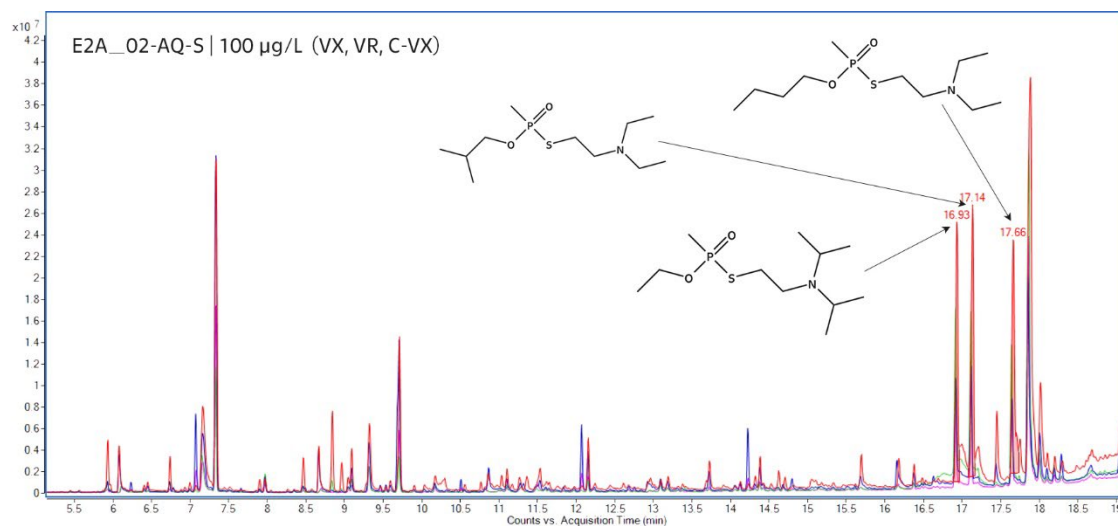
Zdroj: vlastní výzkum

Z pohledu identifikace jsou v tabulce 13 shrnuty především shody hmotového spektra s knihovnou v závislosti na době extrakce a použitého sorbentu.

Tabulka 13 – Úspěšnost identifikace při použití techniky DI-SBSE („A“)

E2A_01-AQ-S (A-234)	RT	Algoritmus	Skóre (Lib)	Lib/DB
15 min. extrakce DI-HCSE (50 °C)				
PDMS	16.34	Dekonvoluce	94.47	OCADv23
PDMS/DVB	16.34	Dekonvoluce	92.29	OCADv23
30 min. extrakce DI-HCSE (50 °C)				
PDMS	16.34	Dekonvoluce	93.3	OCADv23
PDMS/DVB	16.34	Dekonvoluce	93.6	OCADv23
60 min. extrakce DI-HCSE (50 °C)				
PDMS	16.34	Dekonvoluce	93.53	OCADv23
PDMS/DVB	16.34	Dekonvoluce	93.50	OCADv23

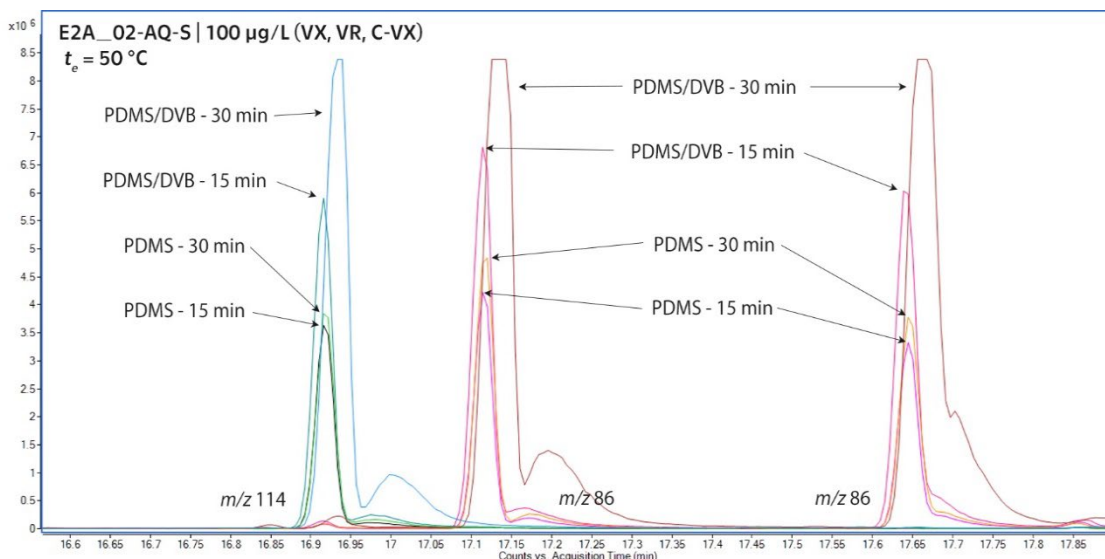
Obdobným způsobem byly vyhodnoceny výstupy z měření obou dalších vzorků **E2A_02-AQ-S** (VX, VR, C-VX) a **E2A_03-AQ-S** (M-thion, P-oxon-m). Chromatografická spektra z analýz pro významné látky série V jsou zobrazena na Obrázku 46.



Obrázek 46 – GC spektra z analýz vzorku E2A_02-AQ-S (VX, VR, C-VX)

Zdroj: vlastní výzkum

Obrázek 47 znázorňuje srovnání intenzity píků v závislosti na době extrakce a použitém sorbentu. Pro přehlednost je využito nejintenzivnější pík m/z 114 pro látku VX a m/z 86 pro VR a C-VX. Kvalitativní analýza je součástí Tabulky 14.



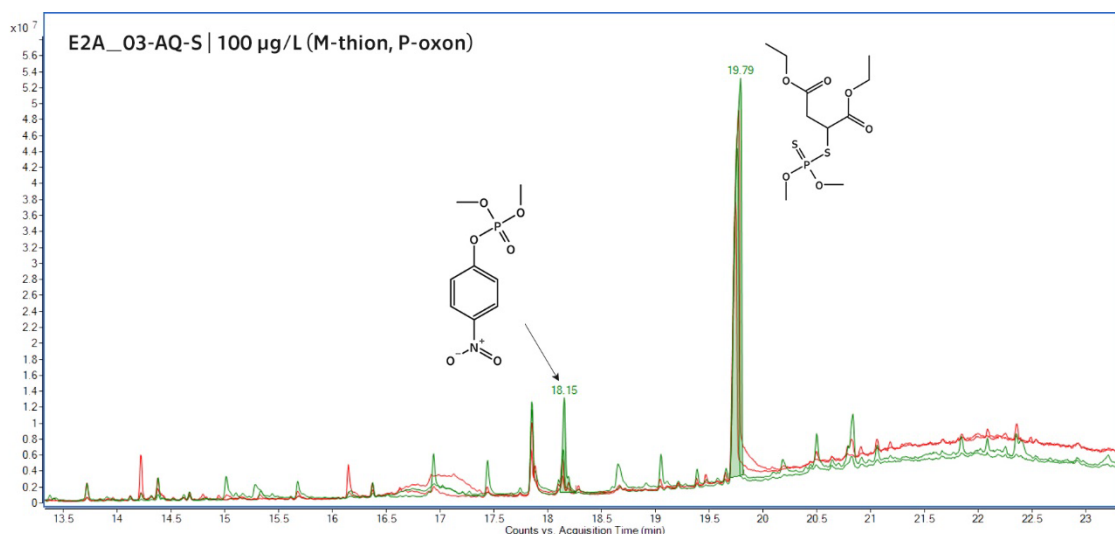
Obrázek 47 – Ukázka srovnání intenzity píků v závislosti na podmínkách ("V")
Zdroj: Vlastní výzkum

Tabulka 14 – Úspěšnost identifikace při použití techniky DI-SBSE („V“)

E2A_02-AQ-S (V-Series)	RT	Algoritmus	Skóre (Lib)	Lib/DB
15 min. extrakce DI-HCSE (50 °C)				
Ethyl S-2-diisopropylaminoethyl methylphosphonothiolate (VX)				
PDMS	16.92	Dekonvoluce	92.15	OCADv23
PDMS/DVB	16.92	Dekonvoluce	92.08	OCADv23
Isobutyl S-2-diethylaminoethyl methylphosphonothiolate (VR)				
PDMS	17.12	Dekonvoluce	93.03	OCADv23
PDMS/DVB	17.11	Dekonvoluce	92.96	OCADv23
Butyl S-2-diethylaminoethyl methylphosphonothiolate (C-VX)				
PDMS	17.64	Dekonvoluce	90.33	OCADv23
PDMS/DVB	17.65	Dekonvoluce	90.38	OCADv23
30 min. extrakce DI-HCSE (50 °C)				
Ethyl S-2-diisopropylaminoethyl methylphosphonothiolate (VX)				
PDMS	16.92	Dekonvoluce	92.14	OCADv23
PDMS/DVB	16.93	Dekonvoluce	93.90	OCADv23
Isobutyl S-2-diethylaminoethyl methylphosphonothiolate (VR)				
PDMS	17.12	Dekonvoluce	92.97	OCADv23
PDMS/DVB	17.14	Dekonvoluce	93.59	OCADv23
Butyl S-2-diethylaminoethyl methylphosphonothiolate (C-VX)				
PDMS	17.65	Dekonvoluce	92.14	OCADv23
PDMS/DVB	17.66	Dekonvoluce	93.97	OCADv23

Jak z výše představené tabulky vyplývá, oproti původnímu plánu nebyla měřena hodinová extrakce. Od tohoto bylo v případě NPL série „V“ upuštěno, neboť již při 30 minutové době extrakce poskytovaly velice silný analytický signál.

Chromatografická spektra z analýz vybraných zástupců organofosforových pesticidů jsou na Obrázku 48. Také u nich nebyla měřena hodinová extrakce, neboť z dalších experimentálních dat nevyplývalo, že by další prodloužení času bylo přínosné. Stejně tak nebude uvedeno srovnání intenzity jednotlivých píků, neboť u nich rovněž nedocházelo k signifikantním nárůstům. Kvalitativní analýza je součástí Tabulky 15.



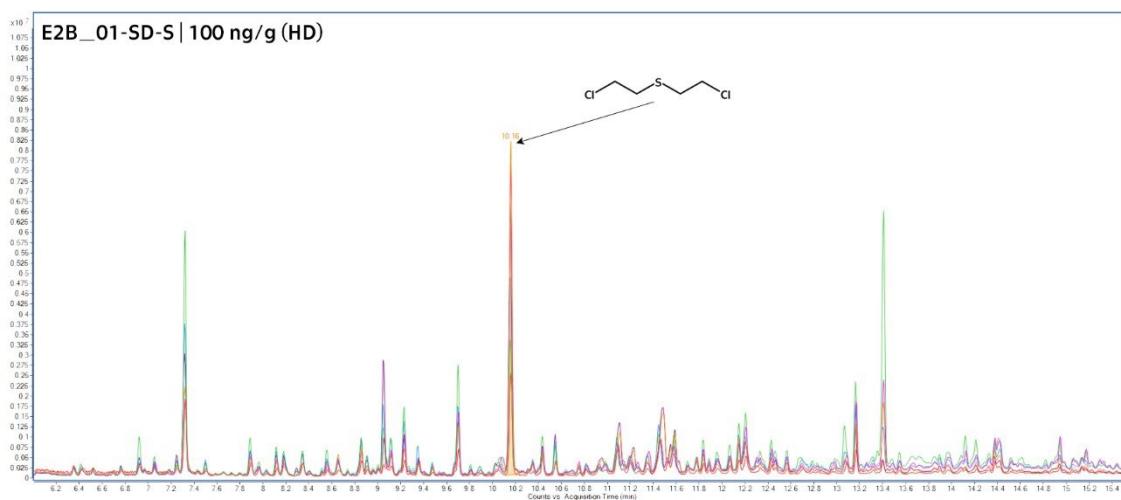
Obrázek 48 – GC spektra z analýz vzorku E2A_03-AQ-S (OPPs)
Zdroj: Vlastní výzkum

Tabulka 15 – Úspěšnost identifikace při použití techniky DI-SBSE (OPPs)

E2A_03-AQ-S (OPPs)	RT	Algoritmus	Skóre (Lib)	Lib/DB
15 min. extrakce DI-HCSE (50 °C)				
Malathion				
PDMS	19.74	Dekonvoluce	90.49	OCADv23
PDMS/DVB	19.76	Dekonvoluce	91.29	OCADv23
Paraoxon methyl				
PDMS	18.14	Dekonvoluce	88.72	OCADv23
PDMS/DVB	18.14	Dekonvoluce	88.55	OCADv23
30 min. extrakce DI-HCSE (50 °C)				
Malathion				
PDMS	19.77	Dekonvoluce	90.86	OCADv23
PDMS/DVB	19.79	Dekonvoluce	89.48	OCADv23
Paraoxon methyl				
PDMS	18.13	Dekonvoluce	89.12	OCADv23
PDMS/DVB	18.15	Dekonvoluce	88.7	OCADv23

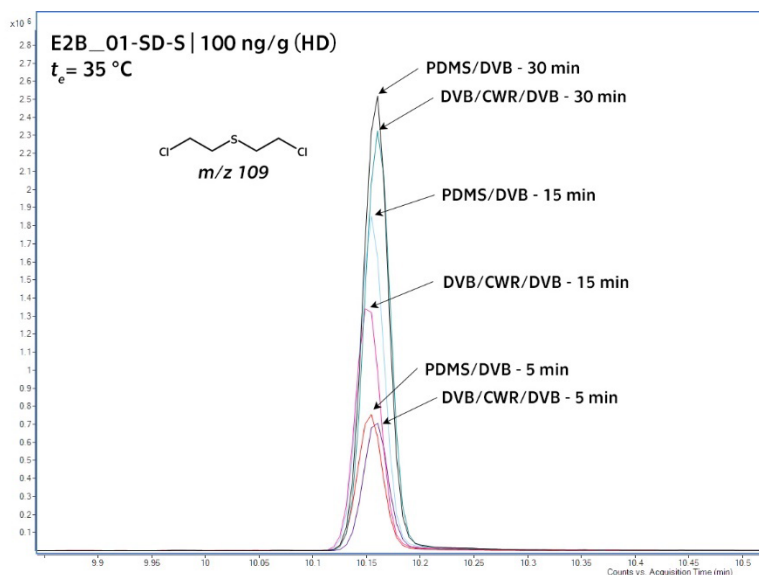
Dílčí experiment 2B se zaměřoval na pevné vzorky (písek) a vzorkování analytu metodou headspace (HS-HCSE). Stejně jako v předchozí části byla studována intenzita píku sledovaného analytu v závislosti na změně extrakčních podmínek s využitím HiSorb sond se sorbenty PDMS/DVB a DVB/CWR/PDMS.

Chromatografická spektra z analýzy vzorku **E2A_01-AQ-S (A-234)** jsou zobrazena na Obrázku 49. Obrázek 50 znázorňuje srovnání intenzity píků v závislosti na době extrakce a použitém sorbentu. Pro přehlednost je využit pík m/z 109.



Obrázek 49 – GC spektra z analýz vzorku E2A_01-SD-S (HD)

Zdroj: vlastní výzkum



Obrázek 50 – Ukázka srovnání intenzity píků v závislosti na podmínkách (HD)

Zdroj: vlastní výzkum

Z pohledu identifikace jsou v tabulce 16 shrnuty především shody hmotového spektra s knihovnou v závislosti na době extrakce a použitého sorbentu.

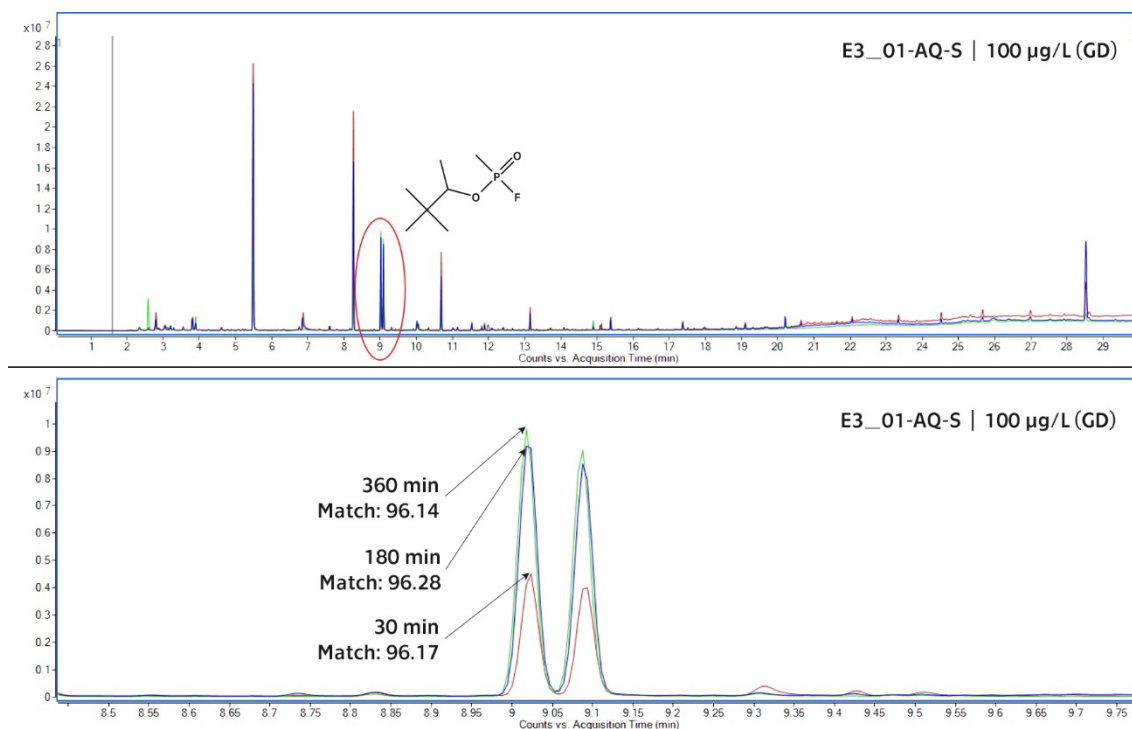
Tabulka 16 – Úspěšnost identifikace při použití techniky HS-SBSE (HD)

E2B_01-SD-S (HD)	RT	Algoritmus	Skóre (Lib)	Lib/DB
5 min. extrakce HS-HCSE (35 °C)				
PDMS/DVB	10.16	Integrace	96.12	OCADv23
DVB/CWR/PDMS	10.16	Integrace	96.22	OCADv23
15 min. extrakce HS-HCSE (35 °C)				
PDMS/DVB	10.15	Integrace	94.88	OCADv23
DVB/CWR/PDMS	10.15	Integrace	94.99	OCADv23
30 min. extrakce HS-HCSE (35 °C)				
PDMS/DVB	10.16	Integrace	93.85	OCADv23
DVB/CWR/PDMS	10.15	Integrace	86.70	OCADv23

5.3 Výsledky experimentálního studia SBSE

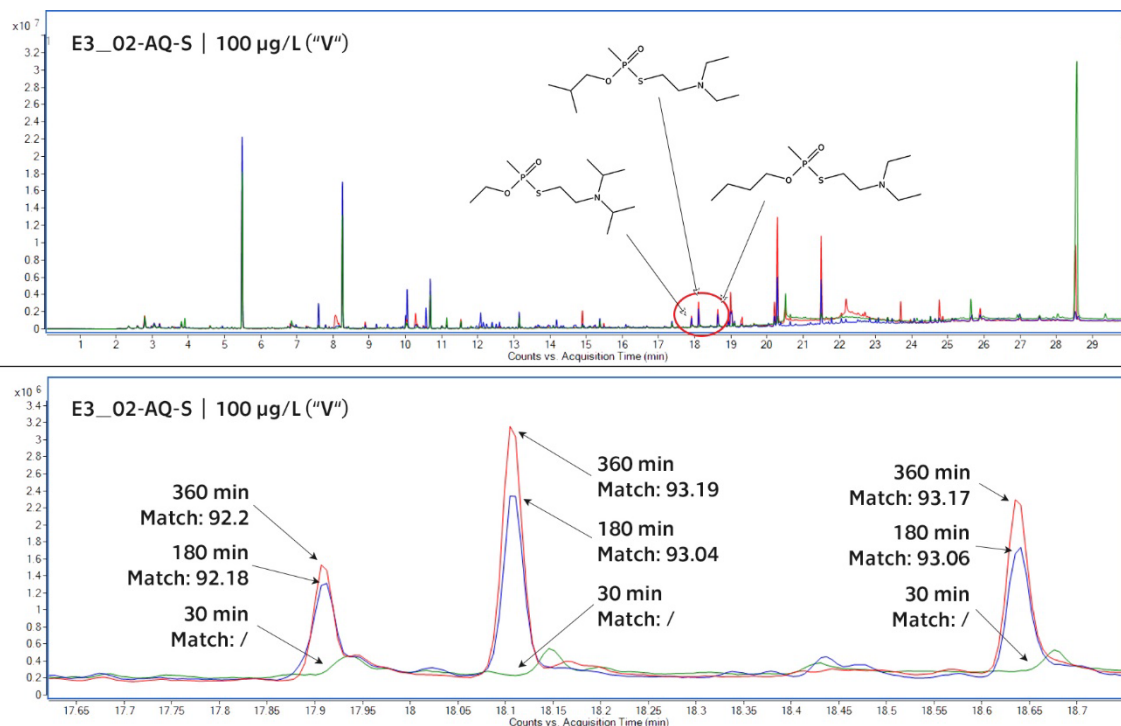
V souladu s pracovním postupem byly připraveny jednotlivé vzorky obsahující vybrané toxické chemické látky. Seznamu 1. Po uplynutí stanovené doby byly SBSE míchadla Twister® vyjmuty z vodného vzorky a hned použity k analýze pomocí termální desorpce následovanou GC/MS analýzou.

Vyhodnocení probíhalo velmi jednoduše a bylo založeno pouze na sledování aspektu přítomnosti anebo nepřítomnosti některého ze stanovených analytů, případně jiných souvisejících látek. Výsledky pokusu jsou znázorněny na Obrázku 51–53 pro jednotlivé látky. Horní chromatografické spektrum je přehledové, spodní zaměřené na porovnání výšky píku (nárůstu analytu) v jednotlivých časech.

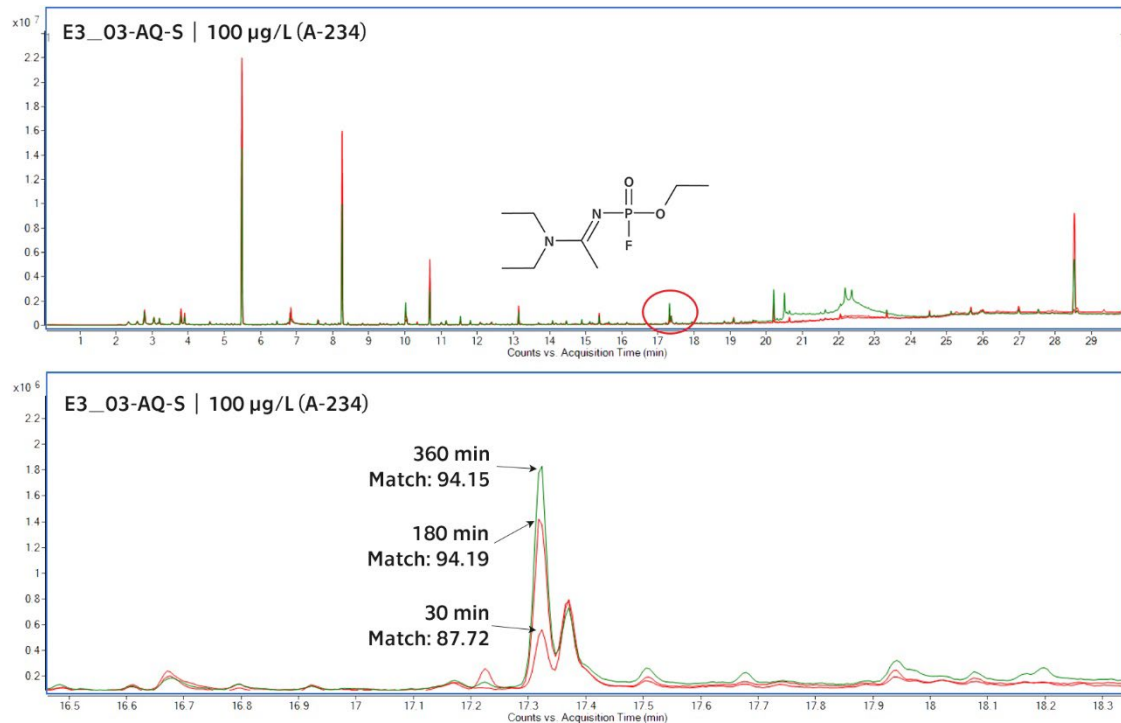


Obrázek 51 – GC spektra z analýz při testování SBSE (GD)

Zdroj: Vlastní výzkum



Obrázek 52 – GC spektra z analýz při testování SBSE („V“)
Zdroj: Vlastní výzkum



Obrázek 53 – GC spektra z analýz při testování SBSE (A-234)
Zdroj: Vlastní výzkum

6 DISKUZE

6.1 Shrnutí experimentálního studia LLE/SLE

Experimentální studium použitelnosti techniky podporované kapalinové extrakce (SLE) v komparaci s klasickou technikou LLE mělo dva základní aspekty. Vedle samotných experimentů s využitím technik bylo souběžně ověřováno použití nově pořízeného odstředivého vakuového koncentrátoru Genevac EZ-2, a to zejména díky výběru a zpracovávání vodných vzorků technikou LLE, na které aplikačně cílí právě zmiňovaný vakuový koncentrátor.

Pro účely sušení vodných vzorků nebo všeobecně polárních rozpouštědel, popřípadě zkoncentrování většího množství nepolárních rozpouštědel, byla na analytickém pracovišti LTL používána standardní rotační vakuová odparka (RVO). Tento typ zařízení je vhodný zejména pro větší objemy vzorků, které jsou ovšem na pracovišti zpracovávány spíše sporadicky. Zavedené analytické metody počítají spíše s malými objemy vzorku, které nejsou moc vhodné pro zpracovávání na rotačních vakuových odparkách. Nevýhodou je zpravidla omezený počet zpracovávaných vzorků, nutnost neustálého dohledu nad provozem zařízení z důvodu kontroly možného vzniku neřízeného varu vzorku, který může mít negativní vliv na kvalitu samotné analýzy a také extrémně dlouhá doba přípravy samotných vzorků, která se odráží v celkově dlouhé době případné analýzy. Dalším negativním jevem je vysoká pravděpodobnost vzniku křížové kontaminace, která je z pohledu zpracovávaných analytů toxických chemických látek sledovaných zákonem vysoce nežádoucí.

Ze zkušeností v průběhu experimentů lze konstatovat, že použití vakuového koncentrátoru oproti klasické ROV je jednoznačně efektivnější, neboť v relativně krátké době mohou být dokonale vysušeny až desítky. Pro příklad lze uvést, že vysušení 24 vodných vzorků pro účely následné derivatizace, která vyžaduje právě dokonalé vysušení od vody, se standardně zpracovávaným objemem 5 mL vzorku nepřekračovalo dvě a půl až tři hodiny. Obdobný počet vzorků by byl pomocí RVO zpracováván v rádech dnů a k tomu by bylo nutné vyčlenit laboratorního pracovníka na obsluhu a samotný dohled.

Během experimentální práce nebyla pozorována žádná tepelná degradace vzorků. To je zabezpečeno díky odpařování rozpouštědel za velmi nízké teploty. V principu je toho dosaženo cestou snížení tlaku a tím i snížení bodu varu vložených vzorků.

Při odpařování vodných vzorků bylo jejich okolí zpravidla osazeno vzorky typu blank. Ty byly následně zpracovávány stejným způsobem, jako vzorky pro analýzu. Ani jeden ze vzorků pro kontrolu kvality nevykazoval křížovou kontaminaci.

Použití vakuového koncentrátoru bylo kladně hodnoceno i z pohledu bezpečnosti. Konstrukčně je koncentrátor řešen tak, že poskytuje vysokou ochranu i pro případ prasknutí vzorkovnice se vzorkem. Záchyt výparů byl vyřešen použitím adaptéru pro připojení kombinovaných NBC filtrů.

Z výše popsaného může být hypotéza **H1**: „*Využitelnost a efektivita použití vakuového koncentrátoru Genevac EZ-2 je srovnatelná s rotační vakuovou odparkou*“ **zamítnuta**.

Využitelnost (z pohledu analytického pracoviště LTL) a zejména efektivita koncentrátoru je mnohonásobně vyšší ve srovnání s klasickou RVO, a to hlavně díky preciznější kvalitě dosažených výsledků sušení, počtu možných zpracovávaných vzorků, eliminaci vzniku křížové kontaminace, téměř nulové nutnosti pozornosti ze strany operátora, a hlavně kratší době nutné pro zpracovávání vzorků.

Diskuze dílčích experimentů

Experimentálnímu studiu předcházela celá řada úvodních testování, které měly za cíl objasnit chování sorbentu. Byly provedeny testy prostupnosti sorbentem v závislosti na použitém rozpouštědle a jeho návratnost. Pro vybraný dichlormenthan návratnost činila 60–75 %. Vedle dichlormethanu bylo rovněž zkoumáno použití hexanu, chloroformu a jejich kombinace. Jako nejefektivnější se v úvodních testech jevil právě DCM.

V aplikačních listech dodavatelů produktů využívajících SLE bylo často zmiňováno použití nepolárního rozpouštědla společně s několikaprocentním množstvím polárního rozpouštědla. Nejčastěji bylo odkazováno na isopropylalkohol, proto byl využit i během experimentální práce.

V průběhu experimentů nebyl sledován signifikantní rozdíl mezi přídavkem pěti nebo deseti procent isopropylalkoholu. Významnější rozdíly byly patrné pouze při použití jen samotného nepolárního rozpouštědla v komparaci se směsí nepolární s přídavkem polárního, a to zejména, podle předpokladu, u extrakcí polárnějších látek.

Přidání polárního rozpouštědla se projevilo hlavně během derivatizačního procesu, kdy bylo možné při následné analýze detekovat alespoň některé derivatizační produkty. Ačkoliv se ve vzorcích nacházely v nízkých koncentracích, byly většinou dobře a jednoznačně identifikovatelné. Ve velmi nízkých koncentracích byla extrakce a následná derivatizace polárních látek problematická u obou používaných technik, snad jen s výjimkou TMS derivátu thiodiglykolu.

Celkově byl koncept (alespoň částečný) extrakce polárních analytů sledován především z důvodu možného rychlého provedení alespoň předběžné analýzy do doby, než bude vodných vzorek řádně připraven standardní cestou. Tento koncept není v zásadě chybný, nicméně je nutné předpokládat, že velká část sledovaných polárních analytů nebude touto cestou detekovatelná.

Vše vychází ze skutečnosti, že příprava vodného vzorku technikou SLE je velmi rychlá a zejména instrumentálně nenáročná. Při navrhovaném použití je doba přípravy jednoho vzorku do 15 minut. Už po této době může být provedena prvotní GC/MS analýza. Ve chvíli jejího doběhu (přibližně do 30 minut podle teplotního programu GC) už může být připraven k analýze derivatizovaný vzorek, případně je přichystaný koncentrovaný rekonstituovaný extrakt. Tohoto bylo možné si povšimnout v průběhu experimentální práce, kdy ve chvíli přechodu sušení vodného vzorku ve vakuovém koncentrátoru do finální fáze, která zpravidla trvá dalších 40 minut, byl vzorek z metody SLE již analyzován v podobě alikvotu přímého extraktu, zakoncentrovaného extraktu i derivatizovaného extraktu. To je velmi přínosné ve chvíli, kdy alespoň předběžná znalost hledaných analytů by mohla mít vliv na výběr vhodného derivatizačního činidla nebo celkově derivatizačního procesu. Ačkoliv je nejvíce a nejčastěji používán BSTFA, s každým vzorkem se připravuje (pokud je to možné) jeho duplikát. Ten by proto mohl být použit na cílenější derivatizaci.

Z výsledků **dílčího experimentu 1A** je patrné, že při relativně vysoké koncentraci analytů (z analytického) bylo možné extrahovat alespoň detekovatelné množství polárnějších látek, pravděpodobně díky přísadku. S klesající koncentrací se ale tato schopnost už ztrácí. Podle předpokladu *2-(Diisopropylamino)ethanol* nebo *Bis(2-hydroxyethyl) sulfid* nebyly v průběhu extrakce zachyceny vůbec, ačkoliv u TDG je časté, že se při vyšších koncentracích v analýzách nepolárních látek objevuje i bez derivatizace. V úvodních experimentech, které nejsou součástí této práce, byl testován i 2-(Diisopropylamino) ethanethiol, který byl ve velmi malé koncentraci detekován.

V případě nepolárních látek bylo spíše jen potvrzeno očekávání, že extrakce budou probíhat dobře. To je pozorovatelné na Obrázku 35, kdy od koncentrace 50 mg/L se naopak zvyšuje efektivita (ve smyslu většího analytického signálu při teoreticky stejných koncentracích extraktu) při použití techniky SLE, která je i prezentována pro své větší výtěžky nepolárních analytů ve srovnání s klasickou technikou kapalina-kapalina.

Tento trend zvyšující se efektivitu při snižování koncentrace nepolárních látek by pozorován u látek, které bývají často označovány jako perzistentní. Jako příklad lze uvést Paraoxon methyl z prvního dílčího experimentu a u látek z druhého dílčího experimentu.

V rámci druhé dílčího experimentu, při práci se vzorky s látkou VX, došlo k tomu, že ze vzorků připravovaných technikou LLE nebyl ani u nejvyšší koncentrace 50 ng/ μ L identifikován kontaminant. Důvod, proč se tomu tak stalo není zřejmý. Přítomnost látky VX v zásobním i ředícím vzorku byla potvrzena paralelně probíhající přípravou pomocí techniky SLE. Látka VX je zpravidla dobře extrahovatelná.

Zajímavé zjištění přinesla příprava vodního vzorku obsahujícího sarin, který byl zpracováván během jedné ze sérií experimentálního studia. Vzhledem k jeho vlastnostem, a zejména pak poločas hydrolyzy ve vodě, nebylo důvod o něm původně uvažovat. Byl vyzkoušen pouze pro zajímavost a dokreslení celkového obrazu případného chování všech hlavních skupin NPL.

Vzhledem k tomu, že se objevuje i v práci Kanaujia et al. (2008), kde byl úspěšně na techniku SLE testován s relativně dobrou výtěžností, nic nenasvědčovalo tomu, že by sarin nebyl pro tuto techniku vhodný. Pozornost se tedy byla věnována mezikrokům, u kterých by teoreticky mohlo dojít ke ztrátě analytu. Pro tyto pokusy byl využit sarin v koncentraci 100 ng/μL. Po opakovaných pokusech bylo zjištěno, že ke ztrátě analytu nejpravděpodobněji dochází v průběhu úvodního prostupu vodného vzorku sorbentem. Díky jeho vysoké těkavosti se to jeví jako nejpravděpodobnější příčina. Původní protokol přípravy vzorků počítal s časem 10 minut na řádný průstup vodného vzorku do sorbentu. Tato doba byla následně zkrácena na pět minut. Následným pokusem již byl sarin detekován i jednoznačně identifikován, jak dokládá Obrázek 40.

Na základě experimentální práce může být k hypotéze **H2**: „*Příprava vodných vzorků technikou podporované kapalinové extrakce (SLE) je vhodná náhrada klasické techniky extrakce kapalina-kapalina (LLE).*“ konstatováno **zamítnutí**.

Ačkoliv se technika SLE jeví jako velmi efektivní pro extrakci a separaci většiny testovaných nepolárních látek za neutrálních nebo lehce alkalických podmínek, její efektivita u polárních a některých nepolárních látek je velmi nízká až nulová.

Spíše než náhradu ji lze chápat jako vhodné doplnění možností portfolia extrakčních a separačních technik analytického pracoviště. Technika SLE je velmi jednoduchá, nenáročná na provedení a poskytuje reprodukovatelné výsledky. Lze ji zvládnout i bez zkušeností s např. technikou SPE. Jak již bylo zmíněno, je možné extrakt připravit relativně rychle, a to i v omezených podmínkách, například v případě mobilní laboratoře. Velice efektivně se jeví pro rychlé orientační stanovení organofosforových sloučenin, jako jsou nervově paralytické látky nebo organofosforové pesticidy. V současné době probíhá navazující experimentální výzkum zaměřený na bližší zkoumání výtěžností u několika skupin cílových analytů. Předpokládá se rovněž o možnostech využít extrakt nikoliv pro následnou derivatizaci silylačním činidlem, ale pro využití termálně podporované methyloxylation pomocí TMS-derivatizace, která by přípravu ještě více urychlila, neboť samotná derivatizace probíhá až uvnitř nástřikového injektoru plynového chromatografu.

6.2 Shrnutí experimentálního studia HCSE

V předkládané diplomové práci byla v souvislosti s testováním vysokokapacitní sorpční extrakce (HCSE) představena jen malá část vykonávaných aktivit. Vzhledem k tomu, že technika se používá ve spojení s modulární platformou CENTRI, která stále ještě není plně optimalizovaná, nebylo například možné použít SPME vlákna na určitou komparaci výsledků podávaných pomocí HiSorb sond. Oba dílčí experimenty nicméně přinesly velice užitečné poznatky o chování velkého množství sorbentu nebo jejich kombinaci, na které bude ve druhé polovině tohoto roku navázáno na pokračující experimentální vývoj některých aplikací.

Celkově lze říci, že technika podávala dobré analytické výsledky jak při vzorkování metodou „Direct immersion“, tak metodou „Headspace“. Tyto experimenty budou sloužit jako určitý „odrazový můstek“ pro další práci.

Z obou testovaných sond během **dílčího experimentu 2A** dosahoval průběžně největší efektivity sorbent PDMS/DVB, který je stále považován jako určitý zlatý standard pro techniku SPME v souvislosti s přípravou vzorků obsahující toxické chemické látky. Oproti klasické SPME technice, která je vybavena vláknem, poskytují sondy HiSorb daleko větší robustnost a zároveň citlivost. Za dobu konání experimentální práce nebylo pozorováno jediné poškození žádné z HiSorb sond, což není úplně běžná praxe při práci se SPME vlákny. Nicméně dnes už existuje alternativa v podobě SPME Arrows.

Z výsledků vyplývá, že jak u látky A-234, látek série V (VX, VR, C-VX), případně vybraných organofosforových pesticidů (OOPs) došlo při definované koncentraci k velmi účinné extrakci z vodného vzorku za 15 minut. Při analýzách byla jejich přítomnost vždy jednoznačně potvrzena. Úspěšnost sorbentu PDMS/DVB byla oproti PDMS v rozmezí 48–59 %. To dokládá vysokou efektivitu PDMS/DVB při srovnatelných podmínkách.

Obrázky 46 a 47 dokládají vzrůstající trend extrakční schopnosti v závislosti na delším čase extrakce. Následné studium bude tedy zaměřeno k optimalizaci podmínek spíše směrem k nižším koncentracím.

V průběhu práce byly provedeny úvodní experimenty s koncentracemi 10 a 5 µg/L, které ovšem byly detekovány pouze v režimu SIM. Velice efektivně se jeví možnost fokusace analytu na elektricky chlazeném fokusačním trapu k jejich zakoncentrování, která byla již několik velmi úspěšně testována.

Testování vzorkovací metody Headspace u techniky HCSE, jako součást **dílčího experimentu 2B**, se omezila pouze na pevnou matici v podobě písčitého materiálu s různou zrnitostí. K rychlé a efektivní sorpci sulfidického yperitu v koncentraci 100 ng/g zaneseném do matrice docházelo již za 5 minut při teplotě 35 °C v případě obou sorbentů. V souvislosti s extrakčními vlastnostmi použitých sorbentů se při čase 5 a 15 minut intenzity příliš nelišily, jejich účinnost se pohybovala v rozmezí 18–27 % ve prospěch PDMS/DVB. K určitému většímu rozdílu došlo pouze v čase 15 minut, kdy sorbent PDMS/DVB dosáhl o 42 % ± 2,8 % vyšší účinnosti.

Experimenty se ve svých počátcích nezaměřovaly pouze na HD, ale rovněž na VX ve vzorcích stěrů. Zde ovšem nedocházelo k efektivním extrakcím, které jsou ovlivněny zejména vlastnostmi látky VX, která se neochotně opařuje a její záchyt je v určitém směru problematický. Těmto typům vzorků a látkám série V je nicméně dále věnována pozornost v rámci následných experimentů. Práce tímto nasměrovala další případný směr následného experimentálního studia.

Během výše zmíněných pokusů byla provedena optimalizace techniky z pohledu doporučené délky extrakce, teploty nebo délky desorpce sondy v injektoru jako součást doporučených postupů pro provedení základní analýzy.

Použití techniky vysokokapacitní sorpční extrakce jako inovované alternativy ke klasické mikroextrakci na tuhou fázi se jeví jako velice efektivní a přínosné. Během práce bylo ověřeno, že technika může sloužit pro přípravu vzorků obsahující chemické látky související s CWC, proto může být hypotéza **H3**: „*Předpokládáme, že příprava vzorků s využitím techniky vysokokapacitní sorpční extrakce (HCSE) je uplatnitelná v podmínkách analytické laboratoře LTL SUÚJCHBO, v.v.i.*“ **přijata**.

6.3 Výsledky experimentálního studia SBSE

S myšlenkou použít míchadlo pro sorpční extrakci k přípravě vzorků už během jejich cesty do laboratoře přišel už před mnoha lety sám výrobce míchadla Twister, tedy firma Gerstel. Tato možnost ovšem nikdy nebyla testována v podmínkách Laboratoře toxických látek, která disponuje výjezdovou expertní skupinou umožňující vysoce kvalifikovaný odběr vzorků toxických chemických látek. Toto uvažované použití se stalo námětem třetího samostatného experimentálního studia.

S ohledem na výsledky lze konstatovat, že soman a látka A-234 byla jednoznačně identifikovatelná při koncentraci 100 µg/L za 30 minut od přidání míchadla do vzorku. Tato doba měla simulovat situaci na místě zásahu, kdy po odběru vzorků dochází po určité době k dekontaminaci a přesunu zpět do mobilní laboratoře. Delší časové intervaly pak simulovali cestu do stacionární laboratoře.

Jak je patrné z Obrázku 51, extrakční kapacita pro soman byla po 180 i 360 minutách téměř shodná. Z času 30 na 180 minut došlo o zvýšení extrakce o 55,7 % ± 1,8 %. Po dalších 180 minutách pouze o 3 % ± 0,3 %.

Ve vztahu k látkám série V (Obrázek 52), identifikace v režimu „Full scan“ nevedla k uspokojivým analytickým výsledkům v případě zkoumání neznámého vzorku. Pro účely vyhodnocení účinnosti extrakce byly látky detekovány v režimu SIM (m/z 114 pro VX; 86 pro VR a C-VX). Zisk analytů po čase 180 minut se oproti 30 minutám pohyboval pro všechny látky v rozmezí 83-85 %. Po čase 360 minut se účinnost zvýšila o dalších 18–22 %.

V případě látky A-234 (Obrázek 53) byl po čase 180 minut oproti 30 minutám pozorován nárůst o 66 % ± 1,4 %, po dalších 180 minutách o dalších 21 % ± 0,7 %.

Použití míchadel pro sorpční extrakci by mohlo mít dva aspekty. Prvním je možnost téměř okamžitě zahájit analýzu po převozu vzorku do laboratoře. To může dát analytikům relativně rychle předběžnou vstupní informaci o povaze případné kontaminace. Druhý aspekt by mohl být využitelný u toxických chemických látek, které snadno a rychle podléhají hydrolýze. Tímto přístupem by mohlo být teoreticky zajištěno, aby ve vzorku zůstala alespoň část původního analytu.

Ve vzorcích s látkami série V z 360. minuty se již nacházely dobře detekovatelné známky degradace v podobě přítomnosti charakteristických degradačních produktů všech tří použitých látek typu V.

Na základě provedeného experimentu využívající reálné vzorky s přítomností toxických chemických látek seznamu 1, vyslovená hypotéza **H4**: „*Předpokládejme, že příprava vzorků s využitím techniky SBSE je uplatnitelná v polních i stacionárních podmínkách analytické laboratoře LTL SUÚJCHBO, v.v.i.*“ může být **přijata**.

Použití míchadel pro sorpční extrakci může být využito během případného odběru vzorků vod, kdy dojde k přípravě vzorků v průběhu cesty do laboratoře. Tento přístup nám může v některých případech v závislosti na chemické látce poskytnout informaci už za přibližně půl hodiny od přijetí vzorku do laboratoře.

6.4 Výstupy práce

Poznatky a zkušenosti z provedené experimentální práce budou sloužit primárně k rozšíření technik přípravy vzorků prováděných na analytickém pracovišti Laboratoře toxických látek SÚJCHBO, v.v.i., a to zejména v následujících oblastech.

- 1) Technika podporované kapalně extrakce byla zapracována do metodiky akreditované zkoušky pod označením: **CH/2021/05-GCMS-WI – Identifikace stanovených látek metodou GC-EI/MS v zájmových vzorcích**. Vybrané části, které byly zapracovány do výše zmíněné metodiky, jsou součástí **Přílohy A**.
- 2) Optimalizované pracovní postupy pro použití vysokokapacitní sorpční extrakce využívající HiSorb sondy v kombinaci s modulární platformou CENTRI byly zapracovány do metodiky akreditované zkoušky **CH/2021/06-GCMS-EXT – Identifikace stanovených látek metodou GC-EI/MS s využitím mikroextrakčních technik**. Postupy obsahují parametry, které se vztahují k průběhu samotné extrakce ze vzorku, průběhu desorpce HiSorb sondy na fokusační trap a v neposlední řadě průběhu desorpce cold trapu do GC/MS instrumentace. Parametry zohledňují jak použití metody headspace, tak techniky pro přímé ponoření do vzorku. Vybrané části, které byly zapracovány do výše zmíněné metodiky, jsou součástí **Přílohy B**.
- 3) Možnost přidat kondiciované míchadlo Gerstel Twister® do vodného vzorku v průběhu odběru zájmových vzorků, u kterého byla předem provedena kontrola pozadí GC/MS analýzou a jeho následné plynotěsné uzavření do vhodném obalu, který je otevřen až v průběhu vzorkování. Tento přístup byl zapracován do metodiky akreditované zkoušky: **CH/2014/02-SAMP-2 – Metoda odběru kapalných vzorků pro následnou instrumentální analýzu**.
- 4) Na základě nově získaných poznatků vznikla také nová analytická strategie pro vyšetřování neznámých vodných vzorků. Algoritmus této strategie je součástí **Přílohy C**.

7 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo, na základě experimentálního studia, zhodnotit efektivitu a využití nových nebo inovovaných extrakčních a separačních technik v návaznosti na novou instrumentaci Laboratoře toxických látek SÚJCHBO, v.v.i., které by mohly vhodně rozšířit zavedené pracovní postupy přípravy vzorků obsahující toxické chemické látky a jejich degradační produkty s následnou analytickou koncovkou pomocí GC/MS analýzy, včetně jejich případného začlenění do souboru akreditovaných metodik Centrální laboratoře SÚJCHBO, v.v.i.

Teoretická část práce se zabývala v problematikou chemických zbraní, vymezením a obecnou charakteristikou sledovaných analytů – toxických chemických látek a jejich degradačními produkty. Byly popsány základní techniky přípravy vzorků obsahující sledované analyty jak z pohledu klasických, tak moderních (pokročilých) technik, pro které je typická snaha o stále modernější přístupy.

V praktické části bylo provedeno experimentální studium tří vybraných technik – podporovaná kapalinová extrakce, vysokokapacitní sorpční extrakce a použití míchadla pro sorpční extrakci – na souboru modelových i reálných matric s využitím toxických chemických látek ze skupiny nervově paralytických a zpuchýřujících látek.

Všechny tři metody byly vyhodnoceny jako efektivní pro jejich zapracování do stávajícího portfolia extrakčních a separačních technik prováděných na analytickém pracovišti Laboratoře toxických látek SÚJCHBO, v.v.i.

Smyslem práce nebylo nahradit některou ze stávajících technik nebo metod, ale spíše více rozšířit možnosti analytiků a laboratorních pracovníků na poli přípravy vzorků, neboť tento krok rozhoduje o tom, zda chemická analýza povede k dobrému, nebo špatnému výsledku.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ACN	Acetonitril
AMDIS	Automatic Mass spectral Deconvolution and Identification System <i>Nástroj pro automatickou dekonvoluci hmotového spektra a identifikaci</i>
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
CWC	Chemical Weapons Convention <i>Úmluva o zákazu chemických zbraní</i>
DCM	Dichlormethan
DFVI	Direct Flash Vaporization Injection <i>Bleskově se vypařující přímý nástržik</i>
FGAs	Fourth Generation Agents <i>(Bojové chemické) látky čtvrté generace</i>
GC-EI/MS	Gas chromatography–Electron ionization/Mass spectrometry <i>Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií využívající elektronovou ionizaci</i>
GC/MS	Gas chromatography-Mass spectrometry <i>Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií</i>
HCSE	High-Capacity Sorptive Extraction <i>Vysokokapacitní sorpční extrakce</i>
HEX	Hexan
IPA	Isopropylalkohol
IZS	Integrovaný záchranný systém
LTL	Laboratoř toxických látek
LLE	Liquid-Liquid Extraction <i>Extrakce kapalina-kapalina</i>
MEPS	Micro Extraction by Packed Sorbent <i>Mikroextrakce na pevný sorbent</i>
NDP	Non-Scheduled Degradation Product <i>Nestanovený degradační produkt</i>
OCAD	OPCW Central Analytical Database <i>Centrální analytická databáze OPCW</i>

OPCW	Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons <i>Organizace pro zákaz chemických zbraní</i>
OPP	Organophosphorus pesticide <i>Organofosforové pesticidy</i>
ROP	Recommended Operating Procedure <i>Doporučený pracovní postup</i>
SBSE	Stir Bar Sorptive Extraction <i>Sorpční extrakci na míchadle</i>
SCP/SAP	Sample Concentration Platform / Sample Automation Platform <i>Platforma pro koncentraci a automatické vzorkování</i>
SIM	Selected ion monitoring <i>Monitorování zvolených iontů</i>
SLE	Supported Liquid Extraction <i>Podporovaná kapalinová extrakce</i>
SPE	Solid-Phase Extraction <i>Extrakce na tuhou fázi</i>
SPME	Solid-Phase Microextraction <i>Mikroextrakce na tuhou fázi</i>
SÚJB	Státní úřad pro jadernou bezpečnost
SÚJCHBO	Státní ústav jaderné, chemické a biologické ochrany
THF	Tetrahydrofuran
VERIFIN	Finnish Institute for Verification of the Chemical Weapons Convention <i>Finský institut pro verifikaci Úmluvy o chemických zbraních</i>

9 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

BOSÁK, Adam, Nikola MÁCHOVÁ a Martin URBAN, 2021. *CH/2021/05-GCMS-WI: Identifikace stanovených látek metodou GC-EI/MS v zájmových vzorcích*. V.01/21. Kamenná. Metodika akreditovaná ČIA podle ČSN EN ISO/IEC 17025:2018.

ALTHOFF, Marc André, Andreas BERTSCH a Manfred METZULAT, 2019. Automation of μ -SPE (Smart-SPE) and Liquid-Liquid Extraction Applied for the Analysis of Chemical Warfare Agents. *Separations*. **6**(4). ISSN 2297-8739. Dostupné z: doi:10.3390/separations6040049

BAJGAR, Jiří, 1993. Action of nerve agents to cholinesterases. *Sborník Vědeckých Prací Lékařské Fakulty Karlovy University v Hradci Králové*. **36**(1-2), 63-72.

BLACK, Robin M. a Bob MUIR, 2003. Derivatisation reactions in the chromatographic analysis of chemical warfare agents and their degradation products. *Journal of Chromatography A*. **1000**(2003), 254-281. ISSN 0021-9673. Dostupné z: doi:10.1016 /S0021-9673(03)00183-3

BLACK, Robin, 2016. Development, Historical Use and Properties of Chemical Warfare Agents. WOREK, Franz, John JENNER a Horst THIERMANN, ed. *Chemical Warfare Toxicology: Volume 1: Fundamental Aspects*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2016, s. 1-28. Issues in Toxicology. ISBN 978-1-84973-969-6.

BLACK, Robin, Christopher TIMPERLEY a Harri KILJUNEN, 2017. Chapter III. Chemicals. VANNINEN, Paula, ed. *Recommended Operating Procedures for Analysis in the Verification of Chemical Disarmament: The Blue Book, 2017 Edition*. Helsinki: University of Helsinki, s. 5-32. ISBN 978-951-51-3916-0.

CHEN, Yiming, Yuping JIA, Weiguo SONG a Lei ZHANG, 2018. Therapeutic Potential of Nitrogen Mustard Based Hybrid Molecules. *Frontiers in Pharmacology*. **9**. ISSN 1663-9812. Dostupné z: doi:10.3389/fphar.2018.01453

ČESKO, 1997. Zákon č. 19/1997 Sb., o některých opatřeních souvisejících se zákazem chemických zbraní, ve znění zákona č. 336/2020 Sb. In: *Sbírka zákonů České republiky*. 1997, částka 5, s. 107–114. ISSN 1211-1244.

DOD, 1990. *Department of Defense – Chemical Warfare and Chemical/Biological Defense Research Program Obligations: Annual report 1 Oct 89 - 30 Sept 1990*. Army Science Board. Washington DC. Dostupné z: <https://discover.dtic.mil/>

FRANCA, Tanos, Daniel KITAGAWA, Samir CAVALCANTE, Jorge DA SILVA, Eugenie NEPOVIMOVA a Kamil KUČA, 2019. Novichoks: The Dangerous Fourth Generation of Chemical Weapons. *International Journal of Molecular Sciences*. **20**(5). ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms20051222

FUSEK, Josef a Jiří BAJGAR, 1994. Treatment of intoxication with GV compound in laboratory rats. *Sborník Vědeckých Prací Lékařské Fakulty Karlovy University v Hradci Králové*. **37**(2), 57-62.

GROENEWOLD, Gary S., 2010. Degradation kinetics of VX. *Main Group Chemistry*. **9**(3,4), 221-244. ISSN 10241221. Dostupné z: doi:10.3233/MGC-2010-0037

HALÁMEK, Emil a Zbyněk KOBLIHA, 2008. Poslední generace chemických zbraní. *Vojenské rozhledy*. Univerzita obrany, **2008**(4), 137-146. ISSN 2336-2995.

HALÁMEK, Emil a Zbyněk KOBLIHA, 2011. Potenciální bojové chemické látky. *Vojenské zdravotnické listy*. **105**(5), 323-333. ISSN 1213-7103.

HENDERSON, Terry J., Nabil M. ELSAYED a Harry SALEM, 2015. Chemical Warfare Agents and Nuclear Weapons. SALEM, Harry a Sidney A. KATZ, ed. *Inhalation Toxicology*. 3rd Ed. Boca Raton, USA: CRC Press, s. 489-522. ISBN 978-1-4665-5274-6.

HENDERSON, Terry J., Ilona PETRIKOVICS, Petr KIKILO, Andrew L. TERNAY, JR. a Harry SALEM, 2019. Chemistries of Chemical Warfare Agents. LUKEY, Brian J., James A. ROMANO, JR. a Harry SALEM, ed. *Chemical Warfare Agents: Biomedical and Psychological Effects, Medical Countermeasures, and Emergency Response*. 3rd Edition. Boca Raton, USA: CRC Press, s. 17-38. ISBN 978-1-4987-6921-1.

JENNER, John, 2016. Toxicology of Vesicants. WOREK, Franz, John JENNER a Horst THIERMANN, ed. *Chemical Warfare Toxicology: Volume 1: Fundamental Aspects*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, s. 29-80. Issues in Toxicology. ISBN 978-1-84973-969-6.

KANAUJIA, Pankaj K., Deepak PARDASANI, Vijay TAK a D. K. DUBEY, 2009. Solid Supported Liquid-Liquid Extraction of Chemical Warfare Agents and Related Chemicals from Water. *Chromatographia*. **70**(3-4), 623-627. ISSN 0009-5893.

KIM, Dongwook, Wooyoung CHUNG a Youngsik KYE, 2015. Liquid-phase Microextraction Pretreatment Techniques for Analysis of Chemical Warfare Agents and Their Degradation Byproducts in Environmental Aqueous Samples. *Applied Chemistry for Engineering*. **26**(1), 17-22. ISSN 1225-0112. Dostupné z: doi:10.14478/ace.2015.1010

KUITUNEN, Marja-Leena, 2010. Sample Preparation for Analysis of Chemicals Related to the Chemical Weapons Convention in an Off-site Laboratory. MEYERS, R.A., ed. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. 15 December 2010. Hoboken, NJ, USA: Wiley. ISBN 9780470027318. Dostupné z: doi:10.1002/9780470027318.a0410.pub2

KROENING, Karolin K., Renee N. EASTER, Douglas D. RICHARDSON, Stuart A. WILLISON a Joseph A. CARUSO, 2011. *Analysis of Chemical Warfare Degradation Products*. United Kingdom: Wiley. ISBN 978-0-470-74587-8.

KURUCZ, Ján, 2016. *Chémia sulfidického yperitu*. Banská Bystrica: Vydavateľstvo Univerzity Mateja Bela v Banskej Bystrici. Fakulta prírodných vied. ISBN 978-80-557-1121-8.

LEHMANN, Fredrik a Johan WENNERBERG, 2021. Evolution of Nitrogen-Based Alkylating Anticancer Agents. *Processes*. **9**(2). ISSN 2227-9717. Dostupné z: doi:10.3390/pr9020377

LIŠKA, František a Ladislav STŘEDA, 2015. Chemické zbraně v Sýrii a jejich ničení. *Chemické listy*. **109**(10), 738-747. ISSN 1213-7103.

MAJORS, Ronald E., 2010. Solid - Phase Extraction. PAWLISZYN, Janusz, ed. *Handbook of sample preparation*. New Jersey: Wiley, s. 53-79. ISBN 978-0-470-09934-6.

MAJORS, Ronald E., 2012. Supported Liquid Extraction (SLE): The Best Kept Secret in Sample Preparation. *LC-GC North America*. UBM Medica Periodical Publication, **30**(8), 626-633. ISSN 1527-5949.

MAŠEK, Ivan, Otakar Jiří MIKA, Zdeněk ŠAFARÍK a Dušan VIČAR, 2015. Interesting group of high-toxic organophosphorus compounds. *The Science for Population Protection*. **7**(2), 85-98. ISSN 1803-635X.

MATOUŠEK, Jiří a Petr LINHART, 2005. *CBRN – chemické zbraně*. Ostrava: Sdružení požárního a bezpečnostního inženýrství. Spektrum (Sdružení požárního a bezpečnostního inženýrství). ISBN 80-866-3471-X.

MESILAAKSO, Markku, ed., 2005. *Chemical Weapons Convention Chemicals Analysis: Sample Collection, Preparation, and Analytical Methods*. Chichester: Wiley. ISBN 0-470-84756-5.

MITRA, Somenath a Roman BRUKH, 2003. Sample preparation: An analytical perspective. MITRA, Somenath, ed. *Sample preparation techniques in analytical chemistry*. Volume 162. New Jersey: Wiley, s. 1-36. Chemical analysis. ISBN 0-471-32845-6.

MUKHERJEE, Sudisha a Rinkoo Devi GUPTA, 2020. Organophosphorus Nerve Agents: Types, Toxicity, and Treatments. *Journal of Toxicology*. **2020**, 1-16. ISSN 1687-8191. Dostupné z: doi:10.1155/2020/3007984

MUMY, Karen L., William R. HOWARD, Ariel PARKER, Jonathan FORMAN a Gwyn WINFIELD, 2019. Organization for the Prohibition of Chemical Weapons (OPCW): History, Mission, and Accomplishments. LUKEY, Brian J., James A. ROMANO, JR. a Harry SALEM, ed. *Chemical Warfare Agents: Biomedical and Psychological Effects, Medical Countermeasures, and Emergency Response*. 3rd Edition. Boca Raton, USA: CRC Press, s. 59-69. ISBN 978-1-4987-6921-1.

MURPHEY, Joseph Scott, 2004. *Architectural Recordation of the Integrated Binary Production Facility, Pine Bluff Arsenal, Arkansas*. Fort Worth District. U.S. Army Corps of Engineers.

NOVÁKOVÁ, Lucie a Hana VLČKOVÁ, 2009. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: Chromatography and sample preparation. *Analytica Chimica Acta*. **656**(1-2), 8-35. ISSN 00032670. Dostupné z: doi:10.1016/j.aca.2009.10.004

OPCW, 1997. *Chemical Weapons Convention: Convention on the Prohibition of the Development, Production, Stockpiling and Use of Chemical Weapons and on their Destruction*. Hague, The Netherlands: Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons (OPCW). Version: 7 June 2020.

OPCW, 2022. *Declarations Handbook 2013: For the Convention on the Prohibition of the Development, Production, Stockpiling and Use of Chemical Weapons and on their Destruction*. 3rd Rev. version (25 Jan 2022). The Hague. OPCW Document S/2018/2022.

PATOČKA, Jiří, 2004. *Vojenská toxikologie*. Praha: Grada. ISBN 80-247-0608-3.

PATOČKA, Jiří, 2010. Kdo syntetizoval první organofosforový inhibitor acetylcholinesterasy?. *Vojenské zdravotnické listy*. **79**(3), 126-128. ISSN 0372-7025.

PAWLISZYN, Janusz, 2010. Fundamental Extraction Techniques: Theory of Extraction. PAWLISZYN, Janusz, ed. *Handbook of sample preparation*. New Jersey: Wiley, s. 3-24. ISBN 978-0-470-09934-6.

PAWLISZYN, Janusz, 2012. Solid-Phase Microextraction in Perspective. *Handbook of Solid Phase Microextraction*. Elsevier, 2012, s. 1-12. ISBN 9780124160170. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-416017-0.00001-2

PITSCHMANN, Vladimír, 2014. Overall View of Chemical and Biochemical Weapons. *Toxins*. **6**(6), 1761-1784. ISSN 2072-6651.

REMBOVSKIY, Vladimir, Elena SAVELIEVA, Andrey RADILOV, et al., 2020. Russian VX. GUPTA, Ramesh C., ed. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. 3rd Edition. Academic Press, 2020, s. 127-141. ISBN 978-0-12-819090-6.

SARAFRAZ-YAZDI, Ali a Amirhassan AMIRI, 2010. Liquid-phase microextraction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. **29**(1), 1-14. ISSN 0165-9936.

SKOOG, Douglas A., Donald M. WEST, F. James HOLLER a Stanley R. CROUCH, 2014. *Fundamentals of analytical chemistry*. 9th edition. Australia: Brooks/Cole Cengage Learning. ISBN 978-0-495-55828-6.

TERZIC, Oliver a Pim DE VOOGT, 2014. Modern Sample Preparation Techniques for Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis of Environmental Markers of Chemical Warfare Agents Use. *Detection of Chemical, Biological, Radiological and Nuclear Agents for the Prevention of Terrorism*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014-9-18, 33-67. NATO Science for Peace and Security Series A: Chemistry and Biology. ISBN 978-94-017-9237-0. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-017-9238-7_4

VALDEZ, Carlos A., Roald N. LEIF, Saphon HOK a Bradley R. HART, 2018. Analysis of chemical warfare agents by gas chromatography-mass spectrometry: methods for their direct detection and derivatization approaches for the analysis of their degradation products. *Reviews in Analytical Chemistry*. **37**(1). ISSN 2191-0189.

VANNINEN, Paula, ed., 2017. *Recommended Operating Procedures for Analysis in the Verification of Chemical Disarmament*. 2017 Edition. Helsinki: University of Helsinki. ISBN 978-951-51-3916-0.

VANNINEN, Paula, 2020. Verification of Chemicals Related to the Chemical Weapons Convention. MEYERS, R.A., ed. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Published 13 March 2020. Chichester: Wiley. ISBN 9780470027318.

YANG, Yu-Chu, 1999. Chemical Detoxification of Nerve Agent VX. *Accounts of Chemical Research*. **32**(2), 109-115. ISSN 0001-4842. Dostupné z: doi:10.1021/ar970154s

YOUNG, Robert A. a Annetta WATSON, 2020a. Organophosphate nerve agents. GUPTA, Ramesh C., ed. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. 3rd Edition. Academic Press, s. 97-126. ISBN 978-0-12-819090-6.

YOUNG, Robert A. a Cheryl B. BAST, 2020b. Blister agents. GUPTA, Ramesh R., ed. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*. 3rd Edition. Academic Press, 2020, s. 149-169. ISBN 978-0-12-819090-6.

10 SEZNAM POUŽITÝCH OBRÁZKŮ

Obrázek 1 – Struktury významných zástupců NPL série G.....	16
Obrázek 2 – Struktury významných zástupců NPL série V	17
Obrázek 3 – Struktura látky GP	19
Obrázek 4 – Struktury významných zástupců NPL série A.....	20
Obrázek 5 – Struktura HD a jeho analogů.....	22
Obrázek 6 – Struktura dusíkových yperitů.....	22
Obrázek 7 – Struktura Lewisitu a jeho analogů.....	23
Obrázek 8 - Degradací schémata látek skupiny 1A01.....	24
Obrázek 9 - Degradací schéma tabunu (GA)	25
Obrázek 10 - Degradací schémata látek skupiny 1A03.....	26
Obrázek 11 - Degradací schéma tabunu látky VX.....	27
Obrázek 12 – Základní degradací schéma HD a další vybrané produkty	28
Obrázek 13 – Degradací schéma Lewisitu 1.....	28
Obrázek 14 – Základní degradací cesta dusíkových yperitů.....	29
Obrázek 15 - SLE patrona Chem Elut S (vlevo) a příklad použití (vpravo).....	34
Obrázek 16 – Porovnání SPME Arrow (a, b) a SPME vlákna (c).....	37
Obrázek 17 – Použití SBSE míchadel Twister®.....	38
Obrázek 18 – HiSorb sondy pro vysokokapacitní sorpční extrakci	38
Obrázek 19 – Příklady použití HiSorb™ sond.....	39
Obrázek 20 – Možnost použití HiSorb™ sondy v TD trubičce	39
Obrázek 21 – Použití PDMS/DVB pásku pro techniku TF-SPME.....	40
Obrázek 22 – Manuální provedení pro techniku MEPS.....	41
Obrázek 23 – Poloautomatické provedení techniky MEPS.....	41
Obrázek 24 – Příklad možné automatizace techniky LLE.....	42
Obrázek 25 – Platforma CENTRI (vpravo) v kombinaci s GC/MS (vlevo).....	43
Obrázek 26 – První fáze procesu – fokusace analytu na Cold trap	44
Obrázek 27 – Druhá fáze procesu – desorpce analytu z Cold trapu	44
Obrázek 28 – Připravená aparatura pro provedení techniky SLE	53
Obrázek 29 – Proces aplikace techniky SLE	54
Obrázek 30 – Uvažované použití SBSE míchadla Twister®.....	57
Obrázek 31 – GC Spektrum vzorku E1A_POC-AQ-S-100 LLE.....	58
Obrázek 32 – GC Spektrum vzorku E1A_POC-AQ-S-100 SLE	59

Obrázek 33 – Porovnání GC spekter z analýz obou technik (100 mg/L)	60
Obrázek 34 – GC Spektra derivatizovaných vzorků (100 mg/L)	60
Obrázek 35 – GC Spektra vzorku E1A_POC-AQ-S-50 LLE (vlevo), SLE (vpravo)	61
Obrázek 36 – GC Spektra derivatizovaných vzorků (50 mg/L)	62
Obrázek 37 – GC Spektra vzorku E1A_POC-AQ-S-10 LLE (vlevo), SLE (vpravo)	63
Obrázek 38 – GC Spektra z měření vzorku s látkou VX	65
Obrázek 39 – GC Spektra z měření vzorku s látkou A-234	66
Obrázek 40 – GC Spektra z měření vodného vzorku s látkou GB	68
Obrázek 41 – Spektrum neznámého vzorku v programu AMDIS	68
Obrázek 42 – Dekonvoluce píku (vlevo) a derivatizované analyty (vpravo)	69
Obrázek 43 – Komparace spekter analytických píků A-234 v různých koncentracích	69
Obrázek 44 – GC spektra z analýz vzorku E2A_01-AQ-S (A-234)	70
Obrázek 45 – Ukázka srovnání intenzity píků v závislosti na podmínkách (A-234)	70
Obrázek 46 – GC spektra z analýz vzorku E2A_02-AQ-S (VX, VR, C-VX)	71
Obrázek 47 – Ukázka srovnání intenzity píků v závislosti na podmínkách ("V")	72
Obrázek 48 – GC spektra z analýz vzorku E2A_03-AQ-S (OPPs)	73
Obrázek 49 – GC spektra z analýz vzorku E2A_01-SD-S (HD)	74
Obrázek 50 – Ukázka srovnání intenzity píků v závislosti na podmínkách (HD)	74
Obrázek 51 – GC spektra z analýz při testování SBSE (GD)	76
Obrázek 52 – GC spektra z analýz při testování SBSE („V“)	77
Obrázek 53 – GC spektra z analýz při testování SBSE (A-234)	77

11 SEZNAM POUŽITÝCH TABULEK

Tabulka 1 - Přehled významných zástupců NPL série G	16
Tabulka 2 – Přehled významných zástupců NPL série V	17
Tabulka 3 – Přehled významných zástupců zpuchýřujících látek.....	21
Tabulka 4 - Použité toxické chemické látky.....	48
Tabulka 5 – Ostatní použité chemikálie	49
Tabulka 6 – Identifikované analyty – vzorek 100 mg/L.....	59
Tabulka 7 – Identifikované derivatizované analyty – vzorek 100 mg/L	61
Tabulka 8 – Identifikované analyty – vzorek 50 mg/L.....	62
Tabulka 9 – Identifikované derivatizované analyty – vzorek 50 mg/L.....	63
Tabulka 10 – Identifikované analyty – vzorek 10 mg/L.....	64
Tabulka 11 – Identifikovaný derivatizovaný analyt – vzorek 10 mg/L	64
Tabulka 12 – Souhrnný přehled identifikovaných analytů.....	67
Tabulka 13 – Úspěšnost identifikace při použití techniky DI-SBSE („A“)	71
Tabulka 14 – Úspěšnost identifikace při použití techniky DI-SBSE („V“)	72
Tabulka 15 – Úspěšnost identifikace při použití techniky DI-SBSE (OPPs).....	73
Tabulka 16 – Úspěšnost identifikace při použití techniky HS-SBSE (HD).....	75

12 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha A Zapracování techniky SLE do metodiky CH/2021/05-GCMS-WI

Příloha B Zapracování techniky HCSE do metodiky CH/2021/06-GCMS-EXT

Příloha C Algoritmus analytické strategie přípravy vodného vzorku na analytickém pracovišti LTL

Příloha A

Zpracování techniky SLE do metodiky CH/2021/05-GCMS-WI

SÚJCHBO, v.v.i.	METODIKA	CH/2021/05-GCMS-WI
<p>Identifikace stanovených látek metodou GC-EI/MS v zájmových vzorcích</p> <p>Identification of CWC-Scheduled chemicals in samples of interest using GC-EI/MS</p>		

4 Popis a princip zkoušky

Autentický vzorek (případně vzorek typu blank) je zpravidla připravován převedením alikvotu vzorku do vhodného rozpouštědla, ve kterém dochází k extrakci analytu metodou kapalina–kapalina (LLE) nebo kapalina–pevná látka (LSE). Vodné vzorky a vodné extrakty mohou být souběžně připravovány také podporovanou kapalinovou extrakcí (SLE), při které dochází k zachytu nepolárních sledovaných analytů na inertní sorpční nosič, ze kterého jsou následně eluovány vhodným rozpouštědlem nemísitelným s vodou.

6.3 Ostatní laboratorní pomůcky

- SLE Patrona Chem Elut S (Agilent) pro 5 mL vzorku
- Manifold pro provádění SPE, včetně příslušenství
- Kovové jehly SPE pro zabránění vzniku křížové kontaminace

7.3.3 Zpracování autentického vzorku – Vodné vzorky

[D] Extrakce nepolárních látek technikou SLE

- 1) Připravte potřebný počet pozic pro použití SPE Manifoldu. Do držáku pro vzorkovnice vložte 8mL extrakční vialku E-Z s vysokou výtěžností.
- 2) Na SLE Patronu Agilent Chem Elut S (20mL; pro 5 mL vzorku) připevněte jehlu pro eliminaci vzniku křížové kontaminace. Jehlu vsuňte otvorem manifoldu tak, aby konec jehly byl pod úrovní hrdla vzorkovnice.
- 3) Změřte pH vzorku a případně upravte na hodnotu 7–8 pomocí 0,1M NH₄OH nebo 0,1M HCl.
- 4) Do SLE Patrony přeneste 5 mL autentického vzorku a ponechte v klidu po dobu 5 minut; dokud nebude vodný vzorek plně nasáknut do sorbentu.
- 5) Promyjte 2x 5 mL DCM s 10% přídavkem IPA.
- 6) Extrakt odpařte dosucha a rekonstituujte v 1 mL DCM.
- 7) V případě potřeby je možné extrakt z kroku 5) rekonstituovat ve 250 uL pro získání koncentrovaného vzorku.
- 8) DCM extrakt analyticky přeneste do 2 mL GC vialky a přidejte 10 uL zásobního roztoku ISTD (10 ng/uL).
- 9) Analytický vzorek připraven pro analýzu.

Příloha B

Zpracování techniky HCSE do metodiky CH/2021/06-GCMS-EXT

SÚJCHBO, v.v.i.	METODIKA	CH/2021/06-GCMS-EXT
<p data-bbox="359 837 1311 943">Identifikace stanovených látek metodou GC-EI/MS s využitím mikroextrakčních technik</p> <p data-bbox="427 1151 1243 1227">Identification of CWC-Scheduled chemicals by GC-EI/MS using microextraction techniques</p>		

7.5 Parametry pro extrakci modulární platformou CENTRI

7.5.2 Použití techniky HCSE

A. Vzorkovací metoda Headspace (HS-)

Vzorkovnice: 20mL HS vialka (HiSorb cap)

Parametry extrakce a obohacování:

Flow path: 180 °C

HiSorb Sonda: PDMS/DVB, krátká varianta (H3-AXABC), inert-coated

Trap: Chemical weapons (U-T10CW-2S)

Inkubace: 35 °C, 15 min, 250 rpm

Desorpce: 260 °C, 3–5 min

Teplota trapu: -10 °C

Trap dry purge: 1 min, 50 mL/min

Desorpce trapu: 280 °C (5 min)

Split: 9 mL/min (10:1 split)

B. Vzorkovací metoda Direct immersion (DI-)

Vzorkovnice: 20mL HS vialka (HiSorb cap)

Parametry extrakce a obohacování:

Flow path: 180 °C

HiSorb Sonda: PDMS/DVB, dlouhá varianta (H3-AXAAC), inert-coated

Trap: Chemical weapons (U-T10CW-2S)

Inkubace: 50 °C, 30 min, 200 rpm

Desorpce: 260 °C, 5 min

Teplota trapu: -10 °C

Trap dry purge: 1 min, 50 mL/min

Desorpce trapu: 280 °C (5 min)

Split: 9 mL/min (10:1 split)

C. Parametry GC při zavádění vzorku z platformy CENTRI (Back Inlet)

Parametry kolony: HP-5MS Ultra Inert | (5%-phenyl)-methylpolysiloxane
O.D. = 0,32 mm; I.D. = 0,25 mm; F.T. = 0,25 µm
L = 1 x 30 m

Základní metoda: „CW_Basic_HCSE-GCMS“

Teplotní program GC: „OPCW“ – 40 °C (60 s); 10 °C/min do 280 °C; 280 °C (300s)

Průtok kolonou: 1 ml/min

MSD Transfer Line: 280 °C

Mobilní fáze: Helium 5.0

Příloha C

Analytická strategie pro vyšetřování neznámých vodných vzorků

