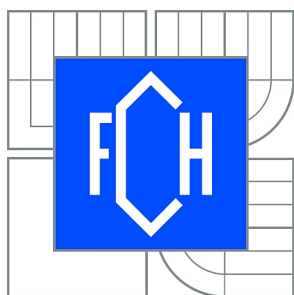


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

RYCHLÁ SEPARACE VÝBUŠNIN VYSOKOÚČINNOU KAPALINOVOU CHROMATOGRAFIÍ

FAST SEPARATION OF EXPLOSIVES BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. JOZEF ŠESTÁK

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

RNDr. Vladislav Kahle, CSc.

BRNO 2011



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

| | | |
|------------------------|---|----------------------------------|
| Číslo diplomové práce: | FCH-DIP0544/2010 | Akademický rok: 2010/2011 |
| Ústav: | Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí | |
| Student(ka): | Bc. Jozef Šesták | |
| Studijní program: | Chemie a technologie ochrany životního prostředí (N2805) | |
| Studijní obor: | Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002) | |
| Vedoucí práce | RNDr. Vladislav Kahle, CSc. | |
| Konzultanti: | doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc. | |

Název diplomové práce:

Rychlá separace výbušnin vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií

Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše se zaměřením na separaci výbušnin vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií a možnosti urychlení separace
2. Testování různých typů kolon a výběr nejvhodnější kolony (celoporézní částice, povrchově porézní částice a monolity)
3. Optimalizace HPLC separace (složení mobilní fáze, teplota, průtok)
4. Zrychlení separace (izokratická/gradientová eluce, zvýšená teplota, maximální průtok)
5. Navržení prototypu miniaturizovaného HPLC systému (výběr vhodných komponentů a sestavení)

Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2011

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Jozef Šesták
Student(ka)

RNDr. Vladislav Kahle, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2011

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Diplomová práce řeší problematiku rychlé separace výbušnin metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie pro účely vývoje miniaturizovaného kapalinového chromatografu vhodného k zakomponování do přenosného analyzátoru výbušnin. Práce zkoumá retenci vybraných nitrovaných výbušnin a selektivitu v systému obrácených fází v závislosti na složení mobilní fáze při použití methanolu, acetonitrilu a acetonu jako organické složky. Nejlepší selektivitu poskytuje systém při použití methanolu. Acetonitril a aceton jsou pro rychlou separaci směsi obsahující pentrit v izokratických podmínkách nevhodné z důvodu jeho vysoké retence. Práce srovnává účinnost a permeabilitu monolitické kolony (Chromolith CapRod RP-18e) s kolonami plněnými povrchově porézním sorbentem (Kinetex 2,6 μm C-18, Poroshell 120 SB-C18). Monolitická kolona vykazuje dobrou účinnost separace a poskytuje nízký hydraulický odpor a k řešení daného úkolu je nejvhodnější. Na základě předpokladu použití analyzátoru výbušnin v různých podmínkách je separace optimalizována pro teplotu 50 °C. Přijatelnou retenci látek a dobrou selektivitu poskytuje za těchto podmínek mobilní fáze s obsahem 35 % v/v methanolu. Pro velmi rychlé posouzení přítomnosti pentritu či jiné nitrolátky ve vzorku je díky nízké viskozitě a výrazně větší retenci oproti ostatním studovaným látkám vhodné použití 70% v/v acetonu. Práce navrhuje konstrukci miniaturizovaného kapalinového chromatografu, který bude schopen provést zakoncentrování vodného roztoku výbušnin a jejich rychlou separaci v čase kratším než 1 minuta. Tento koncept bude začleněn do přenosného analyzátoru výbušnin, kde páry výbušných látek budou pohlceny ve vodě a po následné separaci budou látky detekovány prostřednictvím chemiluminiscence.

ABSTRACT

The topic of the diploma thesis is fast separation of explosives by HPLC and development of miniaturized liquid chromatograph for application in a handheld explosives detection device. In this work the retention of some nitrated explosives and selectivity in reversed phase system as a function of mobile phase composition is studied while methanol, acetonitrile and acetone as an organic solvent is used. Best selectivity and good retention can be observed in methanol mobile phase. Acetonitrile and acetone are not suitable for fast isocratic separation of mixture containing pentaerythritol tetranitrate because of its strong retention. Efficiency and permeability of monolithic column (Chromolith CapRod RP-18e) and columns filled with superficially porous particles are compared (Kinetex 2,6 μm C-18, Poroshell 120 SB-C18). Monolithic column with satisfying efficiency and high column permeability is the most suitable solution for fast separation of explosives. Assuming use of explosives detection device in different conditions the separation was optimized on temperature 50 °C. Under these conditions the 35% v/v methanol gives good retention and selectivity. For very fast scan analysis of pentaerythritol tetranitrate or other nitroaromatics use of 70% v/v acetone mobile phase is suitable. Construction of miniaturized liquid chromatograph that enables preconcentration of explosives from aqueous solutions and fast separation in less than 1 minute is described. This concept will be incorporated into the handheld explosives detection device where the explosives vapor will be absorbed into the water and after the separation detected by chemiluminescence.

KLÍČOVÁ SLOVA

HPLC, výbušniny, rychlá separace, monolitická kolona, povrchově porézní částice

KEY WORDS

HPLC, explosives, fast separation, monolith column, superficially porous particles

ŠESTÁK, J. *Rychlá separace výbušnin vysokoučinnou kapalinovou chromatografií*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 63 s. Vedoucí diplomové práce RNDr. Vladislav Kahle, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval RNDr. Vladislavu Kahlemu, CSc. za trpělivé vedení po celou dobu vypracovávání této práce. Také bych rád poděkoval Ing. Daně Moravcové, Ph.D. za cenné rady a pomoc při řešení některých problémů a prof. RNDr. Zdeňku Friedlovi, CSc. za ochotné poskytnutí vzorků.

OBSAH

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | ÚVOD | 8 |
| 2 | CÍLE PRÁCE..... | 9 |
| 3 | TEORETICKÁ ČÁST | 10 |
| 3.1 | Výbušniny používané a zneužívané | 10 |
| 3.1.1 | Vojenské a průmyslové trhavy | 10 |
| 3.1.2 | Improvizované výbušniny..... | 11 |
| 3.1.3 | Značkovače | 12 |
| 3.2 | Kapalinová chromatografie v analýze výbušnin | 13 |
| 3.2.1 | Ochrana životního prostředí..... | 13 |
| 3.3 | Kritické vlastnosti vybraných látek z hlediska použité techniky | 15 |
| 3.3.1 | Tenze par..... | 15 |
| 3.3.2 | Rozpustnost výbušnin ve vodě..... | 17 |
| 3.3.3 | Polarita látek | 17 |
| 3.4 | Možnosti rychlé a účinné separace..... | 18 |
| 3.4.1 | Zvýšení průtoku mobilní fáze kolonou | 18 |
| 3.4.2 | Volba vhodné mobilní fáze..... | 20 |
| 3.4.3 | Vliv zvýšené teploty | 21 |
| 3.4.4 | Gradientová eluce | 22 |
| 3.4.5 | Moderní nosiče stacionárních fází | 23 |
| 3.5 | Možnosti citlivé analýzy | 25 |
| 3.5.1 | UV-VIS spektrometrie | 25 |
| 3.5.2 | Hmotnostní spektrometrie..... | 26 |
| 3.5.3 | Fluorimetrie..... | 26 |
| 3.5.4 | Další techniky detekce | 27 |
| 3.5.5 | Použití mikrokolon a fokusace vzorku | 28 |
| 3.6 | Rychlé separace v praxi..... | 28 |
| 3.6.1 | Kapalinová chromatografie..... | 28 |
| 3.6.2 | Další separační techniky | 29 |
| 3.7 | Problematika přenosného kapalinového chromatografu | 30 |
| 4 | EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST..... | 31 |
| 4.1 | Použité přístroje a příslušenství..... | 31 |
| 4.2 | Použité chemikálie | 31 |
| 4.3 | Studium retenčních charakteristik vybraných látek | 31 |
| 4.4 | Studium vlivu použité organické složky v mobilní fázi na účinnost kolony | 32 |
| 4.5 | Charakterizace vybraných kolon..... | 32 |
| 4.5.1 | Permeabilita kolon | 32 |
| 4.5.2 | Celková porozita kolon | 33 |

| | | |
|-------|---|----|
| 4.5.3 | Účinnost kolon | 34 |
| 4.6 | Optimalizace separace | 34 |
| 5 | VÝSLEDKY A DISKUZE | 35 |
| 5.1 | Retenční charakteristiky vybraných látek | 35 |
| 5.2 | Vliv použité organické složky v mobilní fázi na účinnost kolony | 41 |
| 5.3 | Volba vhodné kolony | 43 |
| 5.3.1 | Hydraulické vlastnosti kolon | 43 |
| 5.3.2 | Účinnost kolon | 44 |
| 5.3.3 | Separální impedance kolon | 45 |
| 5.4 | Navržení podmínek separace | 46 |
| 5.5 | Návrh miniaturizovaného kapalinového chromatografu | 50 |
| 5.5.1 | Návrh konstrukce | 50 |
| 5.5.2 | Volba vhodných komponent | 50 |
| 5.5.3 | Výpočet základních parametrů a popis funkce | 52 |
| 6 | ZÁVĚR | 55 |
| 7 | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK | 56 |
| 8 | POUŽITÁ LITERATURA | 58 |

1 ÚVOD

Člověk vykonává velké množství činností. Různé profese a s nimi spojené aktivity jsou ovlivňovány rozličnými faktory. Existuje ale jeden velmi důležitý faktor, který ovlivňuje všechny bez rozdílu. Je to čas. I když by tady fyzikové určitě namítali, řekněme, že na Zemi čas běží pro všechny stejně. V současnosti není v moci člověka, aby v tomto směru čas, ve své podstatě, přímo ovlivnil. Musí se proto snažit svou činnost nějak rozumně uspořádat, zrychlit, zefektivnit nebo automatizovat, aby mohl čas lépe využít.

Heslo „čas jsou peníze“ vystihuje jedno ze základních kréd moderního člověka. Zejména co se týče práce, člověk chce stihnout udělat co nejvíc práce, v co nejkratším čase. Z dlouhodobého hlediska lze konstatovat, že právě tato snaha je motorem veškerého technologického pokroku lidstva. Snaha dosáhnout požadované kvality práce v co nejkratším čase.

Tento trend lze pozorovat snad ve všech odvětvích průmyslu a výrob, v analytické chemii tomu samozřejmě není jinak. Potřeba urychlení analýz vyvstává zejména z požadavku zpracování velkého množství vzorků. Zkrácení času analýzy tak zvýší produktivitu laboratoře. Kromě toho, rychlá analýza může sebou přinést i další výhody. Z ekonomického hlediska může dojít ke zkrácení doby, po kterou je přístroj v provozu, což vede ke snížení spotřeby elektrické energie. Případné snížení spotřeby chemikálií je nejen ekonomické, ale je také žádoucí z pohledu ekologie a ochrany životního prostředí.

Další požadavky na rychlou analýzu můžou vyvstat z potřeby rychlého zhodnocení určité situace, například havárie spojené s únikem chemické látky. V takových případech je nutno jednat rychle, neboť mohou být ohroženy lidské životy, zdroje pitné vody nebo jinak chráněné přírodní zdroje. Zde rychlá analýza umožní v krátkém čase získat přehled o rozsahu události a poskytne čas na posouzení situace a na přípravu a realizaci následných opatření. Tato práce zabývající se detekcí výbušnin patří také do oblasti, kde se vyžaduje aplikace rychlých a účinných analytických postupů.

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) prošla od svého vzniku v 60. letech 20. století poměrně dlouhým vývojem. Během této doby byly postupně vyvíjeny účinnější kolony a velký pokrok byl také zaznamenán na poli instrumentace. Z hlediska rychlé separace je nejnovějším výdobytkem tzv. UPLC. Tyto systémy jsou konstruovány na velmi vysoké pracovní tlaky umožňující vysokou rychlost toku mobilní fáze i přes velmi jemnou náplň kolony, čím lze dosáhnout rychlé a vysoce účinné separace.

2 CÍLE PRÁCE

Tato práce je součástí řešení grantového projektu, jehož předmětem je konstrukce přenosného analyzátoru výbušnin. V minulosti bylo již vyvinuto několik typů přenosných analyzátorů výbušnin, řada z nich je i komerčně dostupná. Důvodů, proč vyvíjet další přístroj tohoto typu je několik. Za prvé, většina dostupných analyzátorů pracuje neselektivně. Tato zařízení jsou schopna odlišit výbušné látky od ostatních, nejsou však schopna rozlišit jednotlivé výbušniny mezi sebou (Scintrex E3500, FIDO apod.). Zařízení pracující na principu spektrometru iontové mobility (IMS) nebo miniaturizovaný plynový chromatograf s detektorem povrchové akustické vlny (GC-SAW) jsou schopny rozlišit jednotlivé výbušné látky, ale při vyšších koncentracích může dojít k jejich zahlcení a dlouhodobé kontaminaci.

Cílem projektu je navrhnout a vyvinout přenosný analyzátor výbušnin pracující na principu průtokové analýzy. Zařízení bude schopné detekovat výbušniny v dostatečně širokém rozsahu chemického složení, bude dostatečně selektivní a bude mít samočistící schopnost takovou, aby po zahlcení systému nedošlo k jeho dlouhodobé kontaminaci. Tento systém by měl pracovat tak, že v prvním kroku budou páry výbušných látek pohlceny ve vodě, v druhém kroku budou separovány pomocí kapalinové chromatografie a následně detekovány za použití chemiluminiscenčního detektoru.

V teoretické části má práce za cíl zpracovat literární rešerši zaměřenou na separaci výbušnin pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a podrobně zanalyzovat reálné možnosti urychlení separace. Cílem praktické části práce je studium retenčních charakteristik vybraných výbušnin v systému s obrácenými fázemi za použití různých mobilních fází a otestování několika typů kolon určených pro rychlou separaci látek. Na základě získaných dat budou navrženy optimální podmínky pro rychlou separaci výbušnin a následovat bude návrh prototypu miniaturizovaného kapalinového chromatografu vhodného k zakomponování do přenosného analyzátoru výbušnin.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Výbušniny používané a zneužívané

Síla ukrytá ve výbušninách hraje v dějinách lidstva důležitou roli. Bohužel, jak to tak bývá i u jiných vynálezů, byla tato síla brzy po jejím objevení zneužita pro vojenské účely. Většina lidí si se slovem výbušnina spojuje válku, teroristické útoky, umírání lidí. Není se čemu divit. I po dvou světových válkách ve světě neustále propukají větší či menší ozbrojené konflikty, které v poslední době stále častěji doplňují zprávy o bombových útocích na civilní obyvatelstvo.

Výbušniny ale mají i svou světlou stránku. Jejich síla vykonala pro člověka neocenitelnou práci. Bez použití výbušnin se neobejde skoro žádná stavba silnice, železnice či tunelu. Efekt exploze také těší lidský zrak například při sledování ohňostroje.

Mírové použití výbušnin je bohužel silně zastíněno jejich zneužíváním pro tzv. „řešení“ konfliktů mezi lidmi. Z tohoto důvodu je kladen velký důraz na vývoj spolehlivé a rychlé detekce všech látek, o nichž se ví, že za určitých podmínek jsou schopny explodovat a které by mohly být k tomuto účelu takto zneužity.

Těchto látek je obrovské množství. Americký úřad pro alkohol, tabák a střelné zbraně uvádí seznam výbušnin čítajících na 230 výbušných látek a výbušných směsí [1]. Jejich fyzikální a chemické vlastnosti jsou často natolik odlišné, že žádný v současnosti používaný princip detekce není schopen obsáhnout tak velkou škálu látek.

Z hlediska funkce a použití je možné výbušné látky a látky výbušninám příbuzné začlenit do několika skupin. Vojenské a průmyslové trhavin, improvizované výbušniny a výbušné směsi. S první skupinou pak souvisí látky označovány jako značkovače. Struktura vybraných výbušnin je znázorněna na **Obrázku 3.1**.

3.1.1 Vojenské a průmyslové trhavin

Pod tímto pojmem rozumíme komerční výbušniny, které jsou průmyslově vyráběné a primárně určené pro armádu či policii a výbušniny určené k trhacím pracím při stavbě silnic, tunelů či demolici.

Od vojenských trhavin se očekává vysoký výkon, možnost dlouhodobého skladování bez změny funkčnosti a možnost použití v různých (často extrémních) podmínkách. Aby byla manipulace s nimi bezpečná, musí být výbušná složka dostatečně stabilní. Pro dosažení požadovaných vlastností se výbušniny nepoužívají v čistém stavu, ale ve směsích s jinými výbušninami a dalšími látkami, zejména pro zvýšení stability (flegmatizátory) a lepší tvarovatelnost (změkčovadla). Ve světě se vyrábí velká škála vojenských plastických trhavin pod rozdílným názvem. Složení těchto směsí je často velmi podobné a liší se hlavně poměrem jednotlivých složek. Základem plastických trhavin je plastifikátor a některá vysoce brizantní výbušnina, nejčastěji pentrit (PETN), hexogen (RDX), oktogen (HMX), tritol (TNT) nebo jejich směsí [2]. Mezi nejznámější vojenské plastické trhavin patří americká C-4 a český Semtex. K vojenským trhavinám je nutno zařadit i tetryl, který lze nalézt jako součást některých min a starších rozbušek. Ve velkém množství se již nevyrábí, byl nahrazen RDX.

Mezi průmyslové trhavyiny patří hlavně Dynamity. Složení dynamitových směsí je různé, základními složkami jsou především nitroglycerin (NG), nitrocelulóza (NC) a dusičnany (amonný, draselný).

Pro snížení bodu tuhnutí se začal přidávat ethylenglykol dinitrát (EGDN), který postupně v dynamitech nahradil citlivější NG. Dynamitové směsi v současnosti ve velké míře nahrazují levnější směsi na bázi ledku amonného a paliva (např. motorová nafta), tzv. ANFO.

3.1.2 Improvizované výbušniny

Improvizované výbušné systémy používané při teroristických útocích nebo při pokusech o ně je možné z hlediska původu výbušné složky rozdělit do dvou skupin.

První skupinu tvoří systémy obsahující vojenské plastické trhavyiny (na bázi RDX, TNT apod.) odcizené z vojenských či policejních skladů, které jsou následně dostupné na černém trhu. Pro zvýšení ničivého účinku je často přidáván hliníkový prášek.

Druhou skupinu tvoří výbušné látky, které lze vyrobit relativně jednoduchým způsobem z běžně dostupných surovin. Patří sem některé dusičnany, triacetón triperoxid (TATP) a hexamethylentriperoxodiamin (HMTD). Dusičnan amonný (AN) se běžně používá jako hnojivo, ale po nenáročné úpravě a za určitých podmínek je schopen detonace. Tyto výbušniny jsou známé pod zkratkou ANFO (z angl. ammonium nitrate/fuel oil). Také nitrát močoviny (UN) je hojně užíván jako improvizovaná výbušnina. Uvádí se, že UN dosahuje 90 % síly TNT. TATP a HMTD jsou organické peroxidy patřící do skupiny třaskavin [3]. Vyznačují se vysokou brizancí a vysokou citlivostí k mechanickým podnětům. Na internetu je bohužel každému přístupné velké množství návodů na výrobu těchto látek. Postupy jsou často triviální a vstupní suroviny běžně dostupné. AN tak lze jednoduše připravit rozpouštěním čpavku v roztoku kyseliny dusičné a k výrobě TATP postačí smísit koncentrovaný roztok peroxidu vodíku s roztokem acetonu [4].

ANFO je často používáno v automobilových bombách organizacemi typu ETA či IRA. Snad největší útok, při kterém byla použita výbušnina na bázi ANFO, se odehrál 19. 4. 1995 v Oklahoma City. Cílem byla vládní budova, v níž při výbuchu a následném zhroucení části budovy zahynulo 168 osob. TATP se do historie smutně zapsal především 7. 6. 2006 při bombových útocích na londýnskou hromadnou dopravu, kdy zahynulo celkem 56 lidí. UN byl použit při útoku na WTC v New Yorku v roce 1993 a pravidelně je používán teroristy v Palestině.

Existuje ještě skupina oxidujících solí, které v kombinaci s vhodným palivem mohou být použité k teroristickému útoku. Patří sem dusičnany, dusitany, chlorečnany, chloristany, manganistany, chromistany či iodičnany. Zvýšenou pozornost je nutno věnovat především chlorečnanu draselnému, který byl použit při teroristickém útoku 12. 12. 2002 na Bali.

Tabulka 3.1 – Schválené značkovače a jejich minimální povolený obsah

| Látka | Zkratka | Minimální % hmotnosti | CAS no. |
|-------------------------------|---------|-----------------------|-----------|
| Ethylenglykol dinitrát | EGDN | 0,2 | 628-96-6 |
| 2,3-dimethyl-2,3-dinitrobutan | DMDNB | 0,1 | 3964-18-9 |
| 4-nitrotoluen | 4-NT | 0,5 | 99-99-0 |

3.2 Kapalinová chromatografie v analýze výbušnin

Na rozdíl od plynové chromatografie, nevyžaduje kapalinová chromatografie převedení vzorku do plynného skupenství. Tato skutečnost dovoluje pomocí kapalinové chromatografie analyzovat látky, které jsou teplotně labilní nebo málo těkavé a činí tak z této techniky ideální nástroj pro analýzu výbušnin. Moderní kapalinová chromatografie je v současnosti pro separaci výbušnin využívána zejména pro účely forenzní a environmentální analýzy. Ve forenzní analýze slouží zejména k analýze zplodin po výbuchu nebo výstřelech [6]. On-line detekce výbušnin na bázi HPLC pro bezpečnostní sféru zatím řešena nebyla.

3.2.1 Ochrana životního prostředí

Jako výbušniny byly a jsou používány látky různých struktur a povahy. Některé v životním prostředí podléhají biologické degradaci, přičemž mohou vznikat další látky jiné povahy, často toxické.

Americká agentura pro ochranu životního prostředí (EPA) uvádí použití HPLC jako doporučené metody pro stanovení výbušnin a jejich reziduí ve složkách životního prostředí. Metoda EPA 8330A popisuje stanovení 14 cílových analytů, vybraných výbušnin, jejich degradačních produktů a látek používajících k jejich výrobě (EPA 8330B - 17 analytů) ve vodě, půdě a sedimentech [7]. Seznam sledovaných látek uvádí **Tabulka 3.2**.

Metody popisují doporučený způsob pro úpravu vzorků vody, půdy a sedimentů a podmínky analýzy kapalinovou chromatografií. Standardně je používán UV-VIS detektor s vlnovou délkou 254 nm, pro stanovení NG a PETN 210 nm. Jako mobilní fáze je využíván zejména methanol. Doporučena je kolona s C18 stacionární fází. Případnou koeluci látek je doporučeno eliminovat použitím srovnávací kolony s jinou selektivitou (fenyl-hexyl nebo kyano-propyl fáze).

Na tuto metodu navazuje celá řada pozdějších studií. Rozsah stanovovaných látek zůstává zachován, testovány a optimalizovány jsou zejména nové metody vzorkování, např. použití mikroextrakce tuhou fází (SPME) [8]. Dále jsou vyvíjeny nové druhy detektorů. Velká pozornost je věnována chemiluminiscenci [9, 10], jejíž použití pro látky obsahující $-\text{NO}_2$ skupiny (velká část výbušnin) se jeví velice perspektivním. Značná část prací se zabývá analýzou výbušnin pomocí HPLC v spojení s hmotnostní spektrometrií [11-15].

Tabulka 3.2 – Seznam sledovaných látek dle metody EPA 8330

| Látka | Zkratka | CAS no. |
|---|-----------|------------|
| Octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocin | HMX | 2691-41-0 |
| Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin | RDX | 121-82-4 |
| 1,3,5-trinitrobenzen | 1,3,5-TNB | 99-35-4 |
| 1,3-dinitrobenzen | 1,3-DNB | 99-65-0 |
| N-methyl-N,2,4,6-tetranitroaniline | Tetryl | 479-45-8 |
| Nitrobenzen | NB | 98-95-3 |
| 2,4,6-trinitrotoluen | 2,4,6-TNT | 118-96-7 |
| 3,5-dinitro-p-toluidin | 4-Am-DNT | 19406-51-0 |
| 2-methyl-3,5-dinitrobenzenamin | 2-Am-DNT | 35572-78-2 |
| 2,4-dinitrotoluen | 2,4-DNT | 121-14-2 |
| 2,6-dinitrotoluen | 2,6-DNT | 606-20-2 |
| 2-nitrotoluen | 2-NT | 88-72-2 |
| 3-nitrotoluen | 3-NT | 99-08-1 |
| 4-nitrotoluen | 4-NT | 99-99-0 |
| Glycerol trinitrát* | NG | 55-63-0 |
| Pentaerythritol tetranitrát* | PETN | 78-11-5 |
| 3,5-Dinitroanilin* | 3,5-DNA | 618-87-1 |

**Pouze EPA 8330B*

Stanovením některých výbušnin a jim podobných sloučenin ve vodě se také zabývá norma ISO 22478:2006. Tato norma byla převzata do evropského a poté i do českého systému norem jako ČSN EN ISO (22478 Jakost vod - Stanovení některých výbušnin a podobných sloučenin - Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s UV detekcí).

Tato norma popisuje postup stanovení 21 látek (**Tabulka 3.3**), zejména nitrotoluenů, nitraminů, nitroesterů a podobných sloučenin (vedlejších produktů a produktů rozkladu), v pitné, podzemní a povrchové vodě.

Tabulka 3.3 – Seznam sledovaných látek dle normy ČSN EN ISO 22478:2006

| Látka | M _r | Zkratka | CAS no. |
|---|----------------|-----------|------------|
| Octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocin | 296,16 | HMX | 2691-41-0 |
| Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin | 222,12 | RDX | 121-82-4 |
| 1,3,5-trinitrobenzen | 213,10 | 1,3,5-TNB | 99-35-4 |
| 1,3-dinitrobenzen | 168,11 | 1,3-DNB | 99-65-0 |
| N-methyl-N,2,4,6-tetranitroaniline | 287,14 | Tetryl | 479-45-8 |
| Nitrobenzen | 123,11 | NB | 98-95-3 |
| 2,4,6-trinitrotoluen | 227,13 | 2,4,6-TNT | 118-96-7 |
| 3,5-dinitro-p-toluidin | 197,15 | 4-Am-DNT | 19406-51-0 |
| 2-methyl-3,5-dinitrobenzenamin | 197,15 | 2-Am-DNT | 35572-78-2 |
| 2,4-dinitrotoluen | 182,13 | 2,4-DNT | 121-14-2 |
| 2,6-dinitrotoluen | 182,13 | 2,6-DNT | 606-20-2 |
| 2-nitrotoluen | 137,14 | 2-NT | 88-72-2 |
| 3-nitrotoluen | 137,14 | 3-NT | 99-08-1 |
| 4-nitrotoluen | 137,14 | 4-NT | 99-99-0 |
| Pentaerythritol tetranitrát | 316,14 | PETN | 78-11-5 |
| Glycerol trinitrát | 227,09 | NG | 55-63-0 |
| Ethylenglykol dinitrát | 152,06 | EGDN | 628-96-6 |
| Diethylenglykol dinitrát | 196,12 | DEGDN | 693-21-0 |
| 2,4,6-trinitrofenol | 229,10 | PA | 88-89-1 |
| Diphenylamin | 169,22 | DPA | 122-39-4 |
| Dipikrylamin | 439,21 | HNDPA | 131-73-7 |

3.3 Kritické vlastnosti vybraných látek z hlediska použité techniky

Jelikož je tato práce součástí komplexního řešení detekce par výbušných látek, které spoléhá na pohlcení par výbušných látek do vody a jejich následnou separaci kapalinovou chromatografií, je vhodné uvést některé klíčové vlastnosti, které budou ovlivňovat jednotlivé procesy.

3.3.1 Tenze par

Pro detekci par výbušnin je rozhodujícím faktorem tenze par nebezpečné látky za konkrétních podmínek. Tlak nasycených par je u výbušnin až na několik výjimek poměrně nízký (**Tabulka 3.4**). Tyto hodnoty však představují koncentraci výbušniny ve vzduchu za podmínek dosažení rovnováhy. Reálná situace na letištích či při detekci v terénu představuje podmínky, za kterých je dosažení rovnováhy prakticky nemožné a skutečná koncentrace ve vzduchu je oproti té rovnovážné výrazně nižší. Tenze par látek je funkcí teploty, v některých případech jsou značné rozdíly již v poměrně úzkém rozsahu teplot [16]. Rovněž způsob uložení a použití výbušné látky má vliv na výslednou tenzi par. Bylo zjištěno, že rovnovážná tenze par RDX v plastické trhavině C-4 je při pokojové teplotě stonásobně nižší než u čisté formy.

Z hlediska řešení problematiky rychlé separace není tenze par rozhodujícím faktorem, neboť můžeme pracovat s roztoky standardů a předpokládáme tedy přítomnost všech analyzovaných složek. V reálné situaci však bude pro přenosný analyzátor výbušnin tenze par zcela rozhodujícím faktorem, protože množství látky zachycené ve vodním roztoku bude přímo úměrné tenzi par přítomné látky.

Tabulka 3.4 – Tenze par některých výbušnin

| Látka | Tenze par při 25 °C [Pa] | Teplota [°C] | Ref. # |
|------------|--------------------------|--------------|--------|
| NM | 3200 | 20 | [17] |
| TATP | 7,87 | 25 | [19] |
| EGDN | 6,40 | 25 | [18] |
| DEGDN | 0,48 | 20 | [17] |
| NG | $3,07 \cdot 10^{-2}$ | 25 | [18] |
| 2,4-DNT | $1,47 \cdot 10^{-2}$ | 25 | [18] |
| 2,4,6-TNT | $8,40 \cdot 10^{-4}$ | 25 | [19] |
| AN | $6,70 \cdot 10^{-4}$ | 20 | [20] |
| Pikrová k. | $7,73 \cdot 10^{-7}$ | 20 | [20] |
| Tetryl | $7,60 \cdot 10^{-7}$ | 25 | [20] |
| RDX | $1,47 \cdot 10^{-7}$ | 25 | [18] |
| PETN | $5,07 \cdot 10^{-8}$ | 25 | [18] |
| HMX | $4,40 \cdot 10^{-12}$ | 20 | [20] |

Tabulka 3.5 – Rozpustnost některých výbušnin ve vodě

| Látka | Rozpustnost ve vodě [g/l] | Teplota [°C] | Ref. # |
|------------|---------------------------|--------------|--------|
| AN | 661 | 20 | [22] |
| NM | 100 | 25 | [21] |
| Pikrová k. | 13 | 25 | [21] |
| EGDN | 1,5 | 20 | [22] |
| NG | 1,25 | 25 | [21] |
| 4-NT | 0,29 | 20 | [21] |
| 2-NT | 0,65 | 30 | [21] |
| 3-NT | 0,50 | 30 | [21] |
| 2,4-DNT | 0,27 | 22 | [21] |
| 2,4,6-TNT | 0,12 | 20 | [21] |
| Tetryl | 0,074 | 20 | [21] |
| RDX | 0,06 | 25 | [21] |
| HMX | 0,0066 | 20 | [22] |
| PETN | 0,002 | 25 | [21] |

3.3.2 Rozpustnost výbušnin ve vodě

Pohlcením par výbušnin ve vodě vznikne roztok, jehož koncentrace je limitována rozpustností jednotlivých látek ve vodě. Rozpustnost většiny výbušnin ve vodě je až na pár výjimek malá. Vzhledem k velmi nízké tenzi par látky ve vzduchu, lze i po zakoncentrování očekávat nízkou koncentraci ve vodním roztoku. Z tohoto pohledu nepředstavuje nízká rozpustnost žádné omezení, může dokonce působit jako ochrana proti zahlcení systému (kolony). Některé výbušniny (např. NM, NG) se vyznačují relativně vysokou tenzí par a současně dobrou rozpustností ve vodě. V takovém případě by mohlo dojít k zahlcení systému. Parametry analyzátoru by měly být tedy dimenzovány i s ohledem na situace tohoto typu. Rozpustnost vybraných látek uvádí **Tabulka 3.5**.

3.3.3 Polarita látek

Z hlediska kapalinové separace je nutné přihlédnout k několika vlastnostem výbušnin. V systému obrácených fází (RP-LC) je dominantním mechanismem separace látek rozdělování. Látka je rozdělována mezi polární mobilní fázi (nejčastěji binární směs vody a acetonitrilu nebo methanolu) a stacionární fázi, kterou tvoří nepolární řetězce (nejčastěji oktadecyl C18, oktyl C8 nebo fenyl Ph), chemicky vázané na povrch nosiče. Retence látky k tedy bude přímo ovlivněna jejím rozdělovacím koeficientem K a poměrem fází Φ , jak je patrné z rovnice (1), kde X je koncentrace látky ve stacionární, resp. mobilní fázi, V je objem stacionární resp. mobilní fáze.

$$k = K \cdot \Phi = \frac{X_s}{X_m} \cdot \frac{V_s}{V_m} \quad (1)$$

Rozdělovací koeficient je charakteristický pro soustavu analyt-stacionární-mobilní fáze. Důsledkem rozdílného rozdělovacího koeficientu je pak odlišná selektivita α (rovnice (2)) v jednotlivých systémech stacionární-mobilní fáze (**Tabulka 3.6**).

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} \quad (2)$$

Tabulka 3.6 – Retence některých výbušnin v 50% v/v MeOH na různých stacionárních fázích, při 25 °C

| Látka | log $K_{o/w}$ [23] | k | |
|---------|-----------------------|----------|---------|
| | | C18 [24] | CN [25] |
| HMX | 0,82 | 0,5 | 3,2 |
| RDX | 0,87 | 1,5 | 1,9 |
| Tetryl | 1,64 | 3,7 | 2,6 |
| TNT | 1,60 | 4,6 | 1,5 |
| 2,4-DNT | 1,98 | 6,9 | 1,3 |
| 2,6-DNT | 2,10 | 6,4 | 1,3 |
| PETN | 2,38 | 8,5 | 4,6 |
| 4-NT | - | 9,3 | 1,1 |

3.4 Možnosti rychlé a účinné separace

Pro podrobnou analýzu možností urychlení separace je vhodné blíže se zmínit o procesech, probíhajících v koloně. Pokud neuvažujeme monolitické kolony, standardní kolona je plněna určitým typem sypaného sorbentu, nosiče stacionární fáze. Tento sorbent je tvořen křemennými porézními částicemi o určitém průměru a určité velikosti pórů. V RP-LC, jsou na silanolové skupiny na povrchu částice (nosiče) chemicky vázány nepolární řetězce tvořící stacionární fázi.

Prostorem mezi částicemi protéká mobilní fáze. Mobilní fáze vyplňuje také póry nosiče. Zde ale nedochází k jejímu hydraulickému pohybu a tvoří tzv. stagnantní mobilní fázi. Pokud na kolonu dorazí určité množství analytu, jeho koncentrace v mobilní fázi bude v tom momentě větší než ve stagnantní fázi. Je vytvořen koncentrační gradient a molekuly analytu difundují do pórů, kde navíc dochází k jejich rovnovážnému rozdělení mezi stagnantní a stacionární fázi.

Tok mobilní fáze mezičásticovým prostorem mezitím dál unáší analyt, který vlivem rovnováhy zůstal vně pórů a dochází tak k obrácení koncentračního spádu. Analyty tak postupně difundují ze stagnantní fáze do mobilní a při neustálé snaze systému o dosažení rovnováhy jsou uvolňovány i ze stacionární fáze. Tyto procesy se neustále opakují po celé délce toku analytu kolonou a představují tak jakýsi systém dynamických rovnováh.

Rychlost transportu látek mezičásticovým prostorem je přímo úměrná rychlosti toku mobilní fáze kolonou. Rychlost difuzních procesů závisí na teplotě a délce difuzní dráhy.

3.4.1 Zvýšení průtoku mobilní fáze kolonou

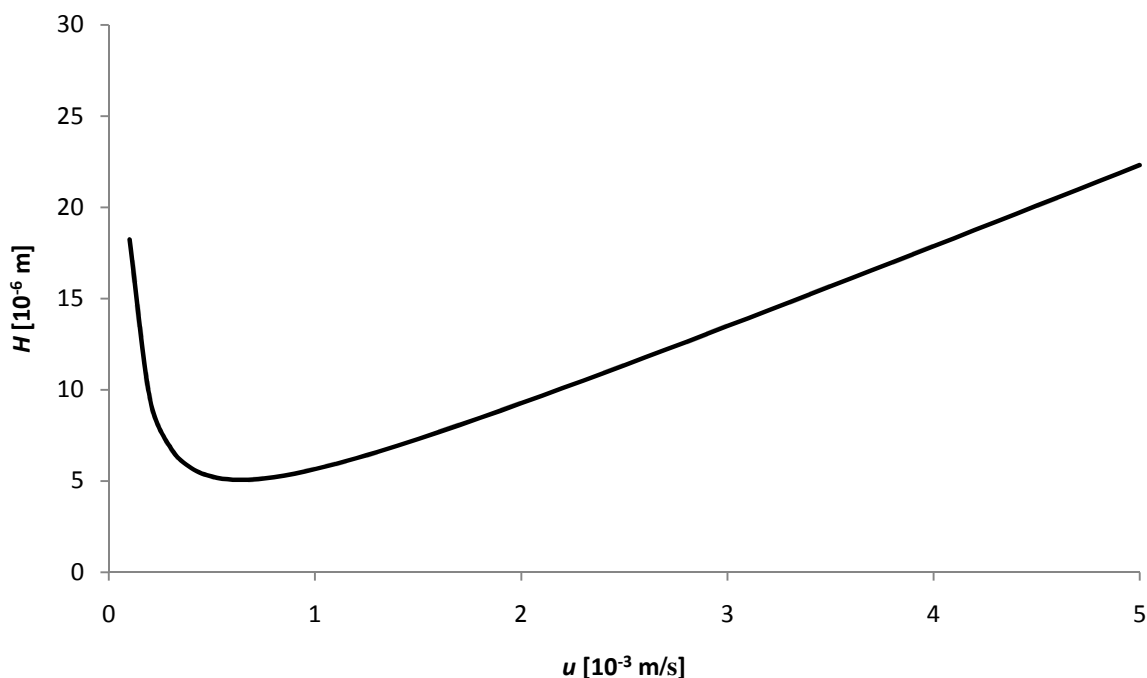
Na HPLC systém, který bude začleněn do přenosného analyzátoru výbušnin, budou kladeny dva základní požadavky. Rychlost separace, pro přiblížení se on-line detekci a účinnost, pro účinnou separaci stopových množství látek. Tyto dva parametry přímo závisí na použité koloně.

Závislost účinnosti chromatografické kolony na lineární rychlosti toku mobilní fáze kolonou se určuje experimentálně, vyhodnocením chromatogramů získaných při různých rychlostech toku mobilní fáze kolonou. Účinnost kolony se nejčastěji vyjadřuje počtem teoretických pater N nebo jako výškový ekvivalent teoretického patra H [26].

$$N = 5,545 \left(\frac{t_r}{w_{1/2}} \right)^2 \quad (3)$$

$$H = \frac{L}{N} \quad (4)$$

Rovnice (3) vyjadřuje závislost N na retenčním čase analytu t_r [s] a šířce píku v polovině jeho výšky $w_{1/2}$ [s]. Dle rovnice (4) je výškový ekvivalent teoretického patra H [m] roven podílu délky kolony L [m] a počtu pater N na ní dosažených.



Obrázek 3.2 – Závislost účinnosti kolony na lineární rychlosti mobilní fáze, $H - u$ křivka

Vynesáním experimentálních dat do grafu je získána křivka charakteristického tvaru, tzv. $H - u$ křivka (**Obrázek. 3.2**). Závislost účinnosti kolony vyjádřené jako H na lineární rychlosti toku mobilní fáze kolonou u popisuje rovnice (5).

$$H = A \cdot u^{0,33} + \frac{B}{u} + C \cdot u \quad (5)$$

Člen A v rovnici (5) představuje vliv turbulentní difuze, člen B zahrnuje příspěvek molekulové difuze a člen C reprezentuje odpor vůči převodu hmoty [27].

Pro řešení rychlé separace je předmětem zájmu průběh $H - u$ křivky kolony při vyšších lineárních rychlostech. Jak je patrné z rovnice (5), při vyšších rychlostech hraje klíčovou roli příspěvek C členu, tedy odpor vůči převodu hmoty. Tento vliv klesá s klesajícím průměrem částic, proto je trendem v kapalinové chromatografii použití stále menších částic. Standardní $5 \mu\text{m}$ částice byly nahrazeny $3 \mu\text{m}$ částicemi a i ty v současně době nahrazují tzv. sub- $2 \mu\text{m}$ částice. Se zmenšujícím se průměrem částic však roste hydraulický odpor kvadraticky a z toho plyne nutnost použití vysokých tlaků (nad 400 bar). Sub- $2 \mu\text{m}$ částice tedy nutně musel doprovázet vývoj nové instrumentace, která je v dnešní době označována jako UPLC.

Cílem chromatografického procesu je dosažení požadovaného rozlišení látek. Rovnice (6) je jedním ze základních vztahů v chromatografii. Rozlišení je funkcí tří parametrů - selektivity α , účinnosti kolony N a kapacitního faktoru k [28]. Kapacitní faktor k a selektivita α jsou charakteristické pro dvojici mobilní a stacionární fáze. Účinnost N závisí na průměru částic náplně d_p , délce kolony L a rychlosti toku mobilní fáze u .

$$R_s = \left(\frac{1}{4}\right) (\alpha - 1) \sqrt{N} \left(\frac{k_1}{1 + k_1}\right) \quad (6)$$

Na zvyšování lineární rychlosti toku mobilní fáze lze nahlížet ze dvou pohledů. Z hlediska separace dochází vlivem rostoucího odporu vůči převodu hmoty ke zhoršení účinnosti. Z hydraulického hlediska je urychlení toku mobilní fáze vždy spojeno s rostoucím odporem proti toku mobilní fáze.

$$u = \frac{B_0 \cdot \Delta p}{\eta \cdot L \cdot \varepsilon_T} \quad (7)$$

Dle Darcyho zákona, rovnice (7), je lineární rychlost toku mobilní fáze kolonou přímo úměrná permeabilitě kolony B_0 [m²], tlakovému spádu na koloně Δp [Pa] a nepřímo úměrná dynamické viskozitě mobilní fáze η [Pa·s], délce kolony L [m] a celkové porozitě náplně kolony ε_T .

Permeabilita kolony B_0 nezávisí na teplotě, rozměrech kolony ani na složení mobilní fáze. Její hodnotu pro kolonu délky L [m] a poloměru r [m] lze získat na základě měření tlaku a průtoku, a dosazením do rovnice (8).

$$B_0 = \frac{F_m \cdot \eta \cdot L}{\Delta p \cdot \pi \cdot r^2} \quad (8)$$

B_0 , L a ε_T jsou parametry konkrétní kolony (**Tabulka 3.7**). Rychlost toku mobilní fáze na konkrétní koloně teda lze zvýšit pouze aplikací vyššího hydraulického tlaku nebo snížením dynamické viskozity mobilní fáze.

Tabulka 3.7 – Permeabilita a celková porozita vybraných kolon

| Kolona | Částice | Permeabilita B_0 [10 ⁻¹⁴ m ²] | Porozita ε_T | Ref. # |
|--------------------------|--------------|---|-----------------------------|--------|
| Zorbax 300 SB C-18, 5 μm | celoporézní. | 1,30 | 0,78 | [30] |
| Kinetex 2,6 μm C18 | povrchově p. | 0,45 | 0,54 | [29] |
| Chromolith RP-C18e | monolit | 7,50 | 0,85 | [30] |

3.4.2 Volba vhodné mobilní fáze

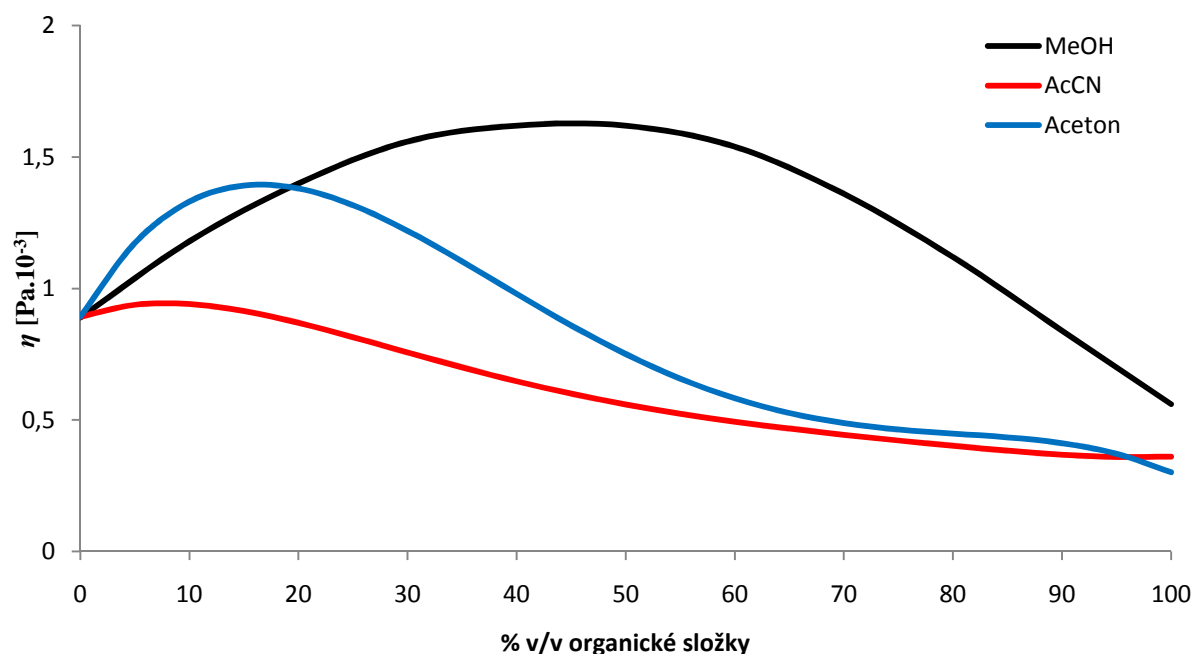
Vhodnost mobilní fáze lze posoudit z hydraulického hlediska i z hlediska separace. Jak již bylo zmíněno výše, lineární rychlost toku mobilní fáze kolonou je nepřímo úměrná dynamické viskozitě konkrétní mobilní fáze. Z tohoto pohledu je tedy výhodné použít mobilní fázi s menší viskozitou.

Jako mobilní fáze se v HPLC používají nejčastěji binární směsi vody a některého organického rozpouštědla (nejčastěji acetonitril a metanol, méně pak tetrahydrofuran nebo aceton).

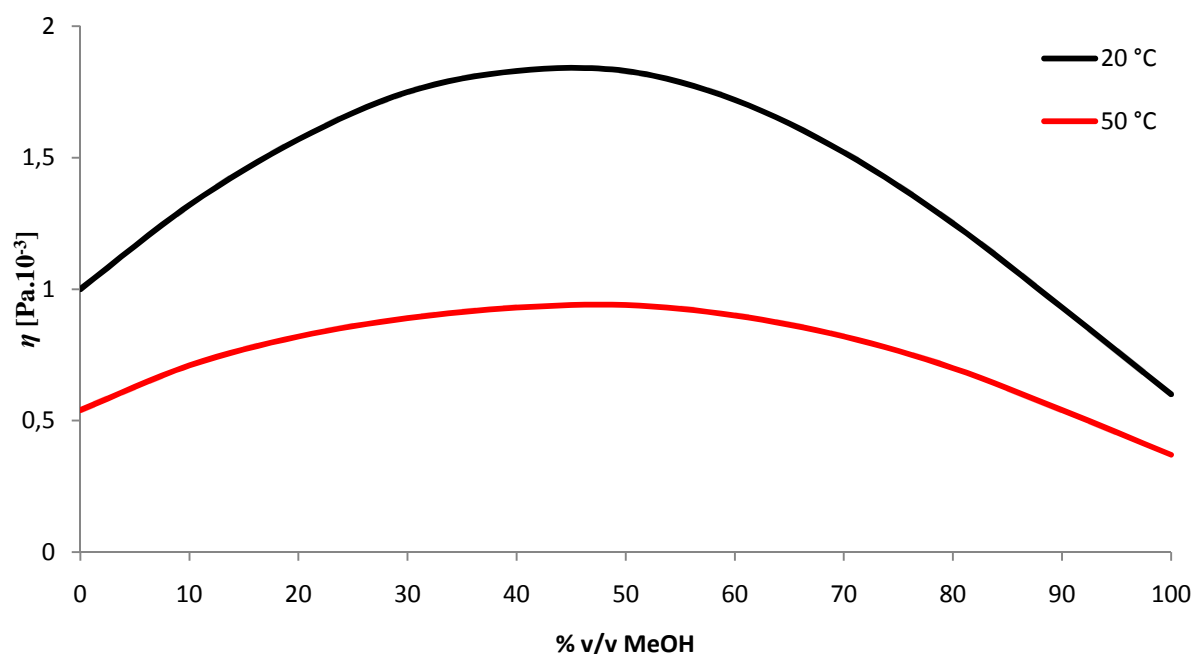
Závislost viskozity na složení prochází u některých směsí maximem, které může mít výrazně vyšší hodnotu než viskozita čistých složek směsi (**Obrázek 3.3**). S touto skutečností je nutno počítat jak při izokratické eluci, tak při navrhování gradientů.

V kapalinové chromatografii hraje mobilní fáze důležitou roli, neboť na rozdíl od plynové chromatografie se zde účastní interakcí s molekulami analytů. Mobilní fáze je charakterizována určitou eluční silou, která závisí na použité organické složce a jejím podílu

ve směsi s vodou. Eluční síla přímo ovlivňuje retenci analytů a tedy i rychlost separace. Typ použitého organického rozpouštědla v mobilní fázi může také výrazně změnit selektivitu systému. Pro separaci výbušnin se používá převážně binární směsi methanol/voda o složení 30-50 % v/v methanolu.



Obrázek 3.3 – Dynamická viskozita binární směsi v závislosti na složení, při 25 °C [31, 32]



Obrázek 3.4 – Vliv teploty na dynamickou viskozitu binární směsi MeOH/voda [32]

3.4.3 Vliv zvýšené teploty

Zvýšení teploty, při které probíhá separace látek, přináší z hlediska urychlování analýzy hned několik pozitiv. Principy vlivu teploty a možnosti urychlení separací byly podrobně popsány

v některých publikacích a člancích [33-35]. Zkráceně lze říci, že teplota ovlivňuje viskozitu mobilní fáze, účinnost separace a retenci analytů.

Dle rovnice (7), je lineární rychlost mobilní fáze kolonou za daného tlaku nepřímo úměrná její dynamické viskozitě. Jak je známo, viskozita kapalin je nepřímo úměrná teplotě. S rostoucí teplotou klesá viskozita mobilní fáze, což umožňuje použití vyšších lineárních rychlostí bez nutnosti zvyšování tlaku v systému. Zvýšená teplota rovněž může částečně eliminovat viskozitní maximum (**Obrázek 3.4**).

Rovnice (5) popisuje účinnost separace jako funkci tří členů. Turbulentní difuze (člen A), molekulové difuze (člen B) a odporu vůči převodu hmoty (člen C). Turbulentní difuze je funkcí velikostní distribuce částic a rovnoměrnosti naplnění kolony. Nezávisí tedy na teplotě. Zbývající dva členy již jsou s teplotou svázány prostřednictvím difuzního koeficientu. Pro molekulovou difuzi platí přímá úměra, zatímco odpor vůči převodu hmoty je nepřímo úměrný difuznímu koeficientu. Dle Wilkeho a Changa je difuzní koeficient D_M , přímo závislý na teplotě [36].

$$D_M = 7,4 \cdot 10^{-8} \frac{\sqrt{\Psi_2 M_2}}{\eta V_1^{0,6}} T \quad (9)$$

V rovnici (9) je V_1 molární objem látky, η je dynamická viskozita mobilní fáze, M_2 je molekulová hmotnost rozpouštědla a Ψ_2 je asociační faktor pro rozpouštědlo.

Zvýšení teploty tedy způsobí změnu průběhu $H - u$ křivky. Nejvyšší dosažitelná účinnost je zachována, dochází ale k posunu optimální lineární rychlosti, při níž je separace nejúčinnější (minimum na křivce), k vyšším hodnotám. Snížení C členu v rovnici má za následek pozvolnější pokles účinnosti směrem k vyšším lineárním rychlostem [37].

S měnící se teplotou dochází tedy i ke změně retence analytu. Tuto závislost popisuje tzv. van't Hoffova rovnice.

$$\ln k = -\frac{\Delta H}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} + \ln \beta \quad (10)$$

V rovnici (10) ΔH a ΔS je entalpie a entropie přestupu látky z mobilní do stacionární fáze, R je ideální plynová konstanta a β je poměr objemů stacionární a mobilní fáze. V RP-HPLC až na vzácné výjimky platí, že zvýšení teploty vždy způsobí zmenšení retence. Parametry ΔH a ΔS rovnice (10) jsou charakteristické pro každou látku, proto změna teploty nevyhnutně způsobí i změnu selektivity α .

3.4.4 Gradientová eluce

Při gradientové eluci dochází v průběhu separace ke změně složení mobilní fáze a tím i ke změně její eluční síly [32, 38]. Gradientová eluce je preferována při separaci složitějších vzorků s velkým rozsahem polarit analytů. Hlavní výhodou oproti izokratické eluci je v těchto případech zlepšení rozlišení nejméně a nejvíce zadržovaných látek, snížení limitu detekce pro více zadržované látky a vyšší píkovaná kapacita.

V gradientové eluci lze optimalizovat více parametrů, proto je vývoj gradientové metody o něco složitější. Retenční faktor je zde zastoupen průměrným retenčním faktorem při gradientových podmínkách k^* , který je dle rovnice (11) přímo úměrný času gradientu t_G , průtoku mobilní fáze F a nepřímo úměrný konstantě S (5 pro malé molekuly), změně obsahu organické složky v mobilní fázi $\Delta\varphi$ a mrtvému objemu kolony V_M .

$$k^* = \frac{\Delta t_G F}{1,15 S \Delta\varphi V_M} \quad (11)$$

Hlavní nevýhodou gradientové eluce je potřeba složitější instrumentace. V minulosti sice byl popsán poměrně jednoduchý způsob tvorby gradientu ve stříkačce [39, 40], avšak v přenosném zařízení by byl i tento způsob částečně omezující. Z hlediska navržení jednoúčelového přenosného HPLC systému pro rychlou separaci vybraných výbušnin bude technicky méně náročné použití izokratické eluce.

3.4.5 Moderní nosiče stacionárních fází

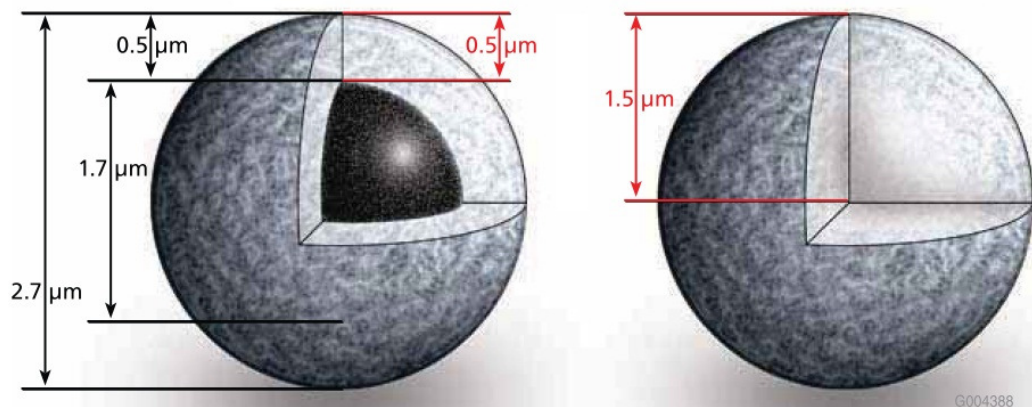
V kapitole 3.4 byla stručně popsána závislost účinnosti separace na lineární rychlosti a souvislost s typem náplně kolony. Optimální kolona pro splnění cíle této práce musí být dostatečně účinná a musí mít předpoklady pro zachování účinnosti i při vysokých lineárních rychlostech. Tuto podmínku splňují již zmiňované sub-2 μm částice používané v UPLC systémech. Tlakový spád Δp [Pa] na koloně je kromě lineární rychlosti mobilní fáze u [m/s], její viskozity η [Pa·s] a délky kolony L [m] také funkcí velikosti částic náplně d_p [m], jak uvádí rovnice (12).

$$\Delta p = \frac{\eta \cdot u \cdot L}{d_p^2} \quad (12)$$

Hydraulický odpor tedy roste kvadraticky se zmenšujícím se průměrem částic náplně. Sub-2 μm částice vyžadují velký tlakový spád (600-1000 bar), jehož vytvoření je energeticky i technicky náročné. Tento typ sorbentu se proto k řešení úkolu této práce nehodí. Reálné možnosti použití představují tzv. povrchově porézní částice a monolity o nichž bude pojednáno dále.

Současným standardem v HPLC jsou náplňové kolony plněné sférickými celoporézními částicemi o průměru 5 a 3 μm , jejichž výroba v úzkém intervalu velikostní distribuce je dobře zvládnuta. Částičky s průměrem < 2 μm jsou pak doménou UPLC [41, 42].

Výrobci kolon se v poslední době pokouší vyplnit mezeru mezi 2 – 3 μm a nabízí určitý kompromis. Na trhu se tak objevily celoporézní částice o průměru 2,8 2,4 a 2,2 μm . Další možnosti jsou povrchově porézní částice druhé generace, které mají pevné jádro pokryté porézní vrstvou (**Obrázek 3.5**). Zvýšení účinnosti bylo dosaženo zkrácením difuzní dráhy, průměr částic nad 2 μm udržuje tlakový spád v mezích přijatelných pro HPLC [43, 44]. Přehled kolon určených pro rychlé a účinné separace je uveden v **Tabulce 3.8**.

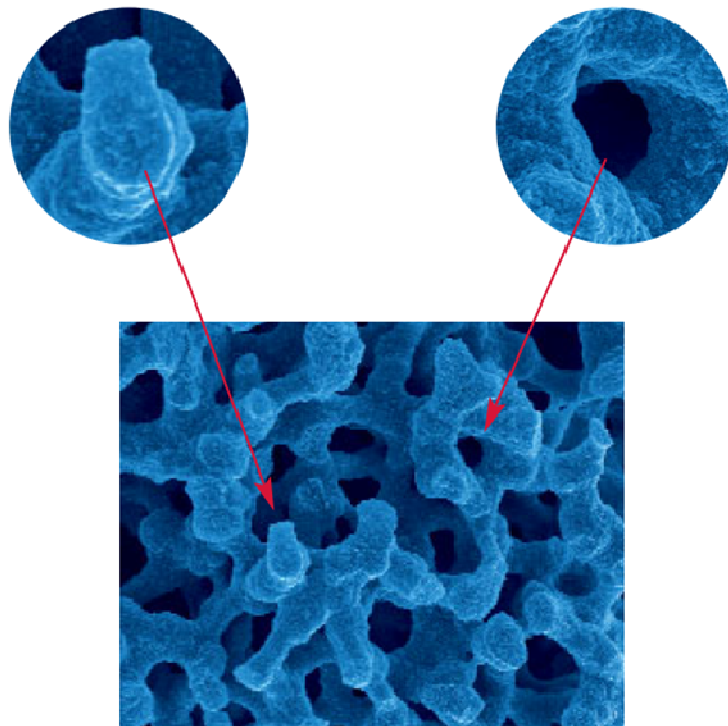


Obrázek 3.5 – Ilustrace povrchově porézní a celoporézní částice

Zcela jiným typem nosiče stacionární fáze jsou monolity. Monolit si lze představit jako kontinuální porézní strukturu vyplňující objem separační kolony. Komerční monolitické kolony na bázi SiO_2 jsou tvořeny monolitickým oxidem křemičitým s bimodální strukturou makro a mesopórů (**Obrázek 3.6**). Makropóry o velikosti $2 \mu\text{m}$ zabezpečují vysokou porozitu kolony a umožňují dosažení vysokých lineárních rychlostí i při nízkém tlakovém spádu. Jemná struktura mesopórů pak vytváří velký aktivní povrch pro vysoce účinnou separaci [45, 46].

Mesopóry 13 nm

Makropóry $2 \mu\text{m}$



Obrázek 3.6 – Struktura monolitu zobrazena elektronovým mikroskopem

Kvalitu kolon lze hodnotit dle tzv. separační impedance E [47]. Tato bezrozměrná veličina v sobě zahrnuje separační účinnost, rychlost analýzy, hydraulický tlak i vliv mobilní fáze. Vztah pro výpočet popisuje rovnice (13), kde t_r je retenční čas látky [s], k je její retenční faktor, Δp je tlakový spád na koloně [Pa], N je počet teoretických pater, H je výškový ekvivalent teoretického patra [m], η je dynamická viskozita [Pa·s] a B_0 je permeabilita kolony [m²]. Čím je hodnota separační impedance E nižší, tím je kolona kvalitnější.

$$E = \frac{t_r \cdot \Delta p}{N^2 \cdot \eta \cdot (1 + k) \cdot \varepsilon_T} = \frac{H^2}{B_0} \quad (13)$$

Tabulka 3.8 – Kolony pro rychlé separace v HPLC a jejich parametry

| Kolona | Výrobce | Náplň | d_p [μm] | Difuzní dráha [μm] | Velikost pórů [Å] | Spec. povrch [m ² /g] |
|-------------------|------------|--------------|---------------|--------------------------|-------------------------|--|
| Pursuit XRs Ultra | Agilent | celoporézní | 2,8 | 1,4 | 100 | 440 |
| Pursuit UPS | Agilent | celoporézní | 2,4 | 1,2 | 100 | 350 |
| Acclaim RSLC | Dionex | celoporézní | 2,2 | 1,1 | 120 | 320 |
| Poroshell 300 | Agilent | povrchově p. | 5 | 0,25 | 300 | 45 |
| HALO | MAC-MOD | povrchově p. | 2,7 | 0,5 | 90 | 150 |
| Poroshell 120 | Agilent | povrchově p. | 2,7 | 0,5 | 120 | 120 |
| Ascentis Express | Supelco | povrchově p. | 2,7 | 0,5 | 90 | 225 |
| Kinetex | Phenomenex | povrchově p. | 2,6 | 0,35 | 100 | 200 |
| Chromolith | Merck | monolit | - | - | 130 | 300 |
| Onyx | Phenomenex | monolit | - | - | 130 | 300 |

3.5 Možnosti citlivé analýzy

Odezva analytického systému obecně závisí na množství analytu a na citlivosti detektoru. Odezvu systému lze tedy zvýšit použitím citlivého detektoru a zakoncentrováním látky.

Ve spojení s plynovým chromatografem jsou pro detekci výbušnin nejčastěji používány hmotnostní spektrometry (MS), spektrometry iontové mobility (IMS) či detektory povrchové akustické vlny (SAW). Mezi nejpoužívanější techniky detekce výbušnin v HPLC patří UV-VIS spektrometrie, hmotnostní spektrometrie a fluorimetrie.

3.5.1 UV-VIS spektrometrie

Široké spektrum analyzovaných látek může činit potíže s výběrem vhodné detekční techniky. Nejhojněji používaným detektorem pro detekce výbušnin v HPLC je UV-VIS detektor. Jeho výhodou je relativní univerzálnost, neboť velké množství látek absorbuje v určité oblasti viditelného nebo UV spektra. Moderní přístroje rozkládají paprsek procházející vzorkem na diodové pole, a dovolují tak sledovat absorbanci při několika vlnových délkách současně.

Výbušniny s aromatickým jádrem (TNT, DNT, Tetryl) a nitraminy (RDX, HMX) jsou obvykle detekovány při vlnové délce 254 nm. Estery kyseliny dusičné (NG, EGDN, PETN)

již nemají výrazné absorpční maximum, detekují se proto při vlnové délce 210 nebo 214 nm. Tato technika má však i jistá omezení. Nutností je použití UV transparentní mobilní fáze a problém činí také organické peroxidy TATP a HMTD, které nelze pomocí UV-VIS spektrometrie spolehlivě detekovat.

3.5.2 Hmotnostní spektrometrie

Poměrně rozšířenou technikou detekce výbušnin v HPLC je také hmotnostní spektrometrie. Po separaci na chromatografické koloně jsou molekuly výbušnin ionizovány a vzniklé ionty jsou analyzovány hmotnostním analyzátozem dle velikosti poměru hmotnosti a náboje (m/z). Nejčastěji používané metody ionizace jsou elektrosprej (ESI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI).

Navzdory značné univerzálnosti hmotnostních spektrometrů, činí spolehlivá detekce některých výbušnin do určité míry problémy. Například stanovení nitroesterů v negativním módu ESI nebo APCI je citlivé na přítomnost nečistot ve vzorku, které mohou způsobit vznik široké škály aduktových iontů. Toto může značně ztížit identifikaci zejména v komplikovaných vzorcích. Pro snížení tohoto vlivu byla studována možnost použití některých aditiv pro přednostní tvorbu a spolehlivou identifikaci aduktových iontů [13, 14]. Další možností jak zabezpečit spolehlivou identifikaci iontů je použití vícenásobným MS systémů. Spolehlivé identifikace trinitrotoluenů a jejich degradačních produktů bylo dosaženo v systému HPLC-ESI-MS/MS [12]. Pro stopovou analýzu organických peroxidů byl zase použit systém HPLC-APCI-MS/MS [48].

3.5.3 Fluorimetrie

Fluorescence je jev, který lze popsat, jako zářivý přechod molekuly v excitovaném stavu do stavu s nižší energií, přičemž rozdíl energií těchto stavů je vyzářen ve formě světelného kvanta. K detekci fluoreskujících látek se využívá fluorimetrický detektor.

Motivací k použití fluorescence je lepší citlivost a selektivita ve srovnání s absorpčními spektrometrickými metodami. Tyto metody srovnávají intenzitu zářivého toku ze zdroje před a po interakci se vzorkem. Odezva je tedy závislá především na koncentraci analytu. U fluorimetrických metod se měří intenzita fluorescence, která mimo koncentrace analytu také závisí na intenzitě záření budícího zdroje. Citlivost tak lze výrazně zvýšit např. použitím laserů (LIF).

Látky používané jako výbušniny přirozeně nefluoreskují. Nitraminy (RDX, HMX), estery kyseliny dusičné (NG, EGDN, PETN) nebo organické peroxidy (TATP, HMTD) mají specifickou nekonjugovanou strukturu, která umožňuje efektivní vibrační relaxaci (nezářivý přechod do základních stavů). Nitroaromáty (TNT, DNT, Tetryl a jiné) sice mají aromatickou strukturu s konjugovanými dvojnými vazbami, avšak nefluoreskují v důsledku silných elektron-akceptorových vlastností vázaných nitroskupin [49].

Pro využití fluorescence k detekci výbušnin v HPLC je tedy zapotřebí určité modifikace. Jednou z možností využití přímé fluorescence je konverze výbušnin na fluoreskující produkty. Po separaci pomocí LC lze například nitrolátky elektrochemicky redukovat na aminy, které následně redukují roztok tris(bipyridyl)ruthenia(III) ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{3+}$) na vysoce fluoreskující $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$. Tímto způsobem byly detekovány RDX, HMX, TNT a jejich degradační

produkty [50]. TATP a HMTD zase lze pomocí UV záření rozložit na peroxid vodíku, který následně katalyzuje oxidaci kyseliny p-hydroxyphenyloctové na fluoreskující dimer [51]. Omezení těchto technik spočívá v poměrně složitém uspořádání. Vysoká selektivita použitých reakcí zase omezuje metodu na poměrně úzké spektrum látek.

Nepřímá fluorescenční detekce využívá zhášení fluorescence určité látky (fluoroforu) v přítomnosti výbušniny. Převládají nezářivé přechody do základních energetických stavů molekul čím je fluorofor je deaktivován. Dle mechanismu deaktivace se rozlišuje zhášení statické a dynamické [52].

Statické zhášení je způsobeno vznikem stabilního komplexu mezi základním stavem fluoroforu a zhášedlem. Dynamické zhášení zahrnuje kolize a následné vytvoření přechodného komplexu mezi fluoroforem v excitovaném stavu a zhášedlem počas trvání excitovaného stavu fluoroforu. Tento typ zhášení popisuje tzv. Stern-Volmerova rovnice.

$$\frac{\Phi_f^0}{\Phi_f} = 1 + K_d C_q \quad (14)$$

V rovnici (14) je Φ_f^0 a Φ_f je kvantový výtěžek fluorescence bez a v přítomnosti zhášeče, K_d je Stern-Volmerova konstanta a C_q je molární koncentrace zhášedla.

Jak již bylo zmíněno výše, nitrolátky jsou silnými elektron-akceptory a vytváří komplex stabilizovaný přenosem náboje mezi nitrolátkou a excitovaným fluoroforem. Praktická realizace spočívá v míchání eluátu se sekundárním tokem obsahujícím fluoreskující látku. Toto uspořádání je poměrně jednoduchou modifikací stávajícího LC systému a umožňuje detekovat širší rozmezí organických i anorganických nitrolátek.

Dobrých výsledků bylo dosaženo při použití roztoku pyrenu [53]. Roztok 2×10^{-4} M pyrenu v acetonitrilu byl míchán s eluátem a byla sledována intenzita LIF. Detekováno bylo všech 14 EPA 8330 standardů. Systém byl srovnán s UV detekcí a bylo zaznamenáno zlepšení selektivity i poměru signál/šum. Úspěšné detekce bylo dosaženo také po separaci EPA 8330 standardů kapilární elektrochromatografií (CEC), kdy byla sledována intenzita LIF barviva Cy-5 [54].

3.5.4 Další techniky detekce

Vzhledem k tomu že organické peroxidy neabsorbují v UV a ve viditelné oblasti a i použití MS občas činí potíže, byla snaha o nalezení optimální metody pro jejich jednoduché a zároveň citlivé detekování. Jako možné řešení bylo úspěšně otestováno spojení HPLC s infračervenou spektrometrií (HPLC-FT-IR) [55]. Peroxidy byly identifikovány na základě charakteristického spektra ve střední infračervené oblasti. V porovnání s ostatními optickými metodami pro stanovení organických peroxidů není nutná jejich derivatizace.

Velmi dobrou citlivost poskytují také detekční postupy založené na principu chemiluminiscence. Chemiluminiscenční techniky jsou považovány za velice perspektivní alternativu detekce výbušnin. Na trhu jsou již dostupné zařízení na přímou chemiluminiscenční detekci par výbušných látek. Postup chemiluminiscenční detekce výbušnin ve spojení s HPLC byl již také popsán. V principu jsou výbušniny detekovány

nepřímo. Po separaci jsou výbušné látky rozloženy a vzniklé rozkladné produkty poskytují chemiluminiscenční reakci s další látkou přidanou za kolonu. Pro přímou detekci par nebo při použití plynové chromatografie je rozklad prováděn pyrolyticky [56]. Pro spojení s HPLC se více osvědčil rozklad pomocí UV záření [57].

Nitroestery (PETN, NG) lze po alkalické hydrolyze detekovat prostřednictvím chemiluminiscenční reakce s 4-dimethylaminophthalhydrazidem. Tímto způsobem lze detekovat až 0,01 ng NG a 1 ng PETN [58]. Často užívanou chemiluminiscenční reakcí je také oxidace luminolu [59]. Luminol oxidují rozkladné produkty nitrolátek a organických peroxidů.

3.5.5 Použití mikrokolon a fokusace vzorku

V souvislosti s miniaturizací přináší další zlepšení odezvy analytického systému zmenšení průměru kolony. Kapalinová chromatografie ve své podstatě zahrnuje naředění vzorku. Na kolonu je nadávkován vzorek o koncentraci látky c_s . Po separaci na koloně je koncentrace analytu v maximu píku c_{max} . Pro izokratickou eluci platí $0 < c_{max}/c_s \leq 1$. Pro Gaussovský tvar píku je c_{max} přímo úměrná dávkovanému množství látky a nepřímo úměrná druhé mocnině průměru kolony [60].

Menší průměr kolony také výrazně snižuje spotřebu rozpouštědla a nižší průtoky bez nutnosti dělení toku zlepšují kompatibilitu s hmotnostní spektrometrií. Menší průměr kolony také umožňuje rychlejší prostup tepla a lepší kontrolu teploty separace. Problém může činit dávkování odpovídajícího objemu vzorku, to však lze jednoduše vyřešit pomocí fokusace (zakoncentrováním) na koloně.

Zakoncentrování vzorku je další možností zvýšení citlivosti analýzy v HPLC. V systému RP-HPLC lze toto obohacení provádět přímo na koloně. K zakoncentrování analytů na začátku kolony dochází, pokud je eluční síla rozpouštědla vzorku menší než eluční síla mobilní fáze. Zakoncentrování látek je nejefektivnější v případě, že matricí vzorku je voda a kolona je promyta vodou. Analyty jsou v podstatě vyextrahovány do stacionární fáze. Tento jev se nazývá fokusační efekt a dovoluje dávkovat i poměrně velké objemy vzorků bez negativních vlivů za normálních podmínek spojených s objemovým přetížením kolony. Přípustný objem fokusovaného vzorku $V_{pc(max)}$ lze odhadnout pomocí rovnice (15), kde $V_{i(max)}$ je maximální objem vzorku pro analýzu bez fokusace, k_0 je retenční faktor látky v rozpouštědle vzorku a k je retenční faktor látky v použité mobilní fázi [61].

$$V_{pc(max)} = V_{i(max)} \frac{k_0 + 1}{k + 1} \quad (15)$$

3.6 Rychlé separace v praxi

3.6.1 Kapalinová chromatografie

Práce s tématem Separace výbušnin pomocí HPLC se soustředí na směs látek uvedených v metodě EPA 8330A. Důraz je kladen na úplnou separaci zvolených látek, přičemž čas analýzy čítá desítky minut. Jistý přehled o potenciální rychlosti separace lze získat z firemní literatury. Lze nalézt kolony, dle výrobce, určené přímo pro separaci výbušnin. Firma Dionex ve svých materiálech uvádí úplnou separaci směsi EPA 8330A na kolonách Acclaim

Explosives E1 a E2 (5 μm částice) v časech 36 minut [62]. Firma Waters udává dosažení úplné separace na koloně XBridge Phenyl v čase 22 minut [63]. Úplné rozlišení směsi v čase 19 minut také uvádí firma Agilent na své koloně Poroshell [64]. Rychlejší analýzy pak již jsou na úkor neúplného rozlišení některých kritických párů, jimiž jsou při použití C18 fáze a methanolu 2,4 a 2,6-DNT, 2-a-4,6-DNT a 4-a-2,6-DNT, NB a 2,4,6-TNT. Společnost MAC-MOD Analytics udává separaci směsi na koloně HALO v čase 3,5 minuty při neúplném rozlišení uvedených párů [65]. Velmi dobrých výsledků dosahuje také kolona Kinetex od firmy Phenomenex, na které bylo v mírném gradientu dosaženo dobré separace uvedených látek kromě dinitrotoluenů [66]. Asi nejrychlejší úplné separace směsi EPA 8330 A standardů včetně HMTD, NG a PETN lze dosáhnout v UPLC systému za necelých 8 minut [67]. Pro monitorovací účely a rychlou separaci byla také testována monolitická kolona Chromolith SpeedRod. V gradientových podmínkách bylo dosaženo rychlé separace HMX, RDX, TNT, 2,4-DNT, 2-NT, 3-NT a PETN v čase 2 minuty [68]. Další informace obsahuje **Tabulka 3.9**.

Tabulka 3.9 – Separace výbušnin na různých kolonách

| Kolona | Rozměry mm×mm | Mobilní fáze | °C | Průtok ml/min | Čas min |
|-----------------------|------------------------------|--------------------|----|------------------|------------|
| Acclaim Explosives E1 | 4,6×250 (5 μm) | 43% MeOH | 30 | 1 | 36 |
| Acclaim Explosives E2 | 4,6×250 (5 μm) | 48% MeOH | 30 | 1 | 36 |
| XBridge Phenyl | 2,1×150 (3,5 μm) | isopropanol | 40 | 0,25 | 22 |
| Poroshell 120 | 2,1×250 (2,7 μm) | 25% MeOH | 44 | 1 | 19 |
| HALO | 2,1×50 (2,7 μm) | 27% MeOH | 40 | 0,85 | 4 |
| Kinetex | 4,6×150 (2,7 μm) | 55-65% MeOH, 6 min | 22 | 1,2 | 5 |
| Acquity UPLC BEH C18 | 2,1×100 (1,7 μm) | 28% MeOH | 55 | - | 8 |
| Chromolith SpeedRod | 4,6×50 | 10-75% MeOH, 5 min | 60 | 8 | 2 |

3.6.2 Další separační techniky

I když je tato práce zaměřena na rychlou separaci výbušnin pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie, je vhodné krátce uvést rychlost separací, které byly dosaženy pomocí jiných separačních technik. Přehled použitých technik, separovaných látek a časů analýz je uveden v **Tabulce 3.10**.

Tabulka 3.10 – Rychlé separace výbušnin při použití vybraných technik

| Technika | Separované látky | min | Ref. # |
|---|--|-----|--------|
| Plynová chromatografie | EGDN, NG, 4-NT, 2,6-DNT, 2,4-DNT 2,4,6-TNT, PETN, RDX, Tetryl | 2,7 | [69] |
| Elektroforéza na mikročipu | TNB, DNB, TNT, 2,4-DNT 2-Am-4,6-DNT a 4-Am-2,6-DNT | 2,3 | [70] |
| Elektroforéza na mikročipu | EGDN, PETN, PGDN a NG | 3 | [71] |
| Kapilární elektrochromatografie | 13 ze 14 analytů směsi EPA 8330 A | 1,8 | [72] |
| Micelární elektrokinetická chromatografie | Směs EPA 8330 A | 4,8 | [73] |

3.7 Problematika přenosného kapalinového chromatografu

Kapalinový chromatograf se skládá z několika základních částí. Jsou to zásobník mobilní fáze, pumpa, dávkovací zařízení, kolona, detektor a vyhodnocovací zařízení. Komerční laboratorní přístroje pak ještě obsahují odplyňovač mobilní fáze, či termostat. Zakomponovat všechny tyto jednotky do přenosného zařízení je poměrně složitý technický problém. Hlavními limitujícími faktory jsou zde fyzické rozměry a energetická náročnost chodu zařízení.

V případě překonání veškerých technických problémů a omezení vyvstává otázka, k jakému účelu se vlastně přenosný kapalinový chromatograf hodí. S miniaturizací a zjednodušením konstrukce je nutně zmenšen i rozsah možného použití, proto jsou taková zařízení často jed nouúčelová.

Myšlenka přenosného kapalinového chromatografu není nová. Již v roce 1980 Pettit a kol. popsal přenosný kapalinový chromatogram pro analýzu pesticidů [74]. Poté následovalo ještě několik prací. V roce 1986 Otagawa a kol. uvedl přenosný kapalinový chromatograf pro analýzu primárních aromatických aminů v syntetických palivech [75]. Sushchik a kol. v roce 1995 popsal použití přenosného kapalinového chromatografu při analýze nitrofenacyl derivátů mastných kyselin [76]. Poslední dostupná práce popisující konstrukci a použití přenosného kapalinového chromatografu pochází z roku 1996 [77]. Malé množství prací a zejména absence novějších potvrzují technickou náročnost řešení a velmi specifické využití takových zařízení.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité přístroje a příslušenství

Kapalinový chromatograf Agilent 1200 series sestávající z:

- Vakuový odplyňovač mobilní fáze G1379B
- Kapilární pumpa G1376A (možnost mikroprůtoku 0,1 – 20 $\mu\text{l}/\text{min}$)
- Autosampler G1377A (dávkovaný objem 0,1 – 8 μl)
- Kolonový termostat G1316A
- DAD detektor G1315D (cela 80 nl)

Chromatografické kolony:

- Poroshell 120 SB-C18, 2,1 \times 50 mm
- Kinetex 2,6 μm C18, 2,1 \times 50 mm
- Zorbax SB-C18, 0,5 \times 150 mm
- Chromolith CapRod RP-18e 0,2 \times 150 mm

4.2 Použité chemikálie

Rozpouštědla:

- Acetonitril, HPLC gradient grade, CHROMALYT, 99,9+ %, Chem-Lab NV
- Methanol LC-MS CHROMASOLV[®], 99,9 %, Riedel-de Haën[®]
- Aceton p.a., 99,5 %, Lach-Ner, s.r.o.

Analytické standardy:

- EPA 8330 mix A, Sigma-Aldrich, 0,1 g/l v acetonitrilu
 - EPA 8330 mix B, Sigma-Aldrich, 0,1 g/l v acetonitrilu
 - NG, 1 g/l v methanolu
 - EGDN, 1 g/l v methanolu
 - DEGDN, 1 g/l v methanolu
 - PETN, 1 g/l v methanolu
 - Směs HMX, RDX, TNT, PETN, 1 g/l v methanolu
- } Technické vzorky

4.3 Studium retenčních charakteristik vybraných látek

Byla proměřena závislost retenčního faktoru k vybraných látek na složení mobilní fáze. Analýzy byly prováděny v HPLC systému Agilent 1200 s DAD detektorem, na koloně Kinetex 2,6 μm s C-18 fází o rozměrech 2,1 \times 50 mm. Studované látky byly připraveny ve třech směsích (**Tabulka 4.1**). Jako markr mrtvého objemu byl v roztocích přítomen uracil o koncentraci 5 mg/l.

Do systému byl nastříknut 1 μl vzorku. Průtok mobilní fáze byl 150 $\mu\text{l}/\text{min}$. Kolonový termostat udržoval konstantní teplotu 25 $^{\circ}\text{C}$. Látky byly detekovány při vlnových délkách 214 nm. Za těchto podmínek byly studovány retenční charakteristiky vybraných látek v závislosti na obsahu organické složky postupně při použití methanolu, acetonitrilu a acetonu jako organické složky v mobilní fázi (**Tabulka 4.2**).

Tabulka 4.1 – Složení analyzovaných směsí

| Směs A 5 mg/l v 10% v/v ACN | Směs B 5 mg/l v 10% v/v ACN | Směs C 10 mg/l v 10% v/v MeOH |
|---------------------------------------|---------------------------------------|---|
| RDX | Tetryl | EGDN |
| HMX | 4-A-2,6-DNT | DEGDN |
| 1,3,5-TNB | 2,6-DNT | NG |
| 1,3-DNB | 2-NT | PETN |
| NB | 3-NT | |
| 2-A-4,6-DNT | 4-NT | |
| 2,4-DNT | | |
| 2,4,6-TNT | | |

Tabulka 4.2 – Studované složení mobilní fáze

| | % v/v organické složky | | | | | |
|--------------------|------------------------|----|----|----|----|----|
| Methanol | 55 | 50 | 45 | 40 | 35 | 30 |
| Acetonitril | 50 | 45 | 40 | 35 | 30 | 25 |
| Aceton | 60 | 55 | 50 | 45 | 40 | 35 |

4.4 Studium vlivu použité organické složky v mobilní fázi na účinnost kolony

Pro posouzení vlivu použité organické složky v mobilní fázi na účinnost kolony byla proměřena závislost výškového ekvivalentu teoretického patra H na lineární rychlosti mobilní fáze u . Pro experimenty byly zvoleny mobilní fáze 55 % v/v methanol, 55% v/v acetonitril a 55% v/v aceton ve vodě. Měření byla provedena v systému Agilent 1200 series s DAD detektorem na koloně Kinetex 2,6 μm C18 2,1 \times 50 mm.

Analyzován byl vzorek s obsahem 0,1 g/l DEGDN rozpuštěný vždy v příslušné mobilní fázi. Látka byla detekována při vlnové délce 214 nm. Měření byla provedena při teplotě 25 °C.

Analýzy byly provedeny při průtocích mobilní fáze 25, 50, 75, 100, 125, 150 a 200 $\mu\text{l}/\text{min}$. Byl zaznamenán retenční čas látky t_r a šířka píku v polovině jeho výšky $w_{1/2}$. Z naměřených dat byl dle rovnice (3) vypočten počet teoretických pater N na dané koloně, jehož dosazením do rovnice (4) byl získán výškový ekvivalent teoretického patra H . Byla provedena regresní analýza získaných dat.

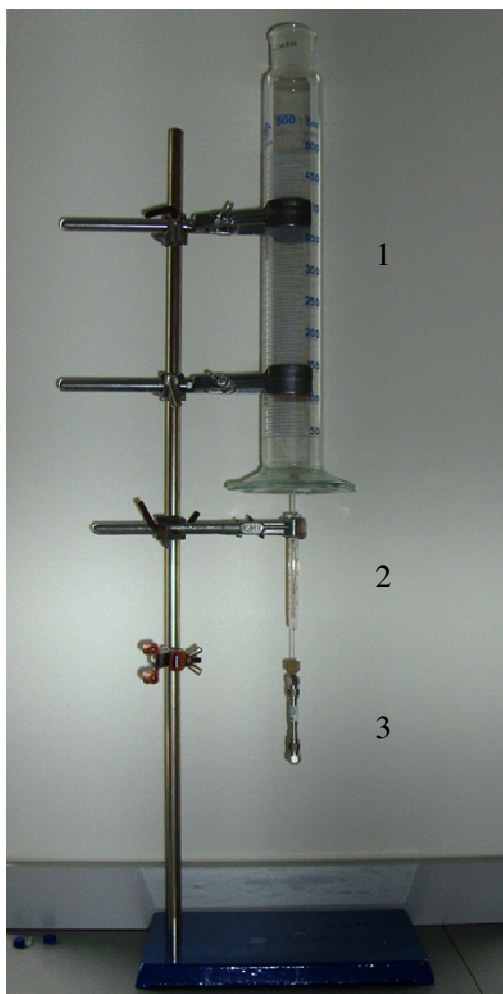
4.5 Charakterizace vybraných kolon

4.5.1 Permeabilita kolon

Pro měření permeability kolony B_0 byla sestavena jednoduchá aparatura (**Obrázek 4.1**). Jako pumpa o konstantním tlaku byla použita soustava injekční stříkačky a závaží. Vybrána byla stříkačka značky Hamilton, pro kterou je charakteristický hladký chod pístu. Tato stříkačka má objem 100 μl , dráha pístku činí 60 mm. Jako závaží byl použit odměrný válec, který byl předem zvážen.

Hydraulický tlak v takovém systému je definovaný plochou pístu a hmotností použitého závaží. Jako pracovní kapalina byl použit aceton. Měření byla prováděna při teplotě 25 °C.

Měřená kolona byla připojena ke stříkačce a byla propláchnuta množstvím acetonu odpovídajícím přibližně trojnásobku geometrického objemu měřené kolony pro důkladné vymytí případných zbytků jiných rozpouštědel. Při vlastním měření permeability bylo uvolněno závaží a byl měřen čas, za který kolonou protekl objem stříkačky (100 μ l). Pro každou kolonu bylo měření provedeno třikrát. Pro výpočet permeability byla průměrná hodnota zaznamenaného průtoku dosazena do rovnice (8). Dle výše uvedeného postupu byla změřena permeabilita všech kolon uvedených v kapitole 4.1.



Obrázek 4.1 – Aparatura pro měření permeability kolony: 1 – závaží, 2 – stříkačka Hamilton, 3 – měřená kolona

4.5.2 Celková porozita kolon

Celková porozita byla určena na základě měření mrtvého objemu kolony. Měření byla prováděna na HPLC systému Agilent 1200 series s DAD detektorem.

Cílem prvního experimentu bylo zjištění mimokolonového objemu systému od místa nástřiku po místo detekce. Jako mobilní fáze byl použit čistý acetonitril, průtok byl nastaven na 10 μ l/min. Ze systému byla vyřazena kolona a bylo nadávkováno 0,1 μ l 1% v/v roztoku

acetonu v acetonitrilu. Aceton byl detekován při vlnové délce 265 nm. Byl zaznamenán čas od nástřiku po zaznamenání maximálního signálu acetonu v detektoru. Experiment byl proveden třikrát. Mimokolonový objem byl vypočten jako součin průměrné hodnoty retenčního času acetonu a objemového průtoku acetonitrilu. Mrtvý objem kolony byl stanoven dle stejného postupu. Do systému byla včleněna měřená kolona a od zjištěné hodnoty mrtvého objemu byl odečten mimokolonový objem.

Celková porozita byla poté vypočtena jako poměr mrtvého objemu kolony a jejího geometrického objemu.

4.5.3 Účinnost kolon

Pro posouzení účinnosti jednotlivých kolon byla proměřena závislost výškového ekvivalentu teoretického patra H na lineární rychlosti mobilní fáze u . Měření byla prováděna v systému Agilent 1200 series s DAD detektorem.

Jako mobilní fáze byl použit 50% v/v MeOH. Analyzován byl vzorek s obsahem 0,1 g/l HMX, RDX, TNT a PETN v 50% v/v MeOH. Dávkovaný objem činil 0,1 μ l. Látky byly detekovány při vlnové délce 214 nm. Měření byly prováděny při teplotě 25 °C. Proměřeny byly kolony Poroshell 120 SB-C18, Kinetex 2,6 μ m C18 a Chromolith CapRod RP-18e.

Při různých průtocích mobilní fáze kolonou (**Tabulka 4.3**) byl pro každou látku zaznamenán retenční čas t_r a šířka píku látky v polovině jeho výšky $w_{1/2}$. Z naměřených dat byl dle rovnice (3) vypočten počet teoretických pater N a jeho dosazením do rovnice (4) byl získán výškový ekvivalent teoretického patra H . Na závěr byla provedena regresní analýza získaných dat.

Tabulka 4.3 – Testované kolony a měřené průtoky

| Kolona | Průtok [μ l/min] | | | | | | |
|--------------------------|-----------------------|----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Chromolith CapRod RP-18e | 1 | 2 | 3 | 5 | 8 | 10 | |
| Poroshell 120 SB-C18 | 25 | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 | 300 |
| Kinetex 2,6 μ m C18 | 25 | 50 | 100 | 150 | 200 | 250 | 300 |

4.6 Optimalizace separace

Optimalizace separačních podmínek pro rychlou separaci výbušnin byla provedena na koloně Chromolith CapRod RP 18-e 0,2 \times 150 mm v HPLC systému Agilent 1200. Do toku mobilní fáze byl dávkován objem vzorku 0,1 μ l. Složení vzorků je uvedeno v **Tabulce 4.1**. Analýzy byly prováděny při průtoku mobilní fáze 20 μ l/min, při teplotě 50 °C a při složení mobilní fáze v intervalu 15-40 % v/v methanolu nebo acetonu ve vodě.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Retenční charakteristiky vybraných látek

Na základě chromatogramů získaných HPLC analýzou směsí vybraných výbušnin při rozdílném složení mobilní fáze byly získány hodnoty retenčních faktorů k těchto látek za podmínek uvedených v kapitole 4.3 (**Tabulka 5.2, 5.4, 5.6**). Tímto způsobem byly studovány retenční charakteristiky všech 14 látek sledovaných dle metody EPA 8330A včetně 4 nitroesterů EGDN, DEGDN, NG a PETN při použití methanolu, acetonitrilu a acetonu jako organické složky mobilní fáze.

Pro účely této práce byly tyto látky rozděleny do dvou skupin (**Tabulka 5.1**). První skupina zahrnuje látky používané jako primární výbušniny, schválené značkovače a prekurzory z výroby výbušnin, které mají detonační schopnost. Tyto látky lze označit jako cílové analyty. Druhá skupina zahrnuje prekurzory výroby, nebo degradační produkty primárních výbušnin, které již mají velmi malou nebo žádnou detonační schopnost. Tyto látky mohou být potenciálním zdrojem interferencí.

Tabulka 5.1 – Praktické rozdělení studovaných látek dle významu

| Cílové analyty | | Potenciální interference |
|----------------|-----------|--------------------------|
| HMX | 1,3,5-TNB | NB |
| RDX | 4-NT | 1,3-DNB |
| 2,4,6-TNT | EGDN | 2-A-4,6-DNT |
| Tetryl | DEGDN | 4-A-2,6-DNT |
| 2,4-DNT | NG | 2-NT |
| 2,6-DNT | PETN | 3-NT |

Závislost přirozeného logaritmu k na složení mobilní fáze $X_{\%}$ je lineární funkce:

$$\ln k = a \cdot X_{\%} + b \quad (16)$$

Lineární regresí přirozených logaritmů hodnot k byly získány parametry rovnice (16) (**Tabulka 5.3, 5.5, 5.7**), jejichž průběh byl pro jednotlivé látky graficky znázorněn (**Obrázek 5.1-5.3**). Cílové analyty reprezentují červené přímky, interferující látky jsou znázorněny černou přerušovanou čarou. Rozdílná selektivita použitých organických složek je také patrná z **Obrázku 5.4**.

Tabulka 5.2 – Retenční faktor látek k při různém obsahu methanolu v mobilní fázi (kolona Kinetex 2,6 μm C18, 25 °C)

| Látka | Složení mobilní fáze [% v/v MeOH] | | | | | |
|-------------|-----------------------------------|-------|-------|------|------|------|
| | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 |
| HMX | 1,14 | 0,88 | 0,64 | 0,46 | 0,33 | 0,25 |
| RDX | 3,19 | 2,51 | 1,87 | 1,39 | 1,02 | 0,75 |
| 1,3,5-TNB | 4,33 | 3,37 | 2,53 | 1,93 | 1,46 | 1,11 |
| 1,3-DNB | 6,89 | 5,22 | 3,85 | 2,86 | 2,11 | 1,56 |
| NB | 9,00 | 6,68 | 4,82 | 3,49 | 2,51 | 1,83 |
| 2-A-4,6-DNT | 17,71 | 12,08 | 8,16 | 5,58 | 3,76 | 2,56 |
| 4-A-2,6-DNT | 18,10 | 12,32 | 8,38 | 5,48 | 3,61 | 2,44 |
| 2,4-DNT | 17,14 | 11,85 | 8,16 | 5,58 | 3,90 | 2,71 |
| 2,6-DNT | 18,10 | 12,32 | 8,58 | 5,75 | 3,87 | 2,68 |
| 2,4,6-TNT | 12,00 | 8,44 | 5,89 | 4,16 | 2,93 | 2,08 |
| Tetryl | 13,17 | 8,84 | 6,01 | 3,94 | 2,60 | 1,75 |
| 2-NT | 23,10 | 15,76 | 10,81 | 7,13 | 4,74 | 3,25 |
| 3-NT | 26,74 | 18,28 | 12,54 | 8,28 | 5,52 | 3,78 |
| 4-NT | 24,36 | 16,58 | 11,37 | 7,51 | 5,01 | 3,44 |
| EGDN | 2,79 | 2,30 | 1,88 | 1,47 | 1,13 | 0,87 |
| DEGDN | 4,14 | 3,17 | 2,44 | 1,81 | 1,34 | 0,99 |
| NG | 11,00 | 8,24 | 6,04 | 4,30 | 2,98 | 2,09 |
| PETN | 31,88 | 22,03 | 15,14 | 9,92 | 6,42 | 4,21 |

Tabulka 5.3 – Vypočtené konstanty rovnice (16) pro metanol, při 25 °C

| Látka | a | b | R^2 |
|-------------|---------|--------|--------|
| HMX | -0,0624 | 2,0292 | 0,9988 |
| RMX | -0,0586 | 2,9519 | 0,9984 |
| 1,3,5-TNB | -0,0549 | 3,1241 | 0,9998 |
| 1,3-DNB | -0,0596 | 3,7289 | 0,9998 |
| NB | -0,0642 | 4,1353 | 0,9998 |
| 2-A-4,6-DNT | -0,0774 | 5,1966 | 1,0000 |
| 4-A-2,6-DNT | -0,0808 | 5,3350 | 0,9997 |
| 2,4-DNT | -0,0739 | 5,0565 | 0,9999 |
| 2,6-DNT | -0,0767 | 5,2020 | 0,9998 |
| 2,4,6-TNT | -0,0702 | 4,5879 | 0,9999 |
| Tetryl | -0,0811 | 5,0181 | 0,9998 |
| 2-NT | -0,0790 | 5,5202 | 0,9997 |
| 3-NT | -0,0788 | 5,6619 | 0,9997 |
| 4-NT | -0,0788 | 5,5659 | 0,9998 |
| EGDN | -0,0469 | 2,4683 | 0,9956 |
| DEGDN | -0,0574 | 3,1629 | 0,9991 |
| NG | -0,0669 | 4,4407 | 0,9980 |
| PETN | -0,0814 | 5,9373 | 0,9988 |

Tabulka 5.4 – Retenční faktor látek k při různém obsahu acetonitrilu v mobilní fázi (kolona Kinetex 2,6 μm C18, 25 °C)

| Látka | Složení mobilní fáze [% v/v ACN] | | | | | |
|-------------|----------------------------------|-------|-------|-------|------|------|
| | 25 | 30 | 35 | 40 | 45 | 50 |
| HMX | 7,88 | 5,00 | 3,21 | 2,04 | 1,43 | 1,02 |
| RDX | 6,48 | 4,32 | 2,92 | 2,04 | 1,43 | 1,02 |
| 1,3,5-TNB | 9,72 | 6,94 | 4,88 | 3,35 | 2,40 | 1,71 |
| 1,3-DNB | 9,69 | 6,70 | 4,62 | 3,20 | 2,40 | 1,71 |
| NB | 9,72 | 6,94 | 4,88 | 3,35 | 2,40 | 1,71 |
| 2-A-4,6-DNT | 17,67 | 10,39 | 6,32 | 3,95 | 2,66 | 1,71 |
| 4-A-2,6-DNT | 18,98 | 11,03 | 6,62 | 4,14 | 2,62 | 1,85 |
| 2,4-DNT | 20,20 | 12,59 | 7,95 | 5,08 | 3,46 | 2,39 |
| 2,6-DNT | 21,57 | 13,23 | 8,21 | 5,28 | 3,45 | 2,39 |
| 2,4,6-TNT | 24,46 | 15,53 | 9,70 | 6,03 | 3,95 | 2,62 |
| Tetryl | 31,21 | 18,28 | 10,82 | 6,43 | 4,05 | 2,89 |
| 2-NT | 20,50 | 12,85 | 8,21 | 5,28 | 3,45 | 2,39 |
| 3-NT | 21,57 | 14,64 | 9,30 | 6,07 | 3,91 | 2,89 |
| 4-NT | 23,53 | 13,23 | 8,67 | 5,70 | 3,65 | 2,74 |
| EGDN | 6,68 | 4,94 | 3,56 | 2,54 | 1,81 | 1,33 |
| DEGDN | 9,84 | 6,80 | 4,65 | 3,17 | 2,18 | 1,55 |
| NG | 29,62 | 18,28 | 10,82 | 6,43 | 4,05 | 2,89 |
| PETN | | 76,00 | 37,23 | 18,31 | 9,54 | 5,34 |

Tabulka 5.5 – Vypočtené konstanty rovnice (16) pro acetonitril, při 25 °C

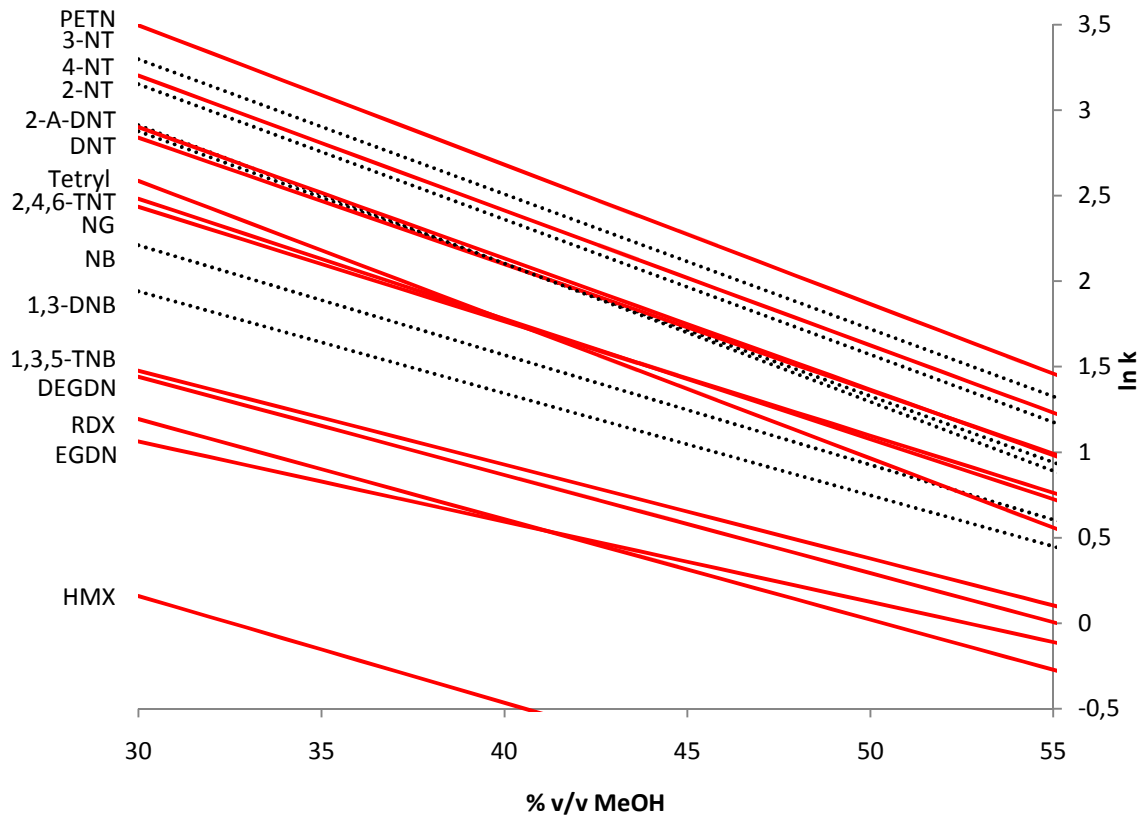
| Látka | a | b | R^2 |
|-------------|---------|--------|--------|
| HMX | -0,0825 | 4,0830 | 0,9962 |
| RDX | -0,0739 | 3,6867 | 0,9989 |
| 1,3,5-TNB | -0,0701 | 4,0295 | 0,9998 |
| 1,3-DNB | -0,0694 | 3,9805 | 0,9982 |
| NB | -0,0701 | 4,0295 | 0,9998 |
| 2-A-4,6-DNT | -0,0928 | 5,1379 | 0,9974 |
| 4-A-2,6-DNT | -0,0938 | 5,2230 | 0,9954 |
| 2,4-DNT | -0,0857 | 5,1054 | 0,9974 |
| 2,6-DNT | -0,0884 | 5,2380 | 0,9976 |
| 2,4,6-TNT | -0,0900 | 5,4329 | 0,9992 |
| Tetryl | -0,0968 | 5,8062 | 0,9949 |
| 2-NT | -0,0865 | 5,1509 | 0,9986 |
| 3-NT | -0,0826 | 5,1309 | 0,9974 |
| 4-NT | -0,0859 | 5,2111 | 0,9921 |
| EGDN | -0,0651 | 3,5400 | 0,9997 |
| DEGDN | -0,0744 | 4,1422 | 0,9997 |
| NG | -0,0954 | 5,7417 | 0,9958 |
| PETN | -0,1335 | 8,2957 | 0,9982 |

Tabulka 5.6 – Retenční faktor látek k při různém obsahu acetonu v mobilní fázi (kolona Kinetex 2,6 μm C18, 25 °C)

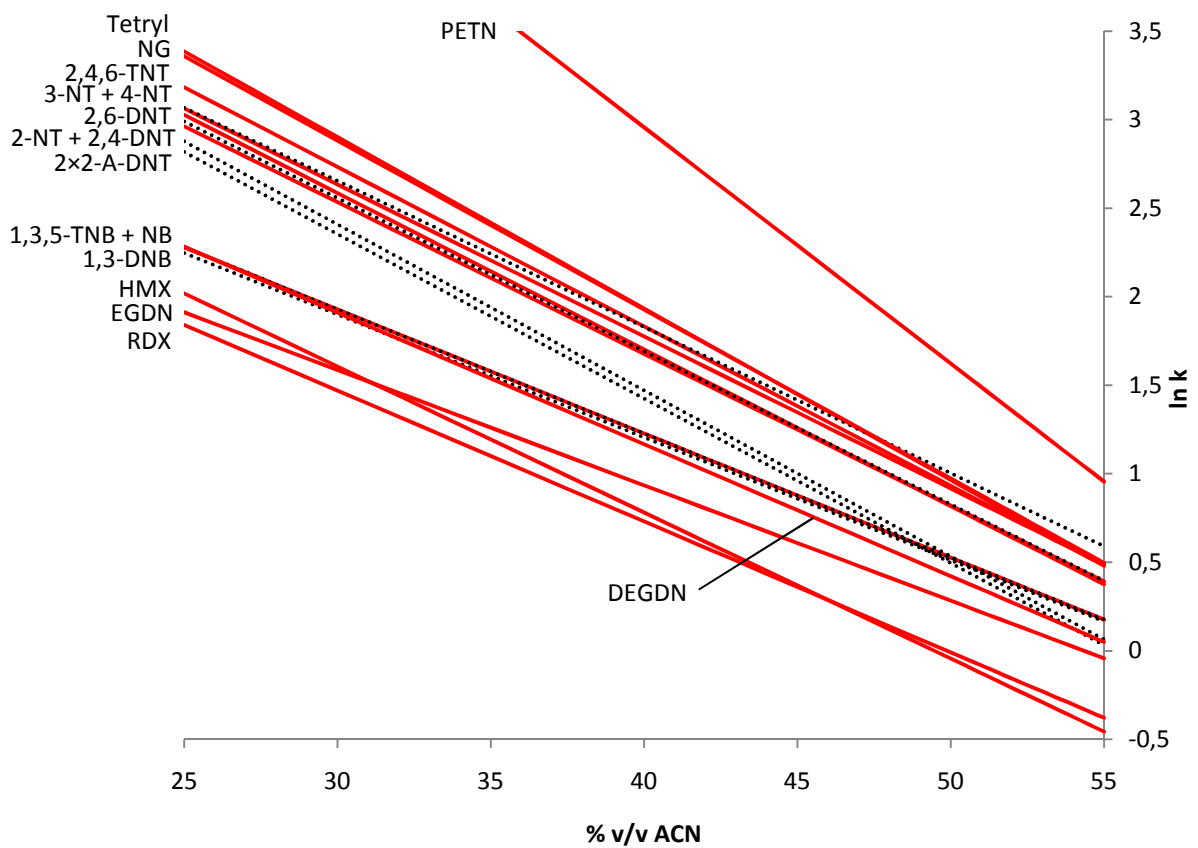
| Látka | Složení mobilní fáze [% v/v aceton] | | | | | |
|-------------|-------------------------------------|-------|-------|-------|------|------|
| | 35 | 40 | 45 | 50 | 55 | 60 |
| HMX | 5,39 | 3,31 | 2,05 | 1,24 | 0,79 | |
| RDX | 5,87 | 3,93 | 2,52 | 1,58 | 1,02 | |
| 1,3,5-TNB | 6,03 | 4,55 | 3,39 | 2,38 | 1,68 | |
| 1,3-DNB | 6,18 | 4,15 | 2,96 | 2,03 | 1,43 | |
| NB | 4,95 | 3,50 | 2,52 | 1,83 | 1,25 | |
| 2-A-4,6-DNT | 15,23 | 9,23 | 5,68 | 3,41 | 2,14 | |
| 4-A-2,6-DNT | 16,14 | 9,63 | 5,93 | 3,51 | 2,14 | |
| 2,4-DNT | 10,68 | 7,04 | 4,72 | 3,08 | 2,14 | |
| 2,6-DNT | 11,24 | 7,28 | 4,81 | 3,08 | 2,14 | |
| 2,4,6-TNT | 12,95 | 9,03 | 6,21 | 4,05 | 2,68 | |
| Tetryl | 19,21 | 11,60 | 7,13 | 4,21 | 2,54 | |
| 2-NT | 9,68 | 6,39 | 4,35 | 2,89 | 2,04 | |
| 3-NT | 10,68 | 7,04 | 4,73 | 3,08 | 2,04 | |
| 4-NT | 9,26 | 6,06 | 4,10 | 2,72 | 1,83 | |
| EGDN | 4,58 | 3,31 | 2,42 | 1,66 | 1,17 | |
| DEGDN | 5,65 | 3,93 | 2,75 | 1,83 | 1,25 | |
| NG | 20,62 | 12,85 | 8,04 | 4,79 | 2,90 | |
| PETN | | 54,11 | 29,33 | 15,35 | 7,96 | 4,14 |

Tabulka 5.7 – Vypočtené konstanty rovnice (16) pro aceton, při 25 °C

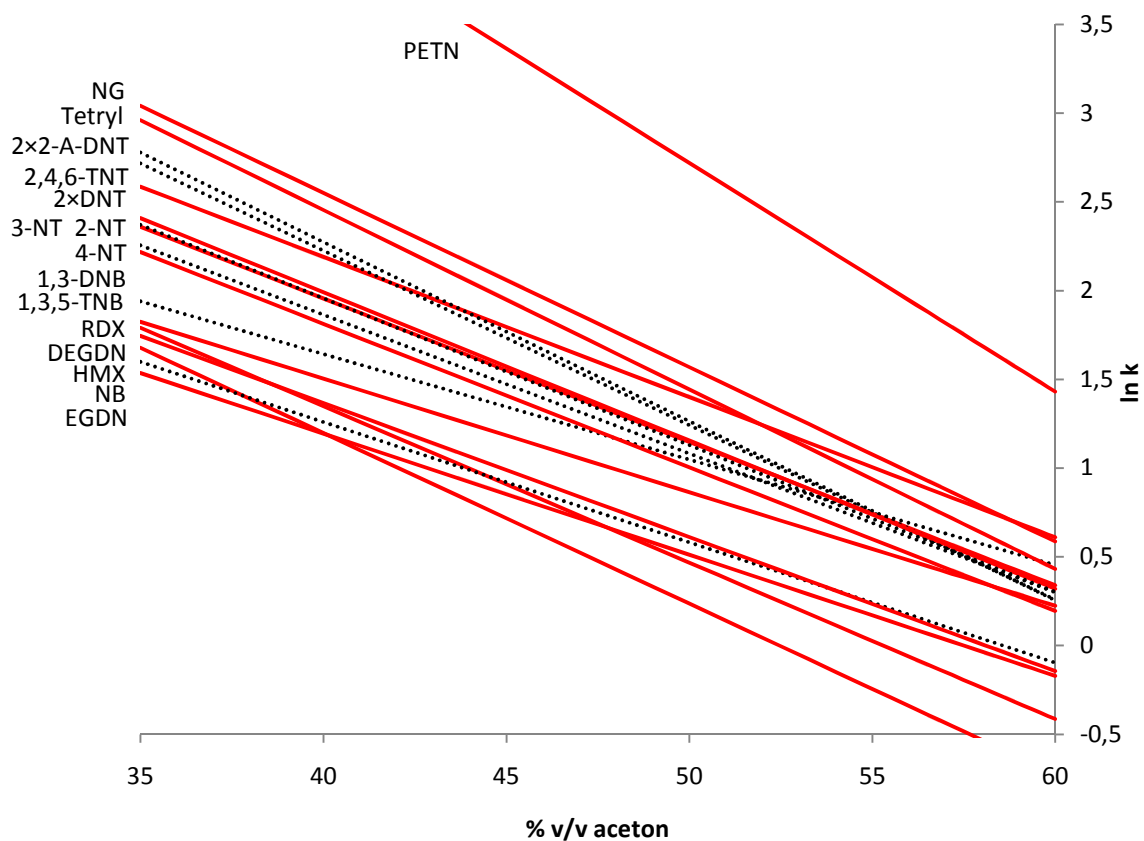
| Látka | a | b | R^2 |
|-------------|---------|--------|--------|
| HMX | -0,0962 | 5,0441 | 0,9997 |
| RDX | -0,0881 | 4,8738 | 0,9994 |
| 1,3,5-TNB | -0,0640 | 4,0649 | 0,9972 |
| 1,3-DNB | -0,0594 | 4,0182 | 0,9997 |
| NB | -0,0678 | 3,9736 | 0,9992 |
| 2-A-4,6-DNT | -0,0984 | 6,1613 | 0,9998 |
| 4-A-2,6-DNT | -0,1010 | 6,3120 | 0,9999 |
| 2,4-DNT | -0,0808 | 5,1872 | 0,9995 |
| 2,6-DNT | -0,0835 | 5,3297 | 0,9991 |
| 2,4,6-TNT | -0,0790 | 5,3490 | 0,9987 |
| Tetryl | -0,1011 | 6,4995 | 0,9999 |
| 2-NT | -0,0782 | 4,9919 | 0,9992 |
| 3-NT | -0,0828 | 5,2669 | 0,9999 |
| 4-NT | -0,0809 | 5,0501 | 0,9998 |
| EGDN | -0,0682 | 3,9252 | 0,9988 |
| DEGDN | -0,0755 | 4,3872 | 0,9995 |
| NG | -0,0982 | 6,4772 | 0,9996 |
| PETN | -0,1289 | 9,1624 | 0,9998 |



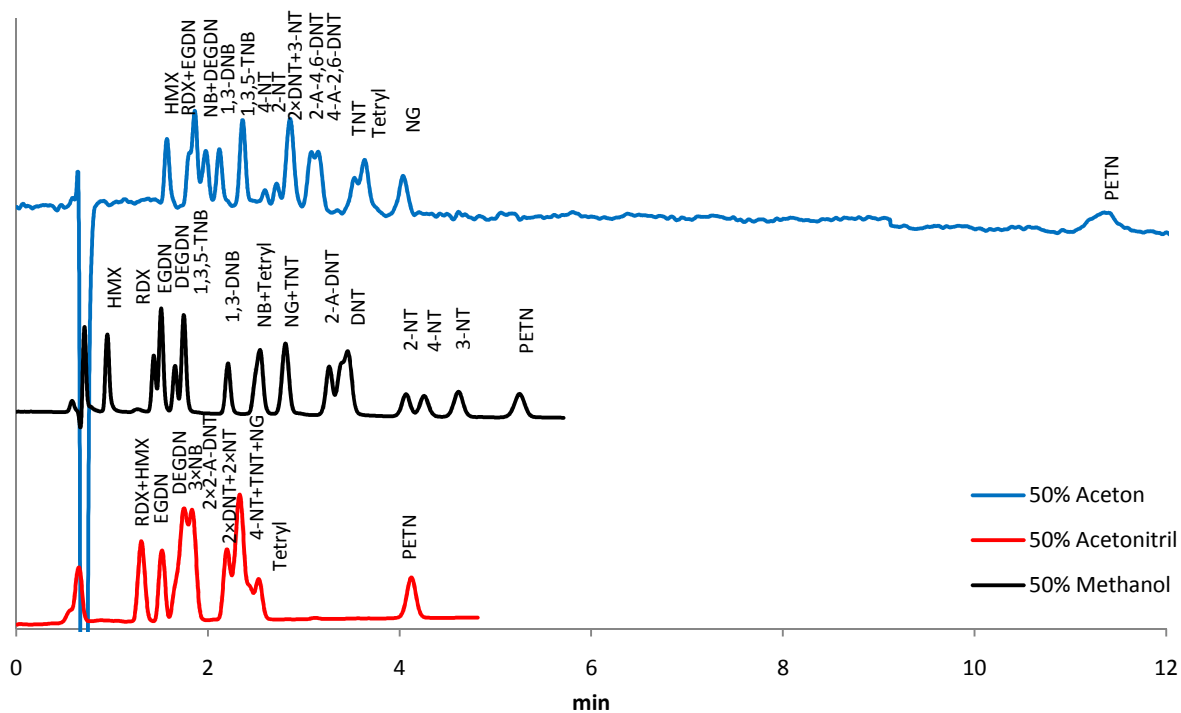
Obrázek 5.1 – Závislost $\ln k$ na obsahu methanolu v mobilní fázi



Obrázek 5.2 – Závislost $\ln k$ na obsahu acetonitrilu v mobilní fázi



Obrázek 5.3 – Závislost $\ln k$ na obsahu acetonu v mobilní fázi



Obrázek 5.4 – Ukázka rozdílné selektivity acetonu, acetonitrilu a methanolu (Agilent 1200, kolona Kinetex 2,6 μm C-18 2,1 \times 50 mm, 150 $\mu\text{l}/\text{min}$, 25 $^{\circ}\text{C}$, 214 nm)

Směs methanolu a vody je nejpoužívanější mobilní fází při separaci výbušnin na C18 fázi. Methanol poskytuje dobrou selektivitu pro všechny studované látky i při poměrně vysokém obsahu metanolu v mobilní fázi (**Obrázek 5.1**). V 50-55% v/v methanolu lze spolehlivě rozlišit cílové analyty a interferující látky. Kritickým párem jsou 2,4 a 2,6-DNT jejichž rozlišení ale není rozhodující, neboť ve výbušné směsi jsou téměř vždy přítomny oba izomery.

Nevýhodou methanolu a jeho směsi s vodou je poměrně vysoká viskozita (**Obrázek 3.3**). Konstrukce miniaturizovaného kapalinového chromatografu pro rychlou separaci výbušnin je limitována tlakem, který musí být vyvinut pro rychlý tok mobilní fáze kolonou. Pro zabudování do přenosného analyzátoru výbušnin je limitujícím požadavkem energetická náročnost kapalinového chromatografu, která je přímo úměrná pracovnímu tlaku. Z těchto požadavků plyne motivace použít mobilní fázi s nižší viskozitou, například acetonitril nebo aceton. Průběh viskozity jejich směsí s vodou v závislosti na složení je ve srovnání s methanolem mnohem příznivější (**Obrázek 3.3**).

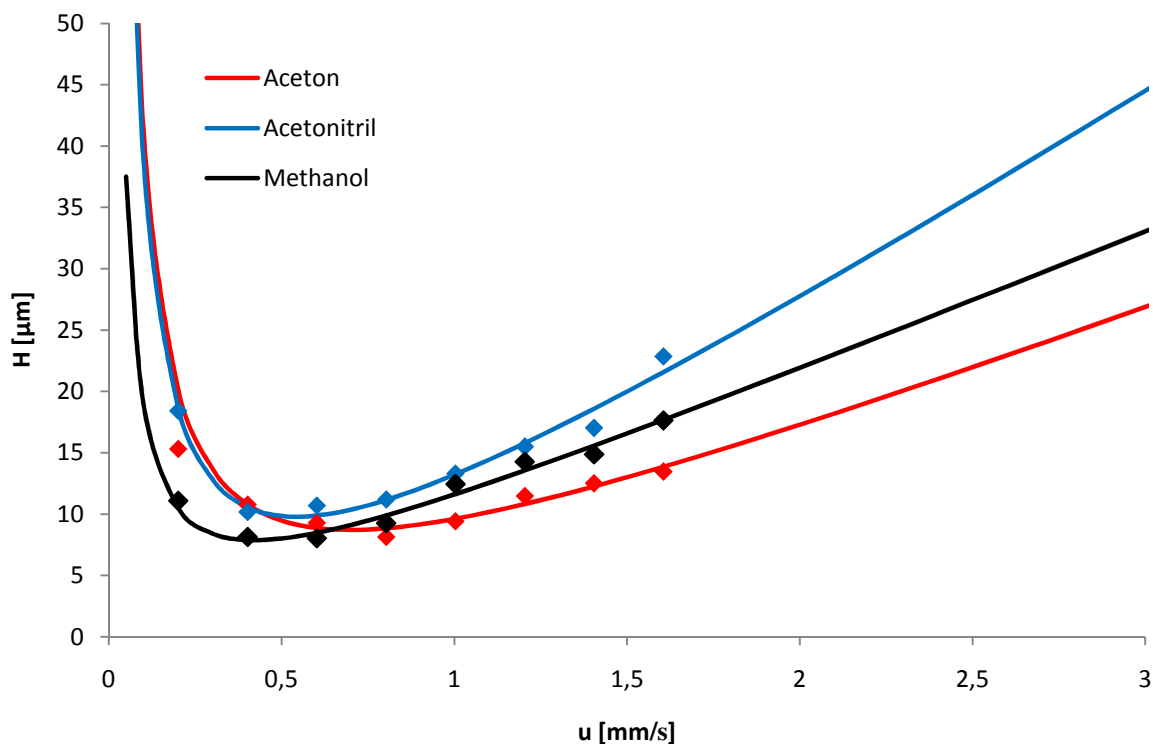
Směs vody a acetonitrilu je pro separace výbušnin používána poměrně zřídka. Důvod je patrný z **Obrázku 5.2**. PETN má poměrně vysoký retenční faktor k v porovnání s ostatními látkami, který s klesajícím obsahem acetonitrilu navíc prudce roste. Ve zvoleném intervalu obsahu acetonitrilu v mobilní fázi navíc nebylo dosaženo uspokojivého rozlišení cílových látek. Značný je vliv interferujících látek, například 1,3,5-TNB nelze spolehlivě rozlišit od NB a 1,3-DNB. Dále nelze spolehlivě rozlišit 2-NT a 2,4-DNT či 3-NT a 4-NT. Lze konstatovat, že pro rychlou izokratickou separaci dané směsi je acetonitril nevhodný, neboť nebylo nalezeno takové složení mobilní fáze, ve kterém by bylo možné uspokojivě rozlišit cílové analyty a interferující látky v kombinaci s přijatelnou retencí PETN.

Použití acetonu při separaci výbušnin nebylo v literatuře doposud zaznamenáno. V obecné praxi k tomuto kroku ani nebyl důvod. V methanolu lze dosáhnout dobrých výsledků a aceton v UV oblasti absorbuje. **Obrázek 5.3** znázorňuje retenci látek v intervalu obsahu acetonu v mobilní fázi 36-60 % v/v. PETN obdobně jako v acetonitrilu vykazuje značný odstup retenčního faktoru k od ostatních látek, ale možnosti rozlišení ostatních látek jsou daleko lepší. Pro rychlou izokratickou separaci se jeví nejvhodnější použití 55% v/v acetonu ve vodě. Při tomto složení lze od sebe rozlišit všechny cílové analyty kromě dinitrotoluenů. Jednoznačně lze identifikovat všechny cílové analyty kromě DEGDN jehož retence je shodná s NB. Také dinitrotolueny mohou být překryty 2-a-DNT nebo 2-NT či 3-NT.

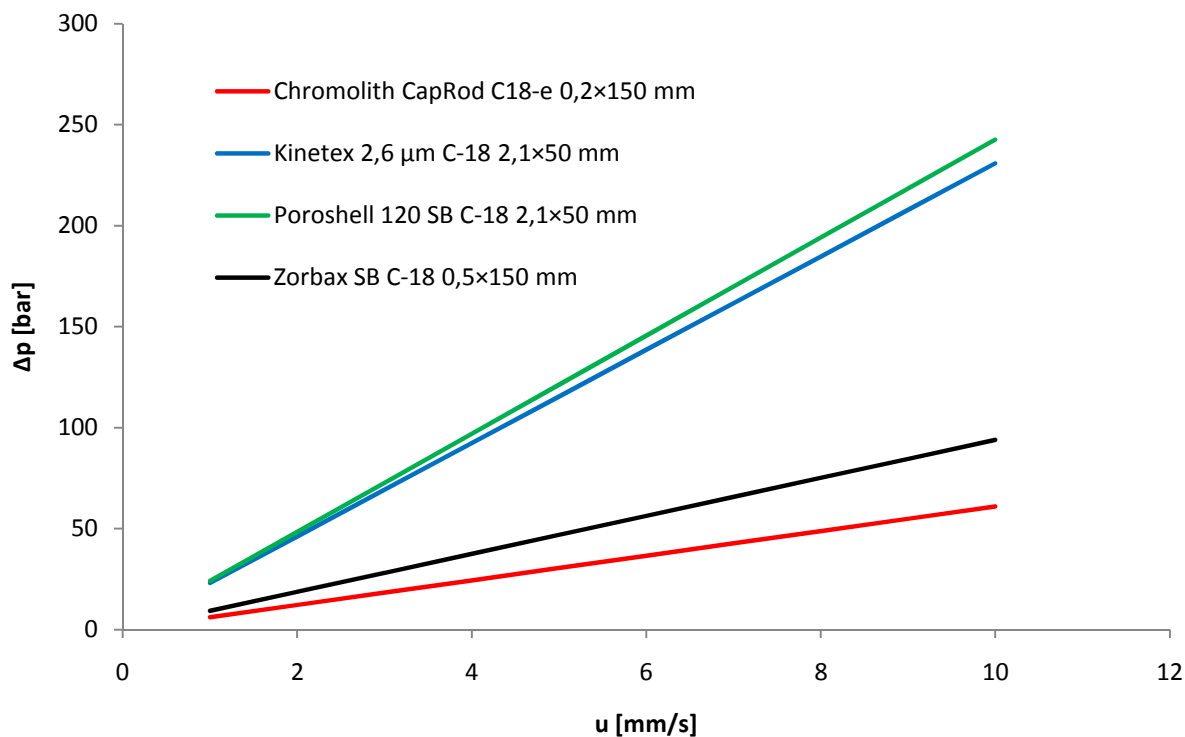
5.2 Vliv použité organické složky v mobilní fázi na účinnost kolony

Účinnost kolony byla v rovnici (5) vyjádřena jako funkce turbulentní difuze, molekulové difuze a odporu vůči převodu hmoty. Molekulová difuze je přímo úměrná difuznímu koeficientu, odpor vůči převodu hmoty je difuznímu koeficientu nepřímo úměrný. Difuzní koeficient je funkcí složení mobilní fáze, z tohoto důvodu lze pro methanol, acetonitril a aceton očekávat rozdílný tvar $H - u$ křivky. Pro testování byla použita kolona Kinetex 2,6 μm C18 a látka DEGDN. Byla studována účinnost kolony při použití mobilní fáze o složení 55 % v/v organické složky ve vodě. Experimentální závislost výškového ekvivalentu teoretického patra H na lineární rychlosti toku mobilní fáze kolonou je znázorněna na **Obrázku 5.5**. Minimum $H - u$ křivek se nachází v intervalu 0,25 až 0,75 mm/s. Rozdíly

mezi průběhem křivek nejsou velké, avšak při vyšších lineárních rychlostech poskytuje testovaná kolona vyšší účinnosti při použití mobilní fáze obsahující methanol a aceton.



Obrázek 5.5 – $H - u$ křivky pro látku DEGDN a mobilní fáze 55 % v/v aceton, acetonitril a methanol (Agilent 1200, kolona Kinetex 2,6 μm C-18 2,1 \times 50mm, 25 °C, 214 nm)



Obrázek 5.6 – Modelová závislost tlakového spádu na koloně na lineární rychlosti toku mobilní fáze kolonou (50% v/v MeOH, 25 °C, 0,32 mPa·s)

5.3 Volba vhodné kolony

5.3.1 Hydraulické vlastnosti kolon

Permeabilita B_0 a celková porozita ε_T jsou důležité veličiny z hlediska modelování hydrauliky toku mobilní fáze kolonou. Hydraulický odpor kolony je důležitý parametr při konstrukci přenosného kapalinového chromatografu. Menší hydraulický odpor dovoluje dosáhnout vyšších průtoků mobilní fáze při stejném tlaku, což vede ke zrychlení separace a zkrácení času nutného pro analýzu. Nízký hydraulický odpor kolony tak snižuje tlak potřebný pro dosažení určité lineární rychlosti toku mobilní fáze kolonou, čím je snížena energetická náročnost systému.

Naměřené hodnoty jsou uvedeny v **Tabulce 5.8**. Po dosazení parametrů do rovnice (8) byl získán modelový průběh závislosti hydraulického odporu kolony Δp na lineární rychlosti toku mobilní fáze u (**Obrázek 5.6**).

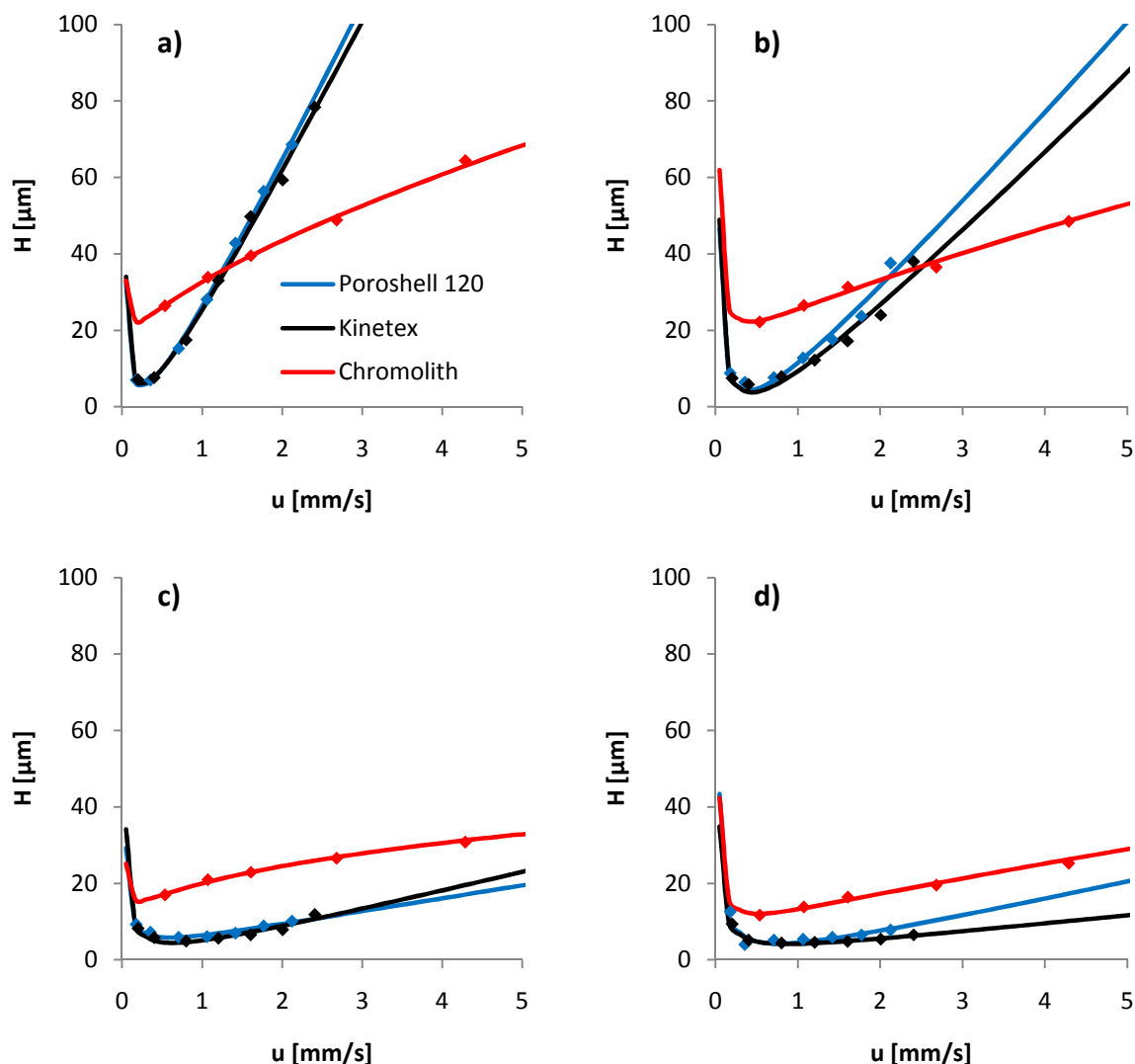
Jednoznačně nejlepší hydraulické vlastnosti má kolona Chromolith CapRod C18-e. Její vysoká permeabilita i porozita zaručují nízký hydraulický odpor i při poměrně vysokých průtocích mobilní fáze. Z kolon plněných povrchově porézními částicemi poskytuje při stejné lineární rychlosti toku mobilní fáze nižší hydraulický odpor kolona Kinetex 2,6 μm C18. Pro srovnání jsou uvedeny výsledky pro kolonu Zorbax SB-C18, která je plněna standardním 5 μm sorbentem.

Tabulka 5.8 – Permeabilita a celková porozita testovaných kolon

| Kolona | Permeabilita B_0 [10^{-14} m^2] | Porozita ε_T |
|-------------------------------|--|-----------------------------|
| Zorbax SB C-18 | 3,6 | 0,70 |
| Poroshell 120 SB-C18 | 0,45 | 0,68 |
| Kinetex 2,6 μm C18 | 0,41 | 0,60 |
| Chromolith CapRod C18-e | 7,8 | 0,99 |

Tabulka 5.9 – Vypočtené konstanty rovnice (5)

| Kolona | | HMX | RDX | TNT | PETN |
|-------------------------|---|----------|----------|----------|----------|
| Poroshell 120 SB C-18 | A | -2,077 | -1,718 | 0,1813 | -0,2618 |
| | B | 1689 | 2584 | 1419 | 2206 |
| | C | 0,04461 | 0,0257 | 0,003232 | 0,004888 |
| Kinetex 2,6 C-18 | A | -1,966 | -1,670 | -0,1803 | 0,03751 |
| | B | 1952 | 2694 | 1728 | 1731 |
| | C | 0,04257 | 0,02296 | 0,005139 | 0,002142 |
| Chromolith CapRod C18-e | A | 2,770 | 1,907 | 1,944 | 0,8647 |
| | B | 1134 | 2738 | 899,8 | 1952 |
| | C | 0,004433 | 0,004161 | 0,000 | 0,002831 |

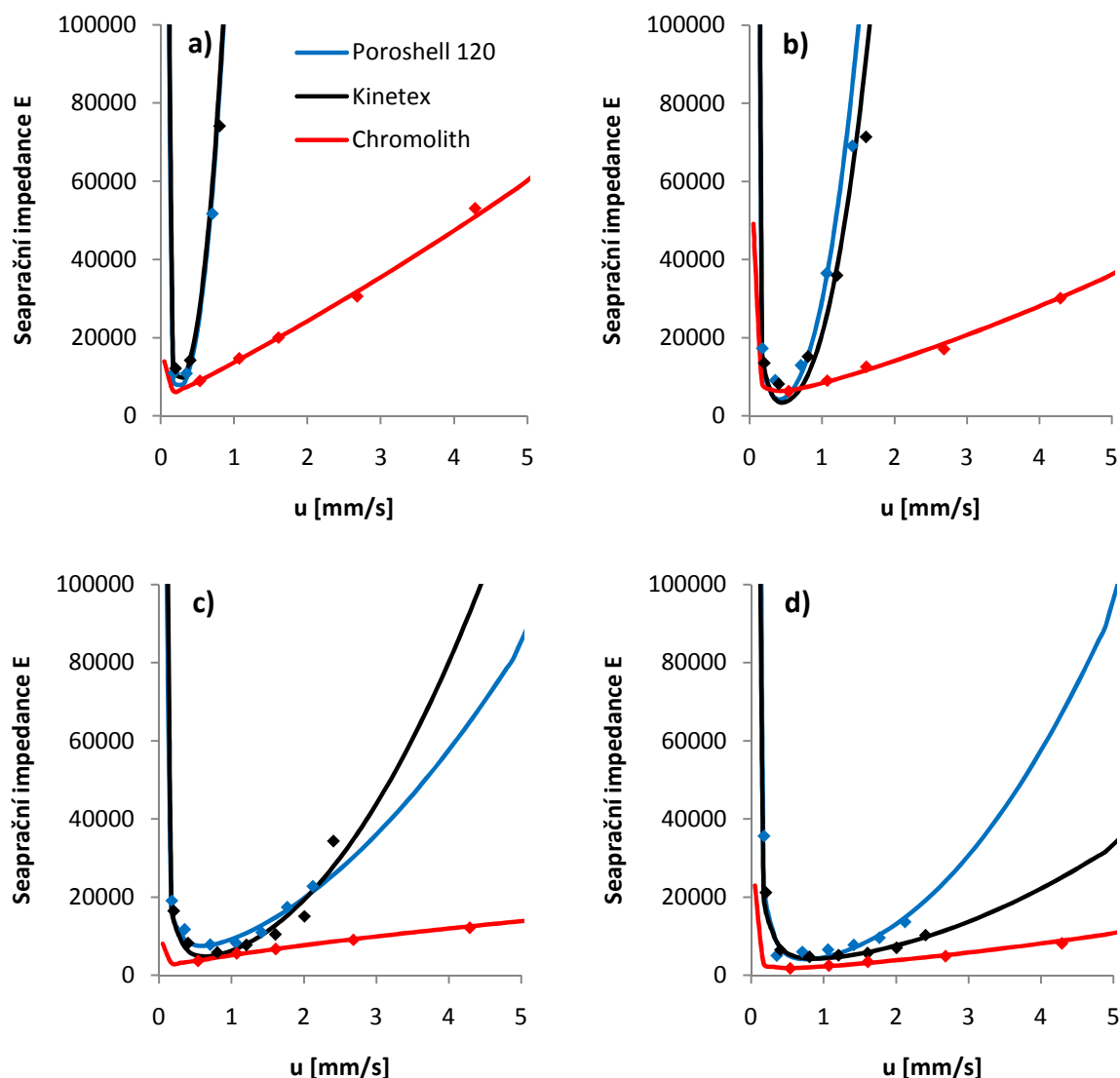


Obrázek 5.7 – $H - u$ křivky pro jednotlivé kolony a látky a) HMX, b) RDX, c) 2,4,6-TNT, d) PETN

5.3.2 Účinnost kolon

Účinnost je z hlediska separace jedna z nejdůležitějších vlastností kolony. Vhodnost kolony pro rychlou a účinnou separaci výbušnin lze posoudit na základě průběhu $H - u$ křivky. Nejvhodnější kolona je ta, která vykazuje nejmenší strmost růstu $H - u$ křivky. Otestovány byly kolony Kinetex 2,6 μm C18, Poroshell 120 SB-C18 a Chromolith CapRod RP-18e. Naměřená data byla zpracována nelineární regresí a byly získány parametry rovnice (5) (**Tabulka 5.9**). Byla vytvořena modelová datová řada, kterou byly proloženy experimentální data (**Obrázek 5.7**). Na základě tvaru $H - u$ křivek lze usoudit, že pro látky s malou retencí, jimiž jsou HMX a RDX ($k = 0,3$ a 1) lze při vysokých lineárních rychlostech mobilní fáze dosáhnout nejlepších výsledků na monolitické koloně Chromolith CapRod RP-18e (**Obrázek 5.7a,b**). Pro látky s větší retencí (TNT a PETN, $k = 3$ a $6,4$) jsou účinnější kolony plněné povrchověporézními částicemi (**Obrázek 5.7c,d**). Nutno dodat, že naměřená účinnost kolony Chromolith CapRod RP-18e zahrnuje negativní vliv mimokolonových příspěvků, které vzhledem k jejím rozměrům a použitému systému Agilent 1200 nebyly zanedbatelné.

Průběh $H - u$ křivek testovaných kolon je při vyšších lineárních rychlostech toku mobilní fáze kolonou pro látky s vyšším retenčním faktorem k srovnatelný.



Obrázek 5.8 – Závislost separační impedance na lineární rychlosti mobilní fáze pro vybrané kolony a látky a) HMX, b) RDX, c) 2,4,6-TNT, d) PETN

5.3.3 Separační impedance kolon

Účinnost kolony a její hydraulický odpor jsou dva základní parametry, na jejichž základě lze vybrat nejvhodnější kolonu pro rychlé separace. Současné působení těchto dvou veličin zohledňuje tzv. separační impedance E . Dosazením hodnot účinností kolony a permeabilit dostupných z předchozích experimentů do rovnice (13) byla vytvořena modelová závislost separační impedance E na lineární rychlosti mobilní fáze (**Obrázek 5.8**). Nejnižších hodnot separační impedance E bylo ve všech případech a v prakticky celém intervalu měření lineárních rychlostí dosaženo na monolitické koloně Chromolith CapRod RP-18e. Nejvýraznější rozdíl lze pozorovat u málo zadržovaných látek HMX a RDX (**Obrázek 5.8a,b**). Kolony Poroshell 120 SB-C18 a Kinetex 2,6 μm C18, plněné povrchověporézními částicemi, se v minimu křivky vyrovnají koloně Chromolith CapRod

RP-18e, ale při vyšších lineárních rychlostech vykazují strmý nárůst separační impedance E . S rostoucí hodnotou retenčního faktoru k tyto rozdíly v separační impedanci pozvolně klesají. U více zadržovaných látek je patrný rozdíl mezi kolonami Poroshell 120 SB-C18 a Kinetex 2,6 μm C18. U látky TNT ($k = 3$) má nižší separační impedanci kolona Poroshell 120 SB-C18. U látky PETN ($k = 6,4$) dosahuje lepších hodnot kolona Kinetex 2,6 μm C18.

Kolony Poroshell 120 SB-C18 a Kinetex 2,6 μm plněné povrchověporézními částicemi jsou účinnější než monolitická kolona Chromolith CapRod RP-18e. Tento rozdíl je však plně kompenzován vysokou permeabilitou kolony Chromolith CapRod RP-18e, díky níž má tato kolona výrazně nižší separační impedanci E ve srovnání s kolonami Poroshell 120 SB-C18 a Kinetex 2,6 μm C18.

5.4 Navržení podmínek separace

Pro rychlou separaci vybraných látek byla zvolena kolona Chromolith CapRod RP-18e 0,2×150 mm. Separace byla optimalizována při teplotě 50 °C. Tato teplota představuje maximální teplotu prostředí, ve kterém se předpokládá použití přenosného analyzátoru výbušnin. Monolitická kolona má v porovnání s náplňovými kolonami díky své velké porozitě menší poměr stacionární a mobilní fáze Φ . Dle rovnice (1) je retenční faktor k přímo úměrný poměru fází Φ , lze tedy očekávat menší retenci studovaných látek. Také zvýšená teplota bude mít podíl na zmenšení retence látek.

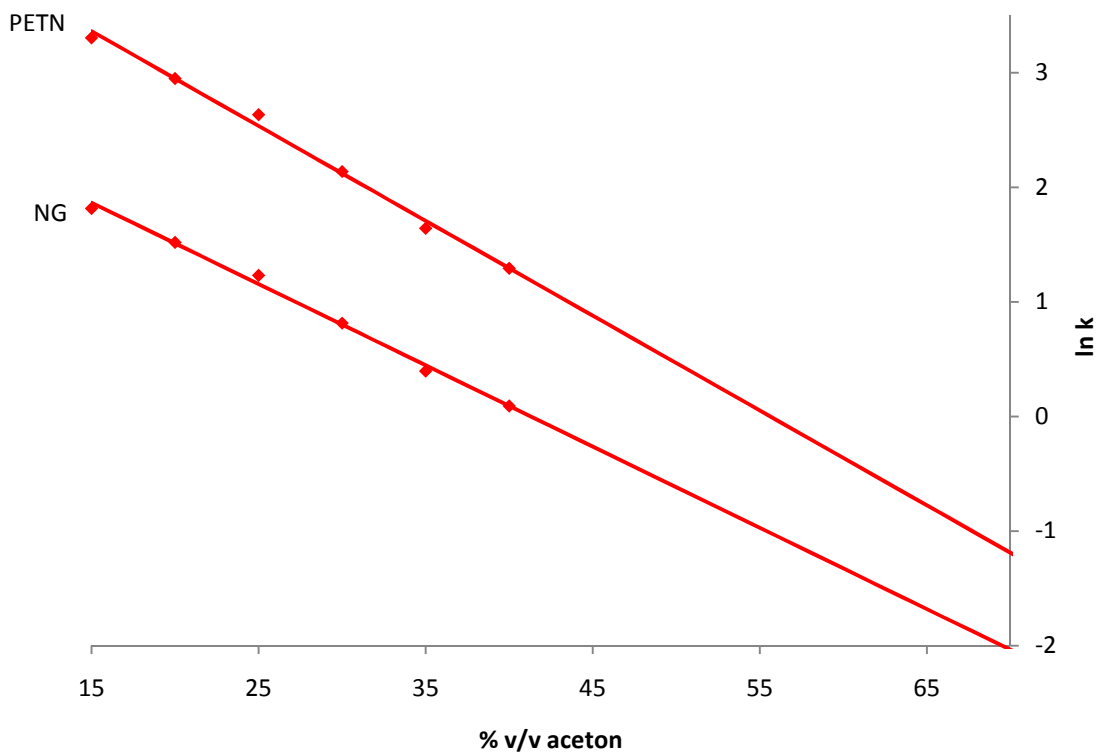
Použití acetonu jako mobilní fáze se pro separaci vybraných látek za zvolených podmínek ukázalo jako nevhodné. Byla pozorována koeluce velkého množství látek prakticky v celém testovaném rozsahu složení. Aceton lze použít při rychlém rozlišení PETN od ostatních nitrolátek. Lze využít skutečnost, že oproti ostatním studovaným látkám má PETN dostatečnou retenci i při poměrně vysoké koncentraci acetonu v mobilní fázi. Pro dané podmínky byla porovnána retence PETN a NG, který je z ostatních látek zadržován nejvíce (**Tabulka 5.10**). Lineární regresí dat byly získány parametry rovnice (16) (**Tabulka 5.11**). Pro odhad hodnoty retenčního faktoru k těchto látek při vyšších koncentracích acetonu v mobilní fázi, byla naměřená data pomocí nalezeného modelu extrapolována (**Obrázek 5.9**). Pro 70% aceton ve vodě lze odhadnout retenční faktory NG $k = 0,13$ a PETN $k = 0,30$.

Tabulka 5.10 – Retenční faktor k látek NG a PETN při různém obsahu acetonu (kolona Chromolith CapRod RP-18e, 50 °C)

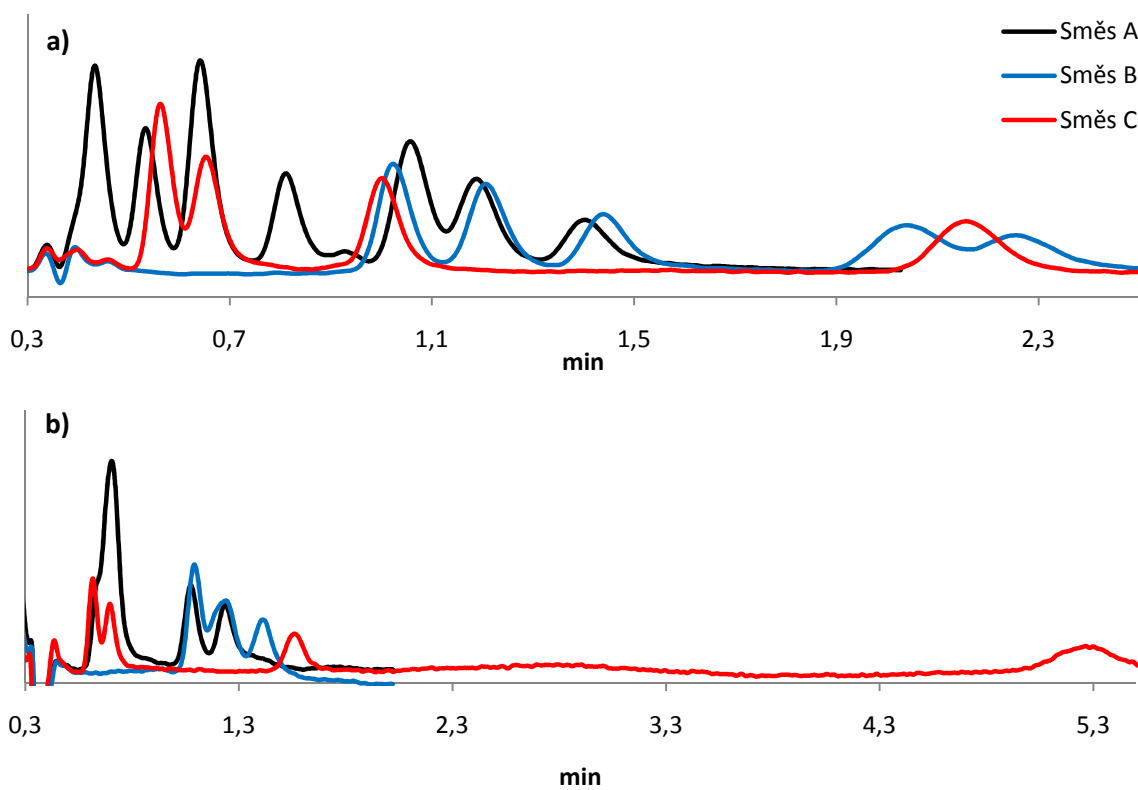
| Látka | Složení mobilní fáze [% v/v aceton] | | | | | |
|-------|-------------------------------------|-------|-------|------|------|------|
| | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 |
| NG | 6,14 | 4,57 | 3,43 | 2,26 | 1,49 | 1,10 |
| PETN | 27,26 | 19,07 | 13,94 | 8,49 | 5,17 | 3,65 |

Tabulka 5.11 – Vypočtené konstanty rovnice (16) pro aceton, při 50 °C

| Látka | a | b | R^2 |
|-------|---------|--------|--------|
| NG | -0,0709 | 2,9277 | 0,9950 |
| PETN | -0,0827 | 4,6023 | 0,9941 |

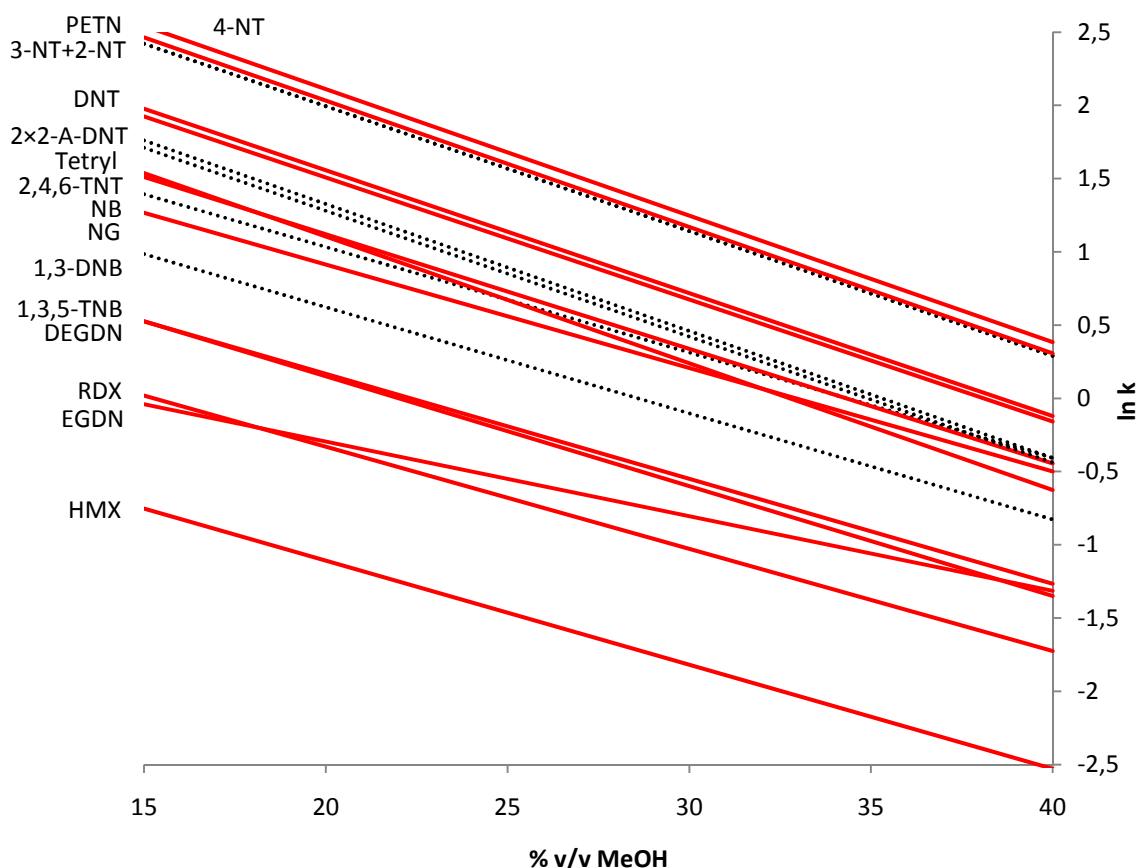


Obrázek 5.9 – Extrapolovaná závislost $\ln k$ na obsahu acetonu v mobilní fázi při 50 °C



Obrázek 5.10 – Chromatogramy analyzovaných směsí při 50 °C; a) 25% v/v methanol b) 25% v/v aceton (Agilent 1200, Chromolith CapRod RP-18e 0,2×150 mm, 20 μ l/min, 214 nm)

V methanolu byla oproti acetonu i při zvýšené teplotě zachována dobrá selektivita (**Obrázek 5.10**). Naměřená data (**Tabulka 5.12**) byla vyhodnocena jako závislost $\ln k$ na obsahu methanolu. Lineární regresí byly získány parametry rovnice (16) (**Tabulka 5.13**), jejíž průběh byl graficky znázorněn (**Obrázek 5.10**). Z průběhu křivek lze vyvodit závěr, že pro izokratickou separaci cílových analytů je za daných podmínek nejvhodnější složení mobilní fáze odpovídající přibližně 35 % v/v methanolu, které představuje kombinaci dobré selektivity a přijatelné retence daných látek.



Obrázek 5.10 – Závislost $\ln k$ na obsahu methanolu v mobilní fázi naměřená na koloně Chromolith CapRod RP-18e při 50 °C

Pro účely rychlé analýzy výbušnin lze tedy navrhnout tyto podmínky:

Monolitická kolona Chromolith CapRod RP-18e temperována na 50 °C. 35% v/v methanol jako mobilní fáze pro rychlou separaci běžných výbušnin a dalších nitrolátek a 65-70% v/v aceton jako mobilní fáze pro velmi rychlý sken vzorku na přítomnost PETN či jiné nitrolátky.

Za předpokladu, že kolona poskytne účinnost 5000 teoretických pater, bylo dosazením hodnot do rovnice (6) vypočteno rozlišení látek za těchto podmínek (**Tabulka 5.14**). Při zvolených podmínkách by mělo dojít alespoň k částečnému rozlišení všech cílových analytů. Potenciální interference s 2,4,6-TNT představuje NB, PETN může být překryt 2-NT a 3-NT.

Tabulka 5.12 – Retenční faktor k látek při různém obsahu methanolu v mobilní fázi (kolona Chromolith CapRod RP-18e, 50 °C)

| Látka | Složení mobilní fáze [% v/v MeOH] | | | | | |
|-------------|-----------------------------------|------|------|------|------|------|
| | 15 | 20 | 25 | 30 | 35 | 40 |
| HMX | 0,49 | 0,34 | 0,23 | 0,14 | 0,11 | 0,09 |
| RDX | 1,00 | 0,71 | 0,51 | 0,37 | 0,26 | 0,17 |
| 1,3,5-TNB | 1,71 | 1,17 | 0,83 | 0,57 | 0,40 | 0,29 |
| 1,3-DNB | 2,69 | 1,83 | 1,29 | 0,94 | 0,63 | 0,43 |
| NB | 4,00 | 2,80 | 2,00 | 1,34 | 0,97 | 0,66 |
| 2-A-4,6-DNT | 5,57 | 3,57 | 2,37 | 1,51 | 0,97 | 0,66 |
| 4-A-2,6-DNT | 5,89 | 3,71 | 2,43 | 1,57 | 1,06 | 0,66 |
| 2,4-DNT | 7,00 | 4,46 | 2,94 | 1,94 | 1,31 | 0,86 |
| 2,6-DNT | 7,34 | 4,69 | 3,09 | 2,03 | 1,37 | 0,89 |
| 2,4,6-TNT | 4,77 | 3,00 | 2,00 | 1,34 | 0,97 | 0,66 |
| Tetryl | 4,80 | 2,97 | 1,91 | 1,26 | 0,83 | 0,54 |
| 2-NT | 11,40 | 7,26 | 4,77 | 3,11 | 2,06 | 1,34 |
| 3-NT | 11,40 | 7,26 | 4,77 | 3,11 | 2,06 | 1,34 |
| 4-NT | 12,77 | 8,23 | 5,34 | 3,49 | 2,29 | 1,46 |
| EGDN | 0,94 | 0,74 | 0,60 | 0,43 | 0,37 | 0,26 |
| DEGDN | 1,63 | 1,17 | 0,86 | 0,54 | 0,37 | 0,26 |
| NG | 3,46 | 2,46 | 1,83 | 1,23 | 0,91 | 0,57 |
| PETN | 11,71 | 7,49 | 5,11 | 3,14 | 2,20 | 1,31 |

Tabulka 5.13 – Vypočtené konstanty rovnice (16) pro metanol, při 50 °C

| Látka | a | b | R^2 |
|-------------|---------|--------|--------|
| HMX | -0,0711 | 0,3146 | 0,9893 |
| RDX | -0,0698 | 1,0662 | 0,9982 |
| 1,3,5-TNB | -0,0717 | 1,6028 | 0,9997 |
| 1,3-DNB | -0,0725 | 2,0729 | 0,9988 |
| NB | -0,0720 | 2,4733 | 0,9994 |
| 2-A-4,6-DNT | -0,0860 | 3,0004 | 0,9997 |
| 4-A-2,6-DNT | -0,0867 | 3,0600 | 0,9996 |
| 2,4-DNT | -0,0833 | 3,1749 | 0,9996 |
| 2,6-DNT | -0,0839 | 3,2348 | 0,9997 |
| 2,4,6-TNT | -0,0782 | 2,6853 | 0,9972 |
| Tetryl | -0,0866 | 2,8368 | 0,9994 |
| 2-NT | -0,0852 | 3,6969 | 0,9999 |
| 3-NT | -0,0852 | 3,6969 | 0,9999 |
| 4-NT | -0,0864 | 3,8403 | 0,9999 |
| EGDN | -0,0509 | 0,7234 | 0,9909 |
| DEGDN | -0,0750 | 1,6523 | 0,9972 |
| NG | -0,0707 | 2,3262 | 0,9956 |
| PETN | -0,0863 | 3,7580 | 0,9983 |

Tabulka 5.14 – Vypočtené hodnoty rozlišení studovaných látek pro navržené podmínky

| Látka | k | α | $R_{1,2}$ |
|-------------|------|----------|-----------|
| HMX | 0,11 | 2,22 | 2,20 |
| RDX | 0,25 | 1,37 | 1,33 |
| EGDN | 0,35 | 1,09 | 0,40 |
| DEGDN | 0,38 | 1,07 | 0,33 |
| 1,3,5-TNB | 0,40 | 1,56 | 2,83 |
| 1,3-DNB | 0,63 | 1,31 | 2,13 |
| Tetryl | 0,82 | 1,05 | 0,38 |
| NG | 0,86 | 1,10 | 0,80 |
| 2,4,6-TNT | 0,95 | 1,01 | 0,05 |
| NB | 0,95 | 1,04 | 0,35 |
| 2-A-4,6-DNT | 0,99 | 1,04 | 0,31 |
| 4-A-2,6-DNT | 1,03 | 1,26 | 2,34 |
| 2,4-DNT | 1,30 | 1,04 | 0,40 |
| 2,6-DNT | 1,35 | 1,52 | 5,26 |
| 2-NT | 2,05 | 1,00 | 0,00 |
| 3-NT | 2,05 | 1,02 | 0,26 |
| PETN | 2,09 | 1,08 | 0,96 |
| 4-NT | 2,26 | | |

5.5 Návrh miniaturizovaného kapalinového chromatografu

5.5.1 Návrh konstrukce

Kapalinový chromatograf se skládá z několika základních komponent. Jsou to pumpa, dávkovací systém, kolona a detektor.

Nejjednodušší pumpou je píst pohybující se ve válci. Na píst působí zvenčí síla a ten je tlačěn do válce, přičemž z válce vytlačuje kapalinu. Příkladem tohoto jednoduchého systému je injekční stříkačka. Pohybem pístu stříkačky vpřed může být vytlačována mobilní fáze, pohybem pístu vzad zase může být vzniklým podtlakem do kapiláry vpraven vzorek.

Změnu směru toku kapaliny a výběr mezi vzorkem a kolonou lze řídit pomocí selekčního ventilu.

Pro miniaturizovaný kapalinový chromatograf je vhodné použití kolony kapilárních rozměrů. Kolona bude spojena s miniaturizovaným detekčním systémem, založeném na principu chemiluminiscence. Tento typ detekce využívá selektivní chemiluminiscenční reakci založenou na oxidaci luminolu rozkladnými produkty nitrolátek. Spojení miniaturizovaného kapalinového chromatografu s tímto typem detektoru představuje vysoce selektivní analytický systém pro detekci nitrovaných výbušnin.

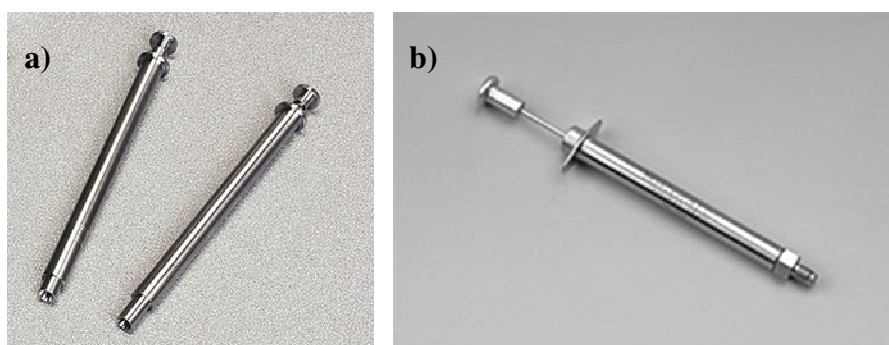
5.5.2 Volba vhodných komponent

Hlavním kritériem při výběru jednotlivých komponent je jejich tlaková odolnost. Na základě měření účinnosti a permeability byla z vybraných kolon pro konstrukci miniaturizovaného

kapalinového chromatografu zvolena kolona Chromolith CapRod RP-18e s rozměry 0,2×150 mm. Většina výrobců náplňových kolon garantuje tlakovou odolnost do 600 barů. Tlaková odolnost monolitických kolon je nižší. Výrobce kolony Chromolith CapRod RP-18e doporučuje její použití při tlaku do 200 barů. Většina selekčních ventilů pracuje bez problémů do tlaku 500 barů. Kritickým článkem ve výše popsaném systému tedy bude použitá stříkačka.

Standardní skleněné stříkačky nejsou konstruovány na vysoké tlaky. Ze zkušenosti lze říct, že tyto stříkačky jsou schopny pracovat do tlaku maximálně 50 barů. Při vyšších tlacích je vysoká pravděpodobnost prasknutí skleněného těla stříkačky nebo podtékání pístu. Pro účely této práce je tedy nutno zvolit stříkačku z vyšší tlakovou odolností. Po podrobné analýze nabídky byly nalezeny dva produkty splňující požadavek tlakové odolnosti.

Firma KD Scientific nabízí ocelovou stříkačku o objemu 2,5 ml s tlakovou odolností až 500 barů (**Obrázek 5.11a**). Dalším produktem jsou stříkačky od firmy PennCentury. Tato společnost nabízí speciální stříkačky FMJ-50 a FMJ-250 (**Obrázek 5.11b**) o objemech 50 a 250 μ l, s tlakovou odolností 210 barů. Stříkačka není ocelová ale má skleněnou trubici zapouzdřenou v oceli. Pro konstrukci miniaturizovaného kapalinového chromatografu byla vybrána stříkačka FMJ-250, jejíž objem a tlaková odolnost jsou pro spojení s vybranou kolonou dostačující.

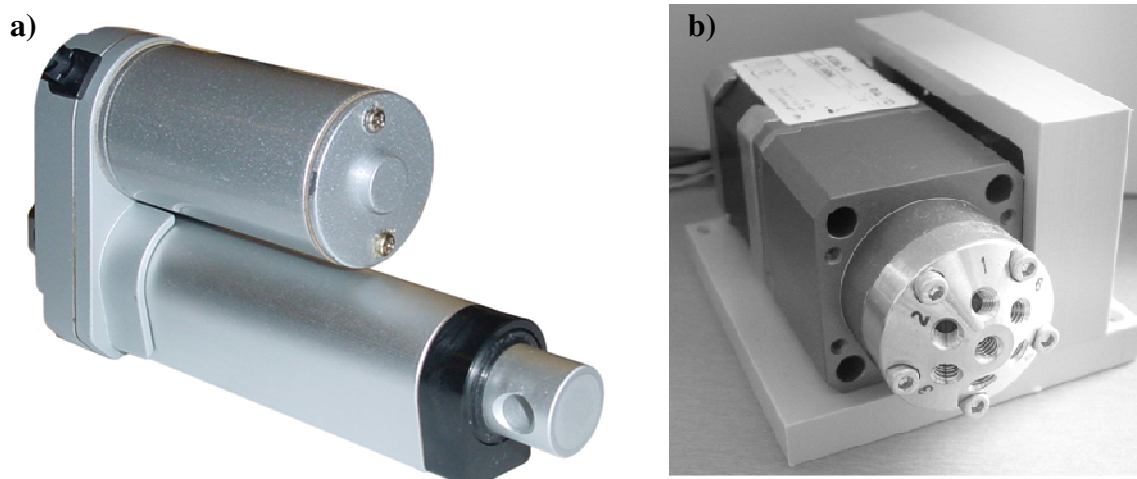


Obrázek 5.11 – Vysokotlaké stříkačky a) KDS 2,5 ml, b) FMJ-250

Pro zajištění pohybu pístu stříkačky byl zvolen lineární aktuátor Transmotec DLA-12-40-A-50-POT s napájením na 12 V (**Obrázek 5.12a**). Aktuátor je zpřevodovaný v poměru 40:1 a je schopen vyvinout sílu až 1000 N. Zdvih tlačného pístu je 50 mm, jeho polohu lze určit potenciometricky. Rychlost pohybu pístu lze ovládat napětím.

Pro dávkování a výběr mobilní fáze byl zvolen šesticestný selekční ventil VICI C55-1006I s vrtáním 0,25 mm (**Obrázek 5.12b**). Ventil je napájen napětím 24 V. Spínáním obvodů lze posunout port o jednu pozici dopředu či do pozice 1 a měnit směr otáčení.

Ohřev kolony bude zabezpečen odporovým drátem, který bude navinut na kolonu. Konstantní teplota bude zabezpečena zapouzdřením kolony do tepelné izolace a kontrolována teplotním čidlem.



Obrázek 5.12 – a) Lineární aktuátor Transmotec, b) Selektor VICI

5.5.3 Výpočet základních parametrů a popis funkce

Miniaturizovaný kapalinový chromatograf by měl být schopen provést analýzu do 1 minuty. Analýza bude zahrnovat zafokosování vzorku a vlastní chromatografickou separaci. Při návrhu funkce miniaturizovaného kapalinového chromatografu lze vycházet ze znalosti retenčních charakteristik daných látek na koloně při zvolených podmínkách.

Při detekci výbušnin v reálných podmínkách není nutno využívat plný potenciál separačního systému. Pro separaci byl zvolen 35% v/v methanol, který má i při 50 °C poměrně vysokou viskozitu (0,9 mPa·s). Pro velký počet skenů je výhodnější použít silnou mobilní fázi s nižší viskozitou. Silná mobilní fáze zabezpečí rychlé odhalení přítomnosti výbušniny, nízká viskozita zase snižuje energetickou náročnost procesu. Zde se nabízí použití acetonu, který i v poměrně vysoké koncentraci poskytne určitou selektivitu pro PETN. Viskozita 70% v/v acetonu je již při 25 °C o polovinu nižší než viskozita 35% v/v methanolu při 50 °C.

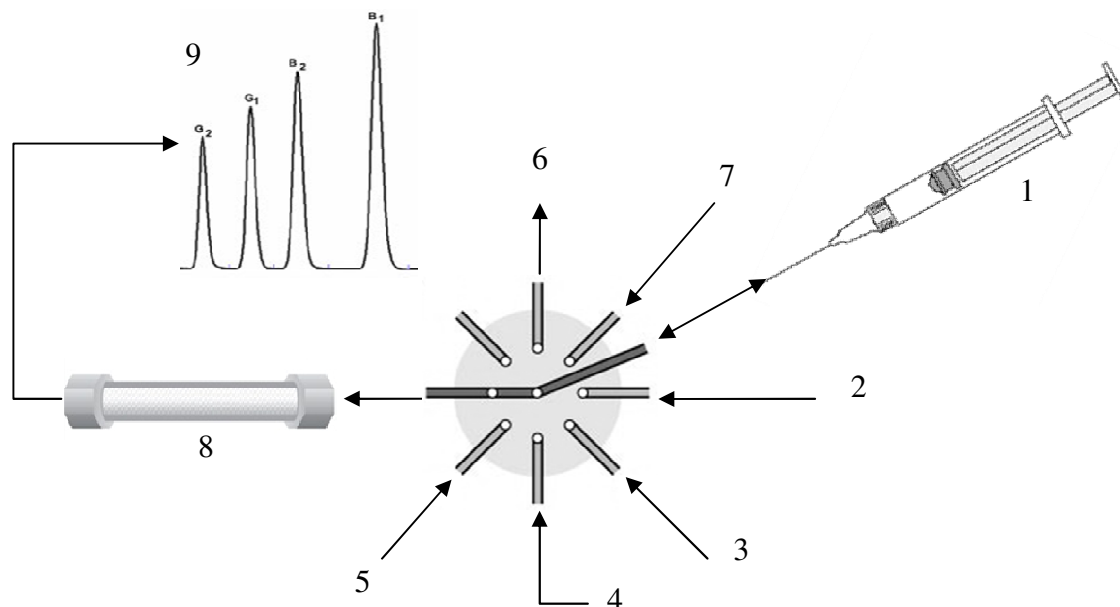
Odezva chemiluminiscenčního detektoru v tomto případě indikuje přítomnost nitrované látky. Po zaznamenání odezvy bude změněna mobilní fáze a analýza bude zopakována. V tomto kroku budou přítomné nitrolátky rozlišeny a identifikovány na základě retenčních charakteristik.

Funkci kapalinového chromatografu lze pro tyto účely popsat takto:

Do stříkačky bude nasáta silná mobilní fáze o koncentraci 70 % v/v acetonu. Poté bude na selekčním ventilu zvolen port se vzorkem a do smyčky mezi stříkačkou a selekčním ventilem bude nasát vzorek. Pozice selekčního ventilu bude přepnuta na port s vodou a bude natažen jeden kolonový objem vody pro regeneraci kolony. Poté bude selektor nastaven na polohu kolona a bude spuštěna analýza.

V tomto kroku by byla odhalena přítomnost PETN nebo jiné nitrolátky. V případě zaznamenání přítomnosti jiné nitrolátky bude do stříkačky nasáta mobilní fáze o složení 35 % v/v metanolu ve vodě a analýza bude provedena ještě jednou. Po určitém cyklu analýz bude systém promyt čistým rozpouštědlem.

Navržený systém (**Obrázek 5.13**) by měl být schopen provádět zakoncentrování a spolehlivé rozlišení všech běžně se vyskytujících výbušnin a příbuzných nitrolátek. Dusičnany a kyselina pikrová se na C18 fázi za daných podmínek nezachytí, jejich přítomnost se tak projeví jako poměrně široký pík v mrtvém retenčním čase odpovídající objemu fokusovaného vzorku.



Obrázek 5.13 – Schéma navrženého kapalinového chromatografu: 1 – stříkačka, 2 – silná mobilní fáze, 3 – slabá mobilní fáze, 4 – voda, 5 – vzorek, 6 – odpad, 7 – aceton na promytí, 8 – kolona, 9 – detekce

Při výpočtu parametrů systému je nutno vycházet z několika požadavků. Miniaturizovaný systém bude konstruován tak, aby byl mimokolonový objem zcela zanedbatelný. Ve výpočtech je proto jako mrtvý objem systému uvažován mrtvý objem kolony.

Maximální průtok F_{max} systémem lze vypočítat dle rovnice (8). Pro kolonu Chromolith CapRod RP-18e 0,2×150mm a stříkačku FMJ-250 uvažujme tlakový limit 200 barů. Dále je nutné uvažovat viskozitu kapaliny, jejíž složení se ale postupně mění. Nejvyšší viskozitu má 35% v/v methanol ve vodě. Při teplotě 50 °C je viskozita této směsi η asi 0,9 mPa·s.

Po dosažení do rovnice (8) je za uvedených podmínek maximální možný průtok systémem:

$$F_{max} = \frac{B_0 \cdot \Delta p \cdot \pi \cdot r^2}{\eta \cdot L} = \frac{7,8 \cdot 10^{-14} \cdot 200 \cdot 10^5 \cdot 3,14 \cdot 0,25 \cdot (0,2 \cdot 10^{-3})^2}{0,9 \cdot 10^{-3} \cdot 150 \cdot 10^{-3}} =$$

$$= 5,9 \cdot 10^{-10} \frac{\text{m}^3}{\text{s}} = 22 \frac{\mu\text{l}}{\text{min}}$$

Mrtvý objem kolony V_M Chromolith CapRod C18-e 0,2×150mm je 4,6 μl . Při analýze vzorku s obsahem 4-NT jehož $k = 2,3$ je na eluci nutný objem:

$$V = V_M \cdot (k + 1) = 4,6 \cdot (2,3 + 1) = 15,2 \mu\text{l}$$

Maximální fokusovaný objem vzorku lze vypočítat z rovnice (15). Nejméně zadržovanou látkou je HMX. Dosazením hodnot z tabulky 5.13 do rovnice (16) byly získány hodnoty retenčního faktoru pro vodu, $k_0 = 1,37$. V 35% v/v methanolu je $k = 0,11$. Pro kolonu Chromolith CapRod RP-18e 0,2×150 mm uvažujeme maximální objem vzorku bez fokusace jako 10 % mrtvého objemu kolony, tedy asi 0,5 μl . Po dosazení do rovnice (15) je maximální objem pro fokusaci za daných podmínek:

$$V_{\text{pc(max)}} = 0,5 \mu\text{l} \cdot \frac{1,37 + 1}{0,11 + 1} = 1 \mu\text{l}$$

Při objemu fokusovaného vzorku 1 μl a 4 μl vody pro regeneraci kolony je doba analýzy:

$$t = \frac{1 + 4 + 15,2}{22} = 0,92 \text{ min} = 55 \text{ s}$$

Při použití 70% v/v acetonu pro rychlý monitoring vzorku s obsahem PETN lze na základě dat z tabulky 5.11 počítat s hodnotou $k = 0,3$ a viskozitou vody za dané teploty 0,55 mPa·s. Po dosazení do rovnice (8) je za uvedených podmínek maximální průtok kolonou:

$$\begin{aligned} F_{\text{max}} &= \frac{B_0 \cdot \Delta p \cdot \pi \cdot r^2}{\eta \cdot L} = \frac{7,8 \cdot 10^{-14} \cdot 200 \cdot 10^5 \cdot 3,14 \cdot 0,25 \cdot (0,2 \cdot 10^{-3})^2}{0,55 \cdot 10^{-3} \cdot 150 \cdot 10^{-3}} = \\ &= 5,9 \cdot 10^{-10} \frac{\text{m}^3}{\text{s}} = 35 \frac{\mu\text{l}}{\text{min}} \end{aligned}$$

Pro jednu analýzu je nutný objem:

$$V = V_M \cdot (k + 1) = 4,6 \cdot (0,3 + 1) = 6 \mu\text{l}$$

Při objemu fokusovaného vzorku 1 μl a 4 μl vody pro regeneraci kolony je odpovídající doba analýzy:

$$t = \frac{1 + 4 + 6}{36} = 0,31 \text{ min} = 19 \text{ s}$$

Na základě těchto výsledků lze sestavit miniaturizovaný kapalinový chromatograf, který bude schopen zakoncentrovat výbušniny z jejich vodného roztoku a provádět rychlé separace těchto látek.

6 ZÁVĚR

Úkolem práce bylo nalézt vhodné podmínky pro rychlou separaci vybraných výbušnin a navrhnout miniaturizovaný kapalinový chromatograf vhodný pro začlenění do komplexního přenosného analyzátoru výbušnin.

Za tímto účelem byly studovány retenční charakteristiky vybraných výbušnin a dalších nitrolátek na C18 fázi při použití methanolu, acetonitrilu a acetonu jako organické složky mobilní fáze. Pro rychlou separaci výbušnin byly otestovány kolony plněné povrchově porézními sorbenty Kinetex 2,6 μm C18 a Poroshell 120 SB-C18 a kapilární monolitická kolona Chromolith CapRod RP-18e. Kolony byly posuzovány na základě jejich účinnosti a hydraulických vlastností.

Pro rychlou separaci výbušnin byla vybrána monolitická kolona Chromolith CapRod RP-18e, která je účinná a díky vysoké permeabilitě poskytuje velmi nízký hydraulický odpor. Na této koloně byla provedena optimalizace složení mobilní fáze při teplotě 50 °C, přičemž byla posuzována vhodnost methanolu i acetonu jako organické složky mobilní fáze pro separaci vybraných výbušnin. Teplota pro separaci byla zvolena jako maximální teplota prostředí, ve kterém se předpokládá použití přenosného analyzátoru výbušnin. Za daných podmínek poskytuje nejlepší selektivitu pro studované látky methanol. Při použití acetonu jako organické složky mobilní fáze je PETN na koloně výrazně více zadržován než ostatní studované látky. Vyšší koncentraci acetonu v mobilní fázi tak lze využít pro rozlišení PETN od jiných nitrolátek.

K účelu rychlé separace běžných výbušnin a příbuzných nitrolátek byl navržen 35% v/v methanol jako vhodná mobilní fáze poskytující dobrou selektivitu a přijatelnou retenci studovaných látek. Pro nízkou viskozitu a možnost rozlišení látky PETN od dalších výbušnin byl 70% v/v aceton navržen jako vhodná mobilní fáze pro velmi rychlé skenování vzorku na přítomnost nitrolátek.

Na základě získaných výsledků byly vypočteny základní parametry miniaturizovaného kapilárního kapalinového chromatografu, jehož konstrukce dovoluje zakoncentrování výbušných látek z vodního roztoku a jejich rychlé rozlišení v čase kratším než 1 minuta. Navržený systém splňuje požadavky na rychlou separaci výbušnin a je vhodný k zakomponování do přenosného analyzátoru výbušnin.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|-------|--|
| AN | <i>Ammonium nitrate</i> , dusičnan amonný |
| ANFO | <i>Ammonium nitrate fuel oil</i> , směs dusičnan amonný - nafta |
| APCI | <i>Atmospheric-pressure chemical ionization</i> , ionizace za atmosférického tlaku |
| CEC | <i>Capillary electrochromatography</i> , kapilární elektrochromatografie |
| ČSN | České technické normy |
| DAD | <i>Diode array detektor</i> , detektor s diodovým polem |
| DEGDN | Diethylenglykol dinitrát |
| DMDNB | 2,3-dimethyl-2,3-dinitrobutan |
| DNB | Dinitrobenzen |
| DNT | Dinitrotoluen |
| EGDN | Ethylenglykol dinitrát |
| EN | Evropská norma |
| EPA | <i>United States Environmental Protection Agency</i> , agentura pro ochranu životního prostředí |
| ESI | <i>Electrospray ionization</i> , elektrosprej |
| ETA | <i>Euskadi Ta Askatasuna</i> , baskická separatistická organizace |
| FT | Fourierova transformace |
| GC | <i>Gas chromatography</i> , plynová chromatografie |
| HMTD | Hexamethylentriperoxodiamin |
| HMX | Oktahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocin |
| HPLC | <i>High performance liquid chromatography</i> , vysoce účinná kapalinová chromatografie |
| IMS | <i>Ion mobility spectrometry</i> , spektrometrie iontové mobility |
| IR | <i>Infra-red</i> , infračervené žiarenie |
| IRA | <i>Irish Republican Army</i> , irská republikánská armáda |
| ISO | <i>International Organization for Standardization</i> , mezinárodní organizace pro standardizaci |
| LC | <i>Liquid chromatography</i> , kapalinová chromatografie |
| LIF | <i>Laser-Induced Fluorescence</i> , laserem indukovaná fluorescence |
| MS | <i>Mass spectrometry</i> , hmotnostní spektrometrie |
| NC | Nitrocelulóza |
| NG | <i>Nitroglycerin</i> , glycerol trinitrát |

| | |
|------|---|
| NM | Nitromethan |
| NT | Nitrotoluen |
| PA | <i>Picric acid</i> , pikrová kyselina |
| PETN | Pentaerythritol tetranitrát |
| RDX | Hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazin |
| RP | <i>Reversed-phase</i> , obrácené fáze |
| SAW | <i>Surface Acoustic Wave</i> , povrchová akustická vlna |
| SPME | <i>Solid Phase Microextraction</i> , mikroextrakce tuhou fází |
| TATP | 3,3,6,6,9,9-hexamethyl-1,2,4,5,7,8-hexaoxonan |
| TNB | 1,3,5-trinitrobenzen |
| TNT | 2,4,6-trinitrotoluen |
| UN | <i>Urea nitrate</i> , nitrát močoviny |
| UPLC | <i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i> |
| WTC | <i>World Trade Center</i> , světové obchodní centrum |

8 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] *Commerce in Explosives; List of Explosive Materials.* URL: <http://www.federalregister.gov/articles/2010/11/17/2010-28874/commerce-in-explosives-list-of-explosive-materials-2010r-27t> [cit. 2011-3-16]
- [2] MARSHALL, M. – OXLEY, J. Explosives: The Threats and the Materials. In *Aspects of Explosives Detection*. 1st Edn. Ed. MARSHALL, M. – OXLEY, J. Oxford: Elsevier, 2009. 288 p. ISBN: 978-0-12-374533-0.
- [3] YAGER, K. Dangerous Innovations. In *Trace chemical sensing of explosives*. Ed. WOODFIN, R. L. Hoboken: Wiley, 2007. 363 p. ISBN 0-471-73839-5
- [4] LEDGARD, J. B. *The Preparatory Manual of Explosives, Third Edition*. 3rd Edn. Seattle: Jared Ledgard, 2007. 586 p. ISBN: 978-0-6151-4290-6.
- [5] *Convention on the Marking of Plastic Explosives for the Purpose of Identification.* URL: http://www.ciaonet.org/cbr/cbr00/video/cbr_ctd/cbr_ctd_33.html [cit. 2011-3-15]
- [6] YINON, J. Explosives. In *Handbook of Analytical Separations*. 1st Edn. Ed. BOGUSZ, M. J. Amsterdam: Elsevier, 2000. 742 p. ISBN: 0-444-82998-9.
- [7] *Method 8330A Nitroaromatics and Nitramines by High Performance Liquid Chromatography* URL: <http://www.epa.gov/waste/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8330a.pdf> [cit. 2011-3-15]
- [8] GUARAV – MALIK, A. K. – RAI, P. K. Development of New SPME-HPLC-UV Method for the Analysis of Nitro Explosives on Reverse Phase Amide Column and Application to Analysis of Aqueous Samples. *J. Hazard. Mater.*, 2009, vol. 172, no. 2-3, pp. 1652-1658. ISSN: 0304-3894.
- [9] WOLTMAN, S. J. – EVEN, W. R. – SAHLIN, E. – WEBER, S. G. Chromatographic Detection of Nitroaromatic and Nitramine Compounds by Electrochemical Reduction Combined with Photoluminescence following Electron Transfer. *Anal. Chem.*, 2000, vol. 72, no. 20, pp. 4928-4933. ISSN: 1520-6882.
- [10] TSAPLEV, Y. B. High-Performance Liquid Chromatography of Nitrate Esters with Chemiluminescence Detection. *J. Anal. Chem.*, 2009, vol. 64, no. 3, pp. 299-303. ISSN: 1608-3199.
- [11] *Trace Level Analysis of Explosives in Ground Water and Soil.* URL: http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/psm_marketing/documents/generaldocuments/cms_042493.pdf [cit. 2011-3-14]
- [12] BEČANOVÁ, J. – FRIEDL, Z. – ŠIMEK, Z. Identification and Determination of Trinitrotoluenes and Their Degradation Products Using Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.*, 2010, vol. 291, no. 3, pp. 133-139. ISSN: 1387-3806.
- [13] MATHIS, J. A. – McCORD, B. R. The Analysis of High Explosives by Liquid Chromatography/electrospray Ionization Mass Spectrometry: Multiplexed Detection of Negative Ion Adducts. *Rapid Commun. Mass Sp.*, 2005, vol. 19, no. 2, pp. 99-104. ISSN: 0951-4198.

- [14] YINON, J. – ZHAO, X. Identification of Nitrate Ester Explosives by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization and Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 2002, vol. 977, no. 1, pp. 59-68. ISSN: 0021-9673.
- [15] TACHON, R. – PICHON, V. – Le BORGNE, M. B. – MINET, J-J. Use of Porous Graphitic Carbon for the Analysis of Nitrate Ester, Nitramine and Nitroaromatic Explosives and by-products by Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionisation-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 2007, vol. 1154, no. 1-2, pp. 174-181. ISSN: 0021-9673.
- [16] MOORE, D. S. Recent Advances in Trace Explosives Detection Instrumentation. *Sens. Imaging*, 2007, vol. 8, no. 1, pp. 9–38. ISSN: 1557-2072.
- [17] MEYER, R. – KÖHLER, J. – HOMBURG, A. *Explosives*. 5th Edn. Verlag: Wiley-VCH, 2002. 474 p. ISBN 3-527-60051-5.
- [18] CONRAD, F. J. Vapor Pressures of Explosives. *J. Nucl. Mater. Manage.*, 1984, vol. 13, no. 212. ISSN: 0893-6188
- [19] OXLEY, J. C. – SMITH, J. L. – LUO, W. – BRADY, J. Determining the Vapor Pressures of Diacetone Diperoxide (DADP) and Hexamethylene Triperoxide Diamine (HMTD). *Propell. Explos. Pyrot.*, 2009, vol. 34, no. 6, pp. 539-543. ISSN: 1521-4087.
- [20] SINGH, S. Sensors – An Effective Approach for the Detection of Explosives. *J. Hazard. Mater.*, 2007, vol. 144, no. 1-2, pp. 15-28. ISSN: 0304-3894.
- [21] YALKOWSKY, S. H. – YAN, H. *Handbook of aqueous solubility data*. Boca Raton: CRC Press, 2003. 1496 p. ISBN: 0-8493-1532-8.
- [22] YINON, J. *Forensic and Environmental Detection of Explosives*. Chichester: Wiley, 1999. 293 p. ISBN: 0-471-98371-3.
- [23] TACHON, R. – PICHON, V. – Le BORGNE, M. B. – MINET, J-J. Use of Porous Graphitic Carbon for the Analysis of Nitrate Ester, Nitramine and Nitroaromatic Explosives and by-products by Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionisation-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 2007, vol. 1154, no. 1-2, pp. 174-181. ISSN: 0021-9673.
- [24] KAISER, M. HPLC Optimization of the Separation of Explosives and Propellant Compoments with an Octadecyl Phase by Computer Simulation. *Propell. Explos. Pyrot.*, 1997, vol. 22, no. 6, pp. 321-325. ISSN: 1521-4087.
- [25] KAISER, M. HPLC Investigation of Explosives and Nitroaromatic Compounds with a Cyanopropyl Phase. *Propell. Explos. Pyrot.*, 1998, vol. 23, no. 6, pp. 309-312. ISSN: 1521-4087.
- [26] DONG, M. W. *Modern HPLC for Practicing Scientists*. Hoboken: Wiley, 2006. 286 p. ISBN: 978-0-471-72789-7. pp. 21-23.
- [27] CHURÁČEK, J. – JANDERA, P. *Separace látek – Kapalinová Vysokoučinná Kolonová Chromatografie*. Praha: SNTL, 1986. 2. vyd., 140 p. ISBN: 450-33685 . Kapitola 2.4, Účinnost Chromatografické Kolony, pp. 21-29.

- [28] SNYDER, L. R. – KIRKLAND, J. J. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. Toronto: Wiley, 1979. 863 p. ISBN: 0-471-03822-9. p. 36.
- [29] GRITTI, F. – LEONARDIS, I. – SHOCK, D. – STEVENSON, P. – SHALLIKER, A. – GUICHON, G. Performance of Columns Packed with the New Shell Particles, Kinetex-C18. *J. Chromatogr. A*, 2010, vol. 1217, no. 10, pp. 1589-1603. ISSN: 0021-9673.
- [30] URBAN, J. – JANDERA, P. – KUČEROVÁ, Z. – STRATEN, M. A. – CLEASSENS, H. A. A study of the Effect of Column Porosity on Gradient Separation of Proteins. *J. Chromatogr. A*, 2007, vol. 1167, no. 1, pp. 63-75. ISSN: 0021-9673.
- [31] YIZHAK, M. *Solvent mixtures: properties and selective solvation*. New York: Marcel Dekker, 2002. 258 p. ISBN: 0-824-70837-7. p. 25.
- [32] SNYDER, L. R. – DOLAN, J. W. *High-performance Gradient Elution: The Practical Application of the Linear Solvent Strength Model*. Hoboken: Wiley, 2007. 461 p. ISBN: 0-471-70646-9.
- [33] TEUTENBERT, T. *High-Temperature Liquid Chromatography: A User's Guide for Method Development*. Cambridge: RSC Publishing, 2010. 618 p. ISBN: 978-1-84973-109-6.
- [34] CAUSON, T. J. – SHELLIE, R. A. – HILDER, E. F. High Temperature for Liquid Chromatography: Practical Approaches for Better Separations. *Separ. Sci.*, 2010, vol. 2, no 6, pp. 4-8.
- [35] TEUTENBERT, T. High Temperature Liquid Chromatography – A Brief Review about an Emerging Technic. *Chrom. Today*, 2010, vol. 3, no. 3, pp. 3-6.
- [36] SNYDER, L. R. – KIRKLAND, J. J. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. Toronto: Wiley, 1979. 863 p. ISBN: 0-471-03822-9. p. 237.
- [37] ANTIA, F. D. – HORVÁTH, C. High-performance Liquid Chromatography at Elevated Temperatures: Examination of Conditions for the Rapid Separation of Large Molecules. *J. Chromatogr.*, 1988, vol. 435, no. 1, pp. 1-15. ISSN: 0021-9673.
- [38] JANDERA, P. – CHURÁČEK, J. *Gradient Elution in Column Liquid Chromatography: Theory and Practice*. New York: Elsevier, 1985. 510 p. ISBN: 0-444-42124-6.
- [39] QUE, A. H. – KAHLE, V. – NOVOTNY, M. V. A Microgradient Elution System for Capillary Electrochromatography. *J. Microcolumn Sep.*, 2000, vol. 12, no. 1, pp. 1-5. ISSN: 1040-7685
- [40] KAHLE, V. – VAZLEROVA, M. – WELSCH, T. Automated Microgradient System for Capillary Electrochromatography. *J. Chromatogr. A*, 2003, vol. 990, no. 1-2, pp. 3-9. ISSN: 0021-9673.
- [41] SÝKORA, D. – TESAŘOVÁ, E. – VOSMANSKÁ, M. – ZVOLÁNKOVÁ, M. Moderní Stacionární Fáze pro RP-HPLC. *Chem. Listy*, 2007, vol. 101, no. 3, pp. 190-199. ISSN: 1213-7103.
- [42] ŠVEC, F. Co Dnes Hýbe Kapalinovou Chromatografií? *Chem. Listy*, 2009, vol. 103, no. 4, pp. 266-270. ISSN: 1213-7103.

- [43] FELINGER, A. Diffusion Time in Core-shell Packing Materials. *J. Chromatogr. A*, 2010, vol 1218, no. 15., pp. 1939-1941. ISSN: 0021-9673.
- [44] CUNLIFFE, J. M. – MALONEY, T. D. Fused-core Particle Technology as an Alternative to sub-2- μm Particles to Achieve High Separation Efficiency with Low Backpressure. *J. Sep. Sci.* 2007, vol. 30, no. 18, pp. 3104-3109. ISSN: 1615-9314.
- [45] ŠVEC, F. Monolitické Stacionární Fáze pro HPLC. Místo Narození: Praha. *Chem. Listy*, 2004, vol. 98, no. 5, pp. 232-238. ISSN: 1615-9314.
- [46] *HPLC kolony Chromolith®*. URL: http://www.merck-chemicals.cz/food-analytics/hplc-kolony-chromolith-/c_29Sb.s1OGNEAAAEWk39ZAh62?PortalCatalogID=merck4food&CountryName=Czech+Republic [cit 2011-3-15]
- [47] BRISTOW, P. A. – KNOX, J. H. Standardization of Test Condition for High-performance Liquid-chromatography Columns. *Chromatografia*, 1977, vol. 10, no. 6, pp. 279-289. ISSN: 0009-5893.
- [48] XU, X. - Van de CRAATS, A. M. – KOK, E. M. - de BRUYN, P. C. Trace Analysis of Peroxide Explosives by High Performance Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Tandem Mass Spectrometry (HPLC-APCI-MS/MS) for Forensic Applications. *J. Forensic Sci.*, 2004, vol. 49, no. 6, pp. 1230-1236. ISSN: 1556-4029.
- [49] MEANEY, M. S., McGUFFIN, V. L. Luminescence-Based Methods for Sensing and Detection of Explosives. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, vol. 391, no. 7, pp. 2557-2576. ISSN: 1618-2650.
- [50] WOLTMAN, S. J. – EVE, W. R. – SAHLIN, E. – WEBER, S. G. Chromatographic Detection of Nitroaromatic and Nitramine Compounds by Electrochemical Reduction Combined With Photoluminescence Following Electron Transfer. *Anal. Chem.*, 2000, vol. 72, no. 20, pp. 4928-4933. ISSN: 1520-6882.
- [51] SCHULTE-LADBECK, R. – KOLLA, P. – KARST, U. Trace Analysis of Peroxide-based Explosives. *Anal. Chem.*, 2003, vol. 75, no. 4, pp. 731-735. ISSN: 1520-6882.
- [52] LAKOWICZ, J. R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd Edn. New York: Springer, 2006. 954 p. ISBN: 978-0387-31278-1. pp. 277-284.
- [53] GOODPASTER, J. V. – McGUFFIN, V. L. Fluorescence Quenching as an Indirect Detection Method for Nitrated Explosives. *Anal. Chem.*, 2001, vol. 73, no. 9, pp. 2004-2011. ISSN: 1520-6882.
- [54] BAILEY, C. G. – WALLENBORG, S. R. Indirect Laser-Induced Fluorescence Detection of Explosive Compounds Using Capillary Electrochromatography and Micellar Electrokinetic Chromatography. *Electrophoresis*, 2000, vol. 21, no. 15, pp. 3081-3087. ISSN: 1522-2683.
- [55] SCHULTE-LADBECK, R. – EDELMANN, A. – QUINTÁS, G. – LENDL, B. – KARST, U. Determination of Peroxide-Based Explosives Using Liquid Chromatography with On-Line Infrared Detection. *Anal. Chem.*, 2006, vol. 78, no. 23, pp. 8150-8155. ISSN: 1520-6882.

- [56] LAFLEUR, A. L. – MILLS, K. M. Trace Level Determination of Selected Nitroaromatic Compounds by Gas Chromatography with Pyrolysis Chemiluminescent Detection. *Anal. Chem.*, 1981, vol. 53, no. 8, pp. 1202-1205. ISSN: 1520-6882.
- [57] SALEVKA, C. M. – TONTARSKI, R. E. – STROBEL, R. A. Improved Determination of Nitrotoluenes using Liquid-Chromatography with Photolytically assisted Thermal Energy Analysis (LC-PAT). *J. Forensic. Sci.*, 1987, vol. 59, no. 17, pp. 941-952. ISSN: 1556-4029.
- [58] TSAPLEV, Y.B. High-Performance Liquid Chromatography of Nitrate Esters with Chemiluminescence Detection. *J. Anal. Chem.*, 2009, vol. 64, no. 3, pp. 268-273. ISSN: 1608-3199.
- [59] MONTEROLA, M. P. P. – SMITH, B. W. – OMENETOO, N. – WINEFORDNER, J. D. Photofragmentation of Nitro-based Explosives with Chemiluminescence Detection. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, vol. 391, no. 7, pp. 2617-2626. ISSN: 1618-2650.
- [60] KREJČÍ, M. *Trace analysis with microcolumn liquid chromatography*. New York: Marcel Dekker, 1992. 206 p. ISBN 0-8247-8641-6. p. 27.
- [61] MILLS, J. – MALTAS, J. – LOUGH, W. J. Assessment of Injection Volume Limits when Using On-column Focusing with Microbore Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1997, vol. 759, no. 1-2, pp. 1-11. ISSN: 0021-9673.
- [62] *A Total Solution to Baseline Separation of 14 Explosives in U.S. EPA Method 8330* URL: <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/56197-ALN-Reprint.pdf> [cit. 2011-3-15]
- [63] *XBridge HPLC Columns* URL: <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720001255en.pdf> [cit. 2011-3-15]
- [64] *Agilent Poroshell 120 Columns for HPLC and UHPLC* URL: http://www.chem.agilent.com/Library/brochures/5990-5951EN_Poroshell%20120.pdf [cit. 2011-3-15]
- [65] *New Fused-Core Particles for Very Fast HPLC Separations*. URL: <http://www.advanced-materials-tech.com/pittcon.pdf> [cit. 2011-3-15]
- [66] *Kinetex Ultra-High Performance on Any LC system*. URL: http://phx.phenomenex.com/lib/br63680808_I_2.pdf [cit. 2011-3-15]
- [67] OEHRLE, S. A. Analysis of Explosives using Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) with UV and/or Mass Spectrometry Detection. *J. Energ. Mater.*, 2008, vol. 26, no. 4, pp. 197-206. ISSN: 1545-8822.
- [68] BRETT, P. – ROUX, P. – DAWSON, M. – DOBLE, P. Rapid Screening of Selected Organic Explosives by High Performance Liquid Chromatography Using Reversed-Phase Monolithic Columns. *J. Forensic. Sci.*, 2004, vol. 49, no. 6, pp. 1181-1186. ISSN: 1556-4029.
- [69] COLLIN, O. L. – NIEGEL, C. – DeRHODES, K. E. – McCORD, B. R. – JACKSON, G. P. Fast Gas Chromatography of Explosive Compounds Using a Pulsed-Discharge Electron Capture Detector. *J. Forensic. Sci.*, 2006, vol. 51, no. 4, pp. 815-818. ISSN: 1556-4029.

- [70] WANG, J. – PUMERA, M. – CHATRATHI, M. P. – ESCAPRA, A. – MUSAMEH, M. Single-channel Microchip for Fast Screening and Detailed Identification of Nitroaromatic Explosives or Organophosphate Nerve Agents. *Anal. Chem.*, 2002, vol. 74, no. 5, pp. 1187-1191. ISSN: 1520-6882.
- [71] PICCIN, E. – DOSSI, N. – CAGAN, A. – CARRILHO, E. – WANG, J. Rapid and Sensitive Measurements of Nitrate Ester Explosives using Microchip Electrophoresis with Electrochemical Detection. *Analyst*, 2009, vol. 134, no. 3, pp. 528-532. ISSN: 0003-2654.
- [72] BAILEY, C. G. Separation of Explosives using Capillary Electrochromatography. *Anal. Chem.*, 1998, vol. 70, no. 15, pp. 3275-3279. ISSN: 1520-6882.
- [73] GIORDANO, B. C. – COPPER, C. L. – COLLINS, G. E. Micellar Electrokinetic Chromatography and Capillary Electrochromatography of Nitroaromatic Explosives in Seawater. *Electrophoresis*, 2006, vol. 27, no. 4, pp. 778-786. ISSN: 1522-2683.
- [74] PETTIT, J. J. – DAVISSON, C. W. Development of a Portable Liquid Chromatograph for the Analysis of Pesticides. *Abstr. Pap. Am. Chem. S.*, 1980, vol. 180, no. AUG, pp. 4-ASCS. ISSN: 0065-7727.
- [75] OTAGAWA, T. – STETTER, J. R. – ZAROMB, S. Portable Liquid Chromatograph of Analysis of Primary Aromatic-Amines in Coal-derived Materials. *J. Chromatogr.*, 1986, vol. 360, no. 1, pp. 252-259. ISSN: 0021-9673.
- [76] SUSHCHIK, N. N. – GLADYSHEV, M. I. – KALACHOVA, G. S. Rapid Assay of Fatty-acid Composition using a Portable High-performance Liquid Chromatograph for Monitoring Aquatic Ecosystems. *J. Chromatogr. A*, 1995, vol. 695, no. 2, pp. 223-228. ISSN: 0021-9673.
- [77] BARAM, G. I. Portable Liquid Chromatograph for Mobile Laboratories . 1. *Aims. J. Chromatogr. A*, 1996, vol. 728, no. 1-2, pp. 387-399. ISSN: 0021-9673.