**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

*Přírodovědecká fakulta*

**Katedra analytické chemie**

# Porovnání různých metod pro stanovení fenolu ve vodách

## The comparison of various methods for determination of phenol in waters

Diplomová práce oboru Chemie životního prostředí

**Praha 2009** **Eva Egersdorfová**

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitele Doc. RNDr. Pavla Coufala, PhD., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala. Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne……

……

Podpis

## Poděkování

Ráda bych poděkovala Doc. Pavlu Coufalovi, Ph.D za odborné vedení a konzultace, které mi vždy s ochotou poskytoval v průběhu zpracování diplomové práce. Ministerstvu školství, mládeže a tělovýchovy České republiky za finanční podporu této práce prostřednictvím výzkumného záměru MSM0021620875.

**Předmětová hesla:** analytická chemie

odměrná analýza

optické metody

separační metody

**Klíčová slova:** fenol

bromometrie

spektrofotometrie

vysokoúčinná kapalinová chromatografie

kapilární kapalinová chromatografie

# OBSAH


**1 ÚVOD ..... 8**

**2 TEORETICKÁ ČÁST ..... 10**

**2.1 Hydroxysloučeniny, fenoly ..... 10**

2.1.1 Fyzikálně chemické vlastnosti fenolu ..... 10

2.1.2 Zdroje fenolů ..... 11

2.1.3 Toxicita fenolu a jeho degradace ..... 13

2.1.4 Metody stanovení fenolu ..... 13

**2.2 Bromometrie ..... 14**

2.2.1 Bromoetrické stanovení fenolu ..... 15

**2.3 Spektrofotometrie ..... 15**

2.3.1 Spektrofotometrické stanovení fenolu pomocí 4-aminoantipyrinu ..... 17

**2.4 Separační metody ..... 18**

2.4.1 Detekce u chromatografických metod ..... 19

2.4.2 Chromatografické kolony ..... 19

2.4.3 Monolitické kolony v kapilární kapalinové chromatografii ..... 20

2.4.4 Základní parametry separace v kolonové chromatografii ..... 20

2.4.5 Účinnost separačního procesu ..... 21

**3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST ..... 23**

3.1 Chemikálie ..... 23

3.2 Vzorky vod ..... 23

3.3 Instrumentace ..... 23

3.4 Laboratorní pomůcky ..... 24

3.5 Pracovní postupy ..... 24

3.5.1 HPLC a CLC ..... 24
3.5.1.1 Experimentální podmínky ..... 24
3.5.2 Spektrofotometrie ..... 24
3.5.2.1 Spektrofotometrické stanovení ..... 24
3.5.3 Bromometrie ..... 25
3.5.3.1 Standardizace odměrného roztoku $Na_2S_2O_3$na $KBrO_3$ ..... 25
3.5.3.2 Příprava vzorků fenolu a jeho bromometrické stanovení ..... 25
**4 VÝSLEDKY A DISKUZE ..... 27**
**4.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie ..... 27**
4.1.1 Určení vlnových délek detekce ..... 27
4.1.2 Kvantitativní analýza fenolu ..... 28
4.1.3 Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti ..... 31
4.1.4 Přesnost metody ..... 34
4.1.5 Stanovení časové stálosti vzorku fenolu ve vltavské vodě ..... 36
**4.2 Kapilární kapalinová chromatografie ..... 37**
4.2.1 Kvantitativní analýza fenolu ..... 37
4.2.2 Stanovení meze detekce a meze stanovení ..... 40
4.2.3 Přesnost metody ..... 43
4.2.4 Porovnání chromatografických kolon ..... 45
**4.3 Spektrofotometrické stanovení fenolu ve viditelné oblasti spektra ..... 46**
4.3.1 Spektrofotometrické stanovení fenolu pomocí 4-aminonatipyrinu ..... 46
4.3.2 Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti ..... 48
4.3.3 Přesnost metody ..... 49
**4.4 Bromometrie ..... 50**

4.4.1 Příprava odměrného roztoku thiosíranu sodného a jeho standardizace na bromičnan draselný....50
4.4.2 Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti....51
4.4.3 Přesnost metody....51
**5 ZÁVĚR....53**
**6 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ....54**
**7 SEZNAM LITERATURY....57**

# 1. Úvod

Voda pokrývá dvě třetiny zemského povrchu a její objem se odhaduje na $1{,}5 \cdot 10^9$ km$^3$. ČR má mimořádně nepříznivou situaci v zásobování vodou, neboť je zcela závislá na dešťových srážkách a tání sněhu. V průměru na jednoho obyvatele připadá v ČR kolem 150 L vody za den, v Praze je spotřeba přibližně o čtvrtinu vyšší. Průmysl a zemědělská činnost nepříznivě ovlivňují čistotu vod. Voda, která není znečištěna činností člověka, má prakticky konstantní zastoupení tří hlavních typů organických látek: karbohydráty (celulosa, cukry, atd.) 82 %, proteiny 17 % a lipidy 1 %. Pokud je obsah uvedených látek vyšší, nebo pokud se objeví ve vodě další organické látky, svědčí to o kontaminaci vody. Hlavními zdroji kontaminace vody jsou splašky, zemědělské odpady a splachy a dále pak průmyslové odpadní vody.

Široké spektrum látek produkovaných člověkem vede k tomu, že se tyto látky objevují v odpadních vodách, následně potom ve vodách povrchových a konečně i ve vodách pitných. Rozdíly jsou pouze v kvantitě. Jestliže se nějaký polutant trvale objevuje v odpadních vodách na úrovni $10^{-3}$ g/L, potom je otázkou času, kdy se objeví v 1pitné vodě na úrovni $10^{-12}$ až $10^{-9}$ g/L. Znečištění vody chemickými látkami lze dělit do čtyř skupin:

1. Anionty, převážně anorganické.
2. Kovové polutanty jsou v mnohých případech přítomny jako ionty, část je však vázána v komplexech nebo v organokovových sloučeninách. Tzv. těžké kovy, hlavně olovo, kadmium a rtuť jsou ve vodě samozřejmě nežádoucí.
3. Organické polutanty těkavé, tj. takové, které lze vytěsnit z vody inertním plynem. Do této skupiny patří nejrůznější rozpouštědla s bodem varu asi do 100 °C, uhlovodíky a chlorované uhlovodíky s bodem varu asi do 250 °C. Podmínku těkavosti nesplňují látky, které ve vodě tvoří vodíkové můstky, např. fenoly, karboxylové kyseliny, atd.
4. Organické polutanty netěkavé plynule navazují na předcházející skupinu. V některých případech je problematické, zda je výhodnější látku z vody vytěsnit inertním plynem, nebo použít jinou techniku, např. extrakci kapalinou. Do skupiny netěkavých organických polutantů patří především vyšší uhlovodíky, polycyklické

aromáty, fenoly, chlorfenoly, pesticidy, chlorované bifenyly, polychlorované dibenzodioxiny a dibenzofurany a povrchově aktivní látky (tenzidy) [1].

Fenol je nepříjemným a jedovatým kontaminantem, který je vypouštěn do říčních toků mnoha chemickými továrnami v jejich odpadních vodách. Cílem této práce bylo porovnání metod a zjištění limitů detekce stanovení fenolu ve vodě z Vltavy pomocí separačních metod – vysokoúčinné kapalinové chromatografie, kapilární kapalinové chromatografie, odměrné analýzy – bromometrické titrace a optické metody – molekulové absorpční spektrofotometrie ve viditelné oblasti.

# 2 TEORETICKÁ ČÁST

## 2.1 HYDROXYSLOUČENINY, FENOLY

Hydroxysloučeniny, v nichž je hydroxylová skupina vázána na nasycený uhlíkový atom, v hybridizaci $sp^3$, se nazývají alkoholy. Pokud je tato skupina vázána přímo na aromatické jádro, jde o fenoly [2].

Fenoly jsou krystalické sloučeniny, jež obsahují jednu nebo více hydroxylových skupin. Podle toho se dělí na fenoly jednosytné a vícesytné. Přítomnost hydroxylových skupin v molekule zvyšuje polaritu a z tohoto důvodu se jednosytné i vícesytné fenoly, pokud neobsahují dlouhý postranní uhlíkový řetězec, dobře rozpouštějí ve vodě [3].

Fenoly jsou ve srovnání s alkoholy značně kyselejší, což vyplývá ze silné rezonanční stabilizace jejich anionů, fenolátů, a proto se u fenolů projevuje větší snaha odštěpit proton než u alkoholů. Fenoly jsou rovněž stabilizovány kladným mezomeriním efektem +M hydroxylové skupiny, ale mnohem méně než fenoláty, u kterých je delokalizován celý jednotkový záporný náboj. Fenoly a fenoláty jsou účinnými nukleofilními činidly. Elektrofilní substituce fenolů probíhá snadno, a to do poloh ortho a para, protože hydroxylová skupina silně atakuje jádro. Z tohoto důvodu fenol bromací nebo nitrací poskytuje příslušné 2,4,6-trisubstituované deriváty. Fenoly se kopulují s diazoniovými solemi, což má velký význam při výrobě azobarviv [3].

### 2.1.1 Fyzikálně chemické vlastnosti fenolu

Fenol, dříve nazývaný kyselina karbolová, byl prvně izolován z dehtu roku 1934. Dále se může získávat zahříváním monochlorbenzenu s vodným hydroxidem sodným pod vysokým tlakem. Tvoří bezbarvé krystalky, charakteristického zápachu, které delším skladováním červenají až hnědnou. Základní fyzikálně chemické vlastnosti fenolu jsou uvedeny v tabulce 1.

**Tabulka 1** Fyzikálně - chemické vlastnosti fenolu.

| | |
|---|---|
| **Sumární vzorec** | $C_6H_6O$ |
| **CAS – No.** | 108-95-2 |
| **Molární hmotnost** | 94,11 g/mol |
| **pH** | 6 |
| **Bod varu** | 182 °C |
| **Bod tání** | 40 – 42 °C |
| **Bod vzplanutí** | 79 °C |
| **Teplota samovznícení** | 715 °C |
| **Tlak par** | 0,36 mmHg (20 °C) |
| **Hustota** | 1,071 g/cm$^3$ |
| **Povrchové napětí** | 38,2 mN/m |
| **Viskozita** | 3,437 Pa s |
| **Hustota par** | 3,24 g/l |
| **Mez výbušnosti** | spodní 1,7 horní 8,6 vol.% |
| **Rozdělovací koeficient** | log $k_{ow}$ 1,46 (50 °C) |

### 2.1.2 Zdroje fenolů

Fenoly jsou nebezpečné látky, náležející do skupiny organických aromatických látek. Fenol se rychle rozkládá ve vzduchu (polovina se ho rozloží během jednoho dne), v půdě je rozložen během 2-5 dnů, ve vodě může přetrvávat po dobu delší než 9 dnů [4]. Do skupiny fenolů patří jak látky přirozeně se vyskytující, tak člověkem vyrobené sloučeniny. Fenoly a jejich deriváty jsou široce rozšířené přírodní látky, které jsou produkovány celou řadou rostlin a živočichů, ale i člověkem. Právě tyto přirozené deriváty fenolů zapříčiňují chuť a barvu mnohých poživatin. Fenoly používají rostliny k produkci ligninu, hlavního přírodního polymeru ve dřevě. Přírodní fenoly nejsou produkovány ve významném množství. Významnější problém představují nadměrná množství fenolů a jejich derivátů, která mohou do životního prostředí unikat v rámci lidské činnosti [5].

Mezi antropogenní zdroje emisí patří:

- úniky při výrobě fenolů;
- úniky z chemického průmyslu při užívání (desinfekce vodních potrubních systémů) a aplikaci fenolů do produktů (např. fenolové pryskyřice a umělá vlákna), odpady z tepelného zpracování uhlí, petrochemie,
- kontaminace vody z nátěrů obsahujících fenoly a jejich deriváty,
- spalovací procesy, např. spalovací motory, cigaretový kouř, otevřená ohniště,
- úniky chlorfenolů do ovzduší během spalování látek obsahujících chlor,
- fenoly mohou být do životního prostředí také vyluhovány ze špatně zajištěných skládek odpadů,
- vznik chlorfenolů v rámci chlorace vod s obsahem fenolů.

Fenoly emitované antropogenní cestou a jejich deriváty mohou mít díky svým vlastnostem negativní vliv na životní prostředí. Antropogenní úniky z důvodu omezené těkavosti fenolů většinou směřují do vody nebo půdy. Nechlorované deriváty fenolů jsou v aerobním prostředí rozkládány mikroorganismy na neškodné produkty. Za nepřístupu vzduchu, např. ve skládkách, sedimentech či v podzemních vodách, jsou stabilnější. Přestože fenoly nejsou látkami ze skupiny těkavých organických látek (VOC-Volatile Organic Compounds), objevují se v literatuře informace, že mohou po vypaření reagovat s dalšími polutanty přítomnými v ovzduší, a tak potenciálně přispívat ke tvorbě škodlivého přízemního ozonu tzv. fotochemického smogu [5].

Hlavním legislativním nástrojem v ČR upravujícím zastoupení fenolů a fenolických sloučenin ve vodním prostředí je nařízení vlády č. 61/2003 Sb., o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a do kanalizací a o citlivých oblastech, které stanovuje emisní standardy pro obsah fenolů v odpadních vodách, vypouštěných z vybraných průmyslových odvětví, imisní standardy pro obsah fenolů v povrchových vodách a požaduje nezvyšování jejich obsahu v sedimentech, plaveninách a živých organismech [7].

Fenol a jeho deriváty jsou široce využívány v chemickém průmyslu. Fenol je hlavním chemickým meziproduktem pro výrobu syntetických vláken a fenolových pryskyřic. Používá se také jako slimicid (protislizový prostředek pro zamezení růstu

bakterií a houbového slizu) v průmyslových vodních systémech, dále jako desinfekční prostředek. Některé druhy bakterií odolávají i dlouhodobému působení fenolů. Např. *Bacillus stearothermophilis* je rezistentní vůči většině fenolů a *Bacillus magaterium* nejcitlivější [8]. V léčivech se fenol používá v prostředcích proti bolení v krku a proti kožním onemocněním, jako jsou např. bradavice.

### 2.1.3 Toxicita fenolu a jeho degradace

Fenol je toxický pro vodní živočichy [9-12], obecně ryby se zdají být nejcitlivější. Znečištění vody fenolem by proto mohlo poškodit vodní organismy a ekosystémy. Předpokládá se, že fenol se na rozdíl od chlorfenolu nebioakumuluje, a tudíž se jeho koncentrace nezvyšuje v potravním řetězci [4].

Fenol je nebezpečný pro lidské zdraví. Je silným protoplasmatickým jedem a může vyvolat genetická poškození. Nadměrná expozice může mít vliv na mozek, trávicí systém, oči, srdce, ledviny, játra, plíce, periferní nervy a kůži [13].

Práce Fanga a Zhoua [14]; Blaszczyka a kol. [15]; Sarfaraza a kol. [16] se zabývaly degradací fenolu za anoxických podmínek a za aerobních podmínek práce Buitrona a kol. [17]; Gonzaleze a kol. [18]. V dalších pracích se lze setkat s použitím železnatých solí, jako $FeCl_3$ a $[FeCl_4]^-$, které způsobují degradaci fenolu a substituovaných fenolů ve vodních roztocích za aerobních podmínek. Oxidy kovů, CuO a $V_2O_5$ jsou též schopny aerobní degradace fenolů, ale mají velmi specifickou substrátovou selektivitu. CuO poměrně špatně rozkládá fenol, zatímco halogenované fenoly poměrně rychle oxiduje. Naopak $V_2O_5$ rychle oxiduje fenol a isomerní nitrofenol [19].

### 2.1.4 Metody stanovení fenolu

Chemické vlastnosti fenolu umožňují ke stanovení fenolu použít různé analytické metody, jako bromometrickou titraci [20]. Fenoly a chlorfenoly podobně jako jiné aromatické polutanty vykazují v alkalickém prostředí výraznou absorpci v UV oblasti, která je vhodná pro jejich rychlé spektrofotometrické stanovení [21-24]. Pro účinnou separaci a stanovení fenolů lze rovněž použít různé varianty plynové chromatografie (GC) [25-26], vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) [27-28] po případném

zkoncentrování kapalinovou extrakcí, extrakcí na pevné sorbenty (SPE) [29-32] nebo pomocí single drop extrakce [33], a také kapilární elektroforézou [34-36], izotachoforézou [37]. Další metodou jak stanovit fenol ve vodě jsou elektrochemické metody [38]. V neposlední radě lze fenol stanovit pomocí velmi citlivé, enzymatické průtokové injekční analýzy (FIA). Byl vyvinut postup pro stanovení fenolu fluorimetricky. Při kontaktu s tyrosinasou, se fenol oxiduje na o-benzochinon, který oxiduje kyselinu askorbovou na kyselinu dehydroaskorbovou, jež produkuje katechol. Následně je katechol enzymaticky reoxidován na o-benzochinon [39].

## 2.2 BROMOMETRIE

Bromometrie patří mezi oxidimetrické titrace. Jako odměrný roztok se používá $KBrO_3$, který je v kyselém prostředí silným oxidovadlem, schopným oxidovat anorganické i organické látky. Pokud je v roztoku přítomna stanovovaná látka, probíhá redukce bromičnanu podle reakce [40]:

$$5\ BrO_3^- + 6\ H^+ + 6\ e^- \rightarrow 5\ Br^- + 3\ H_2O \qquad E^\circ = 1{,}42\ V$$

Odměrný roztok $KBrO_3$ je stálý a připravuje se rozpuštěním navážky $KBrO_3$, který je základní látkou. Titrace se provádějí v roztocích okyselených kyselinou chlorovodíkovou nebo sírovou. Indikace bodu ekvivalence je založena na reakci [41]:

$$5\,Br^- + BrO_3^- + 6\,H^+ \rightarrow 3\,Br_2 + 3\,H_2O$$

Určení konce titrace je založeno na indikaci uvolněného bromu dvěma způsoby. Buď prvním nepatrným nadbytkem bromičnanu po dosažení bodu ekvivalence se uvolní $Br_2$, který rozruší přidanou methylovou červeň nebo methylovou oranž, což je vizuální neutralizační indikátor, na bezbarvé produkty, takže je bod ekvivalence indikován odbarvením roztoku, tedy rozrušením nevratného redoxního vizuálního indikátoru. Ve druhém případě se aplikuje jodometrická indikace, kdy první přebytek bromičnanu poskytne reakcí s přidaným jodidem elementární jod, zbarvující škrobový maz modře [42, 43].

Bromometricky lze v kyselém prostředí stanovit soli cínaté, antimonité, arsenité, thallné a měďné, které se při titraci oxidují na sloučeniny $Sn^{4+}$, $Sb^{5+}$, $As^{5+}$, $Tl^{3+}$ a $Cu^{2+}$.

Titrací bromičnanem za přítomnosti bromidu, tedy bromometricky je možné také stanovit dvojné vazby v nenasycených organických sloučeninách:

$$R_1\text{-}CH{=}CH\text{-}R_2 \; + \; Br_2 \; \rightarrow \; R_1\text{-}CHBr\text{-}CHBr\text{-}R_2$$

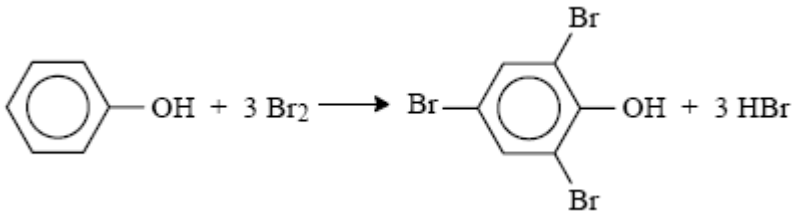
a dále organické látky, jako např. fenol nebo anilin [41, 43].

### 2.2.1 Bromometrické stanovení fenolu

Stanovení fenolu je založené na substitučním působení bromu. Brom se přitom přímo v reakční směsi produkuje reakcí bromičnanu s bromidem po okyselení:

$$BrO_3^- \; + \; 5 \; Br^- \; + \; 6 \; H^+ \rightarrow \; 3 \; Br_2 \; + \; 3 \; H_2O$$

Vzhledem k tomu, že substituční reakce jsou relativně pomalé, působí se přebytkem bromu po předepsanou dobu podle schématu:




Přebytek bromu se určí jodometricky titrací thiosíranem sodným. Výhodou je možnost citlivé a velmi selektivní indikace konce titrace na škrob jako indikátor [8]:

$$Br_2 \; + \; 2 \; I^- \rightarrow \; 2 \; Br^- \; + \; I_2$$

$$I_2 \; + \; 2 \; S_2O_3^{2-} \; \rightarrow \; 2 \; I^- \; + \; S_4O_6^{2-}$$

## 2.3 SPEKTROFOTOMETRIE

Spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné oblasti spektra navazuje na vývojově klasickou kolorimetrii, a je tudíž nejstarší fyzikálně chemickou metodou, a to nejen ve skupině optických metod. Po více než staletém vývoji si spektrofotometrické metody ještě stále udržují své pevné postavení v systému analytických instrumentálních metod

především díky své jednoduchosti jak v přípravě vzorků, tak v konečném měření absorbance. Analýza je rychlá, přesná a citlivá.

Ultrafialové a viditelné záření tvoří malý úsek z celkové oblasti elekomagnetického záření. Molekulová absorpční spektrometrie ve viditelné oblasti se zabývá měřením látek, které absorbují elektromagnetické záření v rozsahu vlnových délek 380 nm až do oblasti 760 nm. Látky absorbující v této oblasti se jeví oku barevné. Vlnová délka pohlceného záření neodpovídá barvě látky, jež vnímáme, ale barvě komplementární.

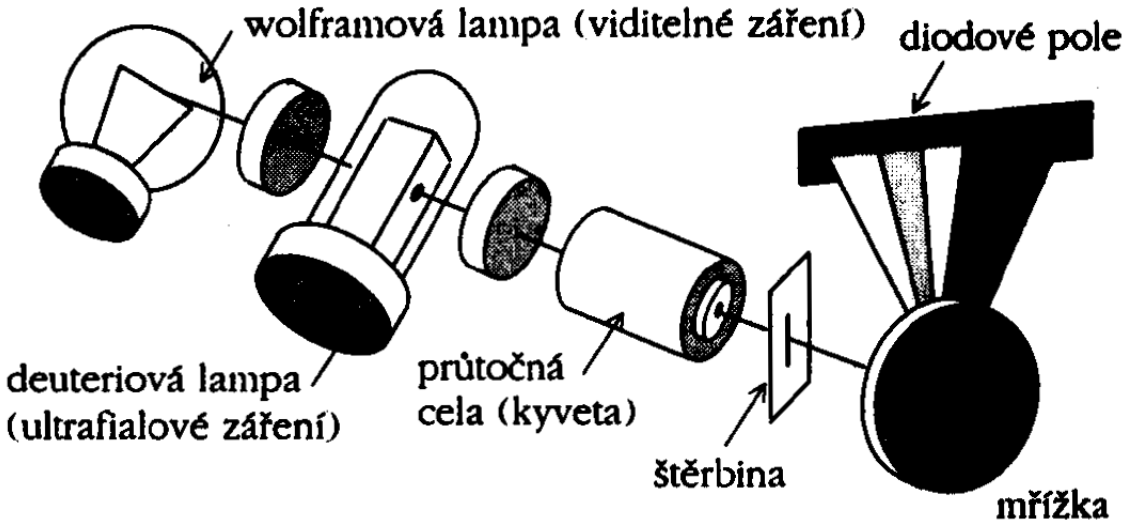
Pokud stanovovaný analyt nevykazuje dostatečnou absorbanci při nějaké vhodné vlnové délce v této oblasti spektra, pak se musí nejprve nechat reagovat s vhodným činidlem, s nímž vytváří přesně definovaný barevný produkt. Intenzita zabarvení roztoku je pak přímo úměrná koncentraci analytu v analyzovaném roztoku a lze ji změřit spektrofotometrem jako hodnotu absorbance příslušného barevného roztoku. Nejprve se proměřuje absorpční křivka barevného produktu závislosti absorbance ($A$) barevného produktu na vlnové délce ($\lambda$) absorbovaného záření. Z absorpční křivky se poté zjistí vlnová délka maxima, při níž barevný produkt vykazuje největší absorbanci a při které je stanovení analytu nejcitlivější. Absorbance při vlnové délce maxima se použije ke konstrukci kalibrační přímky a ke stanovení analytu. Spojený zákon Lambertův-Beerův vyjadřuje vztah mezi absorbovaným zářením, tloušťkou absorbujícího prostředí a jeho koncentrací. Absorbance vzniklého barevného produktu je přímo úměrná koncentraci analytu ve vzorku podle vztahu:

$$A_\lambda = \varepsilon_\lambda \cdot d \cdot c \qquad (1)$$

kde:

$A_\lambda$ je absorbance roztoku při vlnové délce $\lambda$; $\varepsilon_\lambda$ je molární absorpční koeficient barevného produktu (L/mol · cm); $d$ je optická dráha paprsku, tedy tloušťka kyvety (cm) a $c$ je molární koncentrace analytu (mol/L). Tento zákon platí jen pro zředěné roztoky, kde je možné zanedbat změnu indexu lomu měřeného roztoku se změnou koncentrace barevné látky.

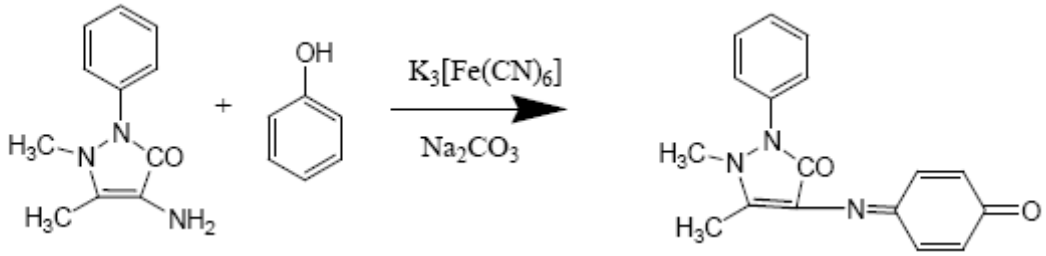
Při měření pomocí diodového pole (diode-array) prochází vzorkem bílé světlo, které je až poté rozloženo na jednotlivé vlnové délky (zpravidla pomocí pevně postavené optické mřížky) a dopadá na destičku s mnoha detektory – fotodiod (odtud název diodové pole). Diodové pole je přitom umístěno tak, že na každou fotodiodu dopadá určitý (poměrně úzký – např. 2 nm) rozsah vlnových délek. Zařízení neobsahuje žádné pohyblivé prvky, což zvyšuje reprodukovatelnost měření, a navíc se změří celé spektrum najednou. Doba měření se tak muže zkrátit z několika minut na zlomky sekundy. Toto uspořádání navíc umožňuje konstruovat přístroje přibližně o řád přesnější, než klasické fotometry, navíc nevyžadující prakticky žádnou údržbu, kalibraci atd. Na obrázku 1 je znázorněno základní schéma spektrofotometru diodového pole.




**Obrázek 1** Základní schéma spektrofotometru diodového pole [44].

### 2.3.1. Spektrofotometrické stanovení fenolu pomocí 4-aminoantipyrinu

Základem tohoto spektrofotometrického stanovení je reakce fenolu s 4-aminoantipyrinem (4-amino-2,3-dimethyl-1-fenyl-3-pyrazolin-5-on) v alkalickém prostředí v přítomnosti hexakynoželezitanu draselného za vzniku červeného barviva chinoidní struktury podle schématu [43]:




## 2.4 SEPARAČNÍ METODY

Kapalinová chromatografie je jednou z chromatografických separačních metod, při níž se molekuly analytu rozdělují mezi stacionární a mobilní fázi. Dělení je založeno na rozdílné afinitě složek směsi k mobilní a stacionární fázi. Kapalinovou chromatografii můžeme dělit pole typu stacionární fáze na:

- sorpční chromatografii, kdy se separace uskutečňuje specifickými interakcemi částice s povrchem adsorbentu – adsorpční chromatografie (liquid-solid chromatography) – LSC nebo se stagnující kapalnou stacionární fází nanesenou na nosiči – rozdělovací (absorpční) chromatografie (liquid-liquid chromatography) – LLC,
- gelovou (permeační) chromatografii (GPC), kdy se separace uskutečňuje na základě velikosti částic a velikosti pórů gelu,
- ionexová chromatografie (ion-exchange chromatography, IEC), kdy dochází k separaci iontů na základě specifických interakci s nabitým nosičem,
- speciální chromatografii – afinitní, chirální aj.

V Chromatografii s obrácenými fázemi je proti běžnému provedení, stacionární fáze nepolární a mobilní fáze polární kapalina. Jako stacionární nepolární fáze se používají (uhlovodíkové řetězce C4 - C18) chemicky vázané na nosič (grafitové nebo uhlíkem potažené silikagely, kopolymery styrenu a divinylbenzenu atd.). Ve většině aplikací této metody slouží jako mobilní fáze směs vody a organického rozpouštědla (acetonitrilu, isopropanolu, methanolu ap.). Vzhledem k nepolárnímu charakteru stacionární fáze k ní mají větší afinitu látky s vyšším obsahem hydrofobních oblastí, tedy méně polární. Chromatografie s reversní fází se uplatňuje zejména v uspořádání HPLC.

### 2.4.1 Detekce u chromatografických metod

Detektorů založených na měření různých fyzikálně-chemických parametrů látek vystupujících z chromatografických kolon existuje velké množství. Liší se od sebe nejen fyzikální podstatou měření, ale i použitelností a citlivostí. V HPLC jsou detektory obecně citlivější a rozmanitější než v plynové chromatografii. Detektor musí být kompaktní s viskózními systémy s malými výřivými koeficienty, musí být univerzální nebo selektivní a musí poskytovat dostatečně rychlou odezvu. Mezi nejčastěji používané detektory patří:

- průtokové jako jsou UV-VIS spektrofotometry, DAD spektrofotometry (Diode Array Detector), fluorimetry, polarimetry, vodivostní detektory, hmotnostní detektory, coulometry, dielektrimetry, refraktometry, radiometry atd.,
- neprůtokové přístroje umožňují sběr frakcí, jejichž analýza proběhne následně.

### 2.4.2 Chromatografické kolony

Účinnost chromatografické kolony závisí na použité stacionární fázi. Dále na délce kolony a na jejím tvaru, materiálu kolony, úpravě vnitřního povrchu kolony a na množství spojovacích částí. Chromatografické kolony se zhotovují z nerezové oceli nebo ze skla. Nejvýhodnější jsou kovové kolony, jejichž vnitřní povrch je potažen vrstvou skla. V současnosti se obvykle používají kolony o délce 10 až 30 cm. Průměr analytických kolon bývá v řádu jednotek milimetrů. Kolony lze plnit stacionární fází přímo v laboratoři, nebo je možné je koupit od výrobců. V současnosti se jako velice nadějné jeví použití kapilárních kolon, jejichž průměr je srovnatelný s velikostí částic náplně.

### 2.4.3 Monolitické kolony v kapilární kapalinové chromatografii

Současný trend v kapalinové chromatografii vede k miniaturizaci kolon [45]. V laboratořích se začínají uplatňovat kapilární kapalinové chromatografy (CLC), které mají oproti klasické HPLC řadu výhod. Např. malá spotřeba vzorku a mobilní fáze, což má význam také z ekologického hlediska, dále dochází k menšímu naředění vzorku v koloně. Připravují se a testují nové typy monolitických kolon [46, 47]. Monolity jsou separační média, která lze přirovnat k jediné velké částici mající tvar i objem zcela zaplňující vnitřek separační kolony. Proti typickým kolonám plněným drobnými částicemi, monolity neobsahují mezičásticové prostory, kterými se v klasických kolonách uskutečňuje valná část průtoku. Z toho důvodu musí všechna mobilní fáze protékat póry monolitu. Monolity se připravují radikálovou polymerací směsi, která obsahuje monomer s funkční či reaktivní skupinou jako je butyl- nebo glycidyl-methakrylát, síťovadlo, monomer se dvěma či více dvojnými vazbami jako je např. divinylbenzen a ethylendimethakrylát, dále iniciátor a porogenní rozpouštědlo. Tato směs se naplní do formy, kde po zahřátí polymeruje [48]. V diplomové práci byla pro stanovení fenolu, rozpuštěného ve vltavské vodě, použita monolitická polybutylmethakrylátová kolona připravená na Katedře analytické chemie, Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze, kde v současné době probíhá výzkum a testování nových monolitických kolon [49-52].

### 2.4.4 Základní parametry separace v kolonové chromatografii

Grafický záznam závislosti signálu detektoru na čase se nazývá chromatogram. Zóny separovaných látek procházející detektorem jsou zaznamenávány jako koncentrační profily (chromatografické píky), které mají v ideálním případě tvar Gaussovy křivky. Retenční čas vzorku $(t_R)$ udává časový interval od nástřiku vzorku do okamžiku detekce odpovídající průchodu maximální koncentrace látky detektorem. Mrtvý čas kolony $(t_M)$ představuje časový interval od nástřiku vzorku do okamžiku detekce maximální koncentrace složky, jež není stacionární fází zadržována. Redukovaný retenční čas $(t'_R)$ charakterizuje dobu, po kterou se analyt zdrží interakcemi se stacionární fází:

$$t'_R = t_R - t_M \qquad (2)$$

Některé analyty jsou na koloně zadržovány méně a některé více, což se projevuje rozdílem v jejich retenčních časech, které se dají porovnat pomocí retenčních faktorů *k*:

$$k = (t_R - t_M) / t_M \quad (3)$$

kde $t_R$ je retenční čas analytu, $t_M$ je mrtvý čas. Rozlišení ($R_S$) dvou složek elulujících v různých časech je definováno vztahem:

$$R_S = 2 \cdot (t_{R,2} - t_{R,1}) / (Y_2 + Y_1) \quad (4)$$

kde $t_{R,2}$ je retenční čas později eluující složky vzorku, $t_{R,1}$ retenční čas dříve eluující složky vzorku a $Y_1$, $Y_2$ šířky chromatografických píků při základně. Látky považujeme za zcela oddělené, jestliže $R \geq 1{,}5$, v případě symetrických píků mnohdy postačí rozlišení R = 1,0.

### 2.4.5 Účinnost separačního procesu

Účinnost chromatografické kolony klesá s rostoucí rychlostí rozmývání zón separovaných látek. Kinetika procesu rozmývání byla popsána následujícími teoriemi:

- teorie chromatografického patra (Martin a Synge, 1941)
- van Deemterova dynamická teorie (van Deemter, 1956)

Za předpokladu Gaussovského symetrického píku lze počet teoretických pater vyjádřit vztahem:

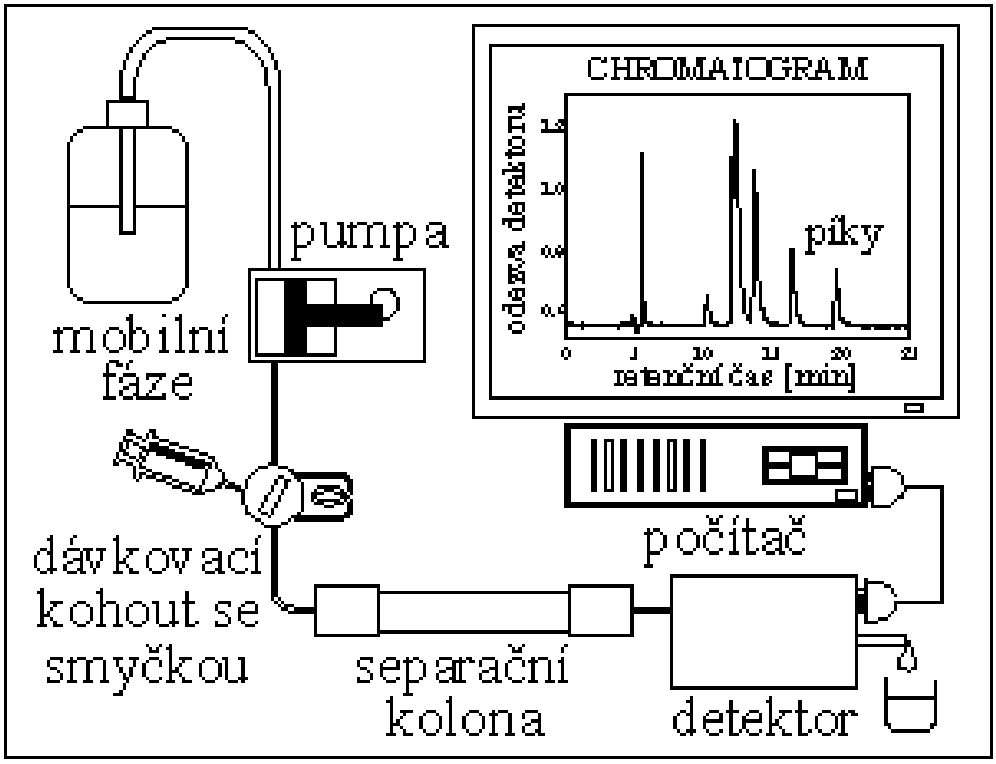
$$n = 16 \cdot t^2_{R,i} / Y^2 = 5{,}54 \cdot t^2_{R,i} / Y^2_{1/2} \quad (5)$$

kde *n* je počet teoretických pater kolony, $t_{R,i}$ je retenční čas látky i, *Y* je šířka píku při základně a $Y_{1/2}$ je šířka píku v polovině výšky. K porovnání účinností kolon různých délek se používá údaj o počtu teoretických pater na jednotku délky kolony nebo údaj o výšce teoretického patra H:

$$H = L / n \quad (6)$$

kde *H* je výškový ekvivalent teoretického patra, *L* je délka kolony a *n* je počet teoretických pater.

Na obrázku je zobrazeno základní schéma HPLC, které se skládá z detektoru, chromatografické kolony, vysokotlakého čerpadla, zásobníku mobilní fáze, dávkovacího ventilu se smyčkou a vyhodnocovacího zařízení.




**Obrázek 2** Schéma HPLC [53].

# 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 3.1. CHEMIKÁLIE

V této práci byly použity pro bromometrické stanovení chemikálie o příslušné čistotě: fenol (p.a.) $M_h$(fenol) = 94,11 g/mol, $KBrO_3$ (p.a.) $M_h(KBrO_3)$ = 167,02 g/mol, KBr (p.a.), $KIO_3$ (p.a.), KI (p.a.), $Na_2S_2O_3$ (p.a.) dodané firmou Lachema (ČR). 4-amino-2,3-dimethyl-1-fenyl-3-pyrazolin-5-on (p.a.) dodaný firmou Merck (Darmstadt, Německo) a $Na_2CO_3$ (p.a.), $K_3[Fe(CN)_6]$ (p.a.), $NaNO_3$ (p.a.) a HCl (p.a.) dodané firmou Lachema byly použity pro spektrofotometrické stanovení. Acetonitril (p.a) od firmy Merck (Darmstadt, Německo) byl použit pro HPLC a CLC. Deionizovaná voda použitá v této práci, připravená na principu reverzní osmózy, byla přečištěna přístrojem Mili-Q (Millipore Corporaton, USA).

## 3.2. VZORKY VOD

Vzorky vody byly odebrány z řeky Vltavy v Praze na Výtoni do 1,5 litrové lahve. Po transportu do laboratoře byl vzorek ihned zfiltrován přes papírový filtr. Vzorky pro sledování stability fenolu ve vodě byly připraveny o koncentraci 4 mg/L.

## 3.3. INSTRUMENTACE

K experimentální práci byly použity následující přístroje: spektrofotometr Agilent Technologies 8453 (Agilent Technologies, Waldbronn, Německo) s měřením ve viditelné i ultrafialové oblasti spektra 190 – 1100 nm, osobní počítač s ovládacím programem UV-Visible ChemStation, verze 9.01. Kapalinový chromatograf, který se skládal z čerpadla LCP 4000 (Ecom, ČR), spektrofotometrického UV detektoru LCD 2084 (Ecom, ČR), dávkovacího ventilu s 10 μL smyčkou (Ecom, ČR) a chromatografické kolony Biospher PSI 100 C18 5 μm, 4,6x150 mm (Labio a.s, ČR). Kapilární kapalinový chromatogram, který se skládal z ISCO pumpy 100DM (Lincoln, NE, USA), polybutylmethakrylátové monolitické kolony připravené v laboratoři, 320 μm I.D, délky 18 cm, ze spektrofotometrického detektoru LINEAR UV/VIS 205 (San

Jose, CA, USA) s detekční celou a dávkovacího ventilu Valco se 60 nL smyčkou (Schenken, Švýcarsko). Získaná data byla zpracována pomocí programu CSW 1.7. od firmy Data Apex (Praha, ČR).

## 3.4. LABORATORNÍ POMŮCKY

K experimentální práci byly použity následující laboratorní pomůcky dodané firmou Simax (Praha, Česká republika): poloautomatická byreta (25 mL), odměrné baňky (25 mL, 50 mL, 100 mL, 200 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL, 2000 mL), kádinky, jodové baňky, odměrné válce (10 mL, 50 mL), dělená pipeta (10 mL), nedělené pipety (5 mL, 10 mL, 20 mL a 25 mL).

## 3.5 PRACOVNÍ POSTUPY

### 3.5.1 HPLC a CLC

Mrtvý čas kolony byl určen vodným roztokem uracilu o koncentraci $1 \cdot 10^{-3}$ mol/L. Zásobní roztok fenolu o koncentraci 30 g/L byl připraven rozpuštěním příslušného množství ve vodě z Vltavy. Roztoky pro měření kalibračních závislostí byly připraveny ředěním tohoto zásobního roztoku.

#### 3.5.1.1 Experimentální podmínky

Všechna měření byla prováděna při laboratorní teplotě. Dávkovaný objem vzorků u vysokoúčinné kapalinové chromatografie byl 10 μL, průtok mobilní fáze 0,5 mL/min, vlnová délka 220 nm a 275 nm a u mikrokapalinové chromatografie dávkovaný objem vzorků činil 60 nL, průtok mobilní fáze 4 μL/min a vlnová délka detekce byla opět 220 nm a 275 nm.

### 3.5.2 Spektrofotometrie

#### 3.5.2.1 Spektrofotometrické stanovení

Nejprve bylo odpipetováno do 25 mL odměrných baněk 2, 4, 6, 8, 10 mL standardního roztoku fenolu o koncentraci 10 mg/L, dále bylo přidáno 0,5 mL 2%-ního roztoku 4-aminoantipyrinu a doplněno téměř po značku roztokem uhličitanu sodného. Poté bylo přidáno 0,25 mL 8%-ního $K_3[Fe(CN)_6]$ a doplněno po značku 0,05%-ním

roztokem uhličitanu sodného. Roztok byl důkladně protřepán [43]. Po 5 minutách byla proměřena absorpční křivka červeně zbarveného roztoku od 400 nm do 700 nm proti slepému vzorku. Srovnávacím slepým vzorkem se myslí roztok obsahující všechny složky ve stejném množství s výjimkou stanovované látky fenolu.

### 3.5.3 Bromometrie

#### 3.5.3.1 Standardizace odměrného roztoku $Na_2S_2O_3$na $KBrO_3$

K vypočítané navážce 12,4 g thiosíranu sodného bylo přidáno 0,5 g $Na_2CO_3$ jako stabilizátoru rozkladu thiosíranu a doplněno destilovanou vodou do 2000 mL odměrné baňky po rysku. Takto připravený odměrný roztok $Na_2S_2O_3$ byl standardizován na $KBrO_3$.

Pro standardizaci odměrného roztoku thiosíranu sodného bylo odpipetováno 25 mL zásobního roztoku $KBrO_3$, připraveného z 20,91 mg $KBrO_3$ naváženého na analytických vahách s přesností na desetinu mg a doplněno destilovanou vodou do 250 mL odměrné baňky. Dále byly do jodové baňky přidány 2 g pevného jodidu draselného, 10 mL $H_2SO_4$ ($c$ = 2 mol/L) pro okyselení a zředěno cca 150 mL destilované vody. Roztok byl důkladně promíchán a po chvíli zhnědlý roztok titrován odměrným roztokem thiosíranu sodného do slabě oranžového odstínu. Poté bylo přidáno 10 mL škrobu jako indikátoru a roztok byl dotitrován do odbarvení.

#### 3.5.3.2 Příprava vzorků fenolu a jeho bromometrické stanovení

Byl připraven zásobní roztok fenolu o koncentraci 1g/L. Z kapalného vzorku obsahujícího fenol bylo odpipetováno nedělenou pipetou 20 mL vzorku do jodové baňky, dále bylo přidáno 10 mL 0,1667 mol/L roztoku $KBrO_3$ a 0,084 mol/L KBr, (připraveného navážením 2,7836 g $KBrO_3$ a 10 g KBr a doplněného destilovanou vodou do 1000 mL odměrné baňky). Do jodové baňky bylo následně přidáno odměrným válcem 10 mL 2 mol/L $H_2SO_4$. Baňka byla ihned uzavřena zátkou a roztok ponechán stát 10 minut. Poté bylo přidáno 10 mL 10% KI a obsah baňky za občasného promíchávání ponechán stát dalších 10 minut. Poté byl uvolněný jód titrován standardním odměrným roztokem $Na_2S_2O_3$ o koncentraci 0,05 mol/L a faktoru

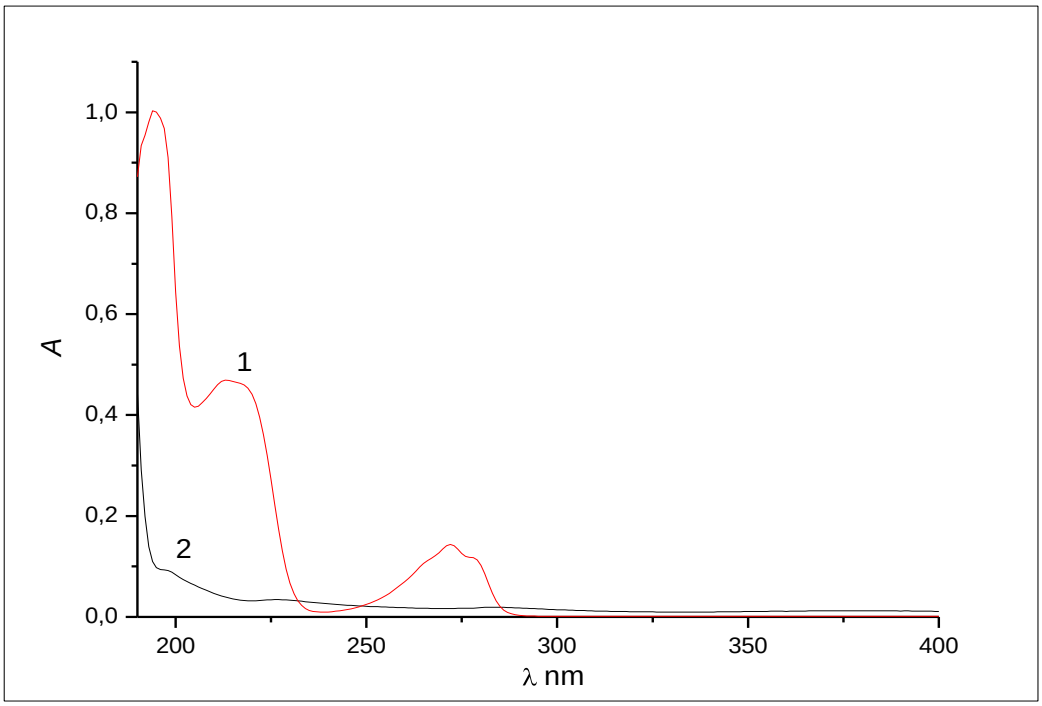
*f* = 0,9972 na škrob do odbarvení, který byl do titrovaného roztoku přidán až těsně před bodem ekvivalence [42].

# 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

## 4.1 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

### 4.1.1 Určení vlnových délek detekce

Prvním krokem pro obě separační metody HPLC a kapilární kapalinová chromatografie bylo proměření spekter fenolu a zjištění, při kterých vlnových délkách nejvíce fenol absorbuje. Na obrázku 3 je zobrazeno proměřené absorpční spektrum fenolu rozpuštěného v mobilní fázi.




**Obrázek 3** Spektra fenolu a mobilní fáze, (1) fenol rozpuštěný v mobilní fázi, (2) mobilní fáze 65% acetonitril.

Pro detekci byly vybrány vlnové délky 220 a 275 nm, protože při těchto vlnových délkách vykazoval vzorek fenolu vysokou absorbanci.

### 4.1.2 Kvantitativní analýza fenolu

Fenol byl rozpuštěn ve vodě z Vltavy v koncentračním rozsahu od 0,1 mg/L do 60 mg/L pro stanovení při vlnové délce 220 nm a dále byly připraveny roztoky fenolu od 0,6 mg/L do 200 mg/L, které byly následně stanoveny při vlnové délce 275 nm. Pro proměření kalibračních křivek fenolu byla použita mobilní fáze acetonitril-voda 65:35 (v/v), při průtoku 0,5 mL/min na chromatografické koloně Biospher PSI 100 C18. Měření bylo opakováno třikrát pro každou koncentraci roztoku fenolu. Průměrné plochy píků byly vyhodnoceny lineární regresí. Získané kalibrační křivky odpovídají závislosti plochy píků na molární koncentraci:

$$A = a + b \cdot c^{i} \qquad (7)$$

kde $A$ je průměrná plocha píků, $a$ je úsek, $b$ směrnice kalibrační přímky, $c$ je koncentrace analytu a $i$ je faktor linearity. V tabulce 2 jsou shrnuty úseky, směrnice, korelační koeficienty a lineární dynamické rozsahy jednotlivých kalibračních křivek pro roztoky fenolu při dvou vlnových délkách.

**Tabulka 2** Parametry kalibračních přímek, jejich směrodatné odchylky (uvedené v závorkách) a lineární dynamické rozsahy fenolu. Kolona Biospher PSI 100 C18; mobilní fáze acetonitril-voda 65:35 (v/v); průtok 0,5 mL/min; vlnová délka detekce 220 a 275 nm.

| **Vlnová délka (nm)** | ***r*** | **Směrnice ($10^{-6}$ mV·s·L/mol)** | **Úsek (mV·s)** | **Lineární dynamický rozsah (mol/L)** |
|---|---|---|---|---|
| 220 | 0,9996 | 20,0 | -25,2 | $2{,}13\cdot10^{-6}$ – $6{,}38\cdot10^{-4}$ |
| | | (0,15) | (39,2) | |
| 275 | 0,9999 | 6,0 | -3,13 | $8{,}50\cdot10^{-6}$ – $2{,}13\cdot10^{-3}$ |
| | | (0,02) | (5,85) | |

Při použití t-testu pro úseky $t = a/s_a$ bylo zjištěno, že žádný z úseků kalibračních křivek nebyl statisticky rozdílný od nuly na hladině významnosti $\alpha = 0{,}01$. Pro potvrzení či vyvrácení závislosti plochy píků na první mocnině koncentrace byly také vyneseny kalibrační závislosti v logaritmickém měřítku podle rovnice:

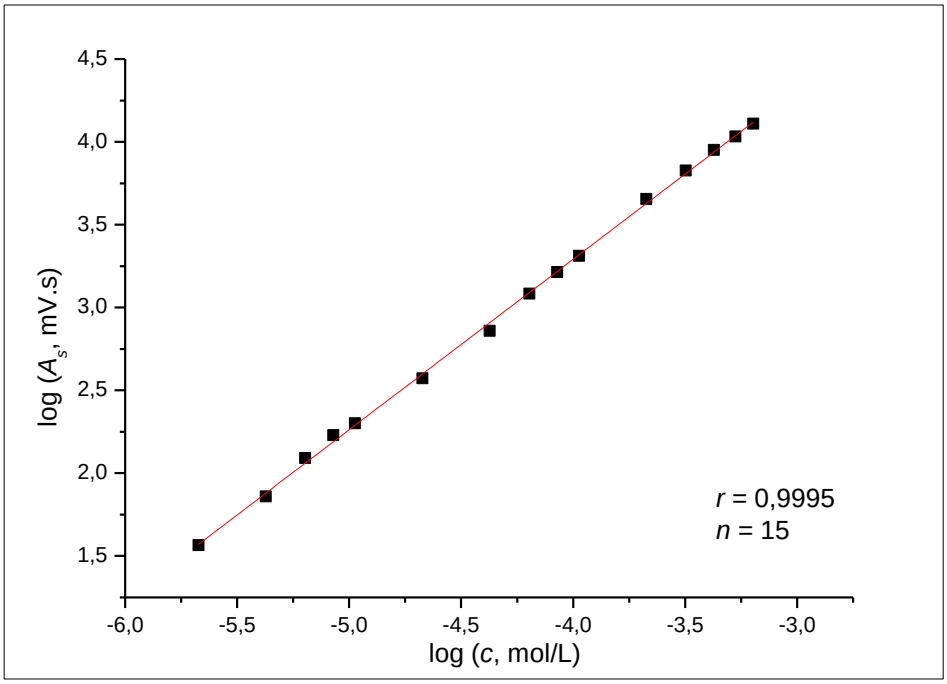
$$\log A = \log \beta + i \cdot \log c \qquad (8)$$

Vynesením log β proti log *c* se dostane v ideálním případě přímka, jejíž směrnice je rovna koeficientu linearity použitého měřícího zařízení. V tabulce 3 jsou shrnuty faktory linearity *i* a porovnání dekadických logaritmů směrnic (log β) získaných logaritmickou regresí a dekadických logaritmů směrnic (log b) z tabulky 2 pro obě měřené vlnové délky.

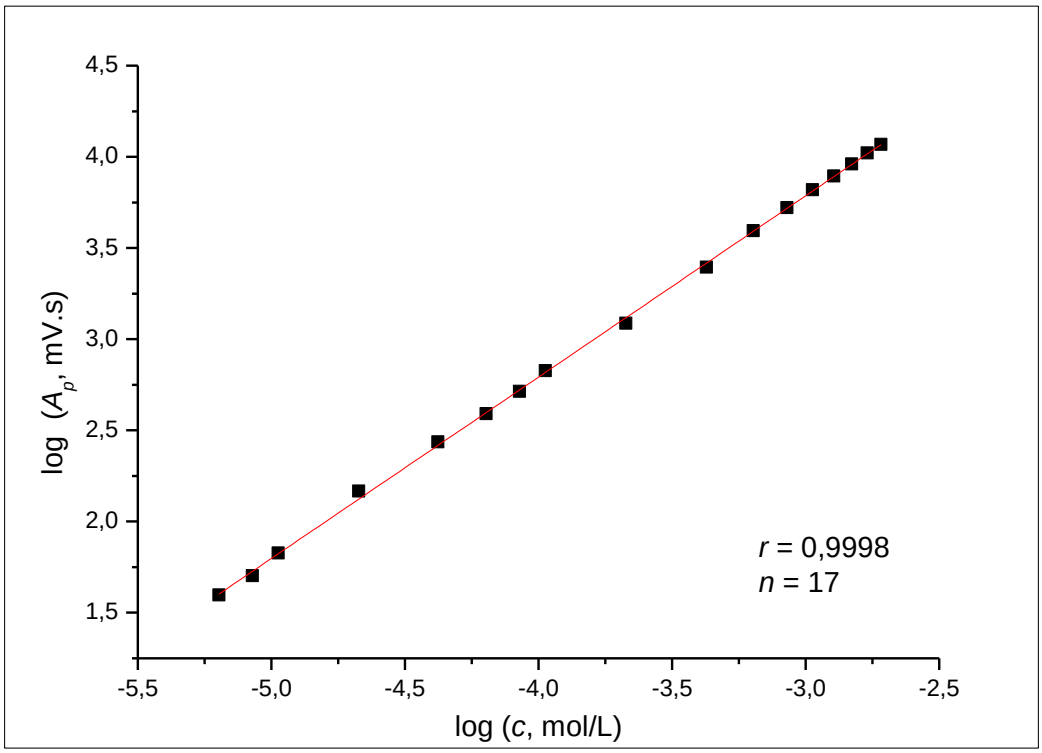
**Tabulka 3** Porovnání parametrů kalibračních křivek v logaritmickém měřítku a dekadických logaritmů. Stacionární fáze Biospher PSI 100 C18, mobilní fáze acetonitril-voda 65:35 (v/v), průtok 0,5 mL/min, vlnová délka detekce 220 a 275 nm.

| **Vlnová délka nm** | ***i*** | **log β** | **log b** |
|---|---|---|---|
| 220 | 1,03 | 7,41 | 7,30 |
| 275 | 0,99 | 6,77 | 6,78 |

Z hodnot v tabulce 3 vyplývá, že faktory linearity pro obě změřené vlnové délky jsou blízké hodnotě 1,00. A tudíž je možné říct, že plocha píků je závislá na první mocnině koncentrace pro roztoky fenolu. Při porovnání logaritmů směrnic obou regresních analýz (log b) a (log β) byla zjištěna dobrá shoda, z čehož také vyplývá statistická nevýznamnost úseků. Na obrázku 4 a 5 jsou jako příklad názorně uvedeny kalibrační křivky v logaritmickém měřítku pro fenol v lineárním dynamickém rozsahu $2{,}13 \cdot 10^{-6}$ – $6{,}38 \cdot 10^{-4}$ mol/L při vlnové délce 220 nm a $8{,}50 \cdot 10^{-6}$ – $2{,}12 \cdot 10^{-3}$ mol/L pro vlnovou délku 275 nm.




**Obrázek 4** Závislost dekadického logaritmu plochy píku na dekadickém logaritmu molární koncentrace fenolu v rozmezí koncentrací $2{,}13 \cdot 10^{-6}$ – $6{,}38 \cdot 10^{-4}$ mol/L, *n* je počet bodů kalibrační přímky. Stacionární fáze Biospher PSI 100 C18; mobilní fáze acetonitril-voda 65:35 (v/v); průtok 0,5 mL/min; vlnová délka detekce 220 nm.




**Obrázek 5** Závislost dekadického logaritmu plochy píku na dekadickém logaritmu molární koncentrace fenolu v rozmezí koncentrací $8{,}50 \cdot 10^{-6}$ – $2{,}12 \cdot 10^{-3}$ mol/L, $n$ je počet bodů kalibrační přímky. Stacionární fáze Biospher PSI 100 C18; mobilní fáze acetonitril-voda 65:35 (v/v); průtok 0,5 mL/min; vlnová délka detekce 275 nm.

### 4.1.3 Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti

Pro stanovení meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) byly metodou lineární regrese zpracovány závislosti výšky píků na koncentraci analytu podle rovnice (2). Hodnota LOD odpovídá trojnásobku $s_a$ a LOQ desetinásobku $s_a$.

$$LOD = (3 \cdot s_a - a)/b \tag{10}$$

$$LOQ = (10 \cdot s_a - a)/b \tag{11}$$

Kde $s_a$ je směrodatná odchylka, $a$ je úsek, $b$ směrnice kalibrační přímky konstruované z výšky píku (mV·L/g). Dalším způsobem stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti je podle rovnic (12) a (13).

$$LOD = 3 \cdot h_n / b \tag{12}$$

$$LOQ = 10 \cdot h_n / b \tag{13}$$

kde $h_n$ je šum základní linie (100 μV).

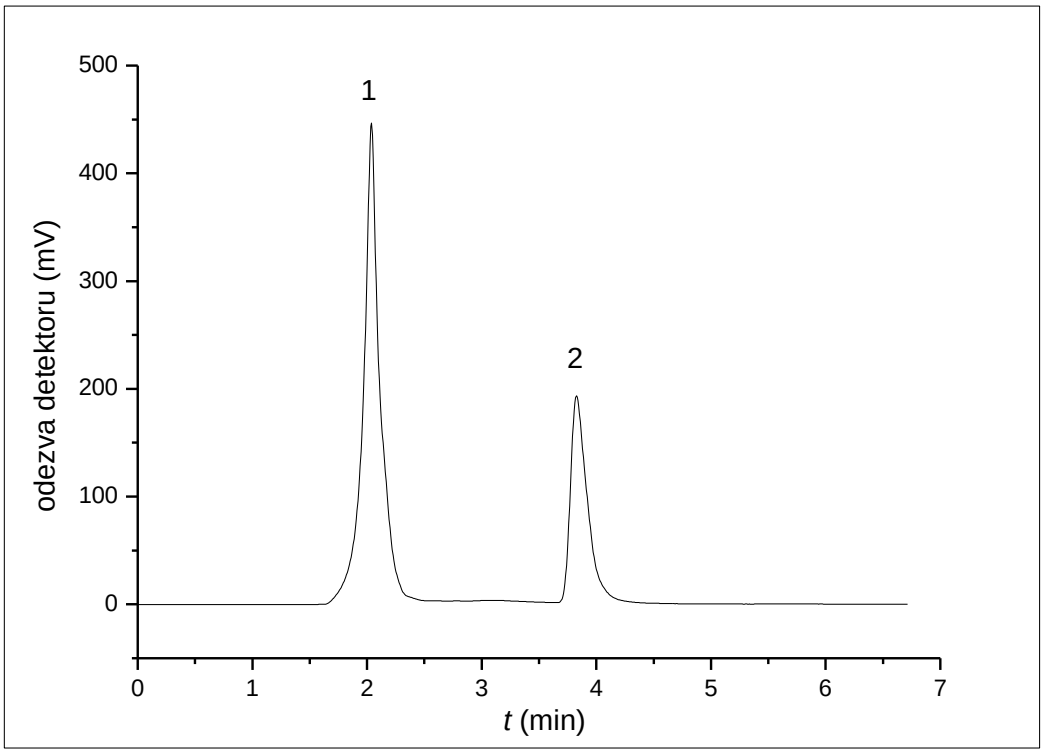
V tabulce 4 jsou uvedeny kalibrační rovnice, korelační koeficienty a limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) vypočtené oběma způsoby pro fenol rozpuštěný ve vltavské vodě.

**Tabulka 4** Parametry kalibrační přímky a srovnání mezí detekce a mezí stanovitelnosti vzorků fenolu rozpuštěných ve vodě z Vltavy v koncentračním rozsahu $2{,}13 \cdot 10^{-6}$ – $6{,}38 \cdot 10^{-4}$ mol/L pro vlnovou délku 220 nm a $8{,}50 \cdot 10^{-6}$ – $2{,}12 \cdot 10^{-3}$ mol/L pro vlnou délku 275 nm. (1) LOD a LOQ vypočítané pomocí trojnásobku a desetinásobku směrodatné odchylky a (2) LOD a LOQ vypočítané pomocí trojnásobku a desetinásobku šumu měření. Stacionární fáze Biospher PSI 100 C18; mobilní fáze acetonitril-voda 65:35 (v/v); průtok 0,5 mL/min.

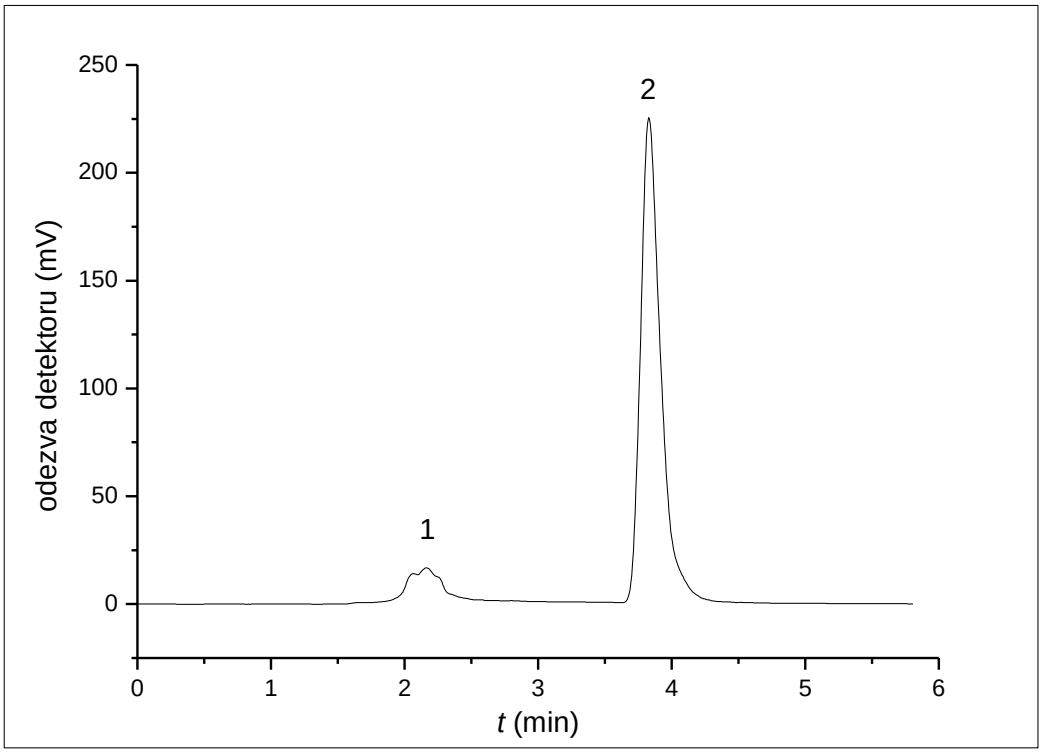
| | **220 nm** | **275 nm** |
|---|---|---|
| Kalibrační rovnice pro výšky píků | y = 20900 x + 0,47 | y = 5810 x + 2,52 |
| *r* | 0,9998 | 0,9998 |
| 1 LOD (mg/L) | 1,32 | 3,75 |
| 1 LOQ (mg/L) | 4,44 | 13,5 |
| 2 LOD (μg/L) | 0,0144 | 0,052 |
| 2 LOQ (μg/L) | 0,0478 | 0,172 |

Limity detekce a kvantifikace fenolu rozpuštěného ve vltavské vodě, vypočtené oběma způsoby se významně liší. LOD a LOQ vypočítané pomocí trojnásobku a desetinásobku směrodatné odchylky je vyšší než dolní hranice lineárního dynamického rozsahu, proto se jako lepší metoda výpočtu jeví LOD a LOQ vyjádřené pomocí šumu měření. Limity detekce a stanovení se pro vlnovou délku 220 nm pohybují v řádech setin μg/L a limity stanovení pro vlnovou délku 275 nm v řádech desetin μg/L.

Na obrázku 6 a 7 jsou jako příklad uvedeny chromatogramy stanovení fenolu ve vodě z Vltavy při koncentraci 0,01 g/L při vlnové délce 220 nm a 0,04 g/L při vlnové délce 275 nm.




**Obrázek 6** Chromatogram fenolu ve vltavské vodě o hmotnostní koncentraci 0,01 g/L. (1) polární sloučeniny obsažené ve vodě, (2) fenol. Chromatografická kolona Biospher PSI 100 C18; mobilní fáze acetonitril-voda 65:35 (v/v); průtok 0,5 mL/min; vlnová délka detekce 220 nm.




**Obrázek 7** Chromatogram fenolu ve vltavské vodě o hmotnostní koncentraci 0,04 g/L. (1) polární sloučeniny obsažené ve vodě, (2) fenol. Chromatografická kolona Biospher PSI 100 C18; mobilní fáze acetonitril-voda 65:35 (v/v); průtok 0,5 mL/min; vlnová délka detekce 275 nm.

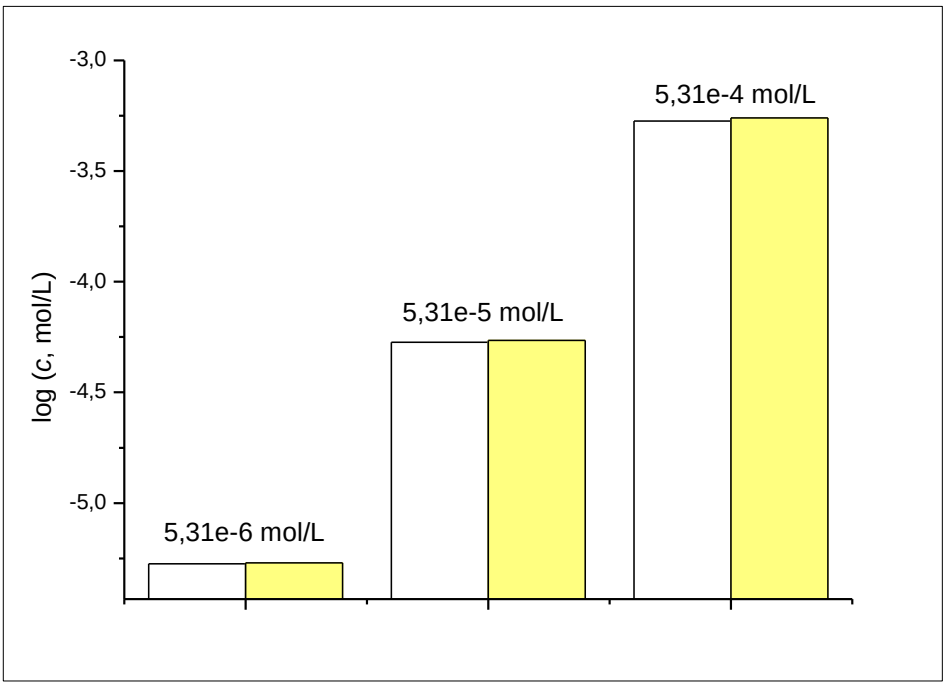
### 4.1.4. Přesnost metody

Pro zjištění přesnosti metody, která byla vyhodnocena faktorem výtěžnosti (*Re*), byl vzorek fenolu rozpuštěný ve vodě z Vltavy stanovován desetkrát pro každou koncentrační hladinu. Průměrné hodnoty ploch píků pro tyto paralelní stanovení byly dosazeny do kalibračních křivek jednotlivých koncentračních hladin a nalezené množství fenolu bylo porovnáno s dávkovaným množstvím fenolu, jak je patrné z obrázku 8 a 9.

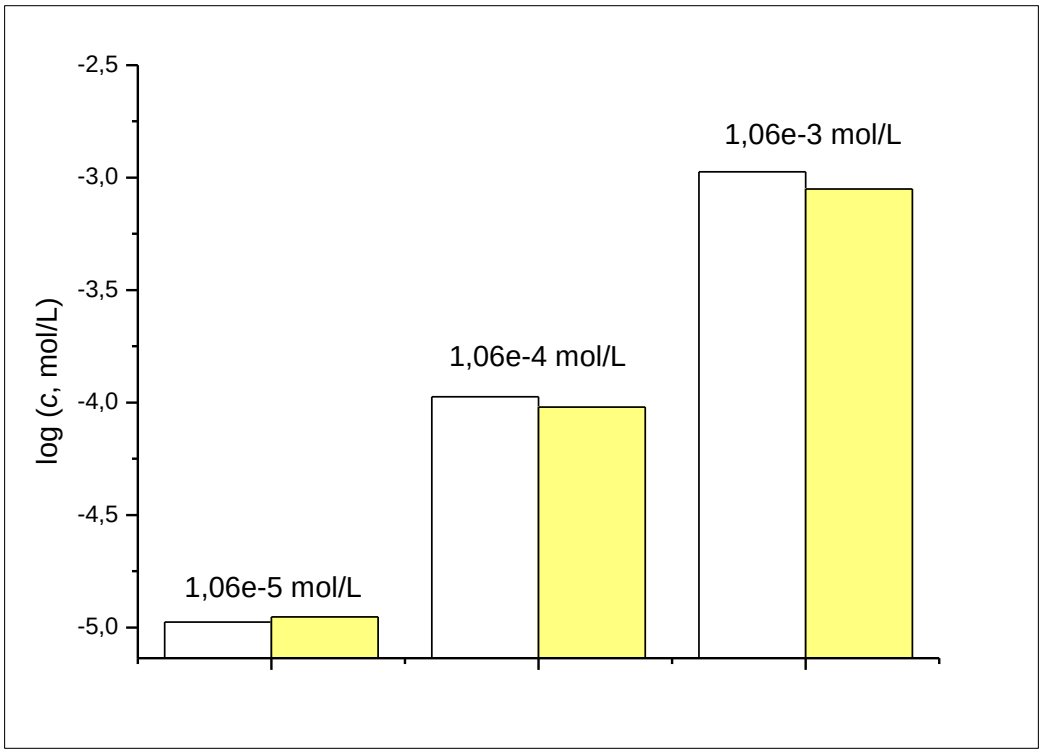
$$Re = n_{II}/n_{I} \qquad (14)$$

Kde *Re* je faktor výtěžnosti, $n_{II}$ je množství analytu získaného danou analytickou metodou a $n_I$ referenční hodnota. Hodnoty byly testovány na odlehlost výsledků pomocí Grubbsova testu. Mezi dávkovaným a nalezeným množstvím fenolu byla zjištěna dobrá

shoda pro obě vlnové délky. Při použití Studentova testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly.




**Obrázek 8** Porovnání dávkovaného (bílé sloupce) a nalezeného množství fenolu (žluté sloupce) ve vodě z Vltavy pro tři koncentrace. Stacionární fáze Biospher PSI 100 C18; mobilní fáze acetonitril-voda 65:35 (v/v); průtok 0,5 mL/min; vlnová délka detekce 220 nm. V grafu jsou uvedeny koncentrace dávkovaného fenolu v mol/L, které odpovídají hmotnostním koncentracím 0,5 mg/L, 5 mg/L a 0,05 g/L.

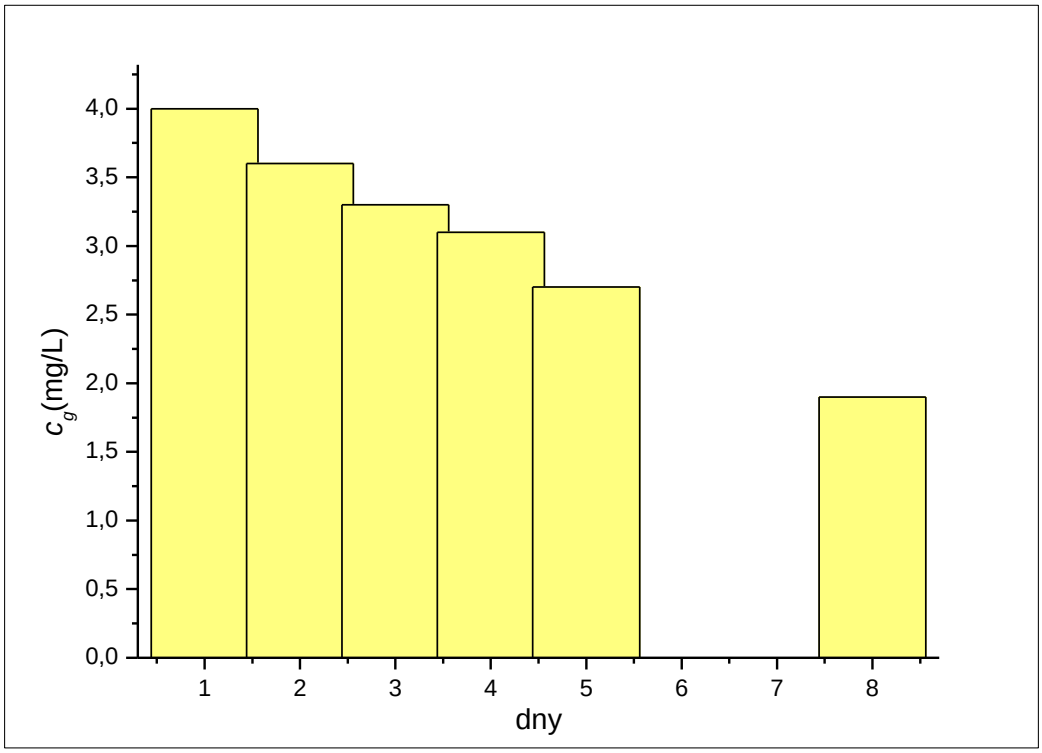



**Obrázek 9** Porovnání dávkovaného (bílé sloupce) a nalezeného množství fenolu (žluté sloupce) ve vodě z Vltavy pro tři koncentrační hladiny. Stacionární fáze Biospher PSI 100 C18; mobilní fáze acetonitril-voda 65:35 (v/v); průtok 0,5 mL/min; vlnová délka detekce 275 nm. V grafu jsou uvedeny koncentrace dávkovaného fenolu v mol/L, které odpovídají hmotnostním koncentracím 1 mg/L, 10 mg/L a 0,1 g/L

Vzorek fenolu o koncentraci 5 mg/L byl desetkrát stanovován při vlnové délce detekce 220 nm pro zjištění opakovatelnosti měření, relativní směrodatná odchylka plochy píku byla 1,5%.

### 4.1.5 Stanovení časové stálosti vzorku fenolu ve vltavské vodě

Byla sledována časová stabilita roztoku fenolu o hmotnostní koncentraci 4 mg/L ve vltavské vodě. Vzorek byl uchováván v lednici ve tmě po dobu 8 dní. Ve sledovaném čase doházelo k postupnému snižování obsahu fenolu ve Vodě z Vltavy. Výsledky pozorování jsou uvedeny na obrázku 10.




**Obrázek 10** Změna koncentrace fenolu v závislosti na čase. Stacionární fáze Biospher PSI 100 C18; mobilní fáze acetonitril-voda 65:35 (v/v); průtok 0,5 mL/min; vlnová délka detekce 220 nm.

## 4.2 KAPILÁRNÍ KAPALINOVÁ CHROMATOGRAFIE

### 4.2.1 Kvantitativní analýza fenolu

Měření byla prováděna na monolitické polybutylmethakrylátové chromatografické koloně připravené v laboratoři. Jako optimální byla zvolena rychlost průtoku 4 μL/min a mobilní fáze acetonitril-voda (65:35, v/v). Kalibrační křivky fenolu rozpuštěného ve vltavské vodě byly proměřeny v koncentračním rozmezí $1{,}06 \cdot 10^{-4}$ – $3{,}19 \cdot 10^{-1}$ mol/L při dvou vlnových délkách 220 a 275 nm. Každé měření bylo opakováno třikrát a získaná data vyhodnoceny metodou lineární regrese, závislosti plochy píku na molární koncentraci podle vztahu (7). V tabulce 5 jsou shrnuty úseky, směrnice, korelační koeficienty a lineární dynamické rozsahy jednotlivých kalibračních křivek pro roztoky fenolu měřeného při dvou vlnových délkách.

**Tabulka 5** Parametry kalibračních přímek, jejich směrodatné odchylky (uvedené v závorkách) a lineární dynamické rozsahy fenolu.; stacionární fáze polybutylmethakrylátová, mobilní fáze acetonitril-voda 65:35 (v/v); průtok 4 μL/min; vlnová délka detekce 220 a 275 nm.

| **Vlnová délka (nm)** | **Úsek (mV·s)** | **Směrnice (mV·s·L/mol)** | ***r*** | **Lineární dynamický rozsah (mol/L)** |
|---|---|---|---|---|
| 220 | 30,7 | 68950 | 0,9999 | $1{,}06 \cdot 10^{-4} – 3{,}19 \cdot 10^{-1}$ |
| | (15,6) | (6900) | | |
| 275 | 10,4 | 21600 | 0,9996 | $5{,}31 \cdot 10^{-4} – 3{,}19 \cdot 10^{-1}$ |
| | (6,06) | (205) | | |

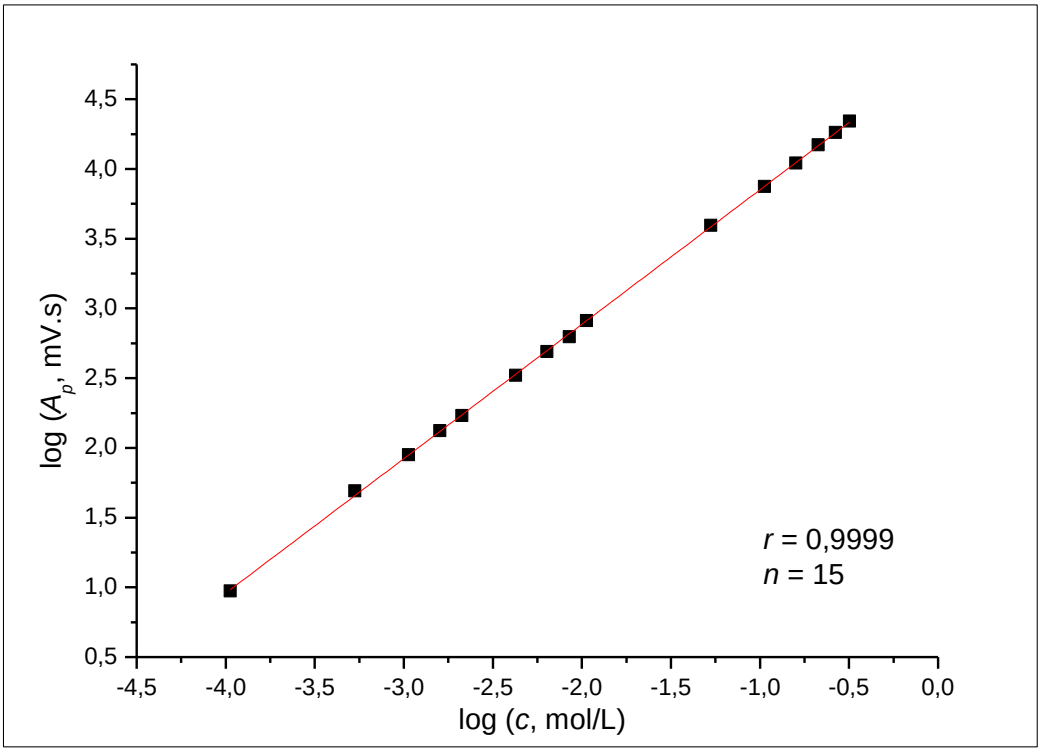
Bylo zjištěno, že žádný z úseků kalibračních křivek nebyl statisticky rozdílný od nuly na hladině významnosti $\alpha = 0{,}01$ při použití t-testu pro úseky. Pro potvrzení či vyvrácení závislosti plochy píků na první mocnině koncentrace byly opět vyneseny kalibrační závislosti v logaritmickém měřítku podle rovnice (8):

V tabulce 6 jsou uvedeny faktory linearity *i* a porovnání dekadických logaritmů směrnic (log β) získaných logaritmickou regresí a dekadických logaritmů směrnic (log b) pro obě měřené vlnové délky. A na obrázku 11 a 12 jsou uvedeny kalibrační křivky stanovení fenolu při dvou vlnových délkách.

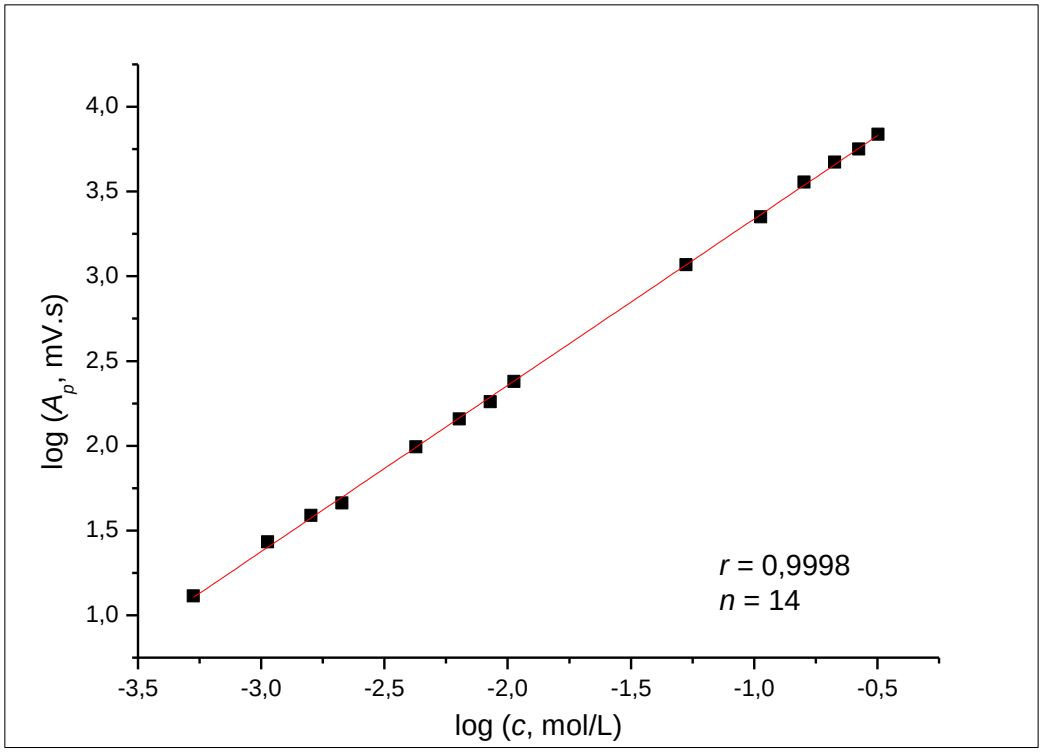
**Tabulka 6** Porovnání parametrů kalibračních křivek v logaritmickém měřítku a dekadických logaritmů. Stacionární fáze polybutylmethakrylátová, mobilní fáze acetonitril-voda 65:35 (v/v), průtok 4 μL/min, vlnová délka detekce 220 a 275 nm.

| **Vlnová délka nm** | ***i*** | **log β** | **log b** |
|---|---|---|---|
| 220 | 0,96 | 4,82 | 4,84 |
| 275 | 0,98 | 4,32 | 4,33 |

Logaritmy směrnic regresních analýz (log β a log b) jsou si opět blízké, z čehož plyne statistická nezávislost úseků kalibračních křivek. Faktory linearity jsou opět blízké hodnotě 1,00, z čehož vyplývá závislost plochy píků na první mocnině koncentrace pro obě vlnové délky.




**Obrázek 11** Závislost dekadického logaritmu plochy píku na dekadickém logaritmu molární koncentrace fenolu v rozmezí molárních koncentrací $1{,}06 \cdot 10^{-4}$ – $3{,}19 \cdot 10^{-1}$ mol/L, *n* je počet bodů kalibrační přímky. Stacionární fáze polybutylmethakrylátová, mobilní fáze acetonitril-voda 65:35 (v/v); průtok 4 µL/min; vlnová délka detekce 220 nm.




**Obrázek 12** Závislost dekadického logaritmu plochy píku na dekadickém logaritmu molární koncentrace fenolu v rozmezí molárních koncentrací $5{,}31 \cdot 10^{-4}$ – $3{,}19 \cdot 10^{-1}$ mol/L, *n* je počet bodů kalibrační přímky. Stacionární fáze polybutylmethakrylátová; mobilní fáze acetonitril-voda 65:35 (v/v); průtok 4 µL/min; vlnová délka detekce 275 nm.

### 4.2.2 Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti

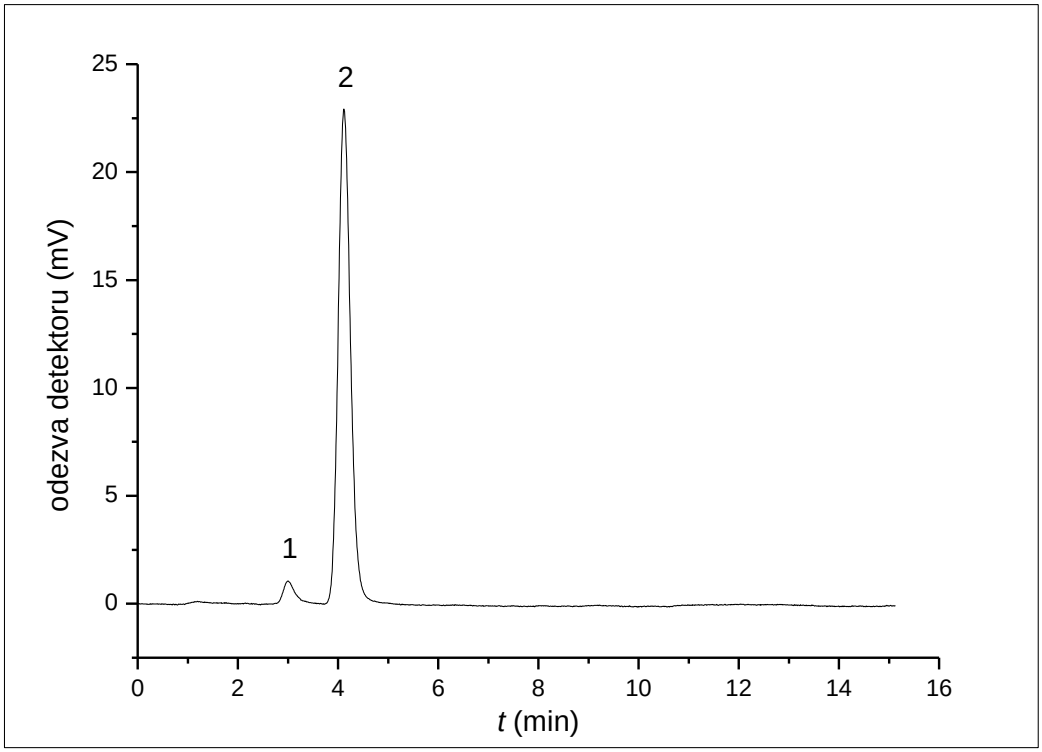
Mez detekce a mez stanovitelnosti byly opět vyhodnoceny dvěma způsoby z kalibračních závislostí jako koncentrace odpovídající trojnásobku a desetinásobku absolutní hodnoty šumu měření podle rovnice (12) a (13) a dále z trojnásobku a desetinásobku směrodatné odchylky vypočítaných podle rovnic (10) a (11). Šum základní linie měřený byl 200 µV. Výsledky jsou shrnuty v tabulce 7.

**Tabulka 7** Srovnání mezí detekce a mezí stanovitelnosti vzorků fenolu rozpuštěných ve vodě z Vltavy v koncentračním rozsahu $1{,}06 \cdot 10^{-4} – 3{,}19 \cdot 10^{-1}$ mol/L při vlnové délce detekce 220 nm a $5{,}31 \cdot 10^{-4} – 3{,}19 \cdot 10^{-1}$ mol/L při vlnové délce detekce 275 nm. (1) LOD a LOQ vypočítané pomocí směrodatné odchylky a (2) LOD a LOQ vypočítané pomocí šumu měření. Stacionární fáze polybutylmethakrylátová; mobilní fáze acetonitril-voda 65:35 (v/v); průtok 4 µL/min.

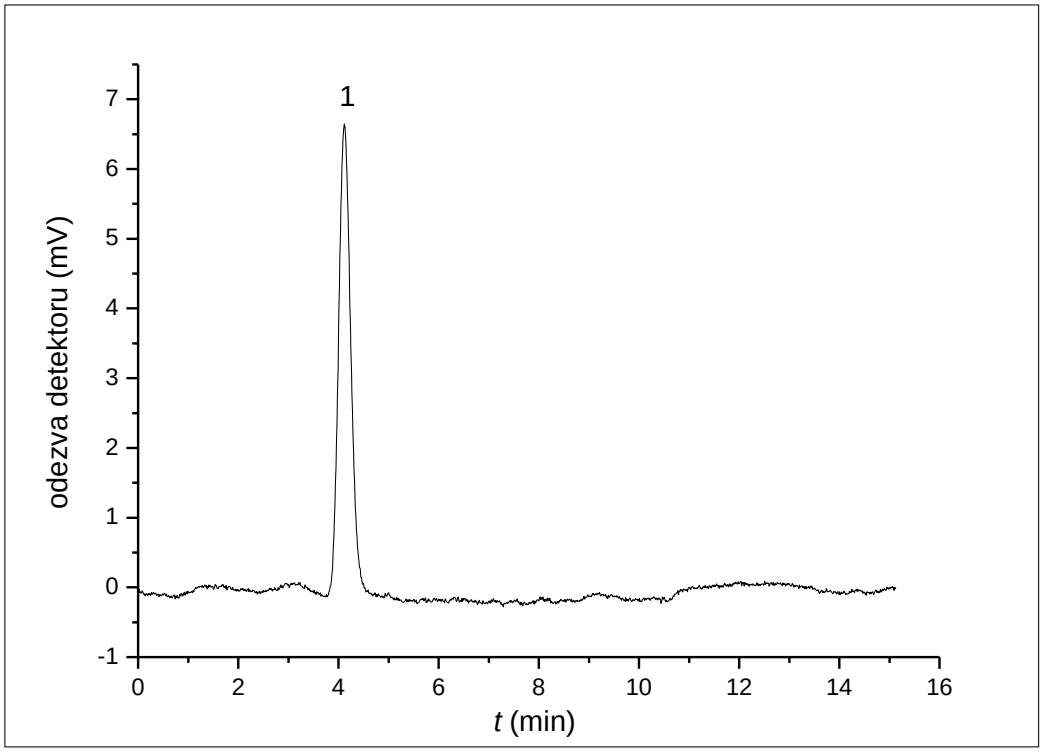
| | **220 nm** | **275 nm** |
|---|---|---|
| Kalibrační rovnice pro výšky píků | y = 41,9x + 5,95 | y = 13,3 x + 1,06 |
| *r* | 0,9997 | 0,9997 |
| 1 LOD (mg/l) | 100 | 212 |
| 1 LOQ (mg/l) | 665 | 897 |
| 2 LOD (µg/l) | 14,3 | 45,1 |
| 2 LOQ (µg/l) | 47,7 | 150 |

Limity detekce a kvantifikace fenolu rozpuštěného ve vodě z Vltavy vypočtené pomocí trojnásobku a desetinásobku směrodatné odchylky a šumu měření se významně liší. LOD a LOQ vypočítané pomocí směrodatné odchylky jsou opět vyšší než dolní hranice lineárního dynamického rozsahu. Limity detekce pro obě vlnové délky se pohybují v řádech desítek µg/L. Naopak nejvyšší stanovitelné koncentrace fenolu, pomocí této metody se pohybují v řádech až desítek g/L.

Na obrázku 13 a 14 jsou jako příklad uvedeny chromatogramy stanovení fenolu ve vodě z Vltavy při koncentraci při dvou vlnových délkách 220 a 275nm.



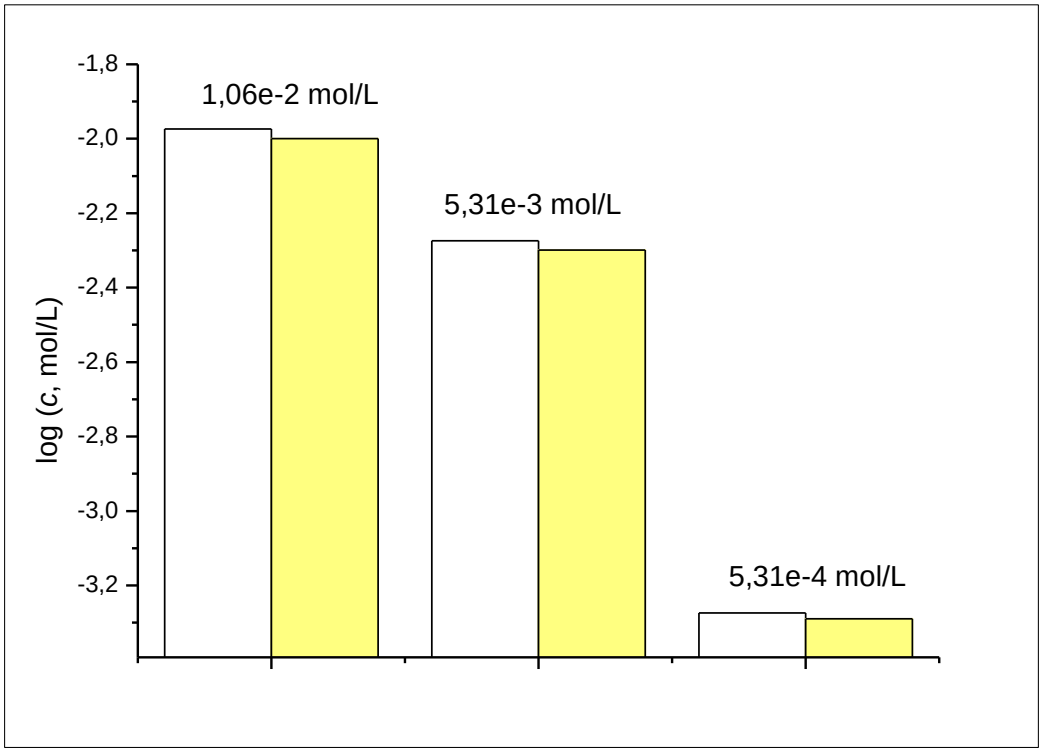

**Obrázek 13** Chromatogram fenolu ve vltavské vodě o hmotnostní koncentraci 0,5 g/L, (1) polární sloučeniny obsažené ve vodě, (2) fenol. Polybutylmethakrylátová monolitická kolona; mobilní fáze acetonitril-voda 65:35 (v/v); průtok 4 µL/min; vlnová délka detekce 220 nm.



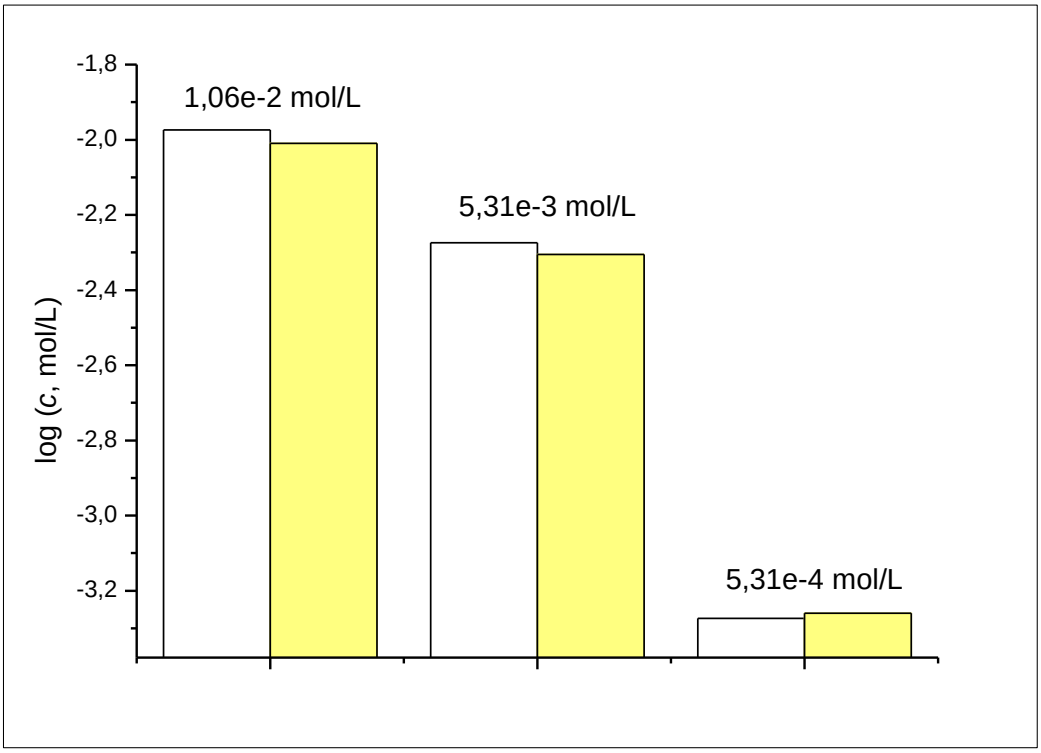

**Obrázek 14** Chromatogram fenolu ve vltavské vodě 0,5 g/L, (1) fenol. Polybutylmethakrylátová monolitická kolona; mobilní fáze acetonitril-voda 65:35 (v/v); průtok 4 μL/min; vlnová délka detekce 275 nm.

### 4.2.3 Přesnost metody

Pro zjištění přesnosti metody byl vzorek fenolu rozpuštěný ve vodě z Vltavy stanovován desetkrát pro každou koncentrační hladinu. Průměrné hodnoty výšek píku pro tyto paralelní stanovení byly dosazeny do kalibračních křivek jednotlivých koncentračních hladin a nalezené množství fenolu bylo porovnáno s dávkovaným množstvím fenolu, jak je patrné z obrázků 15 a 16. Hodnoty byly testovány na odlehlost výsledků pomocí Grubbsova testu. Mezi dávkovaným a nalezeným množstvím fenolu byla zjištěna dobrá shoda pro obě vlnové délky. Při použití Studentova testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly.




**Obrázek 15** Porovnání dávkovaného (bílé sloupce) a nalezeného množství fenolu (žluté sloupce) ve vodě z Vltavy pro tři koncentrační hladiny. Stacionární fáze polybutylmethakrylátová; mobilní fáze acetonitril-voda 65:35 (v/v); průtok 4 µL/min; vlnová délka detekce 220 nm. V grafu jsou uvedeny koncentrace dávkovaného fenolu v mol/L, které odpovídají hmotnostním koncentracím 1 g/L, 0,5 g/L a 0,05 g/L.




**Obrázek 16** Porovnání dávkovaného (bílé sloupce) a nalezeného množství fenolu (žluté sloupce) ve vodě z Vltavy pro tři koncentrační hladiny. Stacionární fáze polybutylmethakrylátová; mobilní fáze acetonitril-voda 65:35 (v/v); průtok 4 μL/min; vlnová délka detekce 275 nm. V grafu jsou uvedeny koncentrace dávkovaného fenolu v mol/L, které odpovídají hmotnostním koncentracím 1 g/L, 0,5 g/L a 0,05 g/L.

Vzorek fenolu o koncentraci 0,1 g/L byl desetkrát stanovován pro zjištění opakovatelnosti měření, relativní směrodatná odchylka plochy píku byla 1,9%.

### 4.2.4 Porovnání chromatografických kolon

V tabulce 9 jsou pro porovnání shrnuty parametry chromatografických kolon Biospher PSI 100 C18 a polybutylmethakrylátové monolitické stacionární fáze.

**Tabulka 8** Parametry chromatografických kolon Biospher PSI 100 C18 o délce 150 mm a polybutylmethakrylátové monolitické kolonydélce 180 mm, chromatografické účinnosti, výškový ekvivalenty teoretického patra, rozlišení a retenční faktory.

| | **Biospher PSI 100 C18** | **Polybutylmethakrylátová monolitická kolona** |
|---|---|---|
| **retenční faktor** | 0,92 | 0,38 |
| **chromatografická účinnost** | 3480 | 1630 |
| **výškový ekv. teoretického patra** | 44 μm | 92 μm |
| **rozlišení** | 2,85 | 2,29 |

Jak vyplývá z tabulky č. 8, lepší chromatografická účinnost a rozlišení bylo dosahováno na chromatografické koleně Biospher PSI 100 C18.

## 4.3 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ FENOLU VE VIDITELNÉ OBLASTI SPEKTRA

### 4.3.1 Spektrofotometrické stanovení fenolu pomocí 4-aminonatipyrinu

Princip spektrofotometrického stanovení je uveden v kapitole 2.3.1 Experimentální část. Měření byla prováděna při vlnové délce 505 nm, protože v této oblasti spektra nejvíce absorbuje červené barvivo chinoidní struktury, a tudíž je stanovení nejcitlivější. Fenol byl rozpuštěn ve vodě z Vltavy v koncentračním rozsahu $1{,}06 \cdot 10^{-6}$ – $8{,}51 \cdot 10^{-5}$ mol/L a každé měření bylo opakováno pětkrát pro každou koncentraci roztoku fenolu. Průměrné hodnoty absorbancí byly vyhodnoceny metodou lineární regrese. Zkonstruované kalibrační křivky odpovídají závislosti absorbance barevného produktu na koncentraci analytu ve vzorku. Korelační koeficient, směrnice, úsek kalibrační křivky jsou uvedeny v tabulce 9.

**Tabulka 9** Parametry kalibračních přímek, jejich směrodatné odchylky (uvedené v závorkách) a lineární dynamické rozsahy fenolu při vlnové délce 505 nm.

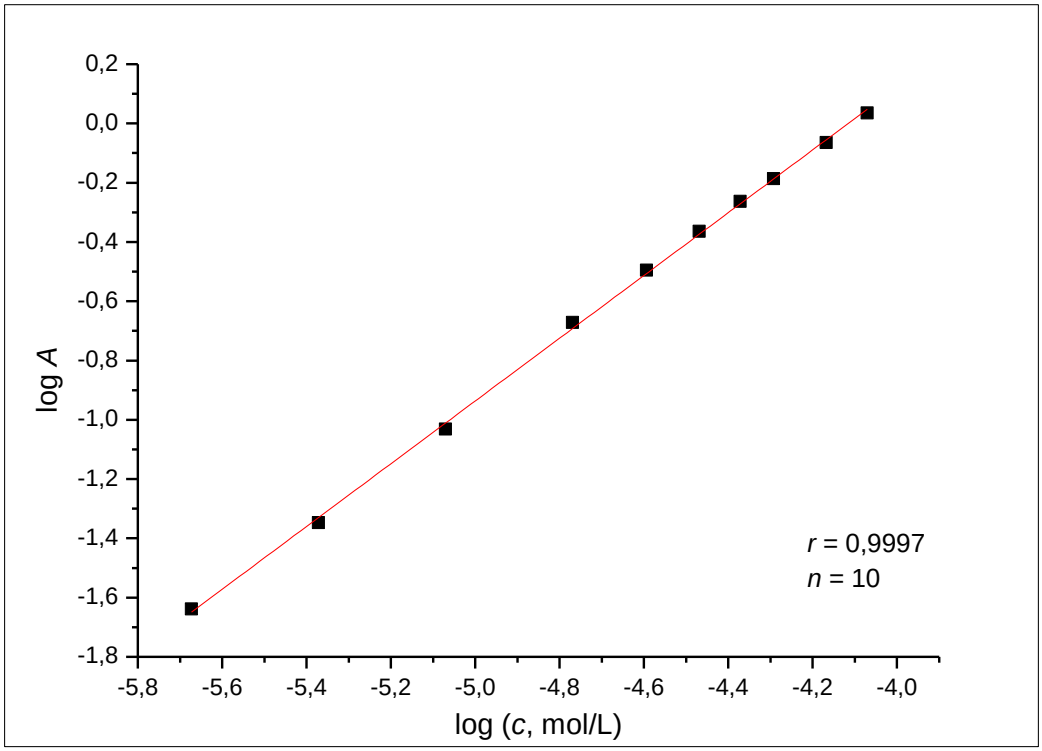
| ***r*** | **Úsek (mV·s)** | **Směrnice (mV·s·L/mol)** | **Lineární dynamický rozsah (mol/L)** |
|---|---|---|---|
| 0,9998 | -0,0078 (0,00261) | 12910 (56,1) | $2{,}13\cdot10^{-6} – 8{,}51\cdot10^{-5}$ |

Použitím t-testu pro úseky se zjistilo, že žádný z úseků kalibrační křivky nebyl statisticky rozdílný od nuly na hladině významnosti $\alpha = 0{,}01$. Kalibrační závislosti byly opět vyneseny ve zlogaritmovaném tvaru, pro zjištění, zda absorbance závisí na první mocnině koncentrace. V tabulce 10 je shrnuto porovnání dekadických logaritmů směrnic (log b) a dekadických logaritmů z logaritmické regrese (log β) a faktor linearity *i*.

**Tabulka 10** Porovnání parametrů kalibračních křivek v logaritmickém měřítku a dekadických logaritmů.

| ***i*** | **log b** | **log β** |
|---|---|---|
| 1,02 | 4,11 | 4,20 |

Faktor linearity je blízký hodnotě 1,00, z čehož lze usuzovat, že absorbance je závislá na první mocnině koncentrace roztoku fenolu. Směrnice obou regresních analýz (log b a log β) vykazují dobou shodu, což dokazuje statistickou nevýznamnost úseků. Pro názorný příklad je na obrázku 17 uvedena kalibrační křivka v logaritmickém měřítku pro fenol v lineárním rozsahu stanovení $2{,}13\cdot10^{-6} – 8{,}51\cdot10^{-5}$ mol/L.




**Obrázek 17** Závislost dekadického logaritmu absorbance na dekadickém logaritmu molární koncentrace fenolu v lineárním dynamickém rozsahu $2{,}13 \cdot 10^{-6} – 8{,}51 \cdot 10^{-5}$ mol/L, *n* je počet bodů kalibrační přímky.

### 4.3.2 Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti

Pro stanovení meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti (LOQ) byly metodou lineární regrese zpracovány závislosti výšky píků na koncentraci analytu podle rovnice (6). Hodnota LOD odpovídá trojnásobku $s_a$ a LOQ desetinásobku $s_a$. V tabulce 11 jsou uvedeny kalibrační rovnice, korelační koeficienty a limity detekce (LOD) a kvantifikace (LOQ) fenolu rozpuštěného ve vltavské vodě.

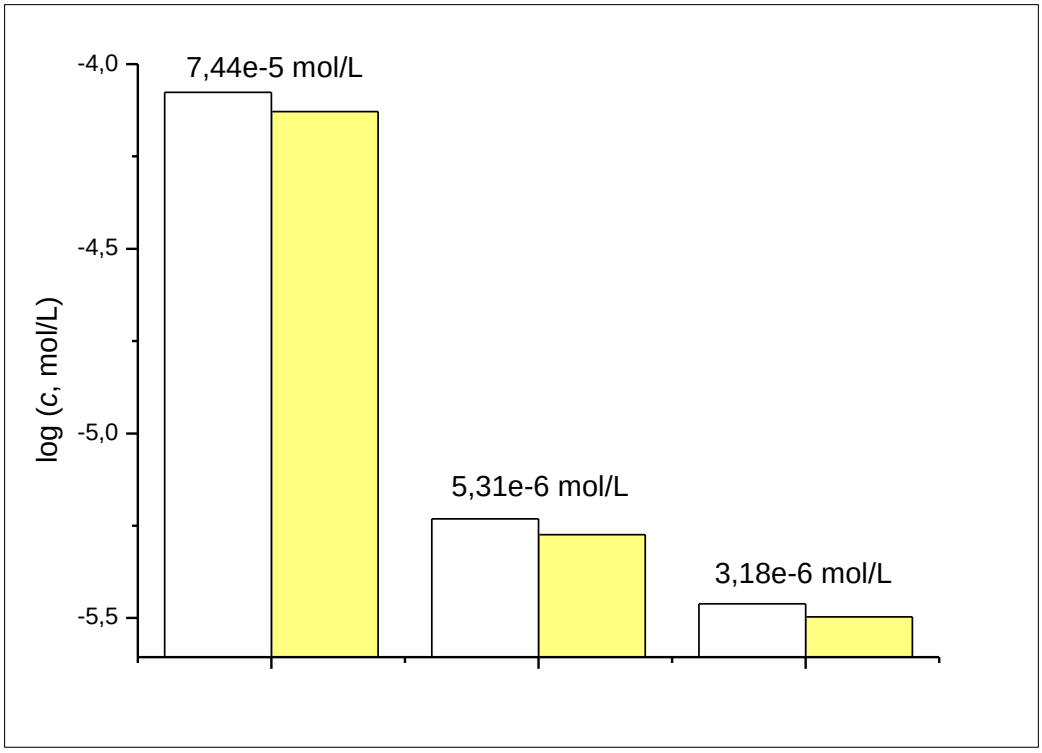
**Tabulka 11** Parametry kalibrační přímky a srovnání mezí detekce a mezí stanovitelnosti vzorků fenolu rozpuštěných ve vodě z Vltavy.

| | |
|---|---|
| Kalibrační rovnice pro hodnotu absorbance | y = 137x - 0,013 |
| *r* | 0,9998 |
| LOD (mg/L) | 0,184 |
| LOQ (mg/L) | 0,613 |

Limity detekce a limity kvantifikace se pohybují v řádech desetin mg/L. Spektrofotometrie je vhodnou metodou pro stanovení fenolu.

### 4.3.3 Přesnost metody

Vzorek fenolu rozpuštěný ve vltavské vodě byl stanovován desetkrát pro zvolenou koncentraci. Průměrné hodnoty absorbancí těchto paralelních stanovení byly dosazeny do kalibračních křivek jednotlivých koncentrací. Nalezené množství fenolu bylo porovnáno s dávkovaným množstvím fenolu, jak je uvedeno na obrázku 18. Mezi těmito hodnotami byla nalezena dobrá shoda. Výsledky byly testovány na odlehlost pomocí Grubbsova testu. Mezi dávkovaným a nalezeným množstvím fenolu byla zjištěna dobrá shoda. Při použití Studentova testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly. Vzorek fenolu o koncentraci 2 mg/L byl desetkrát stanovován pro zjištění opakovatelnosti měření, relativní směrodatná odchylka měření byla 1,4%.




**Obrázek 18** Porovnání dávkovaného (bílé sloupce) a nalezeného množství fenolu (žluté sloupce) ve vodě z Vltavy pro tři koncentrační hladiny. V grafu jsou uvedeny koncentrace dávkovaného fenolu v mol/L, které odpovídají hmotnostním koncentracím 7 mg, 0,5 mg a 0,3 mg.

## 4.4 BROMOMETRIE

### 4.4.1 Příprava odměrného roztoku thiosíranu sodného a jeho standardizace na bromičnan draselný

Bromičnan draselný je jednou ze základních látek pro standardizaci odměrného roztoku $Na_2S_2O_3$. Je méně toxický než dichroman draselný, a proto byl vybrán pro toto stanovení. Roztok $Na_2S_2O_3$ připravený podle návodu v kapitole 5.5.3.1 Experimentální část byl standardizován na $KBrO_3$. Správná koncentrace odměrného roztoku thiosíranu sodného byla vypočtena z navážky zásobního roztoku bromičnanu draselného, spotřeby odměrného roztoku a titrační stechiometrie. Spotřeby standardizovaného roztoku $Na_2S_2O_3$, jeho přesná koncentrace a faktor jsou uvedeny v tabulce 12.

**Tabulka 12** Spotřeba standardizovaného roztoku $Na_2S_2O_3$, přesná koncentrace roztoku $Na_2S_2O_3$, jeho faktor a průměrné hodnoty.

| Číslo stanovení | Spotřeba $Na_2S_2O_3$ mL | Koncentrace $Na_2S_2O_3$ mol/L | Faktor odměrného roztoku |
|---|---|---|---|
| **1** | 15,1 | 0,04975 | 0,9950 |
| **2** | 15,1 | 0,04975 | 0,9950 |
| **3** | 15,0 | 0,05008 | 1,0016 |
| **Průměrná hodnota** | 15,07 | 0,04986 | **0,9972** |

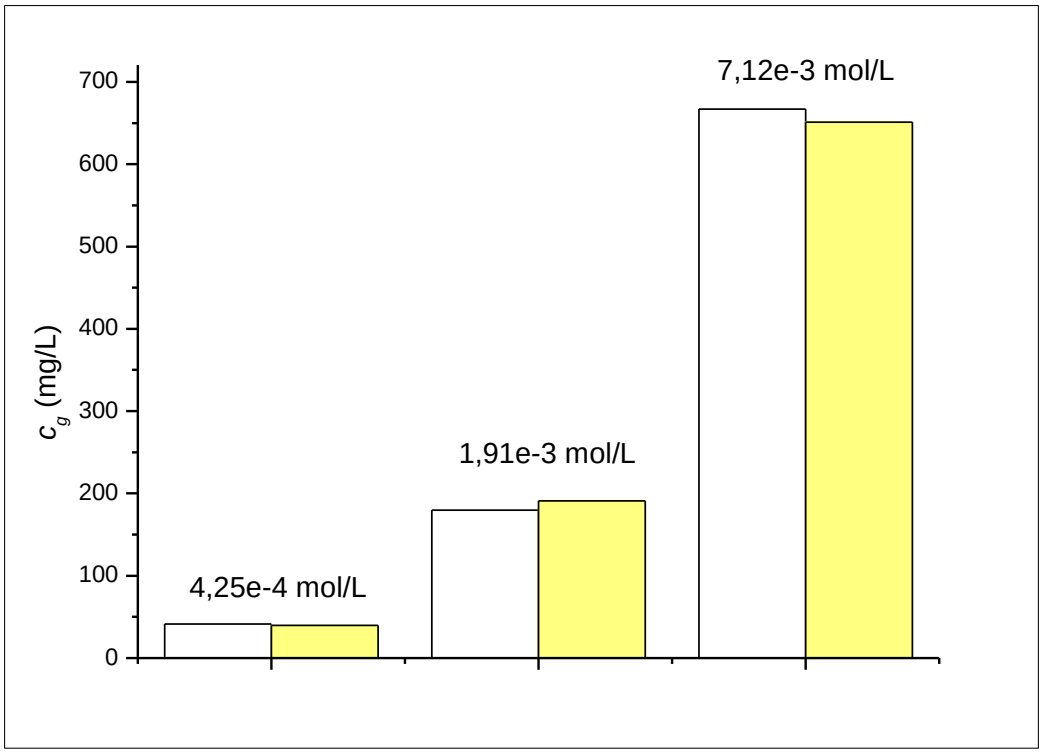
### 4.4.2 Stanovení meze detekce a meze stanovitelnosti

Bromometrická titrace fenolu patří mezi nepřímá volumetrická stanovení, a tudíž nejmenší a největší možná stanovitelná koncentrace závisí na koncentraci roztoku $KBrO_3$ a odměrného roztoku $Na_2S_2O_3$ podle rovnice (16). Spotřeba odměrného roztoku $Na_2S_2O_3$ se může pohybovat do 20 mL. A tudíž fenol rozpuštěný ve vodě se dá stanovit za těchto podmínek v koncentračním rozmezí od cca 2,5 mg/L do cca 770 mg/L.

$$c = \left( c(KBrO_3) \cdot V(KBrO_3) - c(Na_2S_2O_3) \cdot f(Na_2S_2O_3) \cdot \frac{V(Na_2S_2O_3)}{6} \right) \cdot M_h(\text{fenol}) \cdot \frac{1000}{20} \qquad (16)$$

### 4.4.3 Přesnost metody

Vzorek fenolu rozpuštěný ve vodě z Vltavy, pro zjištění výtěžnosti metody, byl stanovován desetkrát pro každou připravenou koncentraci. Průměrné koncentrace paralelních stanovení byly dosazeny do rovnice (9) a nalezené množství fenolu bylo porovnáno s dávkovaným množstvím fenolu, jak je uvedeno na obrázku 19. Hodnoty byly testovány na odlehlost výsledků pomocí Grubbsova testu. Mezi dávkovaným a nalezeným množstvím fenolu byla zjištěna dobrá shoda. Při použití Studentova testu na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly.




**Obrázek 19** Porovnání dávkovaného (bílé sloupce) a nalezeného množství fenolu (žluté sloupce) ve vodě z Vltavy pro tři koncentrace. V grafu jsou uvedeny koncentrace dávkovaného fenolu v mol/L, které odpovídají hmotnostním koncentracím 40 mg/L, 180 mg/L a 680 mg/L.

Pro zjištění opakovatelnosti měření byl vzorek fenolu o hmotnostní koncentraci 50 mg/L desetkrát stanovován, relativní směrodatná odchylka stanovení činila 1,5%.

# 5. ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo porovnání metod stanovení fenolu ve vltavské vodě a to pomocí separačních metod – vysokoúčinné kapalinové chromatografie a kapilární kapalinové chromatografie, optické metody – molekulové absorpční spektrofotometrie ve viditelné oblasti spektra a odměrné analýzy – bromometrické titrace.

Roztoky fenolu byly stanovovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie v reverzním systému na chromatografické koloně Biospher PSI 100 C18, mobilní fázi acetonitril-voda 65:35 (v/v), o průtoku 0,5 mL/min při dvou vlnových délkách 220 nm a 275 nm v koncentračním rozsahu 0,6 až 200 mg/L. Limity detekce pro obě vlnové délky se pohybují řádech setin μg/L. Pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie byla také sledována časová stálost roztoku fenolu o hmotnostní koncentraci 4 mg/L, v průběhu 8 dní docházelo k postupnému snižování obsahu fenolu ve vltavské vodě. Chromatografická kolona Biospher PSI 100 C18 oproti polybutylmethakrylátové koloně poskytovala lepší rozlišení a lepší chromatografickou účinnost.

Jako další separační metoda byla použita kapilární kapalinová chromatografie za použití polybutylmethakrylátové stacionární fáze připravené v laboratoři, mobilní fáze acetonitril-voda 65:35 (v/v), průtoku 4 μL/min, při vlnových délkách 220 nm a 275 nm. Lineární dynamické rozsahy se pohybovaly v rozsahu $1{,}06 \cdot 10^{-4}$ – $3{,}19 \cdot 10^{-1}$ mol/L pro vlnovou délku 220 nm a $5{,}31 \cdot 10^{-4}$ – $3{,}19 \cdot 10^{-1}$ mol/L pro vlnovou délku 275 nm. Limity detekce pro obě měřené vlnové délky byly v řádech desítek μg/L. CLC oproti HPLC poskytuje o 3 řády nižší citlivost měření.

Spektofotometrické stanovení fenolu pomocí vybarvovacího činidla 4-aminoantipyrinu při vlnové délce 505 nm, poskytovalo limity detekce a stanovení v řádech desetin mg/L. Bromometrická titrace je především vhodná pro stanovení fenolu nad 50 mg/L, nevýhodou této metody je především delší doba stanovení.

Na závěr bych chtěla dodat, že nejlepší metodou pro stanovení nejnižších koncentrací fenolu je vysokoúčinná kapalinová chromatografie. Kapilární kapalinová chromatografie naopak umožňuje, ze všech metod použitých v této práci, stanovení nejvyšších koncentrací fenolu rozpuštěného ve vltavské vodě v řádech až desítek g/L.

# SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

| | |
|---|---|
| $A$ | absorbance |
| $a$ | úsek kalibrační křivky |
| $A_p$ | plocha chromatografického píku (mV·s) |
| $b$ | směrnice kalibrační přímky konstruované na výšky píků (mV·L/g) |
| $c$ | molární koncentrace (mol/L) |
| CAS-No. | Chemical Abstracts Service Number |
| $c_g$ | hmotnostní koncentrace (g/L) |
| CLC | kapilární kapalinová chromatografie (Capillary Liquid Chromatography) |
| $d$ | tloušťka kyvety (cm) |
| DAD | detktor diodového pole (Diode Array Detector) |
| $E^\circ$ | standardní redoxní potenciál (V) |
| $F$ | Faradayova konstanta (96486 C/mol) |
| FIA | průtoková injekční analýza (Flow Injection Analysis) |
| $f$ | faktor odměrného roztoku |
| GC | plynová chromatografie (Gas Chromatogpraphy) |
| GPC | gelová (permeační) chromatografie |
| $H$ | výškový ekvivalent teoretického patra |
| $h_n$ | šum základní linie (mV) |
| HPLC | vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography) |
| $i$ | faktor linearity |
| IEC | iontová chromatografie (Ion-Exchange Chromatography) |
| $k'$ | retenční faktor |
| $k_{ow}$ | rozdělovací koeficient oktanol/voda |

| | |
|---|---|
| $L$ | délka kolony |
| LLC | rozdělovací chromatografie ( Liquid-Liquid Chromatography) |
| LOD | limit detekce analytu (g/L) |
| LOQ | limit kvantifikace analytu (g/L) |
| LSC | adsorpčí chromatografie (Liquid-Solid Chromatography) |
| $M_h$ | molární hmotnost (g/mol( |
| $n$ | počet teoretických pater |
| $n$ | počet bodů kalibrační křivky |
| $n_i$ | referenční hodnota – množství analytu |
| $n_{ii}$ | množství analytu získaného danou analytickou metodou |
| p.a. | analytická čistota látky |
| pH | záporný dekadický logaritmus aktivity hydroxoniových kationtů |
| $r$ | korelační koeficient |
| $Re$ | faktor výtěžnosti |
| $R_S$ | rozlišení složek vzorku |
| $s_a$ | směrodatná odchylka |
| SPE | extrakce tuhým sorbentem (Solid Phase Extraction) |
| $t'_R$ | redukovaný retenční čas (min) |
| $t_M$ | mrtvý čas kolony (min) |
| $t_R$ | retenční čas komponenty vzorku (min) |
| UV | ultrafialová oblast záření 200 – 400 nm |
| $V$ | objem (mL) |
| VIS | viditelná oblast záření 400 – 800 nm |
| VOC | těkavé organické látky (Volatile Organic Compounds) |
| $Y$ | šířka chromatografického píku při základně (min) |
| $Y_{1/2}$ | šířka chromatografického píku v polovině výšky píku (min) |

| | |
|---|---|
| $\lambda$ | vlnová délka (nm) |
| $\varepsilon_{\lambda}$ | molární absorpční koeficient (L/mol · cm) |
| $\lambda_{max}$ | vlnová délka absorpčního maxima látky (nm) |

# SEZNAM LITERATURY


[1] http://sci.ujep.cz/chemistry/download.php?soubor-kontaminanty-ve-vodach.pdf [15.4.2009]

[2] Pacák J.: *Úvod do studia organické chemie*, SNTL, Praha 1982

[3] Pacák J.: *Stručné základy organické chemie*, SNTL, Praha 1978

[4] http://environment-agency.gov.uk/business/topics/pollution/208.aspx [15.4.2009]

[5] http://bezjedu.arnika.org/chemicka-latka.shtml?x=1919065 [15.4.2009]

[6] http://environment-agency.gov.uk/business/topics/pollution/351.aspx [15.4.2009]

[7] http://www.irz.cz/latky/fenoly [15.4.2009]

[8] Pfafflin J. R., Ziegler E. D.: *Encyklopedia of Environmental Science* & *Engineering*, Volume 1 A-L, Fifth edition, 2006

[9] Khatami S. H., Pascoe D., Learner M. A.: *Environ. Pol.* **99**, 379 (1998)

[10] Schüürmann G., Segner H., Jung K.: *Aquatic Tox.* **38**, 277 (1997)

[11] Guerra R.: *Chemosphere* **44**, 1737 (2001)

[12] Hernando M. D., Malato O., Farr´e M., Fernandez-Alba A. R.: *Talanta* **69**, 370 (2006)

[13] http://www.scorecard.org [17.5.2009]

[14] Fang H. H. P., Zhoa G. M.: *Environ. Technol.* **18**, 827 (1997)

[15] Blaszczyk M., Przytocka-Jusiak M., Suszek A., Mielcarek A.: *Acta Mocrobiol. Pol.* **47,** 65 (1998)

[16] Sarfaraz S., Thomas S., Tewari U. K., Lyengar L.: *Water Res.* **38**, 965 (2004)

[17] Buitron G., Gonzalez A., Lopez-Marin L. M.: *Water Sci. Technol.* **37**, 371 (1998)

[18] Gonzalez G., Herrera G., Garcia M. T., Pen˜ M.: *Bioresource Technol.* **76**, 245 (2001)

[19] Shul'pin G. P., Bochkova M. M., Nizova G. V.: *Aplied Catalysis B: Environmental* **12**, 1 (1997)

[20] Horáková M., Lischke P., Grünwald.: *Chemické a fyzikální metody analýzy vod*, SNL/ALFA, Praha 1986

[21] Kostrhounová-Štěpánková R., Jančař L., Sommer L.: *Chem. Listy* **97,** 269 (2003)

[22] Schmauch L. J., Grubb M. H.: *Anal. Chem.* **26,** 308 (1954)

[23] Afghan B. K., Bellivean P. E., Larose R. H., Ryan J. F.: *Anal. Chim. Acta* 7**,** 355 (1974)

[24] Amlathe S., Gupta V. K.: *Fresenius J. Anal. Chem.* **339,** 199 (1991)

[25] Tesařová E., Vozňáková Z., Podehradská J.: *Chem. Listy* **93**, 334-337 (1999)

[26] Rennie P. J.: *Analyst* **107,** 327 *(*1982)

[27] Angelino S., Genaro M. C.: *Anal. Chim. Acta* **346**, 61 (1997)

[28] Kostrhounová-Štěpánková R., Hrdlička A., Sommer L.: *Chem. Listy* **98,** 33 (2004)

[29] Saraji M., Bakhshi M.: *J. Chromatogr. A* **1098**, 30 (2005)

[30] Gonzalez-Toledoa E., Prata M. D., Alpenduradad M. F.: *J. Chromatogr. A,* **923**, 45 (2001)

[31] Pocurull E., Calull M., Marco R. M., Borrull F.: *J. Chromatogr. A* **719**, 105 (1993)

[32] Reitzel L. A., Ledin A.: *J. Chromatogr. A* **972**, 175 (2002)

[33] Patsias J., Papadopoulou-Mourkidou E.: *J. Chromatogr. A* **904**, 171 (2000)

[34] Rodrfguez I., Turnes M. I., Bollafn M. H., Mejuto M. C., Cela R.: *J. Chromatogr. A* **778**, 279 (1997)

[35] Tsukagoshi K., Kameda T., Yamamoto M., Nakajima R.: *J. Chromatogr. A* **978**, 213 (2002)

[36] Youyi W., Jin-Ming L.: *Sep. Sci.* **29**, 137 (2006)

[37] Pfeifer P. A., Bonn G. K., Bobleter O.: *Fresenius J. Anal. Chem.* **315**, 205 (1983)

[38] Wang H., Zhang A., Cui H., Liu D., Liu R.: *Microchem. J.* **59**, 448 (1998)

[39] Fuhrmann B., Spohn U.: *Biosensors &Bioelectronics* **13**, 895 (1998)

[40] Garaj J., Bustin D., Hladký Z.: *Analytická chémia*, SNTL, Praha 1987

[41] Holzbecher Z., Churáček J. a kol.: *Analytická chemie*, SNTL/ALFA, Praha 1987

[42] Renger F., Kalous J,: *Analytická chemie I.*, Univerzita Pardubice, 2004

[43] http://www.geopolymer.cz/uiozp/studmat/200694132224/uloha8.doc [20.7.2009]

[44] http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/texty/hplc/HPLC.pdf [27.8.2009]

[45] Vissers J. P. C., Claensens H. A., Cramer C. A.: *J. Chromatrogr. A* **779** 1 (1997)

[46] Švec F., Peters E. C., Sýkora D., Yu C., Fréchet J. M. J.: *J. High Resolut. Chromatogr.* **23** 3 (2000)

[47] Švec F., Peters E. C., Sýkora D., Fréchet J. M. J.: *J. Chromatogf. A* **887** 3 (2000)

[48] Švec F.: *Chem. Listy* **98**, 232 (2004)

[49] Širc J., Bosáková Z., Coufal P., Michálek J., Guryča V.: *Materials and Manuf. Processes*, **23**, 591 (2008)

[50] Širc J., Bosáková Z., Coufal P., Michálek J., Přádný M., Hobzová R., Hradil J.: *e-Polymers*, **117**, 1 (2007)

[51] Štulík K., Pacáková V., Suchánková J., Coufal P..: *J. Chromatogr. B* **841**, 79 (2006)

[52] Grafnetter J., Coufal P., Tesařová E., Suchánková J., Bosáková Z., Ševcík J.: *J. Chromatogr. A* **1049**, 43 (2004)

[53] http://www.natur.cuni.cz/~pcoufal/hplc.html [27.8.2009]