

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie
Studijní obor: Chemie životního prostředí



Zuzana Kadlecová

STANOVENÍ CHLORFENOLŮ VE VODÁCH METODOU HPLC

Determination of chlorophenols in water by HPLC

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Eva Tesařová, CSc.

Konzultantka: RNDr. Květa Kalíková, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné jen po písemném souhlase této univerzity.

V Praze dne 2. března 2017

Abstrakt

Tato bakalářská práce pojednává o problematice chlorfenolů ve vodách. Teoretická část shrnuje informace o jejich vlastnostech, toxicitě, původu a výskytu v životním prostředí. Dále je popsán osud chlorfenolů - bioakumulace, transformace a způsoby degradace v životním prostředí. Důraz je kladen na metody stanovení těchto látek ve vodných vzorcích, především metodou HPLC s předchozím zakoncentrováním extrakcí tuhou fází.

Experimentální část se zaměřuje na separaci vybraných isomerů metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie v reversním módu. Byly stanoveny meze detekce těchto isomerů v optimalizovaných podmínkách. Nalezené podmínky byly aplikovány na analýzu vzorku vody odebraného v Ústí nad Labem.

Klíčová slova: chlorfenoly, HPLC, separace, stanovení chlorfenolů

Abstract

This bachelor's thesis deals with the issue of chlorophenols in waters. The theoretical part summarises the information about their characteristics, toxicity, sources and appearance in the environment. Further, there is described the fate of chlorophenols - bioaccumulation, transformation and ways of degradation in the environment. The emphasis is placed on methods for determination of these compounds in water samples, especially by the HPLC method with previous concentration by solid-phase extraction.

The experimental part deals with separation of certain isomers by high performance liquid chromatography in reverse mode. In this bachelor's thesis, limits of detection of these isomers under optimized conditions of analysis were determined. Found conditions were applied to the analysis of a water sample taken in Ústí nad Labem.

Key words: chlorophenols, HPLC, separation, determination of chlorophenols

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce prof. RNDr. Evě Tesařové, CSc. za její vynikající rady, připomínky, odborné vedení a milý přístup. Dále bych ráda poděkovala rodičům a spolubydlící za podporu a trpělivost během mého celého studia.

Obsah

1 Úvod.....	9
2 Teoretická část	10
2.1 Vlastnosti.....	10
2.2 Toxicita	12
2.3 Původ.....	13
2.3.1 Antropogenní zdroje.....	13
2.3.2 Přírodní zdroje.....	14
2.3.3 Chlorace pitné vody	14
2.4 Výskyt	15
2.5 Transformace.....	16
2.6 Degradace a odstraňování	17
2.6.1 Fyzikální metody.....	17
2.6.2 Chemické metody.....	17
2.6.3 Fotodegradace	18
2.6.4 Biodegradace.....	19
2.7 Analýza chlorfenolů.....	19
2.7.1 Úprava vzorku před analýzou	19
2.7.2 Vlastní analýza.....	21
2.7.2.1 Celkové množství fenolů.....	21
2.7.2.2 Plynová chromatografie	21
2.7.2.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	22
3 Experimentální část.....	25
3.1 Použité přístroje a pomůcky.....	25
3.2 Použité chemikálie	25
3.3 Příprava vzorků	26
3.4 Použité mobilní fáze.....	26
3.5 Podmínky separace.....	26
4 Výsledky a diskuze	27
4.1 Výběr vlnové délky pro detekci	27
4.2 Optimalizace separace v acetonitrilu a vodě.....	28
4.3 Limity detekce v optimalizovaných podmínkách	33
4.4 Vliv úpravy pH mobilní fáze na separaci.....	34
4.5 Analýza vody z Bíliny.....	38
5 Závěr	41
6 Použitá literatura	42

Seznam použitých zkratk a symbolů

<i>A</i>	Absorbance
4-AAP	4-aminoantipyrin
ACN	Acetonitril
ADP	Adenosindifosfát
AOPs	Pokročilé oxidační procesy (advanced oxidation processes)
ATP	Adenosintrifosfát
<i>c</i>	Koncentrace
C8	Oktyl
C18	Oktadecyl
CDBPs	Vedlejší produkty desinfekce vody (chlorination disinfection by-products)
CP	Chlorfenoly
2-CP	2-chlorfenol
3-CP	3-chlorfenol
4-CP	4-chlorfenol
2,4-D	2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina
2,3-DCP	2,3-dichlorfenol
2,4-DCP	2,4-dichlorfenol
2,5-DCP	2,5-dichlorfenol
2,6-DCP	2,6-dichlorfenol
3,4-DCP	3,4-dichlorfenol
3,5-DCP	3,5-dichlorfenol
ECD	Detektor elektronového záchytu (electron capture detector)
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
EPA	Agentura pro ochranu životního prostředí (Environmental Protection Agency)
FID	Plamenově ionizační detektor (flame ionization detector)
GC	Plynová chromatografie (gas chromatography)
HLB	Hydrofilně lipofilní rovnováha (hydrophilic-lipophilic balance)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high performance liquid chromatography)
IC ₅₀	Inhibiční koncentrace (koncentrace, při které dochází k zamezení růstu 50 % sledovaných jedinců)
<i>K_a</i>	Disociační konstanta
<i>K_{o/w}</i>	Rozdělovací koeficient n-oktanol-voda
LLE	Extrakce kapaliny kapalinou (liquid-liquid extraction)
LOD	Limit detekce (limit of detection)
MP	Mobilní fáze (mobile phase)
MS	Hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
PCDD	Polychlorované dibenzodioxiny

PCDF	Polychlorované dibenzofurany
PCP	Pentachlorfenol
pK_a	$-\log K_a$
ppb	10^{-9} (parts per billion)
ppm	10^{-6} (parts per million)
ppt	10^{-12} (parts per trillion)
R_s	Rozlišení
RP-HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie v reversním módu
SP	Stacionární fáze (stationary phase)
SPE	Extrakce tuhou fází (solid phase extraction)
SPME	Mikroextrakce tuhou fází (solid phase microextraction)
2,4,5-T	2,4,5-trichlorfenoxyoctová kyselina
t	Čas
t_M	Mrtvý čas
t_R	Retenční čas
TCA	2,4,6-trichloranisol
TEAA	Octan triethylamonný (triethylammonium acetate)
2,3,4,5-TeCP	2,3,4,5-tetrachlorfenol
2,3,4,6-TeCP	2,3,4,6-tetrachlorfenol
2,3,5,6-TeCP	2,3,5,6-tetrachlorfenol
2,3,4-TrCP	2,3,4-trichlorfenol
2,3,5-TrCP	2,3,5-trichlorfenol
2,3,6-TrCP	2,3,6-trichlorfenol
2,4,5-TrCP	2,4,5-trichlorfenol
2,4,6-TrCP	2,4,6-trichlorfenol
3,4,5-TrCP	3,4,6-trichlorfenol
UV	Ultrafialová oblast spektra (ultraviolet)
v/v	Objemový poměr (volume/volume)
w	Šířka píku při základně
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)
w/v	Poměr hmotnost na objem (weight/volume)
w/w	Hmotnostní poměr (weight/weight)
λ	Vlnová délka

1 Úvod

Chlorfenoly patří mezi významné polutanty životního prostředí a jsou charakteristické svou toxicitou a sklonek k bioakumulaci. Většina chlorfenolů pochází z antropogenní činnosti, jedná se především o rozkladné produkty pesticidů, uplatňují se i v dřevařském průmyslu. Vznikají také při desinfekci pitné vody chlorem. Už při nízkých koncentracích v řádech $\mu\text{g/l}$ způsobují změnu organoleptických vlastností vody.

Chlorfenoly ve vzorcích vod se dají stanovit několika metodami. Pro složité směsi se nejčastěji používají chromatografické metody, které umožňují separovat a stanovit jednotlivé isomery. Před samotnou analýzou kapalinovou nebo plynovou chromatografií je většinou nutné látky ze vzorku zakoncentrovat, nejčastěji extrakcí tuhou fází.

Cílem této práce bylo zmapovat výskyt a chování chlorfenolů v životním prostředí a možnosti jejich analýzy. V rámci experimentální části byly nalezeny a optimalizovány podmínky pro separaci vybraných isomerů vysokoúčinnou kapalinou chromatografií. Vzhledem k charakteru chlorfenolů bylo použito reversního separačního módu. Optimalizované podmínky byly použity při analýze vzorku vody odebraného z řeky Bíliny.

2 Teoretická část

V teoretické části této práce jsou shrnuty informace o vlastnostech, toxicitě, původu a výskytu chlorfenolů v životním prostředí. Jsou popsány procesy jejich transformace a degradace. Poslední kapitola pojednává o metodách jejich stanovení s důrazem na kapalinovou chromatografii.

2.1 Vlastnosti

Chlorfenoly (CP) jsou sloučeniny, které mají aromatické jádro substituované reaktivní hydroxylovou funkční skupinou a jedním až pěti atomy chloru. Může tak vzniknout celkem 19 isomerů. Ty lze podle počtu atomů chloru rozdělit do pěti základních skupin od monochlorfenolů až po úplně substituovaný pentachlorfenol (PCP). Isomery mají různé fyzikální i chemické vlastnosti, které závisí jak na počtu atomů chloru, tak na jejich poloze vůči hydroxylové skupině. V této práci budou dále diskutovány především 2-chlorfenol (2-CP), 3-chlorfenol (3-CP), 4-chlorfenol (4-CP), 2,3-dichlorfenol (2,3-DCP), 2,4-dichlorfenol (2,4-DCP), 2,5-dichlorfenol (2,5-DCP) a 2,6-dichlorfenol (2,6-DCP).

Za normálních podmínek jsou chlorfenoly krystalické látky s bodem varu nad 200 °C. Výjimku představuje 2-chlorfenol, který je kapalný a jeho teplota varu je 175 °C. Jsou nehořlavé a za vyšších teplot se rozkládají na CO₂, CO a HCl¹. Některé vlastnosti chlorfenolů jsou uvedené v tabulce 1.

Obecně lze říci, že rozpustnost chlorfenolů ve vodě je nízká a ještě se snižuje se zvyšujícím se počtem navázaných atomů chloru. To je dáno růstem hydrofobního charakteru s počtem chlorů. Naopak v organických rozpouštědlech jsou chlorfenoly dobře rozpustné. Rozpustnost draselných a sodných solí ve vodě je až o čtyři řády vyšší než rozpustnost mateřského chlorfenolu².

Osud všech chemických látek v životním prostředí závisí především na jejich disociační konstantě (K_a) a rozdělovacím koeficientu v prostředí n-oktanol-voda ($K_{o/w}$)³. Z hodnot pK_a uvedených v tabulce 1 je zřejmé, že chlorfenoly jsou slabé kyseliny (pK_a je větší než 4). Kyselost chlorfenolů stoupá se zvyšujícím se počtem atomů chloru v molekule. Rozdělovací koeficient $K_{o/w}$ udává míru hydrofobicity. Je určován jako podíl koncentrace chemické látky v n-oktanolu a koncentrace této látky ve vodě v rovnovážném stavu při dané teplotě. Hydrofobicita roste s hodnotou $\log K_{o/w}$. Se stupněm chlorace se zvyšuje $\log K_{o/w}$ a tím i sklon k bioakumulaci².

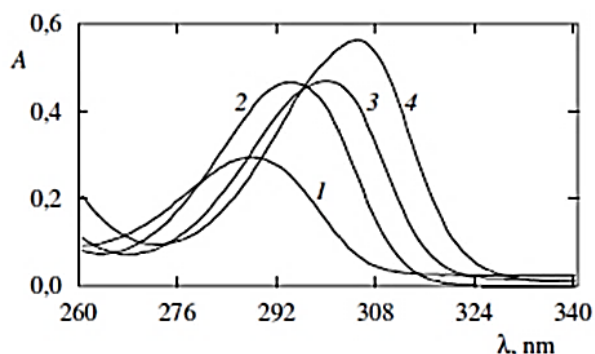
Tabulka 1: Vybrané vlastnosti chlorfenolů ¹

Chlorfenol	Teplota varu [°C]	Teplota tání [°C]	Rozpustnost [g.l ⁻¹] ^a	pK_a ^a	$\log K_{o/w}$ ^a	IC_{50} (20 °C) [mg.l ⁻¹]
2-CP	174-175	8-10	23,256	9,13	2,17	17,95
3-CP	213-214	33-34	22,190	9,53	2,50	15,78
4-CP	219-220	43-44	26,390	9,70	2,35	8,07
2,3-DCP	206	58-60	8,215	8,52	3,19	5,19
2,4-DCP	209-210	42-43	5,547	8,51	3,08	2,68
2,5-DCP	210-211	55-57	-	7,69	3,20	4,50
2,6-DCP	219-220	65-68	2,625	7,15	2,86	9,38
3,4-DCP	253-254	66-68	9,256	8,87	3,37	2,77
3,5-DCP	232-233	67-69	7,394	8,54	3,52	2,09
2,3,4-TrCP	257	79-81	0,915	7,34	4,07	2,24
2,3,5-TrCP	253-254	61-62	0,771	6,92	4,21	2,28
2,3,6-TrCP	257	57-58	0,591	6,10	3,88	7,38
2,4,5-TrCP	252-253	68-70	0,649	7,20	3,72	2,08
2,4,6-TrCP	245-246	69-70	0,708	6,51	3,69	5,47
3,4,5-TrCP	276-277	100-101	-	7,57	4,39	0,88
2,3,4,5-TeCP	275	116-117	0,166	5,64	4,69	1,76
2,3,4,6-TeCP	275	69-70	0,166	5,22	4,45	2,7
2,3,5,6-TeCP	275	114-115	0,100	5,04	4,90	2,27
PCP	309-310	173-174	0,018	4,74	5,12	0,76

$pK_a = -\log K_a$, kde K_a je disociační konstanta kyseliny; $\log K_{o/w}$ – rozdělovací koeficient v prostředí n-oktanol-voda; IC_{50} – inhibiční koncentrace – koncentrace, při které dochází k zamezení růstu 50 % sledovaných jedinců *Daphnia magna*; ^a měřeno při 25 °C ve vodě

Rozdíly ve vlastnostech jednotlivých izomerů jsou nejvíce patrné při porovnávání chlorfenolů chlorovaných v poloze 2 s ostatními izomery. U 2-chlorfenolů dochází k tvorbě intramolekulárních vodíkových můstků mezi chlorem a vodíkem z hydroxylové funkční skupiny. To má za následek vyšší stabilitu. Díky vysoké elektronegativitě chloru dochází k zápornému indukčnímu efektu a vytvoření parciálních nábojů. Proto jsou 2-chlorfenoly kyselější než ostatní izomery. Ze stejného důvodu roste kyselost se zvyšujícím se počtem chlorů⁴.

Podobně jako všechny aromatické sloučeniny vykazují i chlorfenoly v UV oblasti kolem 280 nm v alkalickém prostředí výraznou absorbanci. Toho lze využít při jejich spektrofotometrickém stanovení. Absorpční maximum se posouvá se vzrůstajícím počtem atomů chloru na aromatickém jádře k vyšším vlnovým délkám do oblasti 280-320 nm⁵. Tento trend je zřejmý na obrázku 1. Další absorpční maxima budou detailněji diskutována v kapitole výsledky a diskuze.



Obrázek 1: Absorpční spektra⁵ fenolu (1), 2-CP (2), 2,6-DCP (3), 2,3,6-TrCP (4); spektra jednotlivých komponent v prostředí NaOH (1 mol.dm⁻³) a EDTA (1 mmol.dm⁻³), koncentrace fenolu 100 μmol. dm⁻³

2.2 Toxicita

Chlorfenoly mají charakteristický štiplavý zápach, silně dráždí sliznice, oči a vstřebávají se kůží. S jistotou lze říci, že se jedná o látky imunotoxické, fytotoxické a embryotoxické. Světová zdravotnická organizace (WHO) klasifikuje 2,4,6-TrCP, 2,4,5-TrCP a PCP jako látky podezřelé z karcinogenity⁶. Agentura pro ochranu životního prostředí (EPA) má 2-CP, 2,4-DCP, 2,4,6-TrCP a PCP na seznamu prioritních polutantů².

Toxicita chlorovaných fenolů spočívá v jejich schopnosti rozpojit oxidační fosforylaci v dýchacím řetězci. Tím se ukončí přeměna ADP (adenosindifosfát) na ATP (adenosintrifosfát). Typickým projevem inhibice syntézy ATP je horečka. Takový účinek je charakteristický pro fenoly s elektronegativními substituenty. V případě chlorfenolů má největší inhibiční účinek pentachlorfenol⁷.

Toxicita je závislá na počtu chlorů v molekule i jejich poloze. Obecně lze říci, že s rostoucím stupněm chlorace roste i toxicita, a to především díky větší rozpustnosti v tucích (tabulka 1). Proto bylo účinkům PCP věnováno několik studií. Například v Číně se vyskytuje ve vysokých koncentracích ve většině povrchových

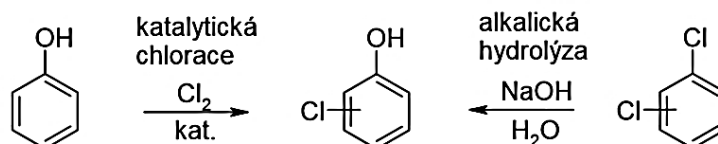
řek⁸. Chlorfenoly s chlorem v poloze 2- mají vždy nižší toxicitu, naopak substituce v poloze 4- toxicitu zvyšuje⁹.

Toxicitu výrazně ovlivňuje také pH prostředí. S rostoucím pH klesá míra bioakumulace a tím také toxicita pro vodní organismy. To je způsobeno disociací chlorfenolů při vyšším pH než je pK_a daného chlorfenolu. Disociací se zvýší hydrofilita a látky pak obtížně procházejí lipidovou membránou buňky v organismech. Tím se sníží bioakumulace¹⁰.

2.3 Původ

Hlavním zdrojem chlorfenolů je jednoznačně antropogenní činnost. Jsou to látky široce využívané v různých oblastech průmyslu a zemědělství. Do životního prostředí se mohou dostat přímo nebo jako produkt degradace. Speciálním případem je vznik CP jako vedlejších produktů při dezinfekci pitné vody chlorem nebo jeho sloučeninami.

Průmyslová výroba chlorfenolů může probíhat dvěma základními postupy (obrázek 2). Prvním je katalytická chlorace fenolu, druhým pak alkalická hydrolýza odpovídajícího chlorbenzenu¹.

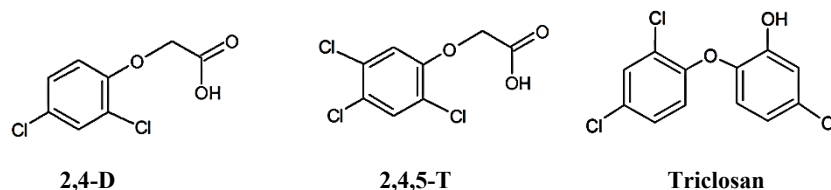


Obrázek 2: Schéma průmyslové výroby chlorfenolů¹

2.3.1 Antropogenní zdroje

Průmyslově se využívá pouze osm chlorfenolů, a to tři monochlorfenoly, 2,4-dichlorfenol, 2,4,6-trichlorfenol, 2,4,5-trichlorfenol, 2,3,4,5-tetrachlorfenol, 2,3,4,6-tetrachlorfenol a pentachlorfenol³. Monochlorfenoly se používají především pro syntézu vyšších chlorfenolů nebo jako rozpouštědla (při extrakci síry z uhlí a rafinaci olejů)¹. V zemědělství se CP využívají jako herbicidy, insekticidy, fungicidy a baktericidy. Chlorfenoly s nejméně dvěma chlorem se používají buď přímo jako pesticidy, nebo slouží k jejich výrobě. Směsi různých chlorfenolů se kvůli baktericidním a fungicidním účinkům používají také k impregnaci dřeva a kůže². *Para*-chlorfenol se používá jako antiseptikum. CP mohou vzniknout i při bělení buničiny ze dřeva chlorem při výrobě papíru¹¹.

Významným zdrojem chlorovaných fenolů v životním prostředí je mikrobiální degradace pesticidů. Například rozkladem kyseliny 2,4-dichlorfenoxyoctové (2,4-D) a kyseliny 2,4,5-trichlorfenoxyoctové (2,4,5-T), které se používají jako selektivní herbicidy na ochranu obilovin, vznikají 2,4-dichlorfenol a 2,4,5-trichlorfenol¹². Chlorfenoly vznikají také degradací triclosanu, který se přidává do mýdel a dalších hygienických přípravků jako antibakteriální složka¹³. Strukturální vzorce uvedených sloučenin jsou na obrázku 3.



Obrázek 3: Struktura 2,4-dichlorfenoxyoctové kyseliny (2,4-D), 2,4,5-trichlorfenoxyoctové kyseliny (2,4,5-T) a triclosanu

2.3.2 Přírodní zdroje

Minoritní podíl chlorfenolů pochází z biogenní činnosti, především pak z nejrůznějších geologických procesů a lesních požárů. CP mohou v přírodě vzniknout z organických látek a anorganického chloridu dvěma způsoby. Prvním je *de novo* syntéza, druhým chlorace katalyzovaná chloroperoxidasou. Ve druhém případě musí být kromě peroxidu vodíku a anorganického chloru přítomny i sloučeniny s aromatickým jádrem. Těmi může být buď samotný fenol, nebo huminové sloučeniny¹⁴.

Zajímavostí je, že ve slinách kobylek *Romalea guttata* byl nalezen 2,5-dichlorfenol. Jeho výskyt je ale přisuzován tomu, že kobylka mohla konzumovat rostliny, na které byl aplikován herbicid na bázi chlorfenolu (2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina)¹⁵. U roztočů byl nalezen 2,6-dichlorfenol jako sexuální feromon. *De novo* syntéza byla popsána například u 2,4-dichlorfenolu pomocí půdních hub z rodu *Penicillium*¹⁴.

2.3.3 Chlorace pitné vody

Při desinfekci pitné vody se využívají silná oxidační činidla, která působí usmrcení nežádoucích mikroorganismů. Nejčastěji užívanými činidly jsou látky obsahující chlor, jako například chlornan sodný, oxid chloričitý nebo samotný chlor. Kromě oxidačních reakcí mohou mezi desinfekčním činidlem a ostatními látkami ve

vodě probíhat i reakce chlorační. Ty mají za následek tvorbu vedlejších produktů (CDPBs – chlorination disinfection by-products). Mezi nejvýznamnější CDPBs patří trihalogenmethany, halogenoctové kyseliny a chlorfenoly. Použití oxidu chloričitého sice neposkytuje CDPBs, ale má i své nevýhody - ClO_2 je explozivní plyn, který není možné skladovat¹⁶.

V současné době je situace kolem tvorby chlorfenolů při dezinfekci vody dobře zmapovaná. Fenolické látky ve vodě se i ve velmi malých koncentracích snadno chlorují. Fenoly nemusí pocházet jen z průmyslových odpadních vod (jako tomu bylo v 60. a 70. letech minulého století), ale vznikají i z přírodních huminových látek. Chlorací těchto látek dochází ke vzniku silně zapáchajících a chuťově výrazných chlorfenolů. Limity pro pitnou vodu jsou proto dané spíše senzoričtými než toxikologickými hledisky. Pokud tedy voda nemá zjevnou chuť po některém z chlorfenolů, není pro spotřebitele nebezpečná. Většina chlorfenolů poměrně dobře destiluje s vodní parou (tvoří azeotropní směs s vodou s minimem teploty varu), a proto jejich část při varu odtěká¹⁷.

2.4 Výskyt

Výskyt chlorfenolů v životním prostředí závisí na vlastnostech konkrétního kongeneru a na podmínkách v okolním prostředí – například pH ovlivňuje formu výskytu (disociovaná/nedisociovaná forma), a tím také chování látek. Naměřené hodnoty koncentrací jsou samozřejmě závislé i na lokálních zdrojích znečištění, jako jsou velké zemědělské oblasti používající pesticidy na bázi chlorfenolů nebo podniky dřevařského průmyslu. Obecně lze říci, že CP jsou kontaminanty vod, půd a v menší míře i atmosféry. Chlorfenoly z půdy jsou často vyplavovány do podzemních nebo povrchových vod.

Nejběžnějším výskytem chlorfenolů jsou různé typy vod, proto je většina analytických metod zaměřena právě na analýzu vodních vzorků. Koncentrace už v řádech ppb (w/v) jsou chuti dobře postihnutebné a velmi malé koncentrace lze poznat dle chuti ryb žijících v kontaminovaných vodách. V chlorované pitné vodě byly naměřeny koncentrace v řádech ppt (w/v)¹¹. Nejčastěji vyskytující se isomery v pitné vodě jsou 4-CP, 2,4-DCP, 2,4,6-TrCP a PCP³.

U kontaminace půdy je velmi důležitý transport látek, který závisí na mnoha faktorech. Těmi jsou například pH, rozpustnost ve vodě, obsah organických látek v půdě a množství srážek. Chlorfenoly v půdě jsou především problémem zemí, kde je

většina zemědělských plodin chráněna pesticidy na bázi chlorfenolů. To se týká například Kanady, Finska a Švédska³. Analýzy pevných matric nebo sedimentů z řek jsou složitější a kvůli množství kroků před samotnou analýzou nemusejí vždy poskytnout relevantní výsledky.

Výskyt chlorfenolů v atmosféře je závislý na jejich tendenci vypařovat se. Monochlorfenoly a dichlorfenoly (především 2,4-DCP) jsou nejtěkavější, a proto se v ovzduší vyskytují nejvíce. CP jsou z atmosféry vymývány srážkami. Naměřené koncentrace CP ve městech jsou nižší než ppt (v/v)¹¹. V roce 2011 byla provedena studie, podle které jsou koncentrace CP (ale také hexachlorbenzenu a polychlorovaných dibenzodioxinů a dibenzofuranů) v ovzduší vyšší při používání ohňostrojů¹⁸.

2.5 Transformace

Chlorfenoly v životním prostředí podléhají nejen degradaci na jednodušší a většinou méně toxické látky, ale také transformaci. Výsledné látky mohou být toxičtější než původní CP.

Příkladem z běžného života je například tzv. korkovatění vína, za jehož hlavní příčinu je považován 2,4,6-trichloranisol (TCA). TCA je produkt metabolické přeměny některých hub (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Actinomyces*, *Streptomyces*) a vzniká metylací 2,4,6-trichlorfenolu, který se používá jako fungicid na ochranu korků proti plísním. TCA sice není toxický, ale jeho koncentrace už od 4 ng/l v bílém víně způsobí zatuchlou chuť, čímž celou láhev vína znehodnotí¹⁹.

Studie *in vitro* ukazují, že i lidské tělo může být schopné transformace chlorfenolů. Bílé krvinky obsahují myeloperoxidasu, která za přítomnosti peroxidu vodíku transformuje chlorfenoly (2,4,5-TrCP, 2,3,4,6-TeCP a PCP) na polychlorované dibenzodioxiny a dibenzofurany (PCDD a PCDF). To může být příčinou naměření vyšších koncentrací PCDD a PCDF v kravích a lidských exkrementech, než jakému množství byli testovaní jedinci vystaveni²⁰.

K transformaci chlorfenolů na PCDD nebo PCDF dochází i v životním prostředí. Tento jev byl pozorován v půdách, kde přednostně vznikají PCDD²¹. Při reakci 2,4,5-TrCP katalyzované křenovou peroxidázou v přítomnosti peroxidu vodíku vznikají PCDD a PCDF. Peroxidázovou aktivitu vykazuje i půdní houba *Phanerochaete chrysosporium*, která může v přítomnosti peroxidů vodíku způsobit přeměnu 2,4,5-TrCP na PCDD nebo PCDF¹⁴.

2.6 Degradace a odstraňování

Chlorfenoly jsou toxické a perzistentní látky se sklonem k bioakumulaci, a proto je třeba je z odpadních vod odstranit. Ekologická legislativa (Nařízení vlády č. 61/2003 Sb.) definuje hodnotu 0,1 mg/l jako maximální přípustný limit pro vypouštění CP do odpadních vod. Skutečné hodnoty ale mohou být až tisíckrát vyšší¹. Běžně používanými metodami je adsorpce, iontová výměna, extrakce kapalinou, oxidační procesy, fotodegradace nebo biodegradace. Procesy se liší nejen finanční náročností, ale také šetrností k životnímu prostředí – při některých vznikají toxické vedlejší produkty²².

2.6.1 Fyzikální metody

Fyzikální metody odstraňování CP z vody jsou založené na adsorpci nebo rozdílné distribuci látek mezi dvě různé fáze. Jak již bylo uvedeno výše, chování látek závisí na pH prostředí (ve vztahu k jejich hodnotám pK_a) a na jejich rozdělovacím koeficientu v prostředí n-oktanol-voda (který charakterizuje jejich hydrofobicitu). Při čištění odpadních vod se využívají polární i nepolární sorbenty. Mezi ty nepolární patří například hlíny typu alumina-montmorillonit, pórovité látky jako je aktivní uhlí, popílek a bentonit. Problémem ale zůstává odstranění CP ze sorbentu. Řešením je následná oxidace pomocí MnO_2 na povrchu sorbentu¹. Přírozenou fyzikální metodou odstraňování CP z vody je jejich sorpce na říční a břehové sedimenty³. V případě čištění velkého množství odpadních vod lze s výhodou využít zkoncentrování chlorfenolů extrakcí emulzní fází. Ta je tvořena vodou, hydroxidem sodným, tenzidem (Span-80) a nepolárním solventem (kerosin). Emulze slouží jako kapalná membrána, ve které se chlorfenoly kvantitativně zachytí²³.

V případě odstraňování CP z kontaminované půdy (obsah CP < 500 ppm (w/w)) je nejdříve nutné provést destilaci vodní parou. Přehřátá vodní pára s teplotou vyšší než 100 °C přechází přes půdu okyselenou pomocí H_2SO_4 na pH < 2 a přitom tvoří azeotropní směs s chlorfenoly. Po kondenzaci par je možné CP odstranit stejným postupem jako z odpadních vod¹.

2.6.2 Chemické metody

Mezi chemické metody odstraňování CP patří například oxidační procesy, enzymatické reakce a reduktivní dechlorace pomocí hydridů¹. K oxidačním

procesům se řadí spalování, mokrá katalytická oxidace a pokročilé oxidační procesy (tzv. AOPs). Alternativou k AOPs je elektrochemická oxidace²⁴.

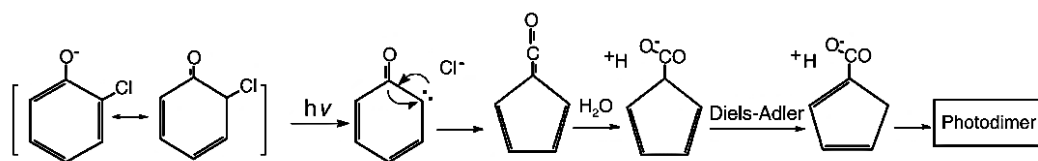
Spalování je široce používanou metodou, při které po určitém čase dochází k rozkladu chlorfenolů. Při spalování musí být podmínky přesně nastavené tak, aby nedocházelo k tvorbě toxických látek jako PCDD, PCDF nebo PCB (polychlorované bifenyly)²⁵.

Pokročilé oxidační procesy se vyznačují velkým oxidačním účinkem a slouží k degradaci těžko odbouratelných látek. Mezi AOPs patří procesy využívající peroxid vodíku ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{UV}$, $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$), fotolýza, fotokatalýza a procesy založené na ozonu (O_3 , $\text{O}_3 + \text{UV}$). Systém $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+}$ je známý jako Fentonovo činidlo²⁶.

Elektrochemickou degradaci lze na rozdíl od AOPs použít i pro odpadní vody s vysokým obsahem polutantů. V minulosti se elektrochemické metody používaly především k odstranění kovů, v současnosti se jejich využití rozšiřuje. Nevýhodou těchto metod je vysoká spotřeba elektrické energie. Mechanismus oxidace a výsledné produkty závisí na druhu použité anody, reakčních podmínkách a konkrétním chlorfenolu. Klíčovou roli ale vždy hraje hydroxylový radikál $\text{OH}\cdot$ sorbovaný na elektrodě, který se dále účastní rozkladu chlorfenolů²⁴.

2.6.3 Fotodegradace

Přímým ozařováním polychromatickým světlem dochází k rozkladu CP. Transformace probíhají přes fotoexcitované stavy s následným homolytickým štěpením vazeb C-Cl a O-H za tvorby chlorfenoxylových radikálů¹. Degradace může probíhat přímou fotolýzou, reakcí s hydroxylovým radikálem nebo reakcí se singletovým kyslíkem. Nevýhodou je možnost vzniku PCDD nebo PCDF. Způsoby a produkty degradace se liší pro konkrétní chlorfenoly a jsou závislé na jejich disociaci²⁷. Například fotodegradací nedisociované formy 2-chlorfenolu vzniká pyrokatechol, ale v případě disociované formy vzniká dimer cyklopentadieonové kyseliny (obrázek 4)³. Rozšířenou metodou je i odbourávání fotokatalýzou na povrchu polovodičů, například ZnO nebo TiO_2 ²⁸.



Obrázek 4: Mechanismus fotodegradace disociované formy 2-chlorfenolu³

2.6.4 Biodegradace

Chlorfenoly jsou hůře biodegradovatelné než fenol a s počtem chlorů se účinnost odbourání ještě snižuje²⁹. Účinnost mikrobiálního odbourávání ovlivňuje také poloha atomu chloru. Sloučeniny substituované v poloze *meta*- (3-CP, 3,5-DCP) jsou vůči mikrobiální degradaci více rezistentní, a tím také toxičtější, než sloučeniny s chlorem v poloze *orto*-. Aby degradace mohla probíhat, musejí mikroorganismy produkovat enzym dehalogenasu, který katalyzuje štěpení C-Cl vazeb. Dehalogenace může probíhat redukční nebo oxidační cestou¹. Oxidační dehalogenace probíhá za aerobních podmínek a je katalyzována monooxygenasami. Konečnými produkty jsou chinony a katecholy. Redukční dehalogenace probíhá za anaerobních podmínek. Chlorfenoly mohou být methanogenními kmeny bakterií degradovány až na oxid uhličitý a metan²².

2.7 Analýza chlorfenolů

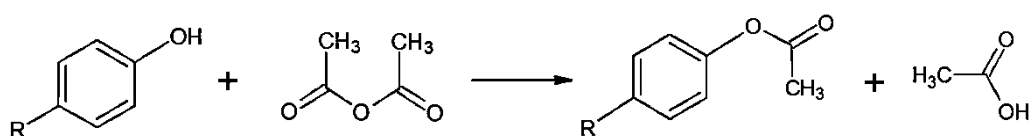
2.7.1 Úprava vzorku před analýzou

V případě analýzy reálných vzorků je nutné je před samotnou analýzou vhodně upravit. Do chromatografických přístrojů se nesmí dostat pevné částice, proto je vždy nutná filtrace. Obsah chlorfenolů ve vodách je velmi nízký, a proto se provádí extrakce, která slouží k nakoncentrování analytu. V praxi se nejčastěji využívá extrakce tuhým sorbentem (SPE), mikroextrakce tuhým sorbentem (SPME) nebo extrakce kapaliny kapalinou (LLE).

Před extrakcí chlorfenolů metodou LLE je nutné potlačit jejich disociaci okyselením vzorku na pH 1 až 3. Nejčastěji se pracuje při pH 2 za využití H₂SO₄, HCl nebo H₃PO₄. Výtěžnost extrakce lze někdy zlepšit přidávkem neutrální soli nebo vytvořením molekulárního komplexu v nevodném prostředí. Nederivatizované chlorfenoly mohou být z vody extrahovány například toluenem, hexanem, benzenem

nebo dichlormethanem. Pro zlepšení afinity k rozpouštědлу se používá derivatizace. Využívá se reakcí s acetanhydridem, chloracetanhydridem nebo 4-aminoantipyrinem³⁰.

Nejpoužívanější metodou zkoncentrování nejen chlorfenolů, ale i většiny dalších organických látek, je SPE, která postupně nahrazuje dříve široce používanou LLE. Na sorbentech typu polymerů (polyanilin, poly-N-methylanilin, polypyrol), silikagelů modifikovaných hydrofobními řetězci (C8,C18) a aktivního uhlí se sorbují nedisociované chlorfenoly. Disociace musí být potlačena přidavkem kyseliny. Derivatizace acetanhydridem (obrázek 5) zlepšuje afinitu chlorfenolů k sorbentu (sníží polaritu analytu)³¹. Přídavek vysolovacího činidla (NaCl, KCl) zvýší iontovou sílu roztoku, dojde k vysolení organické látky z roztoku do pevné fáze a zvýší se výtěžnost izolačního postupu. Na výsledek extrakce má vliv nejen volba sorbentu a elučního rozpouštědla, ale také objem vzorku, koncentrace chlorfenolů a kapacita extrakční kolonky (5 % hmotnosti sorbentu)³². Jako eluční rozpouštědlo se většinou používá aceton, acetonitril nebo methanol³³.



Obrázek 5: Obecné schéma derivatizace chlorfenolů acetanhydridem³⁴

Hlavními výhodami SPE oproti LLE je menší časová náročnost a jednoduchost provedení. Při SPE se nepracuje s často drahými a toxickými rozpouštědly, a díky bohatému výběru pevných sorbentů polární i nepolární povahy umožňuje extrakci širší škály organických látek³⁵. LLE se dá využít pouze pro extrakci nepolárních látek.

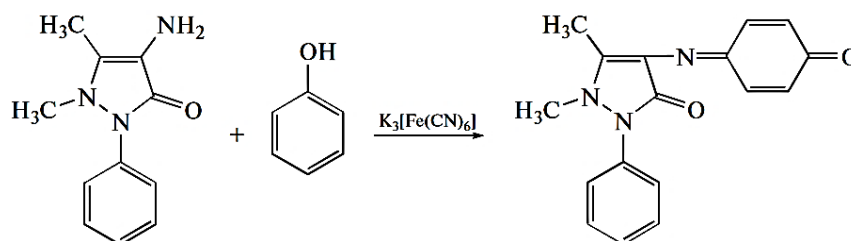
SPME je rychlá, levná a nenáročná izolační metoda, při které se nepoužívají žádná rozpouštědla. Sjednocuje proces vzorkování a extrakce a využívá se především před plynovou chromatografií. Principem je sorpce analytu na stacionární fázi, která je nanášena na křemenném vlákne uvnitř jehly. Kovová jehla slouží kromě mechanické ochrany k propíchnutí septa nádoby se vzorkem, při čemž se z jehly se vysune vlákno se sorbentem. Analyty se akumulují na vlákne až do dosažení rovnováhy. Vlákno se poté přeneso do nástřikového prostoru plynového chromatografu, kde dojde k tepelné desorpci látek³⁶.

2.7.2 Vlastní analýza

Před samotnou analýzou je nutné ujasnit si, zda potřebujeme stanovit množství jednotlivých isomerů (například kvůli rozdílné toxicitě), nebo stačí celkový obsah fenolu a jeho derivátů. Ten může být stanoven spektrofotometricky. V případě nutnosti separace isomerů se používají chromatografické metody. Často je využívána plynová chromatografie společně s SPME. Kapalinová chromatografie nabízí možnost úpravy několika parametrů, které zajistí optimální separační podmínky pro konkrétní vzorek.

2.7.2.1 Celkové množství fenolů

Ke stanovení celkového množství fenolu a jeho derivátů (včetně chlorfenolů) lze použít spektrofotometrii. Reakcí fenolu nebo jeho derivátů s 4-aminoantipyrinem (4-AAP) v přítomnosti $K_3[Fe(CN)_6]$ vzniká červeně zbarvený roztok. Schéma reakce je na obrázku 6. S 4-AAP reagují bez omezení *orto*- a *meta*- substituované fenoly, optimální pH této reakce je 10 ($\pm 0,2$). V případě *para*- substituovaných chlorfenolů je optimální pH 8. Některé *para*- substituované fenoly, například alkyl-, aryl-, nitro-, benzoyl-, nitroso- nebo aldehyd- fenoly, nereagují s 4-AAP vůbec. Absorbance je měřena ve viditelné oblasti spektra, většinou při vlnové délce kolem 500 nm, v případně extrakce chloroformem (používané při nízkých koncentracích) při vlnové délce 460 nm³⁷.



Obrázek 6: Schéma reakce fenolu s 4-AAP³⁷

2.7.2.2 Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) je separační metoda, při které se jako mobilní fáze používá nosný plyn. Tím může být například vodík, helium nebo argon. Stacionární fáze je umístěna v koloně, která je tenčí a mnohem delší než u kapalinové chromatografie. Na stacionární fázi dochází k separaci látek podle rozdílné afinity k náplni kolony. Vzorek je po vstříknutí do chromatografu teplem

převeden do plynné fáze. Podmínkou úspěšné analýzy tedy je, aby u sledovaných látek nedoházelo vlivem tepla k rozkladu. V případě zkoncentrování analytu pomocí SPME musí teplota v nástřikovém prostoru odpovídat teplotě, při které dochází k desorpci analytu z SPME vlákna³⁴. Teplota se během analýzy většinou postupně zvyšuje až k 250 °C³⁸. K detekci se využívají FID, detektory elektronového záchytu ECD nebo hmotnostní spektrometry. Před analýzou může být provedena vhodná derivatizace, která sníží polaritu a tím teplotu varu analytů.

2.7.2.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC je kvantitativní i kvalitativní analytická metoda, během které dochází na základě rozdílných vlastností analytů k distribuci mezi stacionární (SP) a mobilní fází (MP). Stacionární fáze je umístěna v koloně. Mobilní fáze je většinou směsí rozpouštědla a vody, případně pufru. Úspěšná separace je podmíněna nejen výběrem vhodné kolony, ale také vhodnou MP. Analýzu lze provádět i za laboratorní teploty, případně za snížené teploty, proto lze na rozdíl od plynové chromatografie stanovit i tepelně nestálé sloučeniny. Při separaci v reversním módu (RP-HPLC), který byl využit pro analýzu chlorfenolů, je SP méně polární než MP. Na koloně tedy dochází k silnějšímu zadržování hydrofobnějších látek. K detekci se využívají spektrofotometrické, fluorimetrické, vodivostní nebo elektrochemické detektory. Možností je i hmotnostní spektrometrie. Nejběžnější je detekce spektrofotometrická.

K separaci chlorfenolů se dá využít i HPLC v normálním módu, při kterém by stacionární fáze (například silikagel) byla polárnější než mobilní fáze. Mezi analytem a silikagelem se pak uplatňují odlišné interakce (elektrostatické, vodíkové vazby aj.), které způsobují retenci analytů. Polární substituent v poloze *orto*- tvoří intramolekulární vodíkové vazby, a tím oslabuje intermolekulární interakce. *Orto*-substituované fenoly mají kratší retenční čas. Nevýhodou tohoto uspořádání (normálního separačního módu) je nutnost použití nepolárních rozpouštědel (hexanu), což většinou nedovoluje přímou analýzu vodných roztoků.

V případě RP-HPLC (zahrnuje 80 % analýz fenolů) se jako stacionární fáze nejčastěji využívá silikagel modifikovaný oktadecylem (C18) nebo oktylem (C8). Jako mobilní fáze se nejvíce využívá směs voda-acetonitril nebo voda-methanol. Okyselení MP potlačuje disociaci chlorfenolů a zlepšuje symetrii píků³⁹.

Pro zpracování naměřených dat a určení výsledků analýz se využívají následující vztahy. Uvedené jsou vzorce potřebné k výpočtu naměřených veličin diskutovaných v kapitole Výsledky a diskuze.

Retenční faktor je jedna ze základních charakteristik chromatografického systému. Udává, kolikrát delší dobu stráví látka ve stacionární fázi než ve fázi mobilní. Pro retenční faktor (k) platí:

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (1)$$

t_R [min] retenční čas daného analytu a t_M [min] mrtvý čas kolony, tj. eluční čas látky, která neinteraguje se stacionární fází.

Rozlišení charakterizuje míru vzájemného překrývání dvou sousedních píků. Pro rozlišení (R_s) platí:

$$R_s = \frac{2(t_{R,2} - t_{R,1})}{w_1 + w_2} \quad (2)$$

$t_{R,1}$ [min] ; $t_{R,2}$ [min] jsou retenční časy dříve; později eluující složky, w_1 a w_2 jsou šířky daného píku při základně.

Pokud je hodnota $R_s \geq 1,5$, mluvíme o separaci analytů na základní linii.

V následující části jsou uvedeny příklady reversních separačních systémů použitých pro dělení chlorfenolů.

Při separaci monochlorfenolů na koloně LiChrosorb (průměr částic 5 μm) s mobilní fází tvořenou směsí methanol-0,001 M H_3PO_4 (45+55, v/v), nebylo dosaženo úplného oddělení 3-chlorfenolu od 4-chlorfenolu. Detekční limity při vlnové délce 280 nm byly řádově 10^{-4} $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pro všechny tři monochlorfenoly⁴⁰.

V jiné studii byly porovnány výsledky separace při změně poměru methanolu a vody v mobilní fázi. Byla použita kolona RP C_{18} LUNA (250 mm x 4,6 mm, 5 μm). pH v mobilní fázi bylo pomocí H_3PO_4 upraveno na 4,552. Teplota kolony byla 25 °C. Detekce probíhala opět při 280 nm. Optimálních podmínek bylo dosaženo při složení MP 50 % vody a 50 % methanolu, separace 3-CP a 4-CP byla téměř na základní linii⁴¹.

Studie z roku 2006 porovnává výsledky separace 11 fenolů, mezi nimi 2-CP, 2,4-DCP, 2,4,6-TrCP a PCP. Bylo použito 9 různých kolon, všechny pro RP-HPLC. Bylo měněno také složení mobilních fází, použit byl methanol, acetonitril, tetrahydrofuran a 50 mM H_3PO_4 . Nejlepších výsledků bylo dosaženo při složení

mobilní fáze 40 % acetonitrilu a 50 mM H₃PO₄ (pH = 5). Byl studován i vliv teploty na průběh analýzy. S rostoucí teplotou klesal retenční faktor⁴².

Bylo provedeno i porovnání analýz kohoutkové vody s vodou z řeky Jenisej. Kromě jiných fenolů patřily mezi sledované analyty 2-CP, 4-CP, 2,6-DCP, 2,4,6-TrCP a PCP. Byla použita kolona Zorbax eclipse XDB-C18 s průměrem částic 5 μm. Kolona byla termostátována na 30 °C. MP tvořila směs vodného roztoku kyseliny octové (pH = 3,35) a acetonitrilu. Byla zvolena gradientová eluce: 35 % acetonitrilu do 6,6 minut, poté 60 % acetonitrilu. Signál detektoru byl zaznamenáván při vlnových délkách 195 nm, 200 nm, 215 nm, 230 nm, 270 nm, 280 nm a 290 nm. Po optimalizaci podmínek byla zvolena detekce při 280 nm do 9,38 minut, následně při 290 nm pro později eluující více chlorované fenoly³³.

V review z roku 1993 jsou shrnuty meze detekce několika chlorfenolů při použití různých typů detektorů a za použití různých kolon. Diskutován je také vliv derivatizace na jejich stanovení³⁰.

Byla testována i upravená stacionární fáze s navázanými β-cykloextriny. Průtok MP byl 1 ml/min, teplota kolony 20 °C. Detekce probíhala při 280 nm. MP byla tvořena 10 mM octanem triethylamonným (TEAA), pH 5, s methanolem (v objemových poměrech 9:1-5:5)⁴³.

Asi nejkompexnější studií byla separace 14 isomerů chlorfenolů. Optimální se ukázala gradientová eluce s mobilní fází 35:65 (v/v) methanolu-10 mM fosfátového pufru, pH 3,5 (složka A) a 100% methanolu (složka B). Optimální gradient eluce byl následující: 3,5 minuty isokratická eluce složkou A, 23,5 minut s rostoucím gradientem složky B a posledních 5 minut isokratická eluce složkou B. Nástřik větších objemů než 15 μl na kolonu způsobil deformaci píků. Optimální rychlost průtoku byla 0,35 ml/min a teplota kolony 18 °C. Detekce byla prováděna při 230 nm a 280 nm. Rozlišení většiny píků bylo uspokojivé, s výjimkou 2,4-DCP a 2,5-DCP ($R_s = 0,95$), a také 2,3,4-TrCP a 2,4,6-TrCP ($R_s = 0,69$)³².

Vlnové délky využívané pro detekci chlorfenolů jsou různé, ve většině prací se však objevuje 280 nm. Pro většinu fenolů je typický dvojitý pás zvýšené absorpce při 274 nm a 266 nm. V literatuře byla popsána vysoká absorpce též v oblasti pod 225 nm³⁹.

3 Experimentální část

3.1 Použité přístroje a pomůcky

Spektrofotometrie

Spektrofotometr UV-2401PC, Shimadzu, Japonsko

Křemenné kyvety, 1 cm

Software UV-Probe

Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Separální modul Waters 2690, Alliance HPLC Systém, Waters, Milford, USA

Detektor Waters 2487, Dual λ Absorbance Detector, Waters, Milford, USA

Kolona ZORBAX SB-C8, rozměry 4,6 x 150 mm, velikost částic 5 μ m,

Agilent Technologies, Santa Clara, USA

Program Empower

Ostatní

pH metr PHM 240, Radiometr Analytical SAS, Villeurbanne Cedex, Francie

Váhy Mettler AE 240, Greifensee, Švýcarsko

Zařízení Ultrapur pro přípravu ultra čisté vody deionizací, výrobce

Watrex®, Praha, Česká republika

SPE kolonka, silica C18, PerkinElmer, Massachusetts, USA

SPE kolonka, supra-poly HLB, PerkinElmer, Massachusetts, USA

Počítačový program Origin, verze 6.1

3.2 Použité chemikálie

Deionizovaná voda ze zařízení Ultrapur pro přípravu ultra čisté vody deionizací, Watrex®, Praha, Česká republika

Methanol Chromasolv® pro HPLC a acetonitril R Chromasolv® pro HPLC, Sigma-Aldrich®, Steinheim, Německo

Standardy: 2-chlorfenol, 3-chlorfenol a 2,6-dichlorfenol, $\leq 99\%$, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo

Standardy: 2,3-dichlorfenol, 2,4-dichlorfenol a 2,5-dichlorfenol, $\leq 99\%$, Sigma-Aldrich (Superlco), Steinheim, Německo

Standard: 4-chlorfenol, $\leq 99\%$, Honeywell Riedel-de Haën, Seelze, Německo

Triethylamin, kyselina octová, fenol, $\leq 99\%$, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo

3.3 Příprava vzorků

Vzorky jednotlivých chlorfenolů byly připraveny rozpuštěním naváženého množství látky v methanolu, přičemž požadovaná koncentrace výsledného roztoku byla 1 mg/ml. Vzorek vody byl odebrán z Bíliny a poté uchováván v lednici v tmavé láhvi naplněné po okraj. Před SPE prekoncentrací a analýzou byl vzorek přefiltrován.

3.4 Použité mobilní fáze

Tabulka 2 shrnuje složení použitých mobilních fází. Octan triethylamonný byl připraven přidáváním kyseliny octové do 0,1% roztoku triethylaminu pro dosažení požadované hodnoty pH.

Tabulka 2: Složení použitých mobilních fází

Složení fází č.	V _{ACN} [%]	V _{voda} [%]
1	80	20
2	60	40
3	40	60
4	30	70
5	20	80
	V _{ACN} [%]	V _{TEAA} [%] pH = 4,0
6	30	70
7	20	80
	V _{ACN} [%]	V _{TEAA} [%] pH = 6,0
8	30	70
	V _{ACN} [%]	V _{TEAA} [%] pH = 7,0
9	30	70

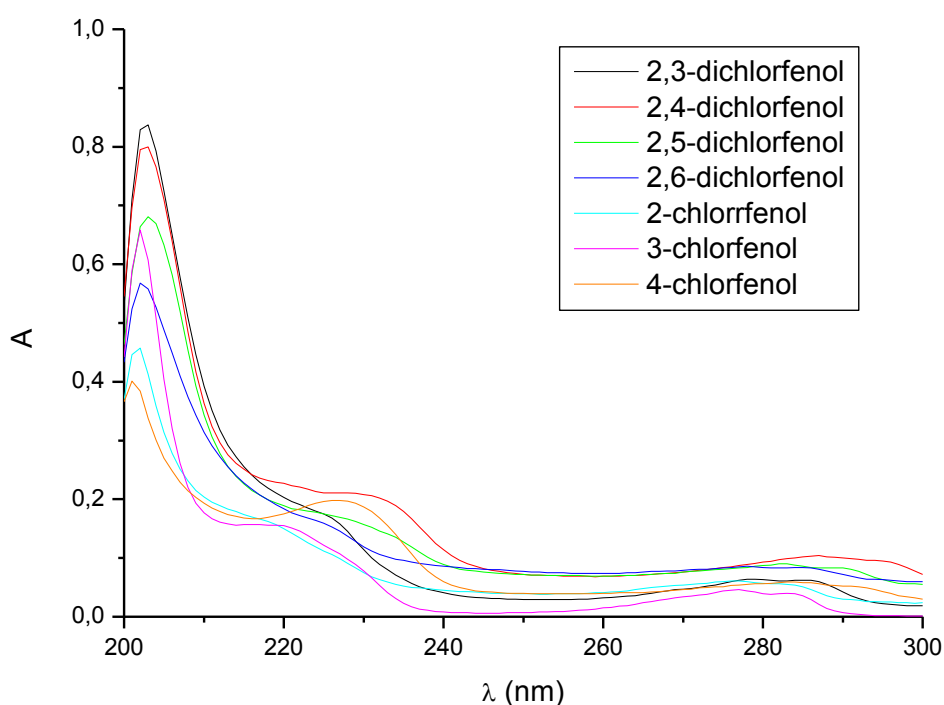
3.5 Podmínky separace

Separace chlorfenolů byla prováděna vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií v reversním módu. Kolona byla termostatována na 25 °C, teplota v karuselu byla nastavena na 20 °C, dávkovaný objem byl 5 µl. Kromě složení mobilní fáze byla měněna i průtoková rychlost, konkrétně byly provedeny analýzy při průtoku 1 ml/min a 1,5 ml/min. Detekce byla prováděna při vlnové délce 210 nm, 254 nm a 280 nm. Pro všechny analýzy byla zvolena isokratická eluce.

4 Výsledky a diskuze

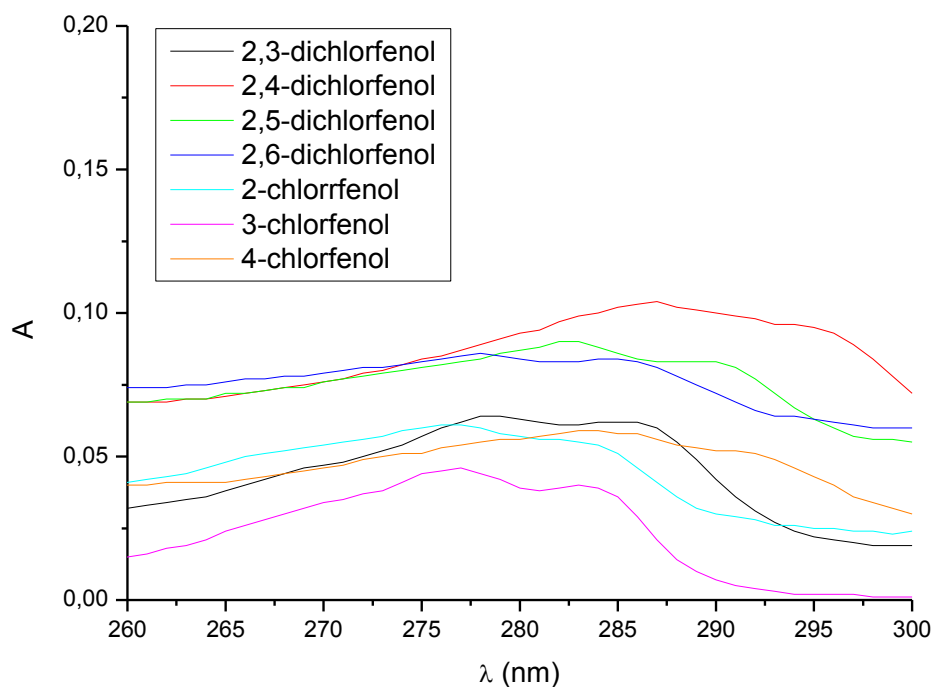
4.1 Výběr vlnové délky pro detekci

Před HPLC analýzou byla pozornost věnována optimalizaci vlnové délky pro spektrofotometrickou detekci. Jednotlivé roztoky byly proměřeny v oblasti spektra 200-300 nm za použití křemenných kyvet. Vzorky byly zředěny methanolem na koncentraci přibližně 3 $\mu\text{g/ml}$, aby se měřilo v oblasti platnosti Lambertova-Beerova zákona. Obrázek 7 ukazuje proměřená spektra všech 7 sledovaných isomerů chlorfenolů.



Obrázek 7: Spektra jednotlivých chlorfenolů

Ve shodě s literaturou se ukázalo lokální absorpční maximum v oblasti 280 nm, které se pro více chlorované deriváty posouvá k vyšším vlnovým délkám (obrázek 8). Pro následnou analýzu byly vybrány vlnové délky 210 a 280 nm. Některé analýzy byly provedeny i při 254 nm.

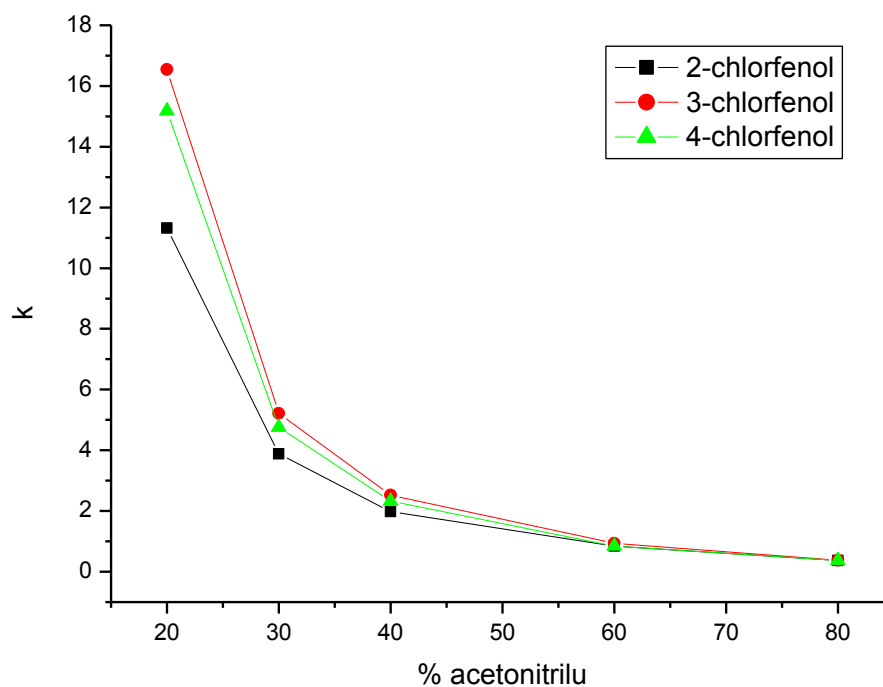


Obrázek 8: Lokální absorpční maximum v oblasti 280 nm

4.2 Optimalizace separace v acetonitrilu a vodě

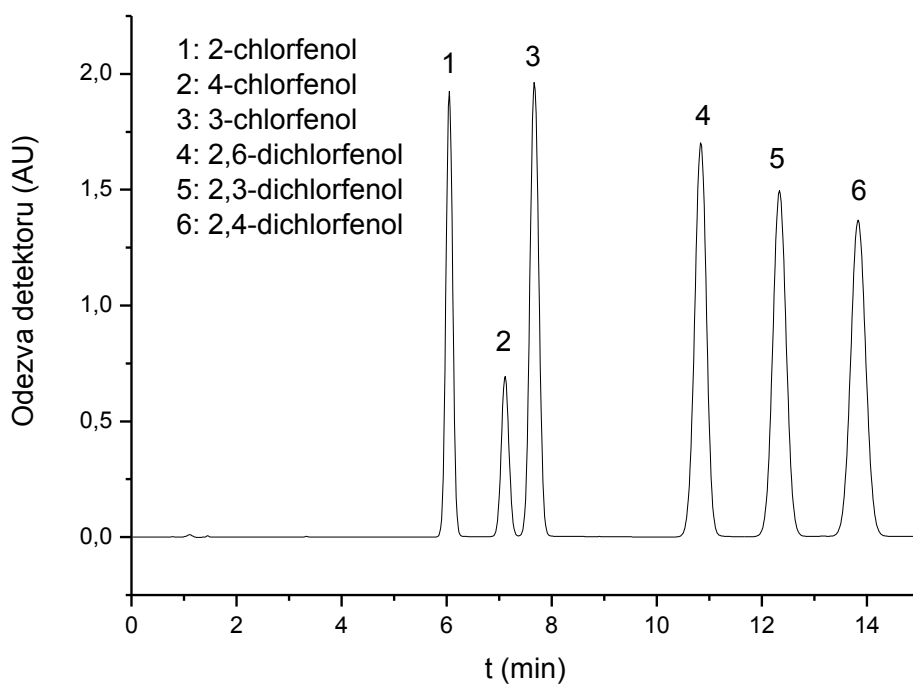
Podmínky separace byly optimalizovány nejprve pro směs monochlorfenolů a až následně byly přidány dichlorfenoly. 2,5-DCP byl do směsi přidán jako poslední, jelikož jeho obtížná separace od 2,4-DCP byla avizována v odborné literatuře³⁰.

Nejprve bylo provedeno měření při průtoku MP 1 ml/min. Množství acetonitrilu v mobilní fázi bylo postupně snižováno z původních 80 % na 20 %. Na obrázku 9 je ukázána závislost retenčního faktoru na složení mobilní fáze pro monochlorfenoly. Snižování podílu acetonitrilu prodloužilo analýzu, ale vedlo k úspěšné separaci.



Obrázek 9: Závislost retenčního faktoru monochlorfenolů na složení mobilní fáze ACN/H₂O; stacionární fáze Zorbax SB-C8

Složení mobilní fáze acetonitril-voda 30/70 (v/v) se ukázalo optimální pro separaci monochlorfenolů i dichlorfenolů (kromě 2,5-DCP). Průtok MP byl zvýšen na 1,5 ml/min. Čas analýzy se tím zkrátil o více než 7 minut, ale rozlišení se změnilo jen nepatrně (ve všech případech však bylo větší než 1,5). Při těchto podmínkách bylo úspěšně dosaženo separace 6 isomerů na základní linii (obrázek 10). Doba analýzy nepřesáhla 15 minut. Tabulky 3 a 4 shrnují optimalizované podmínky.



Obrázek 10: Separace 6 isomerů ($c = 1 \text{ mg/ml}$) za podmínek: složení mobilní fáze 30 % acetonitrilu a 70 % vody; průtok 1,5 ml; detekce při 210 nm

Tabulka 3: Optimalizované podmínky pro separaci 6 isomerů

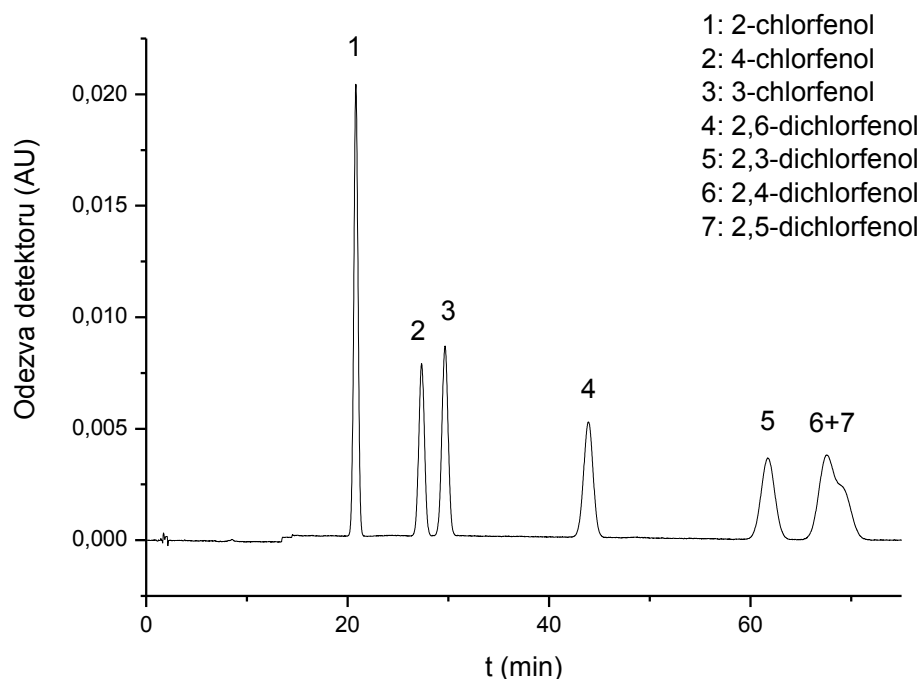
Složení mobilní fáze ACN/voda (v/v)	30/70
Průtok (ml/min)	1,5
Vlnová délka detekce (nm)	210 a 280
Dávkovaný objem vzorku (μl)	5
Teplota kolony ($^{\circ}\text{C}$)	25
Teplota v karuselu ($^{\circ}\text{C}$)	20

Tabulka 4: Hodnoty retenčního času t_R , retenčního faktoru k a rozlišení R_s

v optimalizovaných separačních podmínkách; mrtvý čas $t_M = 1,27 \text{ min}$

Látka	t_R (min)	k	R_s
2-CP	6,07	3,77	
4-CP	7,13	4,61	4,34
3-CP	7,69	5,05	2,02
2,6-DCP	10,76	7,46	8,27
2,3-DCP	12,34	8,70	3,43
2,4-DCP	13,84	9,88	3,03

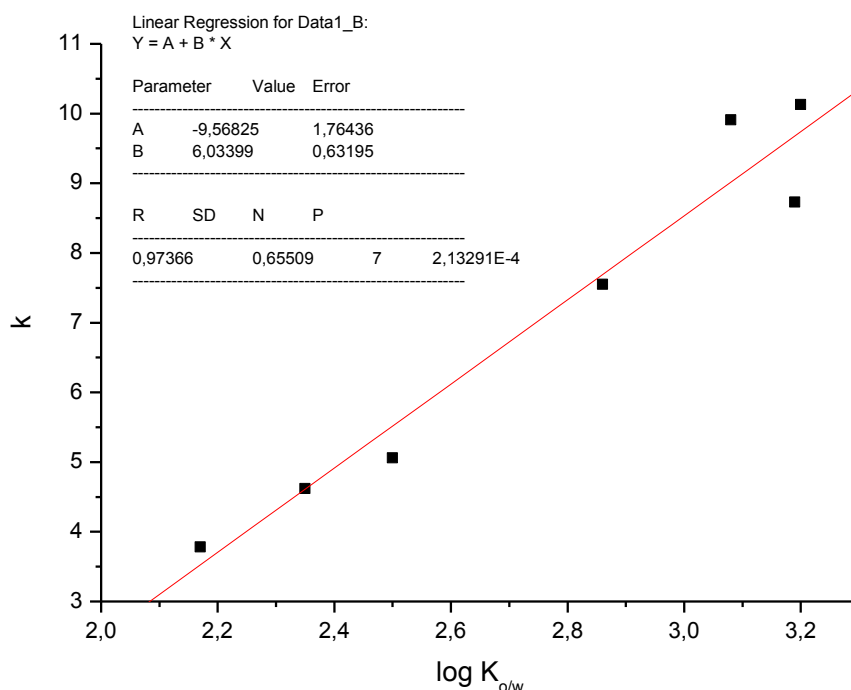
Při hledání optimálních separačních podmínek sedmi isomerů (včetně 2,5-DCP) byl průtok MP snížen opět na 1 ml/min z důvodu určitého zlepšení rozlišení píků. Složení mobilní fáze bylo upraveno na 20 % acetonitrilu a 80 % vody. Větší podíl vody podporuje prodloužení retenčních časů, což může zlepšit separaci. Ani za těchto podmínek však nedošlo k separaci 2,4-DCP od 2,5-DCP (obrázek 11). Další snížení množství acetonitrilu v MP by způsobilo přílišné prodloužení analýzy.



Obrázek 11: Separace 7 isomerů za podmínek: složení mobilní fáze 20 % acetonitrilu a 80 % vody; průtok 1 ml/min; detekce při 280 nm

Z naměřených dat byla sestrojena závislost retenčního faktoru na hydrofobicitě analytů (obrázek 12). Lineární závislost ukazuje, že se na retenci výrazně uplatňují hydrofobní interakce. Použitá kolona se silikagelem modifikovaným oktylem interaguje přednostně s nepolárními látkami. Může však docházet k interakci polárních skupin přímo se silikagelovým nosičem. Vzhledem k povaze chlorfenolů (mají polární i nepolární část) se v principu mohou uplatnit oba typy interakcí, prioritní je ale interakce nepolární části s oktylem. V důsledku toho se s rostoucí hydrofobitou obvykle zvyšuje i retence. Jako míra hydrofobicity byl zvolen rozdělovací koeficient oktanol-voda ($\log K_{o/w}$), jehož hodnoty se v literatuře mírně liší nebo jsou udávány v určitém rozmezí. Kvůli jiným interakcím a sterickým zábránám nemusí striktně platit, že látka s vyšší hodnotou $\log K_{o/w}$ má při analýze

v reverzním systému větší retenční faktor. Následující graf byl sestaven s využitím hodnot $\log K_{o/w}$ uvedených v této práci v tabulce 1.



Obrázek 12: Závislost retenčního faktoru na hydrofobicitě

Tabulka 5 shrnuje retenční časy sledovaných chlorfenolů při měřeních, kde byla mobilní fáze složená z acetonitrilu a vody.

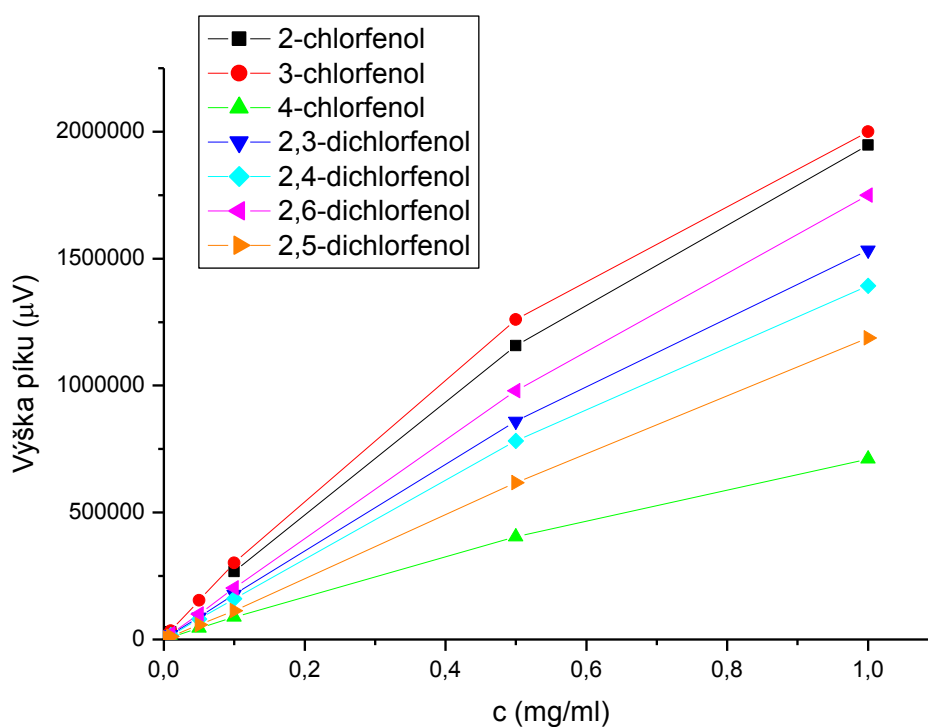
Tabulka 5: Retenční časy jednotlivých chlorfenolů při různém složení mobilní fáze

Průtok MP 1 ml/min	t_M (min)	t_R (min)						
		2-CP	4-CP	3-CP	2,6- DCP	2,3- DCP	2,4- DCP	2,5- DCP*
80A 20B	1,41	1,92	1,94	1,95	-	-	-	-
60A 40B	1,40	2,58	2,64	2,71	-	-	-	-
40A 60B	1,67	4,98	5,57	5,89	7,81	7,94	8,77	-
30A 70B	1,88	9,23	10,88	11,74	16,54	18,90	21,24	-
20A 80B	1,69	20,82	27,35	29,67	43,91	61,70	67,57	69,14
Průtok MP 1,5 ml/min								
30A70B	1,272	6,07	7,13	7,69	10,76	12,34	13,84	14,16

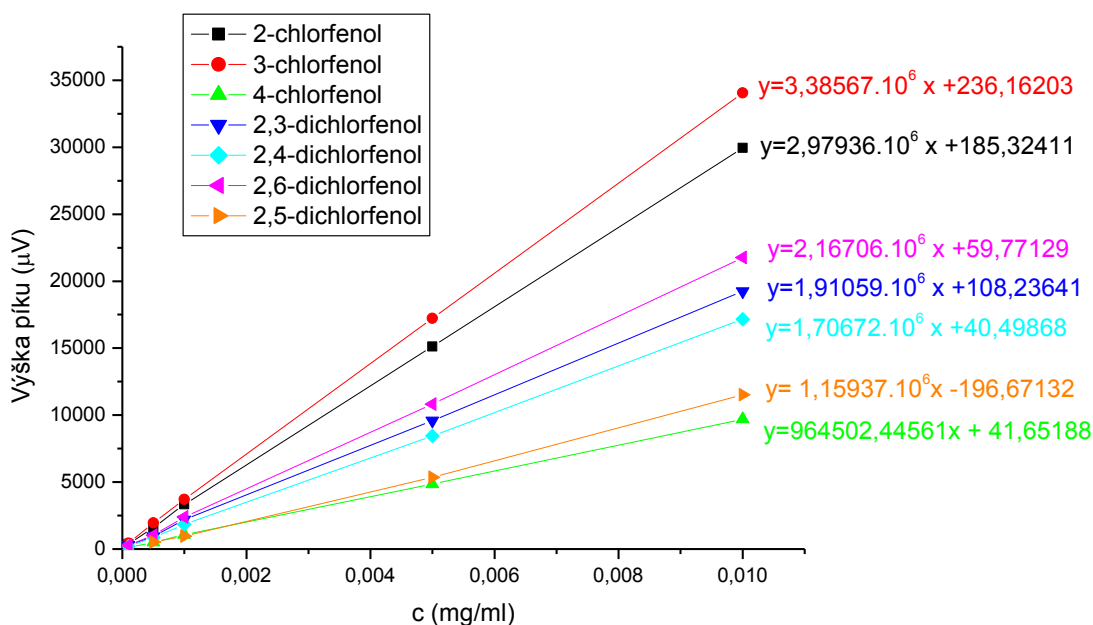
A: acetonitril; B: voda; 80A 20B = složení fází 80 % acetonitrilu a 20 % vody; *data nebyla získána z měření ve směsi

4.3 Limity detekce v optimalizovaných podmínkách

Po optimalizaci separačních podmínek byly stanoveny limity detekce (LOD) jednotlivých isomerů (tabulka 6). Byly sestrojeny kalibrační závislosti výšky píku na koncentraci při dvou vlnových délkách (210 nm a 280 nm). Bylo provedeno měření pro devět různých koncentrací v rozsahu od 1 µg/ml do 1 mg/ml. Z lineární části závislosti byla sestrojena kalibrační přímka, z jejíž rovnice byly vypočteny limity detekce. Za limit detekce se obecně považuje trojnásobná výška šumu, v našem případě 90 µV. Po dosažení této hodnoty do rovnice přímky byla získána minimální detekovatelná koncentrace. Obrázek 13 ukazuje kalibrační závislosti v celém rozsahu měřených koncentrací pro všech sedm isomerů při 210 nm. Na obrázku 14 je pouze lineární část těchto závislostí s příslušnými rovnicemi, ze kterých byl posléze LOD vypočítán. LOD pro 6 isomerů byl měřen ve směsi, 2,5-DCP byl měřen zvlášť.



Obrázek 13: Kalibrační závislosti při vlnové délce 210 nm pro celý rozsah měřených koncentrací



Obrázek 14: Lineární část kalibračních závislostí při vlnové délce 210 nm

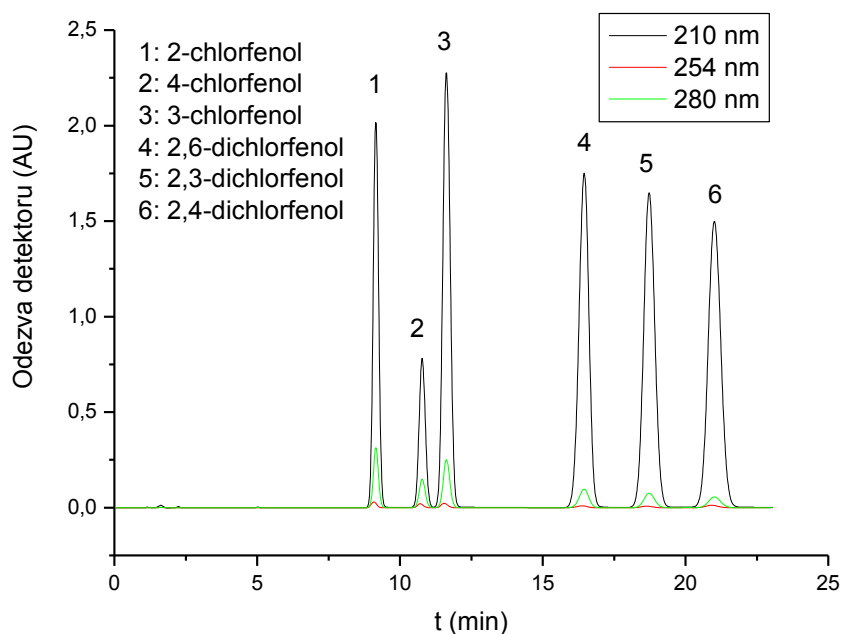
Tabulka 6: Naměřené limity detekce pro jednotlivé chlorfenoly

Chlorfenol	LOD při 210 nm (μg/ml)	LOD při 280 nm (μg/ml)
2-CP	$3,02 \cdot 10^{-2}$	0,162
3-CP	$2,66 \cdot 10^{-2}$	0,284
4-CP	$5,01 \cdot 10^{-2}$	0,418
2,3-DCP	$4,71 \cdot 10^{-2}$	0,970
2,4-DCP	$4,71 \cdot 10^{-2}$	1,53
2,5-DCP	$24,7 \cdot 10^{-2}$	2,71
2,6-DCP	$1,39 \cdot 10^{-2}$	0,806

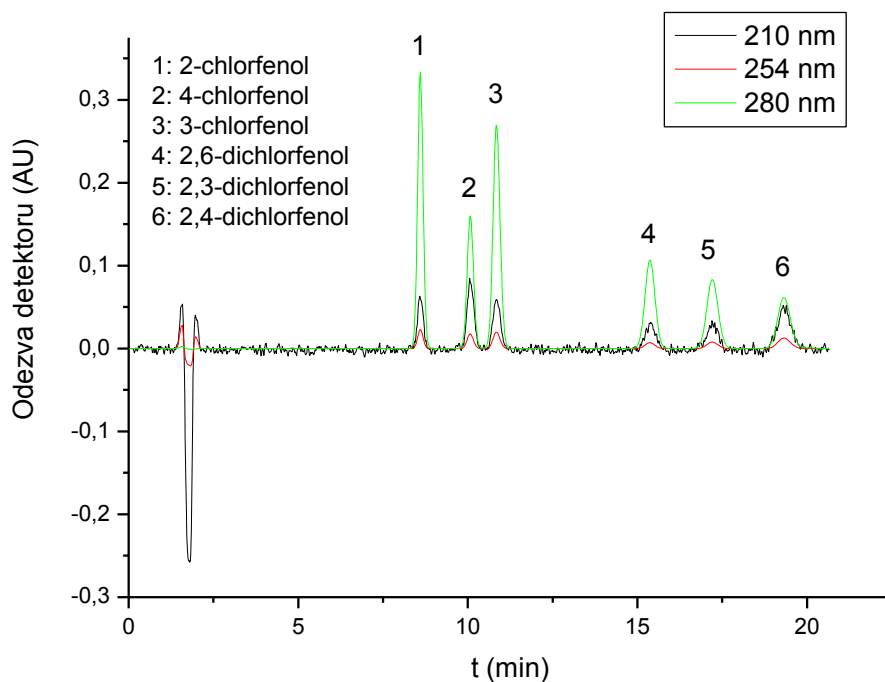
4.4 Vliv úpravy pH mobilní fáze na separaci

Dále byl zkoumán vliv pH vodné složky mobilní fáze na separaci 6 isomerů. Byly připraveny 3 roztoky 0,5% triethylaminu, jejichž pH bylo upraveno kyselinou octovou na hodnotu 4, 6 a 7. Roztoky s pH 4,0 a 6,0 vykazovaly vysokou pufrací kapacitu, na rozdíl od roztoku s pH 7,0. Zajímavé bylo sledovat nejen změnu retenčních časů, ale také změnu odezvy detektoru při různých vlnových délkách. Měření probíhalo při vlnových délkách 210 nm, 254 nm a 280 nm. Zatímco u mobilní fáze ACN-voda bylo nejvyšší odezvy dosaženo při 210 nm (chromatogram

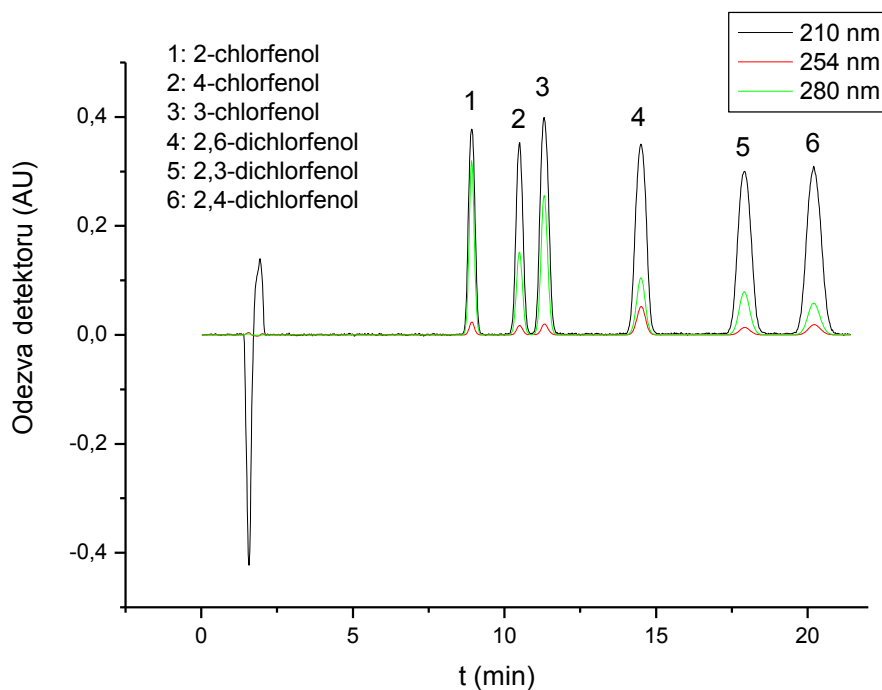
na obrázku 15), při složení ACN-pufr (pH = 4,0) byla nejvyšší odezva při 280 nm (obrázek 16). Odezva při vlnové délce 210 nm u MP ACN/H₂O byla přibližně 50x vyšší než u MP ACN/pufr. Navíc byla odezva každého chlorfenolu při nejvhodnější vlnové délce přibližně 10x nižší. Při použití pufru s pH = 6,0 se zásadně zvýšila odezva dichlorfenolů, která se stala srovnatelnou s monochlorfenoly (obrázek 17). V případě použití roztoku o pH = 7,0 došlo ke koeluci 2,6-DCP a 2,3-DCP (obrázek 18). Hodnota pKa 2,6-DCP je 7,15, tj. nejnižší ze všech sledovaných isomerů. Při pH kolem sedmi tak tento analyt na rozdíl od ostatních chlorfenolů ve směsi odštěpuje proton a stává se alespoň částečně nabitým, tvoří fenolát.



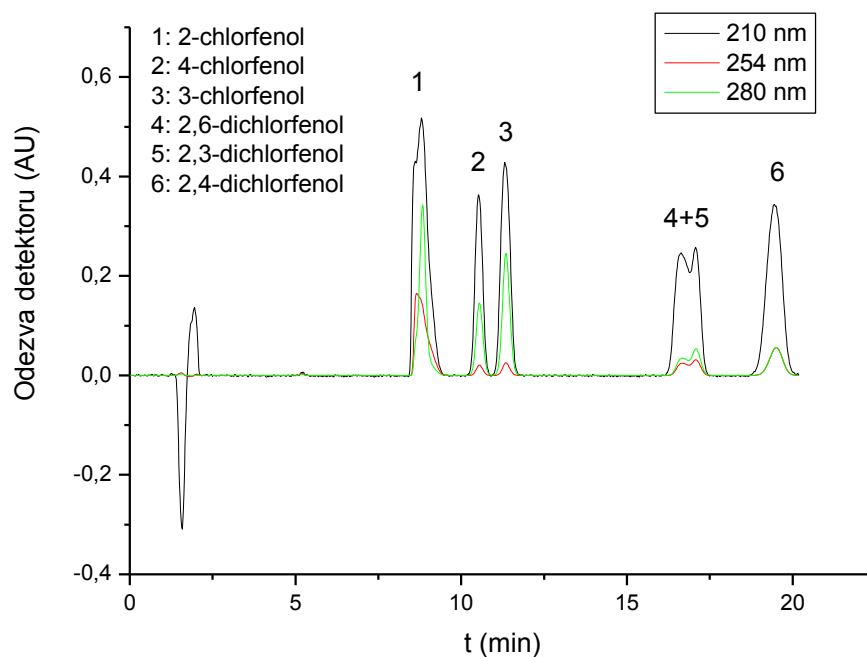
Obrázek 15: Chromatogram separace šesti chlorfenolů při použití mobilní fáze o složení ACN/H₂O 30/70 (v/v) pro tři vlnové délky detekce



Obrázek 16: Chromatogram separace šesti chlorfenolů při použití mobilní fáze o složení ACN/TEAA (pH = 4,0) 30/70 (v/v) pro tři vlnové délky detekce

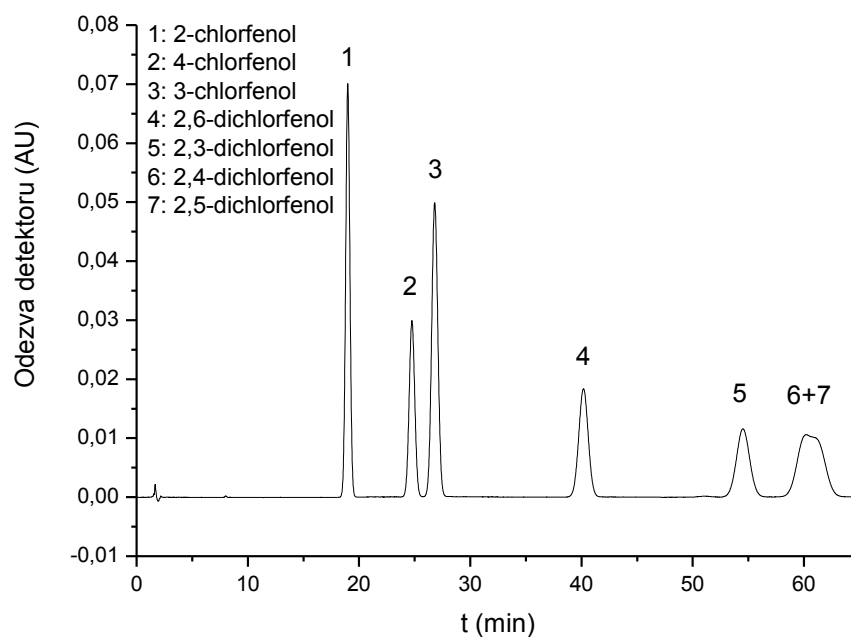


Obrázek 17: Chromatogram separace šesti chlorfenolů při použití mobilní fáze o složení ACN/TEAA (pH = 6,0) 30/70 (v/v) pro tři vlnové délky detekce



Obrázek 18: Chromatogram separace šesti chlorfenolů při použití mobilní fáze o složení ACN/TEAA (pH = 7,0) 30/70 (v/v) pro tři vlnové délky detekce

Při použití mobilní fáze složené z 20 % ACN a 80 % pufru o pH = 4,0 a při průtoku 1 ml/min byl do směsi přidán 2,5-DCP (obrázek 19). Jeho separace od 2,4-DCP nebyla ani v této MP úspěšná. Oproti MP z 20 % ACN a 80 % vody se čas analýzy o zhruba 10 minut zkrátil.



Obrázek 19: Chromatogram separace 7 isomerů za podmínek: složení mobilní fáze 20 % acetonitrilu a 80 % TEAA (pH = 4,0); průtok 1 ml/min; detekce při 280 nm

Tabulka 7 shrnuje retenční časy sledovaných chlorfenolů při měřeních, kde byla mobilní fáze složena z acetonitrilu a pufru.

Tabulka 7: Retenční časy jednotlivých isomerů při různém složení mobilní fáze

Průtok MP 1 ml/min	t_M (min)	t_R (min)						
		2-CP	4-CP	3-CP	2,6- DCP	2,3- DCP	2,4- DCP	2,5- DCP*
30A 70C	1,67	8,59	10,06	10,83	15,35	17,19	19,35	19,66
30A 70D	1,61	8,92	10,50	11,32	14,51	17,92	20,22	-
30A 70E	1,58	8,80	10,53	11,32	16,63	17,07	19,44	-
20A 80C	1,57	18,98	24,75	26,80	40,17	54,51	60,23	60,91

A: acetonitril; C: TEAA pH = 4,0; D: TEAA pH = 6,0; E: TEAA pH = 7,0; 30A 70C = složení fází 30 % acetonitrilu a 70 % TEAA o pH = 4; *data nebyla získána z měření ve směsi

4.5 Analýza vody z Bíliny

Vzorek vody byl odebrán v Ústí nad Labem v místě, kde do Bíliny přitéká Klíšský potok, který protéká areálem Spolchemie. Vzorek byl nejprve přefiltrován, aby byl zbaven pevných částic, a poté byla provedena extrakce tuhým sorbentem. K SPE byly použity dvě odlišné kolonky, dále označované jako SPE 1 a SPE 2. Jejich charakteristika je shrnuta v tabulce 8.

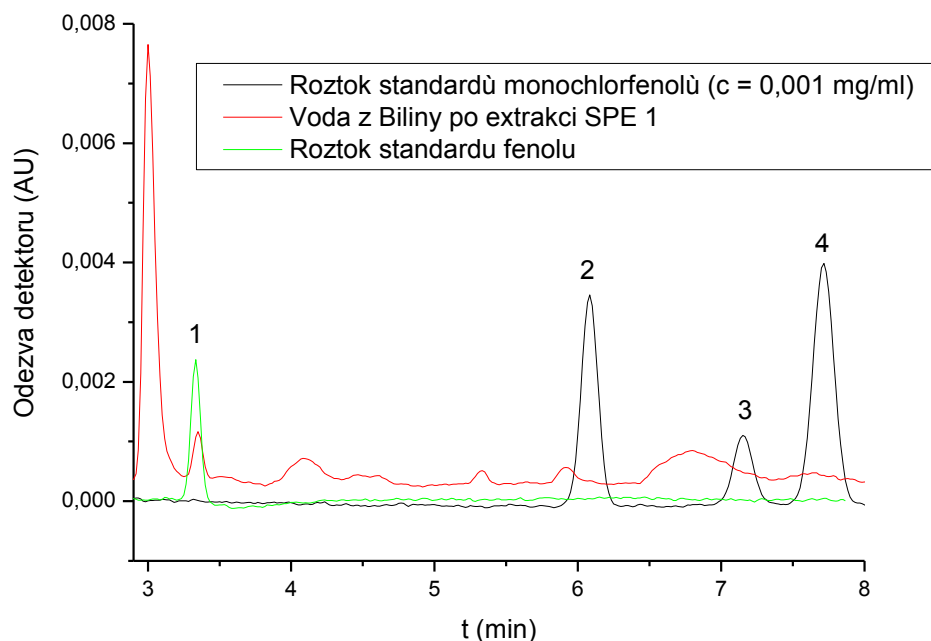
Tabulka 8: Charakteristika použitých extrakčních kolonek pro SPE

	SPE 1	SPE 2
Komerční název	Silica C18	Supra-poly HLB*
Materiál	Silikagel modifikovaný C18	Polymer
Velikost částic (μm)	50	50
End capping	Ano	Ne

*hydrofilic-lipofilic balance

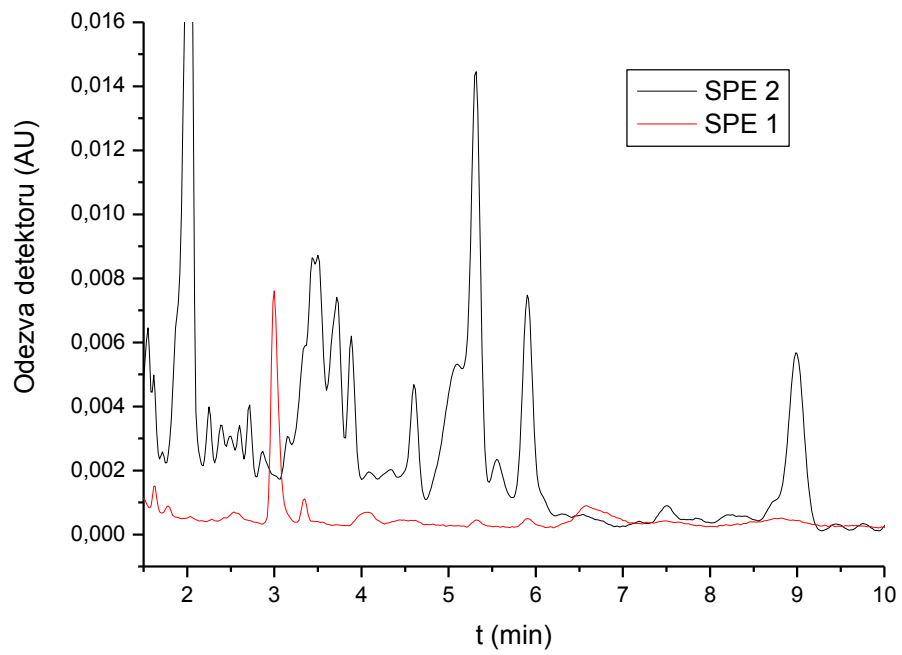
S každou SPE kolonkou byla provedena jedna extrakce. V obou případech prošlo 400 ml vody z Bíliny extrakční kolonkou a zachycené látky byly eluovány 0,5 ml methanolu. Vzorek vody byl tedy vždy 800x zkoncentrován. Na obrázku 20 je chromatogram vzorku vody získaný za optimalizovaných podmínek po extrakci a

zakoncentrování pomocí kolonky SPE 1. Chromatogram je porovnán se záznamem získaným analýzou roztoku standardů chlorfenolů ($c = 0,001 \text{ mg/ml}$) a se standardem fenolu, jehož analýza byla provedena na základě podezření, že jeden z píků eluujících před chlorfenoly by mohl být fenol. Dle retenčních časů by se skutečně mohlo jednat o fenol, ale bez MS detekce to nelze potvrdit. Z grafu 20 je zřejmé, že v Bílině se chlorfenoly nevyskytují, alespoň ne v množství, které by se dalo použitou metodou zjistit.



Obrázek 20: Porovnání analýzy vody z Bíliny s roztokem standardů chlorfenolů a fenolu; složení mobilní fáze 30 % ACN a 70 % vody; průtok MP 1,5 ml/min; detekce při 210 nm; 1: fenol; 2: 2-chlorfenol; 3: 4-chlorfenol; 4: 3-chlorfenol

V případě použití SPE 2 kolonky se extrakce vzhledem k většímu počtu píků a jejich větší odezvě zdála účinnější. Z obrázku 21 je vidět, že některé píky si odpovídají, na obě kolonky tedy mohly být zachyceny stejné látky. Ani v tomto případě ale nelze jednoznačně konstatovat, že se ve vodě z Bíliny nacházejí chlorfenoly.



Obrázek 21: Porovnání chromatogramů získaných za použití dvou různých extrakčních kolonek; separační podmínky byly shodné

5 Závěr

Byly nalezeny podmínky pro separaci směsi chlorfenolů (2-CP, 3-CP, 4-CP, 2,3-DCP, 2,4-DCP, 2,5-DCP a 2,6-DCP) metodou HPLC v reversním módu za použití kolony se silikagelem modifikovaným oktylem. Pro všechny analýzy byla zvolena isokratická eluce. Byl zkoumán vliv složení mobilní fáze na retenci analytů. Dále byly nalezeny limity detekce pro jednotlivé chlorfenoly. Na závěr byla provedena analýza reálného vzorku z řeky Bíliny s předchozím zkoncentrováním metodou SPE.

Optimalizovanými podmínkami pro separaci směsi výše uvedených isomerů (kromě 2,5-DCP) je složení mobilní fáze 30 % acetonitrilu a 70 % vody při průtoku 1,5 ml/min a spektrofotometrická detekce při vlnové délce 280 nm a 210 nm. Délka analýzy je 14,5 minuty. Limity detekce při vlnové délce 210 nm byly stanoveny řádově na desítky ng/ml, při vlnové délce 280 nm na stovky ng/ml.

Analýza vzorku vody z Bíliny ukázala rozdíly mezi výsledky extrakce dvěma různými extrakčními kolonkami. Výskyt chlorfenolů však nebyl potvrzen. Dodatečná analýza standardu fenolu ukázala na jeho možný výskyt. Bez MS detekce to ovšem nelze s jistotou potvrdit.

6 Použitá literatura

- (1) Vlkova, L.; Cirkva, V. *Chem. Listy* **2005**, *99* (2), 125.
- (2) Olaniran, A. O.; Igbinsola, E. O. *Chemosphere* **2011**, *83* (10), 1297.
- (3) Czaplicka, M. *Sci. Total Environ.* **2004**, *322* (1–3), 21.
- (4) Han, J.; Deming, R. L.; Tao, F.-M. *J. Phys. Chem. A* **2004**, *108* (38), 7736.
- (5) Kostrhounová, R.; Jančář, L.; Sommer, L. *Chem. Listy* **2003**, *97* (5), 269.
- (6) Igbinsola, E. O.; Odjadjare, E. E.; Chigor, V. N.; Igbinsola, I. H.; Emoghene, A. O.; Ekhaise, F. O.; Igiehon, N. O.; Idemudia, O. G. *Sci. World J.* **2013**, 460215.
- (7) *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky*. Dostupné z URL: <http://147.33.74.135/knihy/uid_isbn-80-7080-548-X/page-img/001.html> [Dostupné 18.2.2017]
- (8) Zheng, L.; Liu, Z.; Yan, Z.; Zhang, Y.; Yi, X.; Zhang, J.; Zheng, X.; Zhou, J.; Zhu, Y. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2017**, *135*, 216.
- (9) Kishino, T.; Kobayashi, K. *Water Res.* **1996**, *30* (2), 393.
- (10) Kishino, T.; Kobayashi, K. *Water Res.* **1995**, *29* (2), 431.
- (11) *ATSDR - Public Health Statement: Chlorophenols*. Dostupné z URL: <<https://www.atsdr.cdc.gov/phs/phs.asp?id=939&tid=195>> [Dostupné 18.2. 2017]
- (12) Haugland, R. A.; Schlemm, D. J.; Lyons, R. P.; Sferra, P. R.; Chakrabarty, A. M. *Appl. Environ. Microbiol.* **1990**, *56* (5), 1357.
- (13) Regueiro, J.; Becerril, E.; Garcia-Jares, C.; Llompert, M. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216* (23), 4693.
- (14) Hoekstra, E. J.; de Weerd, H.; de Leer, E. W. B.; Brinkman, U. A. T. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33* (15), 2543.
- (15) Eisner, T.; Hendry, L. B.; Peakall, D. B.; Meinwald, J. *Science* **1971**, *172* (3980), 277.
- (16) Janda, V.; Svecova, M. *Chem. Listy* **2000**, *94* (10), 905.
- (17) Janda, V.; Pech, P.; Pechová, M. *Kvas. Prům.* **2004**, *50* (11–12), 335.
- (18) Schmid, P.; Bogdal, C.; Wang, Z.; Azara, V.; Haag, R.; von Arx, U. *Chemosphere* **2014**, *114*, 158.
- (19) Cravero, M. C.; Bonello, F.; Pazo Alvarez, M. del C.; Tsolakis, C.; Borsa, D. *J. Inst. Brew.* **2015**, *121* (3), 411.
- (20) Wittsiepe, J.; Kullmann, Y.; Schrey, P.; Selenka, F.; Wilhelm, M. *Chemosphere* **2000**, *40* (9–11), 963.
- (21) Peng, Y.; Chen, J.; Lu, S.; Huang, J.; Zhang, M.; Buekens, A.; Li, X.; Yan, J. *Chem. Eng. J.* **2016**, *292*, 398.
- (22) Arora, P. K.; Bae, H. *Microb. Cell Factories* **2014**, *13*, 31.
- (23) Lin, S. H.; Pan, C. L.; Leu, H. G. *Chem. Eng. J.* **2002**, *87* (2), 163.
- (24) Gernatova, M.; Janderka, P. *Chem. Listy* **2006**, *100* (10), 877.
- (25) Narang, A. S.; Swami, K.; Narang, R. S.; Eadon, G. A. *Chemosphere* **1991**, *22* (11), 1029.

- (26) Pera-Titus, M.; Garcia-Molina, V.; Banos, M. A.; Gimenez, J.; Esplugas, S. *Appl. Catal. B-Environ.* **2004**, *47* (4), 219.
- (27) Czaplicka, M. *J. Hazard. Mater.* **2006**, *134* (1–3), 45.
- (28) Musa, A. Y.; Ba-Abbad, M. M.; Kadhum, A. A. H.; Mohamad, A. B. *Res. Chem. Intermed.* **2012**, *38* (3–5), 995.
- (29) Annachhatre, A. P.; Gheewala, S. H. *Biotechnol. Adv.* **1996**, *14* (1), 35.
- (30) Korba, T.; Popl, M. *Chem. Listy* **1993**, *87* (5), 332.
- (31) de Moraes, P.; Stoichev, T.; Basto, M. C. P.; Vasconcelos, M. T. S. D. *Talanta* **2012**, *89*, 1.
- (32) Kostrhounova, R.; Hrdlicka, A.; Sommer, L. *Chem. Listy* **2004**, *98* (1), 33.
- (33) Sursyakova, V. V.; Burmakina, G. V.; Rubaylo, A. I. *J. Anal. Chem.* **2015**, *70* (1), 98.
- (34) Jursikova, K.; Janda, V. *Feedback* **1997**, *91*.
- (35) Andrade-Eiroa, A.; Canle, M.; Leroy-Cancellieri, V.; Cerdà, V. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, *80*, 655.
- (36) Piri-Moghadam, H.; Ahmadi, F.; Pawliszyn, J. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2016**, *85*, Part A, 133.
- (37) Magasumova, A. T.; Khatmullina, R. M.; Safarova, V. I.; Kitaeva, I. M.; Kudasheva, F. K. *J. Anal. Chem.* **2014**, *69* (3), 237.
- (38) Ben Hassine, S.; Hammami, B.; Touil, S.; Driss, M. R. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2015**, *95* (5), 654.
- (39) Tesařová, E.; Pacáková, V. *Chromatographia* **1983**, *17* (5), 269.
- (40) Makuch, B.; Gazda, K.; Kamiński, M. *Anal. Chim. Acta* **1993**, *284* (1), 53.
- (41) Aktas, A.; Calik, A. *ASIAN J. Chem.* **2013**, *25* (15), 8339.
- (42) Cledera-Castro, M.; Santos-Montes, A.; Izquierdo-Hornillos, R.; Gonzalo-Lumbreras, R. *J. Sep. Sci.* **2007**, *30* (5), 699.
- (43) Araki, T.; Chiba, M.; Tsunoi, S.; Tanaka, M. *Anal. Sci.* **2000**, *16* (4), 421.