

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie životního prostředí



**Tereza Jíšová**

**CHLORFENOLY V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ**

Chlorophenols in the environment

Bakalářská práce

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

Konzultant: Dr. Sándor T. Forczek, Ph.D.

Praha 2015

### **Prohlášení**

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

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**

Na tomto místě bych chtěla velmi poděkovat mému konzultantovi Dr. Sándorovi T. Forczekovi, Ph.D, z Ústavu experimentální botaniky AV ČR, za jeho vedení, pomoc a odborné rady.

Dále bych chtěla poděkovat svým rodičům za velkou podporu psychickou i materiální během celého studia.

## **Abstrakt**

Chlorfenoly patří mezi významné polutanty životního prostředí a jsou charakteristické svou výraznou toxicitou, stálostí a bioakumulací. Pro své baktericidní a fungicidní účinky mají rozmanité použití. Snadno vznikají během chloračního procesu a způsobují tak senzorické závady v pitné vodě. Představují vážné nebezpečí pro zdraví.

Chlorfenoly pocházející z přírodní činnosti se v přírodě vyskytují v minoritním množství.

Přítomnost chlorfenolů ve vodních vzorcích se stanovuje pomocí rozličných analytických metod. V této práci je kladen důraz na stanovení pomocí plynové chromatografie. Modelové stanovení bylo provedeno pro 2-chlorfenol a 4-chlorfenol pomocí derivatizace a následné extrakce s koncovou analýzou plynové chromatografie s detektorem elektronového záchytu. Mez detekce pro 2-chlorfenol byla 2,47 µg/l pro 4-chlorfenol 3,14 µg/l.

### **Klíčová slova:**

Chlorfenoly, stanovení chlorfenolů, degradace, toxicita

**Abstract**

Chlorophenols belong to major environmental pollutants and are characterized by their considerable toxicity, persistence and bioaccumulation. For their bactericidal and fungicidal properties have multiple uses. They are readily formed during water chlorination process and cause sensoric defects of drinking water. Thus they are posing a serious health hazard. Chlorophenols also occur in nature in minor amounts due to natural activity.

The presence of chlorophenols in water samples is determined by various analytical methods. In this work, emphasis is placed on their determination by gas chromatography. The model assay was performed for 2-chlorophenol and 4-chlorophenol using derivatization and subsequent extraction with a final analysis by gas chromatography with electron capture detection. The limit of detection for 2-chlorophenol was 2.47  $\mu\text{g/l}$  for 4-chlorophenol 3.14  $\mu\text{g/l}$ .

**Key words:**

Chlorophenols, determination chlorophenols, degradation, toxicity

### Seznam použitých zkratk

2-CP	2-chlorfenol
4-CP	4-chlorfenol
CP	Chlorfenoly
DI-SPME	Přímá mikroextrakce tuhou fází
DLLME	Disperzní mikroextrakce typu kapalina – kapalina
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
GC	Plynový chromatograf
GC-ECD	Plynový chromatograf s detektorem elektronového záchytu
GC-MS	Plynový chromatograf s hmotnostním detektorem
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie
IC	Inhibiční koncentrace
LLE	Extrakce kapalina-kapalina
PA	Polyakrylát
PCB	Polychlorované bifenyly
PCDD	Polychlorované dibenzodioxiny
PCDF	Polychlorované dibenzofurany
PDMS	Polydimethylsiloxan
SME	Mikroextrakce rozpouštědlem
SPE	Extrakce pevným sorbentem
SPME	Mikroextrakce tuhou fází
UV	Ultrafialové záření

## Obsah

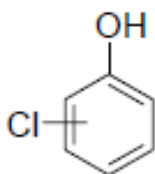
1.	Teoretický úvod.....	8
1.1.	Fyzikálně chemické vlastnosti chlorfenolů.....	8
1.2.	Toxikologické vlastnosti .....	10
1.3.	Účinky na lidské zdraví.....	11
1.4.	Původ chlorfenolů v životním prostředí.....	12
1.5.	Vznik chlorfenolů během čištění vody.....	13
1.6.	Výskyt chlorfenolů v životním prostředí .....	14
1.6.1.	Voda .....	14
1.6.2.	Půda .....	14
1.6.3.	Kontaminace čistírenských kalů chlorfenoly .....	14
1.7.	Biogenní chlorfenoly.....	15
1.7.1.	Hmyz .....	15
1.7.2.	Člověk.....	15
1.8.	Analytické metody k detekci a stanovení chlorfenolů se zvláštním důrazem na plynovou chromatografii .....	16
1.9.	Degradace a odstraňování chlorfenolů.....	18
1.9.1.	Fyzikální metody .....	18
1.9.2.	Chemické metody .....	18
1.9.3.	Elektrochemické zpracování a $\gamma$ -ozářování.....	19
1.9.4.	Fotochemické zpracování .....	20
1.9.5.	Mikrobiální degradace .....	20
2.	Cíle práce.....	21
3.	Materiály a metody.....	22
3.1.	Použité chemikálie, standardy.....	22
3.2.	Metody .....	22
3.2.1.	Plynová chromatografie.....	22
3.2.2.	Detektor elektronového záchytu .....	23
3.2.3.	Automatické vzorkování.....	23
3.3.	Extrakční techniky.....	24
3.3.1.	Extrakce kapalina-kapalina.....	24
3.3.2.	Mikroextrakce tuhou fází (SPME) .....	24
3.4.	Derivatizace.....	25
3.5.	Příprava standardů 2-CP a 4-CP a stanovení metodou SPME-GC-ECD.....	25
3.5.1.	Použití vlákna PDMS 100 $\mu$ m .....	26
3.5.2.	Použití vlákna PA 85 $\mu$ m s okyselením.....	26
3.6.	Stanovení 2-CP a 4-CP GC-ECD s využitím přímého nástřiku.....	26
3.7.	Stanovení 2-CP a 4-CP GC-ECD s předchozí acetylací a LLE .....	27
3.7.1.	Postup acetylace a extrakce .....	27
4.	Výsledky a diskuze.....	28
4.1.	Stanovení 2-CP a 4-CP metodou SPME-GC-ECD.....	28
4.2.	Stanovení 2-CP a 4-CP GC-ECD s využitím přímého nástřiku.....	28
4.3.	Stanovení 2-CP a 4-CP GC-ECD s předchozí acetylací a extrakcí LLE .....	28
5.	Závěr.....	31
6.	Použitá literatura .....	32
7.	Seznam příloh.....	35

## 1. Teoretický úvod

Teoretická část této práce shrnuje informace o vlastnostech chlorfenolů, jejich použití, výskytu v životním prostředí a účincích na lidské zdraví. Jsou popsány metody pro stanovení těchto látek s důrazem na chromatografické stanovení. Poslední kapitola pojednává o možných způsobech odstranění chlorfenolů z životního prostředí.

### 1.1. Fyzikálně chemické vlastnosti chlorfenolů

Chlorfenoly (CP) jsou sloučeniny, které mají na aromatickém jádře vázanou reaktivní hydroxylovou skupinu a zbývající polohy jsou substituovány jedním až pěti atomy chloru (obrázek 1). Může tak vznikat až 19 isomerů, od monochlorfenol až po plně chlorovaný pentachlorfenol, rozdílnými fyzikálními a chemickými vlastnostmi. Zásadní roli má zde poloha atomu chloru vzhledem k hydroxylové skupině<sup>1,2</sup>.



**Obrázek 1** Strukturní vzorec chlorfenolů<sup>3</sup>

. Za normálních podmínek jsou chlorfenoly krystalické látky, mající bod varu nad 200°C a bod tání mezi 33 až 191°C. Výjimkou je kapalný 2-chlorfenol s bodem varu 175°C a bodem tání při 9°C<sup>1-4</sup>.

Obecně platí, že s rostoucím počtem atomů chloru se snižuje rozpustnost chlorfenolů ve vodě, naopak jejich rozpustnost v organických rozpouštědlech je výrazně vyšší (dáno hydrofobním charakterem). Fyzikální a chemické vlastnosti vybraných chlorfenolů jsou uvedeny v tabulce 1.

Osud a transport chemické sloučeniny v přirozeném prostředí striktně závisí na hodnotě disociační konstanty ( $K_a$ ) a rozdělovacím koeficientu ( $K_{ow}$ ) v prostředí oktanol-voda. Disociační konstanta závisí na struktuře sloučeniny, mimo jiné na počtu atomů chloru v molekule. V případě chlorfenolů disociační konstanta obecně vzrůstá s počtem atomů chloru v molekule. Z hlediska disociace se jedná o slabé kyseliny, stupeň disociace roste se zvyšujícím se počtem atomů chloru. Tyto vlastnosti jsou také zodpovědné za snížení sorpce na sedimenty a snížení bioakumulace při hodnotách pH nad hodnotami  $pK_a$ <sup>1-4</sup>.



**Tabulka 1** Vybrané vlastnosti devatenácti kongenerů chlorfenolů <sup>3</sup>

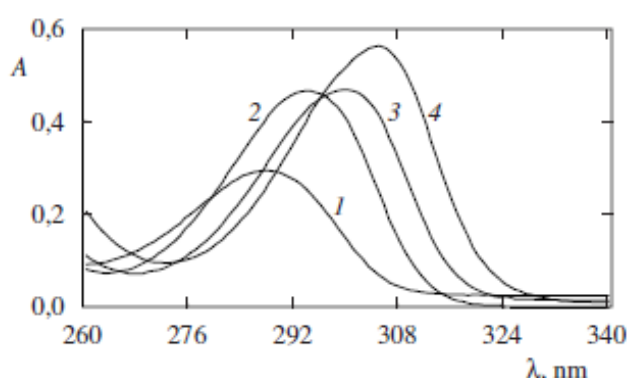
Chlorovaný fenol	Bod varu °C	Bod tání °C	Rozpustnost g/l	pKa	Log $K_{o/w}$ (25°C)	IC <sub>50</sub> (20°C) mg/l
PCP	309-310	173-174	0,018	4,74	5,12	0,76
2,3,4,5-tetraCP	275	116-117	0,166	5,64	4,69	1,76
2,3,4,6-tetraCP	275	69-70	0,166	5,22	4,45	2,70
2,3,5,6-tetraCP	275	114-115	0,100	5,03	4,90	2,27
2,3,4-triCP	257	79-81	0,915	7,34	4,07	2,24
2,3,5-triCP	253-254	61-62	0,771	6,92	4,21	2,28
2,3,6-triCP	257	57-58	0,591	6,10	3,88	7,38
2,4,5-triCP	252-253	68-70	0,649	7,20	3,72	2,08
2,4,6-triCP	245-246	69-70	0,708	6,51	3,69	5,47
3,4,5-triCP	276-277	100-101	-	7,57	4,39	0,88
2,3-diCP	206	58-60	8,215	8,52	3,19	5,19
2,4-diCP	209-210	42-43	5,547	8,51	3,08	2,68
2,5-diCP	210-211	55-57	-	7,69	3,20	4,50
2,6-diCP	219-220	65-68	2,625	7,15	2,86	9,38
3,4-diCP	253-254	66-68	9,256	8,87	3,37	2,77
3,5-diCP	232-233	67-69	7,394	8,54	3,52	2,09
2-monoCP	174-175	8.10	23,256	9,13	2,17	17,95
3-monoCP	213-214	33-34	22,190	9,53	2,50	15,78
4-monoCP	219-220	43-44	26,390	9,70	2,35	8,07

pKa - disociační konstanta,  $K_{ow}$  - rozdělovací koeficient v prostředí oktanol-voda, IC<sub>50</sub> -inhibiční koncentrace- koncentrace, při které dochází k zamezení růstu 50 % sledovaných jedinců *Daphnia magna*

Distribuce molekul mezi lipidní a vodnou fází je také důležitým aspektem pro jejich akumulaci v životním prostředí. Tuto vlastnost charakterizuje rozdělovací koeficient oktanol/voda  $K_{o/w}$ , který modeluje chování a transport organických látek v životním prostředí. Pro chlorfenoly platí, že rozdělovací koeficient se zvyšuje s počtem atomů chloru ve sloučenině. Z 19 kongenerů má tedy nejvyšší hodnotu  $K_{o/w}$  pentachlorfenol. Z termodynamického hlediska je pak tento koeficient definován jako poměr molární

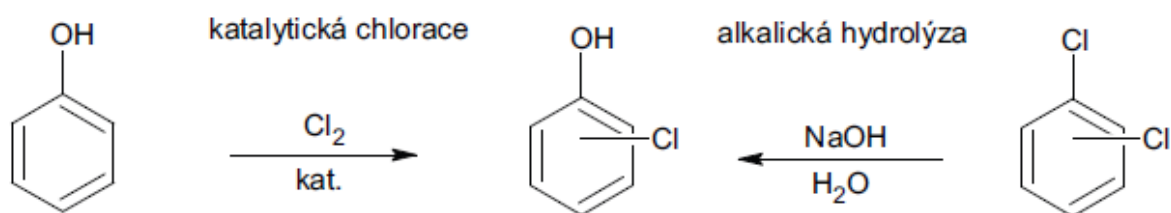
koncentrace látky v oktanolu nasyceném vodou  $c_s^o$  k molární koncentraci látky ve vodě nasycené oktanoem  $c_s^w$  za rovnovážných podmínek, tj.  $K_{o/w} = c_s^o / c_s^w$ . Rozpustnost chlorfenolů ve vodě je sice nízká, ale sodné a draselné soli vykazují o až čtyři řády vyšší rozpustnost než původní sloučeniny<sup>1-4</sup>.

Chlorfenoly podobně jako jiné aromatické polutanty vykazují v alkalickém prostředí výraznou absorpci v UV oblasti, která je vhodná pro jejich rychlé spektrofotometrické stanovení. S rostoucím počtem atomů chloru v molekule se absorpční maximum ve spektru posouvá k delším vlnovým délkám do oblasti 280-320 nm a vzrůstá hodnota molárního absorpčního koeficientu, jak je ilustrováno na obrázku 2<sup>5</sup>.



**Obrázek 2** Absorpční spektra fenolu, 2-CP, 2,6-diCP a 2,3,6-triCP-spektra jednotlivých komponent v prostředí NaOH (1 M) a EDTA (1 mM), koncentrace fenolů 100 $\mu$ M, **1**-fenol, **2**-2-CP, **3**- 2,6-diCP, **4**-2,3,6-triCP<sup>5</sup>

Průmyslová syntéza chlorfenolů je založena na dvou základních postupech, a to na katalytické chloraci fenolu nebo na alkalické hydrolyze odpovídajících chlorbenzenů<sup>3</sup>.



**Obrázek 3** Průmyslová výroba chlorovaných fenolů<sup>3</sup>

## 1.2. Toxikologické vlastnosti

Chlorfenoly jsou charakteristické pronikavým a štiplavým zápachem, jsou nehořlavé, obtížně biodegradovatelné. Při vyšších teplotách se rozkládají na oxid uhličitý, oxid uhelnatý a chlorovodík. Dráždí silně sliznice, oči a velmi dobře se vstřebávají kůží

(především 2-CP, 4-CP, 2,4-diCP a 2,4,6-triCP). Všeobecně lze říci, že chlorfenoly jsou imunotoxické, fytotoxické, embryotoxické, ale určitě nejsou neurotoxické a teratogenní. Mutagenní a karcinogenní účinky doposud nebyly prokázány<sup>1-3,6</sup>.

Toxicita chlorfenolů spočívá v jejich schopnosti rozpojit v dýchacím řetězci oxidační fosforylaci a ukončit tak přeměnu ADP na ATP (adenosindifosfát na adenosintrifosfát). Síla inhibičního účinku souvisí se stupněm chlorace, nejsilnější inhibitor oxidační fosforylace je pentachlorfenol, nejslabší monochlorfenol. Takto mohou být ovlivněny všechny aerobní eukaryontní formy života<sup>3,7</sup>.

Toxicita chlorfenolů závisí na stupni chlorace a poloze atomů chloru vzhledem k hydroxylové skupině. Zjednodušeně platí, že s rostoucím stupněm chlorace se zvyšuje toxicita chlorfenolů a to především vlivem jejich lepší rozpustnosti v tucích. V tabulce 1 jsou uvedeny hodnoty inhibičních koncentrací pro jednotlivé CP. Pod pojmem inhibiční koncentrace rozumíme takovou koncentraci, při které dochází k zamezení růstu 50 % sledovaných jedinců ( $IC_{50}$ ). Nejtoxikčtějším z daných kongenerů je pentachlorfenol  $IC_{50}=0,76$  mg/l pro sledovaný druh *Daphnia magna*<sup>1-4</sup>.

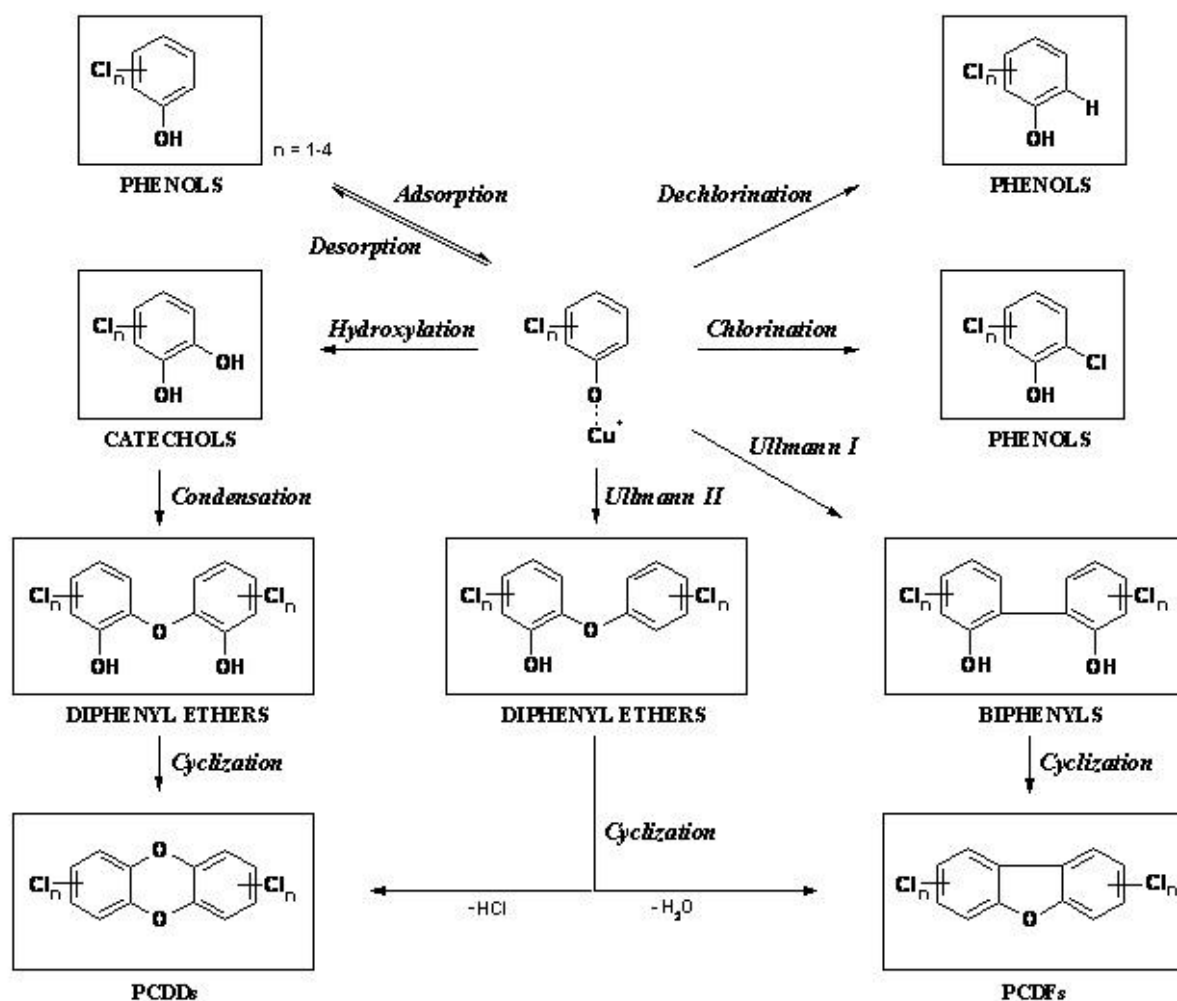
Účinnost mikrobiálního odbourávání CP ovlivňuje poloha chlorových atomů na aromatickém jádru tak, že v poloze meta substituované sloučeniny (3-CP a 3,5-diCP) jsou více rezistentní k mikrobiální degradaci, než sloučeniny substituované v poloze ortho (2-CP a 2,6-diCP). Uvedené sloučeniny jsou méně toxické především vzhledem k přítomné vodíkové vazbě a stínění hydroxidové skupiny chlorem. Také platí, že v jakékoli izomerní skupině kongenerů jsou toxikčtějši ty, které mají chlor v poloze para, jako např. 4-CP<sup>1-4</sup>.

### 1.3. Účinky na lidské zdraví

Vliv látek na lidské zdraví závisí na mnoha faktorech, jakými je exponovaná dávka, doba vystavení látky, aktuální stav jedince a interakce exponované látky s dalšími látkami v těle přítomnými<sup>4</sup>.

Je několik cest, jak se mohou chlorfenoly dostat do lidského organismu. Možné expozice jsou inhalací, požitím, očním nebo kožním kontaktem. Počet atomů chloru v molekule ovlivňuje příznaky intoxikace: okamžitá vystavení nižším chlorovaným chlorfenolům (jeden nebo dva chlory v molekule) způsobuje křeče, zatímco vyšší chlorované fenoly způsobují zastavení oxidační fosforylace. Dlouhodobá expozice způsobuje popáleniny kůže a očí, slabost, bolesti hlavy, závratě, poškození plic, jater a ledvin, smrt od srdeční nebo plicní selhání<sup>1-4</sup>.

Chlorfenoly působí na člověka toxicky i sensoricky. Toxické působení je spojováno především s pentachlorfenolem, zvláště pak ve spojitosti s výskytem polychlorovaných dibenzodioxinů a dibenzofuranů (PCDD/F)<sup>8</sup>.



**Obrázek 4** Prekurzorová syntéza vzniku PCDD/F z chlorfenolů<sup>9</sup>

Senzorické působení se týká především níže chlorovaných chlorfenolů. Jejich koncentrace již na úrovni několika jednotek  $\mu\text{g/l}$  v pitné vodě jí dává charakteristický zápach a příchut'.

Abychom si udělali hrubou představu o tom, jaké koncentrace chlorfenolů ve vodě je zapotřebí analyzovat, můžeme se řídit podle limitních hodnot určených pro pitnou vodu. Například Světová zdravotnická organizace doporučuje pro pentachlorfenol limitní hodnotu  $9 \mu\text{g/l}$ <sup>8</sup>.

#### 1.4. Původ chlorfenolů v životním prostředí

Chlorfenoly jsou rozšířeny ve všech sférách životního prostředí vlivem jejich velké stálosti a vysoké bioakumulace. Jsou přítomny v mnoha ekosystémech povrchových i

podzemních vod, sedimentech, ve vzduchu i půdě. Do životního prostředí se dostávají převážně antropogenní činností. Přítomnost chlorfenolů v prostředí je dána jejich širokým použitím v mnoha oblastech průmyslu i zemědělství. Hlavními zdroji CP jsou jednak ochranné prostředky užívané zejména v zemědělství (pesticidy, herbicidy, fungicidy, algicidy, insekticidy, ovicidy, baktericidy a moluskocidy), dále pak odpadní produkty chemického, dřevařského a papírenského průmyslu.

Do životního prostředí se mohou chlorované fenoly dostávat buď přímou aplikací insekticidů a fungicidů na bázi pentachlorofenolu nebo jako degradační produkty vznikající metabolickým rozkladem chlorovaných pesticidů obsahujících ve své molekule substituované fenoly (chlorfenoxyalkanové kyseliny a nitrofenoly), odbouráváním herbicidů (diuron, chloroxuron na bázi močoviny) a přeměnou organofosfátů, chlorovaných benzenů a nitrobenzenů.

Tvorba chlorfenolů nastává i ve vodárnách a stanicích při úpravě vod chlorací. Aktivní chlor reaguje s přítomnými aromáty za vzniku sloučenin charakteristických intenzivní vůní a chutí již ve velmi nízkých koncentracích<sup>3, 4,8,10</sup>.

### **1.5. Vznik chlorfenolů během čištění vody**

Dezinfekce vody bývá zpravidla posledním krokem při její úpravě na vodu pitnou. Hlavní cílem je zajistit mikrobiologickou nezávadnost vody. Tento proces s sebou však přináší nežádoucí efekty, jakými jsou vznikající vedlejší produkty dezinfekce. Jedná se především o chlorované látky, protože chlor a jeho sloučeniny jsou České republice ale i ve světě nejvíce používány pro dezinfekci pitné vody.

Chlorfenoly, jak již bylo zmíněno, patří mezi vedlejší produkty chlorace vody a situace je okolo nich již poměrně dobře zmapována. Fenolické látky se i ve velmi nízkých koncentracích ve vodě snadno chlorují za vzniku silně páchnoucích a chuťově postižitelných chlorfenolů. Prekurzory chlorfenolů jsou v tomto případě i přirozeného původu díky přítomnosti ve vodě rozpustných organických látek, např. fulvokyseliny, které obsahují velké množství aromatických jader. Fenoly z průmyslových odpadních vod byly záležitostí šedesátých a sedmdesátých let minulého století a jejich výskyt byl omezen legislativní cestou.

Chlorfenoly vykazují zpravidla tak silný zápach, že koncentrační limit pro pitnou vodu se odvíjí spíše od sensorických a nikoli toxikologických hledisek. I když dřívější norma pro kvalitu pitné vody chlorfenoly uváděla, v současně platné vyhlášce č. 252/2004 Sb. ve znění pozdějších změn a doplňků chlorfenoly nenalezneme. Většina chlorfenolů

poměrně snadno „destiluje s vodní párou“ (tvoří azeotropickou směs s vodou s minimem teploty varu), a proto jejich část při varu odtéká (do jaké míry, to závisí na intenzitě a době varu)<sup>11,12,29</sup>.

## **1.6. Výskyt chlorfenolů v životním prostředí**

Chlorfenoly jsou primárně označovány jako kontaminanty vod a půd, v menší míře se také vyskytují v atmosféře. Detekovat lze CP v dešťových a sněhových srážkách a exhalátech. CP jsou vyplavovány z půdy do podzemních a povrchových vod, kde se sorbují v nedisociované formě na huminové látky a do sedimentů s perzistencí po mnoho let<sup>1</sup>.

### **1.6.1. Voda**

Ve vodním prostředí se mohou chlorfenoly nacházet jak v disociované, tak i v nedisociované formě. V jaké formě se CP nachází závisí především na hodnotě pH prostředí, ale také na fyzikálních a chemických vlastnostech konkrétního kongeneru. Ve většině případů jsou disociované formy stabilnější než nedisociované<sup>13</sup>.

Většina metod pro stanovení CP je zaměřena právě na detekci ve vodném prostředí. S použitím prekoncentračních technik LLE, SPME atd viz kapitola 1.8.

### **1.6.2. Půda**

U půdy je zvláště důležitý transport kontaminujících látek. Transport chlorfenolů v půdě je ovlivněn mnoha faktory: jejich rozpustností ve vodě, pH půdy, úhrnu srážek, obsah organické hmoty, propustnosti půdy, rychlost odpařování a biologických procesy vyskytujících se v půdě<sup>4</sup>. V půdě se CP sorbují v nedisociované formě na huminové látky s perzistencí po mnoho let<sup>1</sup>.

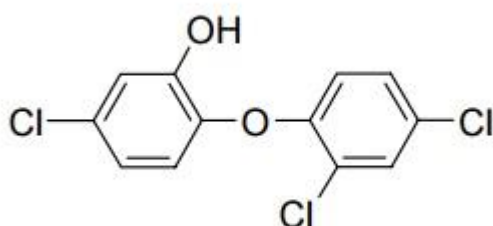
Detekce CP v půdě je obtížná. Z analyzované pevné matrice se dostávají i látky, které analýzu komplikují, činí tak separaci, identifikaci a kvantifikaci složité směsi látek často velmi náročnou. Příprava vzorku k analýze, izolace sledovaných látek, preseparace, prekoncentrace, případně derivatizace mohou velmi výrazně ovlivnit výsledek analýzy<sup>14</sup>.

### **1.6.3. Kontaminace čistírenských kalů chlorfenoly**

Čistírenské kaly jako konečný produkt čištění odpadních vod akumulují mnoho látek, které jsou přítomny v odpadní vodě, ale nejsou plně degradovány v průběhu jejího čištění. Spektrum organických látek antropogenního původu vyskytujících se u čistírenských kalů je velmi široké a stále se mění. Závisí především na lokalitě, ročním období a také na technologiích, které se k čištění vody používají<sup>15</sup>. Obvyklý chlorovaný kontaminant je triclosan (5-chlor-2-(2,4-dichlorfenoxy)fenol) jehož přeměnou vzniká 2,4-

dichlorofenol a 2,4,6-trichlorofenol. Triclosan byl původně zaregistrován jako herbicid, ovšem s objevem jeho baktericidních a antimikrobiálních vlastností se více rozšířilo jeho využití. Používá se proto v řadě čisticích a toaletních přípravků. Zvláště pak prostředky pro osobní péči, jako jsou zubní pasty, ústní vody, antiperspiranty a mýdla nesou hlavní odpovědnost za přítomnost této sloučeniny v odpadní vodě<sup>16</sup>.

V čistírenských kalech byla také prokázána přítomnost pentachlorofenolu jako degradačního produktu při rozkladu chlorovaných pesticidů<sup>17</sup>.



**Obrázek 5** Strukturní vzorec Triclosanu<sup>3</sup>

### 1.7. Biogenní chlorfenoly

Chlorované fenoly jsou v životním prostředí tvořeny přirozeně z organického materiálu a anorganického chloridu a to *de novo* syntézou nebo chlorací katalyzovanou chlorperoxidázou<sup>18</sup>. Chlorfenoly pocházející z přírodní činnosti se v přírodě vyskytují pouze v minoritním množství. Mohou také vznikat různými geoprojevy, působením vulkánů nebo například lesními požáry<sup>3</sup>.

#### 1.7.1. Hmyz

Hmyz využívá chemické látky pro komunikaci (feromony) a ochranu (allomony), některé z těchto látek mají ve své struktuře zabudovaný halogen. U roztočů byl nalezen jako sexuální feromon 2,6-dichlorofenol<sup>19</sup>. Sliny kobylek obsahují také dichlorofenol konkrétně 2,5-dichlorofenol<sup>18</sup>.

#### 1.7.2. Člověk

Lidské bílé krvinky obsahují myeloperoxidasu, která při napadení organismu patogenem nebo při různých onemocnění vyvolá halogenaci. Může tedy dojít k přeměně chlorfenolů (2,4,5-triCP; 2,3,4,6-tetraCP a PCP) na polychlorované dibenzodioxiny a dibenzofurany<sup>20</sup>.

## **1.8. Analytické metody k detekci a stanovení chlorfenolů se zvláštním důrazem na plynovou chromatografii**

S nárůstem výskytu a užívání fenolických sloučenin byl kladen důraz na jejich rychlou a spolehlivou analýzu<sup>9</sup>.

Mnohé fenolové sloučeniny jsou toxické v koncentracích několika  $\mu\text{g/ml}$  a jsou také perzistentní. Z těchto důvodů je řada fenolických sloučenin uvedena v seznamu prioritních znečišťujících látek. Vzhledem k velkému rozdílu toxicity mezi různými fenoly, je nutná analýza jednotlivých chlorfenolů ve vzorcích životního prostředí. Analýza těchto sloučenin, může být provedena různými chromatografickými a elektroforetickými metodami<sup>21</sup>.

Hlavní problém při sledování chlorfenolů v oblasti životního prostředí je velmi nízká koncentrace analytů v reálných vzorcích, je proto nutné separační metodu spojit i s vhodnou prekoncentrační technikou<sup>21</sup>.

Celkový obsah chlorfenolů je určován UV/Vis spektrometrií, tato metoda je citlivá, neumožňuje však stanovení jednotlivých fenolů ve složitějších směsích. V životním prostředí se však vyskytují složitější směsi, proto je nutná předchozí separace.

Pro účinnou separaci a stanovení CP ve směsích přicházejí v úvahu různě časově náročné varianty plynové chromatografie (GC) a vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) po předchozím zakoncentrování kapalinovou extrakcí či extrakcí na pevné sorbenty (SPE)<sup>5</sup>.

### **1.8.1. Metoda LLE-GC**

Metody analýzy chlorfenolů ve vodě založené na extrakci typu kapalina-kapalina (LLE) s následnou detekcí plynovou chromatografií (GC) jsou časově náročné, vyžadují čisticí procedury a dochází k velké spotřebě drahých organických rozpouštědel. Tato metoda navíc vyžaduje předchozí derivatizaci chlorovaných látek. Z těchto důvodů bývá často nahrazovaná mikroextrakcí tuhou fází (SPME).

### **1.8.2. Metoda SPME-GC**

Výhody této metody jsou značné, je rychlá, účinná a není třeba organických rozpouštědel. Používá se jak přímá analýza s extrakcí pomocí SPME vlákna a následným stanovením pomocí GC, tak i metoda s předchozí derivatizací CP<sup>22,23</sup>. Sorpce látek přímo z vody pomocí SPME má dvě zásadní nevýhody: silně se může uplatňovat vliv matrice (vliv dalších látek přítomných ve vodě, kompetitivní sorpce např. humátů, vliv iontově rozpuštěných látek atd.) a při tepelné desorpci se může do chromatografického systému



vnášet voda. I když je sorbent na SPME vlákně hydrofobní povahy, vždy na něm zůstanou po sorpci zachyceny kapičky vody, které se při tepelné desorpci převedou do chromatografického systému, kde mohou ničit stacionární fázi, měnit její polaritu<sup>24</sup>. Další nevýhodou je možný vznik širokých chromatografických píků, pokud dojde k nevhodně provedené desorpci. K tomu, aby metoda poskytovala použitelné výsledky, je také nutné, aby při tepelné desorpci docházelo k úplnému uvolnění analyzovaných látek z SPME vlákna do proudu nosného plynu a dále do chromatografické kolony. Nedokonalá tepelná desorpce by měla za následek kontaminaci následné analýzy nedesorbovaným reziduem z předchozí analýzy<sup>8</sup>.

Pro tuto metodu bylo vyvinuto nové vlákno na bázi 5,11,17,23-tetra-*tert*-butyl-25,27-diethoxy-26,28-dihydroxycalix[4]aren (C[4]/OH-TSO) pro přímou analýzu chlorfenolů z vodních vzorků. Vlákno bylo testováno na reálných vzorcích kontaminovanými čtyřmi druhy kongenerů CP. Výtěžnost extrakce byla kolem 100% a detekční limit byl stanoven v rozmezí 0,005-0,276 µg/l. Povrchová úprava vlákna poskytuje zvýšenou tepelnou stabilitu až do 380°C, které zdaleka nedosáhnou klasická polydimethylsiloxanová (PDMS) nebo polyakrylátová (PA) vlákna. Použití tohoto vlákna je tak rychlou a levnou alternativou pro stanovení chlorfenolů<sup>25</sup>.

### **1.8.3. Metoda SPE DLLME - GC- ECD**

Spojením extrakce pevným sorbentem (SPE) a paralelní disperzní mikroextrakce typu kapalina – kapalina (DLLME) byla vyvinuta nová prekoncentrační technika pro stanovení chlorfenolů ve vzorcích vody. Po prekoncentračních technikách následovalo chromatografické stanovení s detekcí pomocí detektoru elektronového záchytu. Studie prokázala, že tato separační technika je rychlá a jednoduše proveditelná. Bylo dosahováno nízké meze detekce (0,001–20 µg/l), čímž metoda získala velký potenciál pro analýzu ultrastopových množství látek v reálných vzorcích vody<sup>26</sup>.

### **1.8.4. Metoda SME-GC-MS**

Mikroextrakce rozpouštědlem (SME) ze vzorku je obdobnou technikou mikroextrakce tuhou fází. Tato metoda používá organické rozpouštědlo jako médium pro mikroextrakci. Mikrokapka rozpouštědla je v přímém styku s analyzovaným vodným roztokem, po určité době je pak rozpouštědlo analyzováno pomocí GC-MS. Tato metoda je unikátní v tom, že propojuje dva kroky extrakci a dávkování. Vše probíhá v mikrostřikačce, není tak nutné speciální vybavení laboratoře. Mez detekce v rozmezí

0,049-0,081 µg/l. Rychlost, jednoduchost a reprodukovatelnost jsou výhodami této metody<sup>27</sup>.

## 1.9. Degradace a odstraňování chlorfenolů

Maximální přípustný limit pro vypouštění chlorfenolů do odpadních vod definuje ekologická legislativa (Nařízení vlády č. 61/2003 Sb.) jako hodnotu 0,1 mg/l.

Pokud se povrchová voda používá pro vodárenské účely, je imisní standard pro jednosytné chlorfenoly přísnější 0,5 µg/l (Nařízení vlády č. 229/2007 Sb . ve znění pozdějších předpisů č. 229/2007 Sb a č. 23/2011 Sb). Skutečné výtokové hodnoty 100-1000 mg/l však tyto limity značně překračují. Proto bylo pro degradaci a odstranění chlorfenolů navrženo několik technologií, které je možno rozčlenit do pěti skupin<sup>3,28,29</sup> .

### 1.9.1. Fyzikální metody

Jsou to především nedestruktivní metody, využívající procesu **adsorpce** nebo **rozdílné distribuce** látek mezi dvě různé fáze. Využívá se polárních i nepolárních sorbentů, kterými jsou například přírodní sedimenty, hlíny typu alumina-montmorillonit, pórovité látky jako je aktivní uhlí, popílek a bentonit. Velkou nevýhodou je potřeba následného zpracování sorbentů se zachycenými látkami. Řešením je následná oxidace chlorfenolů na povrchu oxidu manganičitého<sup>3,4,29</sup>.

Pro kontaminovanou zeminu (< 500 mg chlorfenolů na 1 kg) lze také využít sanaci destilací vodní parou, kdy přehřátá vodní pára (teplota > 100 °C) přechází přes okyselenou hlínu (pH < 2, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a tvoří azeotropní směs s chlorfenoly. Po kondenzaci jsou látky ve vodě následně odbourávány metodami pro zpracování odpadních vod<sup>3,4</sup>.

Jako účinný postup pro zpracování většího množství odpadních vod se jeví zakoncentrování chlorfenolů extrakcí emulzní fázi, která je tvořena vodou, NaOH, tensidem (Span-80) a nepolárním solventem (kerosin). Chlorfenoly se kvantitativně zachytí v této emulzi, která je vlastně kapalnou membránou<sup>3,4,29</sup>.

### 1.9.2. Chemické metody

Často využívanou technologií pro destrukci chlorovaných aromátů je **spalování**. Pro rozklad chlorfenolů je obvykle dostačující vysoká teplota a delší čas. Nevýhodou této technologie je citlivé nastavení podmínek spalování, tak aby v oblasti chlazení spalných plynů nevznikaly nežádoucí sekundární produkty jako PCB, PCDD/F<sup>3</sup>.

Jejich podstatou je chemická reakce, při které dochází k přeměně chlorfenolů na méně toxické produkty a to destruktivní nebo nedestruktivní cestou. Využívá se **oxidačně redukčních pochodu**<sup>3,4,29</sup>.

K oxidaci chlorfenolů v odpadních vodách jsou používána oxidační činidla, kdy se účastní reakce hydroxylový radikál ( $\cdot\text{OH}$ ), zejména chlor, peroxid vodíku nebo ozon.

Tzv. Advanced Oxidation Processes. (AOPs) se vyznačují velmi vysokou oxidační schopností. Využívají kombinace několika oxidačních systémů: UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$ , UV/ $\text{O}_3$  nebo  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{2+}$  (Fentonovo činidlo)<sup>3</sup>.

K oxidační dechloraci za současného štěpení aromatického jádra dochází při reakci chlorfenolů s peroxidem vodíku katalyzované modifikovaným aktivním uhlím nebo tetrasulfoftalokyaninem železa. Produktem je směs fenolu, kyseliny chlormaleinové a chlorfumarové,  $\text{CO}_2$  a  $\text{Cl}^-$ <sup>3</sup>.

Pro oxidaci či redukci pentachlorfenolu až na monochlorfenol, lze využít elektromagnetické vlnění o frekvenci 20-530 kHz (ultrazvuk). Díky produkci tepla a tlaku na mikroskopické hladině dochází ke kolapsu kavitačních bublin, vzniká hydroxylový a vodíkový radikál, který pak následně podle charakteru prostředí (vzduch, kyslík, argon, peroxid vodíku) oxiduje či redukuje pentachlorfenol<sup>3</sup>.

Chlorfenoly lze také odstraňovat z průmyslových odpadních vod **enzymaticky** pomocí křenové peroxidasy (*horseradish peroxidase*, HRP), která v přítomnosti peroxidu vodíku katalyzuje oxidaci chlorfenolů. Takto jsou generovány fenoxylóvé radikály  $\text{ArO}\cdot$ , které spontánně tvoří nerozpustné sedimentující polymery<sup>3,4</sup>.

Další možnou metodou, která využívá systémy hydridů nebo destrukci solvatovanými elektrony je **reduktivní dechlorace**. V kapalně fázi lze realizovat katalytickou dechloraci chlorfenolů přechodnými kovy. V plynné fázi lze aplikovat pro triCP a monoCP katalytickou dechloraci na systémech Ni/ $\text{SiO}_2$  nebo CuCl/ $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Tato metoda je nedestruktivní vůči C-C vazbám, a tím je předurčen jako hlavní produkt fenol<sup>3</sup>.

### 1.9.3. Elektrochemické zpracování a $\gamma$ -ozařování

Elektrochemické metody jsou založeny na **elektrolýze vody**. Nejrozšířenější je anodická oxidace, kdy na se anodě adsorbuje hydroxylový radikál  $\cdot\text{OH}$ , který se dále velmi aktivně účastní destrukce chlorfenolů<sup>3</sup>.

Další možností, je využití chemisorpce vodíku na povrchu katody, kterou tvoří uzavřená uhlíková elektroda s Pd/ $\text{Al}_2\text{O}_3$  či Rh/ $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Tato katalytická hydrogenace probíhá v alkalickém prostředí za vzniku fenolu nebo cyklohexanolu<sup>3</sup>.

**Ionizující  $\gamma$ -záření** ( $^{60}\text{Co}$ ) způsobuje rozklad vody a vznik reaktivních částic, tj. hydratovaného elektronu a hydroxylového radikálu. Následně probíhá jednoelektronová redukce chlorfenolů na fenol<sup>3</sup>.

#### 1.9.4. Fotochemické zpracování

K rozkladným reakcím chlorfenolů dochází přímým **ozařováním polychromatickým světlem**. Transformace probíhají přes fotoexcitované stavy s následným homolytickým štěpením vazeb C-Cl a O-H za tvorby chlorfenoxylových radikálů. Redukční dechlorací tak vznikají méně chlorované fenoly. Adice hydroxylového radikálu vede ke vzniku katecholů, hydrochinonů a benzochinonů. U oxidace aromatického jádra je produktem dichlormaleinová kyselina. Nevýhodou této metody je možnost vzniku PCDD/F<sup>3,4</sup>.

**Fotokatalýza na povrchu polovodičů** (TiO<sub>2</sub>, ZnO, ZrO<sub>2</sub>, MoO<sub>3</sub>) je velmi rozšířenou metodou degradace a mineralizace chlorfenolů. Nevýhodou je ale nízký kvantový výtěžek a kontaminace fotokatalyzátoru<sup>3,4</sup>.

#### 1.9.5. Mikrobiální degradace

Mikroorganismy jsou schopné čerpat uhlík, nezbytný k jejich životu z celé řady chemikálií. Toho lze využít právě pro degradaci chlorovaných fenolů. Podmínkou však je, že daný organismus musí produkovat enzym dehalogenasu, která katalyzuje štěpení C-Cl vazeb. Vznikají tak látky, kde chlor je substituován vodíkem nebo hydroxylovou skupinou. **Dehalogenační enzymy** se mohou podle mechanismu účastnit redukční nebo oxidační dehalogenace<sup>3,4</sup>.

Redukční dehalogenace chlorfenolů probíhající za anaerobních podmínek, vede ke kompletní degradaci až na oxid uhličitý a methan. Z hlediska reaktivity jednotlivých poloh atomu chloru na fenolu dochází nejochotněji k dechloraci poloh *ortho*, v nepřítomnosti *ortho* polohy je preferována poloha *meta* před polohou *para*<sup>3,4</sup>.

Oxidační dehalogenace chlorfenolů katalyzovaná monooxygenasami vede k tvorbě konečných produktů, kterými jsou katecholy či chinony<sup>3,4</sup>.

## **2. Cíle práce**

1. Provedení literární rešerše na téma chlorfenoly v životním prostředí.
2. Seznámení se s analytickou metodou GC-ECD.
3. Provedení předběžných měření standardů obsahujících monochlorfenoly a stanovení základních analytických parametrů.
4. Zhodnocení naměřených výsledků práce a porovnání s výsledky z literatury.

### **3. Materiály a metody**

#### **3.1. Použité chemikálie, standardy**

2-chlorfenol, 99%, Sigma-Aldrich

4-chlorfenol, 99%, Sigma-Aldrich

izopropylalkohol, p.a., Lachema

ethanol, 96%, BHD Prolabo

anhydrid kyseliny octové, p.a., Sigma-Aldrich

uhličitan draselný, p.a., Penta

síran sodný, p.a., Penta

n-hexan, p.a., Merck

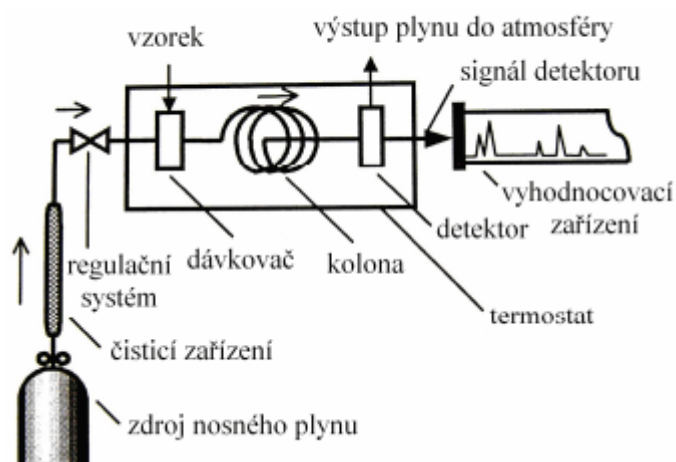
#### **3.2. Metody**

##### **3.2.1. Plynová chromatografie**

Plynová chromatografie (GC - Gas Chromatography) je separační metoda, při které se oddělují složky obsažené ve vzorku. V chromatografii se vzorek vnáší mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. Vzorek je pomocí mobilní fáze unášen na stacionární (nepohyblivou) fázi umístěnou v koloně, kde dochází k separaci složek na základě schopnosti zachycovat se na této fázi. Více se zdrží složky, které jsou stacionární fází poutány silněji. Aby vzorek mohl být transportován, musí se ihned přeměnit na plyn. Mobilní fází u této metody je nosný plyn, kterým může být např. vodík, helium nebo argon.

Složky opouštějící kolonu indikuje detektor. GC využívá detekci pomocí plamenového ionizačního detektoru (FID - Flame Ionization Detector), detektoru elektronového záchytu (ECD - Electron Capture Detector) nebo hmotnostního spektrometru (MS - Mass Spectrometer). Signál z detektoru se vyhodnocuje a z časového průběhu intenzity signálu se určí druh a kvantitativní zastoupení složek<sup>30,31</sup>.

Pro stanovení byl použit GC Varian 3400 (Walnut Creek, USA). Separace látek probíhá na kapilární koloně Restek Rxi-624Sil MS (Bellefonte, USA, délka 30 m, vnitřní průměr 0,32 mm, tloušťka filmu 1,8 μm). Tato kolona obsahuje středně polární Crossbond® silarylenovou fázi, vykazuje vysokou teplotní stabilitu – teplotní maximum až 320°C a je inertní, čímž poskytuje kvalitní píky pro širokou škálu sloučenin. Detekce separovaných složek probíhá na detektoru elektronového záchytu (viz kapitola 3.2.2.). K vyhodnocení chromatogramů z GC-ECD byl použit program Star Chromatography Workstation, verze 6.41.



**Obrázek 6:** Schéma plynového chromatografu <sup>30</sup>

### 3.2.2. Detektor elektronového záchytu

Podstatou ECD je radioaktivní zářič (většinou izotop  $^{63}\text{Ni}$ ), který svým zářením  $\beta$  (proud rychlých elektronů) ionizuje molekuly dusíku jako nosného plynu a vyvolává ionizační proud a emisi sekundárních termálních elektronů.

Mezi kovovou stěnou detektoru zapojenou jako anoda a katodou prochází díky přítomnosti termálních elektronů elektrický proud. Když se do detekčního prostoru dostane z výstupu chromatografické kolony látka, která pohlcuje termální elektrony, tak poklesne jejich počet a tím poklesne i hodnota procházejícího proudu. Pokles proudu závisí na typu a koncentraci látky vystupující z kolony. Velmi citlivý je tento detektor na halogenované sloučeniny, proto je intenzivně využíván v analýzách složek životního prostředí<sup>24,25</sup>.

### 3.2.3. Automatické vzorkování

Plynový chromatograf Varian CP-3800 GC-ECD je spojený s automatickým robotem Combi PAL (CTC Analytics, Švýcarsko). Tento automatický robot umožňuje několik úkonů, které usnadňují práci se vzorky. Umožňuje třepání a zahřívání vzorku v agitátoru během extrakčního procesu a hlavně přesné časové intervaly, čímž se snižuje chybnost a zvyšuje reprodukovatelnost měření. Robot připraví vzorek k extrakci dle nastavených parametrů, exponuje SPME vlákno do vzorku a následně spustí analýzu vložení vlákna do prostoru dávkočce GC.

### 3.3. Extrakční techniky

#### 3.3.1. Extrakce kapalina-kapalina

Tato extrakce označovaná zkratkou LLE (Liquid-liquid Extraction) představuje nejstarší a nejrozšířenější techniku izolace látek. Z vodného roztoku vzorku se analyt převádí do organického rozpouštědla. Při této metodě jsou používána organická rozpouštědla s nízkou polaritou a bodem varu o vysoké extrakční schopnosti např. pentan, hexan, benzen, chloroform. Extrakce se provádí manuálně protřepáváním obou kapalin v dělicí nálevce. K analýze se bere organická fáze. Metoda je vhodná pro stanovení nepolárních organických látek<sup>30,31</sup>, jako jsou CP.

#### 3.3.2. Mikroextrakce tuhou fází (SPME)

Solid phase microextraction (SPME, v češtině mikroextrakce tuhou fází) je izolační metoda, při níž dochází ke sjednocení procesu vzorkování a extrakce. Principem této metody je sorpce vzorku na stacionární fázi pokrývající křemenné vlákno, které se nachází uvnitř kovové jehly. Vlákno o délce 1 cm pokryté polymerem je nejdůležitější součástí zařízení. Jehla slouží k ochraně vlákna před mechanickým poškozením a k propíchnutí septa v zátce vialky, ve které se nachází matrice. Jehla s vláknem se zasune do vzorku, vlákno se z jehly při procesu vzorkování vysune pomocí pístu a po dosažení sorpční rovnováhy se zase zasune zpět do jehly. Po dosažení rovnováhy (individuální; 2 – 90 min) se vlákno zatáhne a celá jehla se ze vzorkované matrice vytáhne a vloží se do nástřikového prostoru chromatografu a vlákno se opět vysune, kde dojde rychlé desorpci látek. K výhodám této metody patří rychlost stanovení, citlivost a také vysoká přesnost<sup>32</sup>.

#### *Optimalizace SPME metody*

K získání dobrých a spolehlivých výsledků při používání metody SPME je ovlivněna celou řadou faktorů, např. polaritou a tloušťkou stacionární fáze, způsobem vzorkování, hodnotou pH, iontovou silou roztoku, teplotou vzorku, mícháním apod. Vhodné je použití automatu provádějící vzorkování pro získání reprodukovatelných výsledků.

Citlivost SPME metody ovlivňuje tloušťka stacionární fáze vlákna. Maximální efektivnosti docílíme vhodnou volbou vlákna. Dostupná je celá řada SPME vláken, která jsou obalena polymerem. Pro naše stanovení byla použita vlákna se silnější vrstvou polymeru polydimethylsiloxan (Supelco 100  $\mu\text{m}$  PDMS) a polyakrylát (Supelco 85  $\mu\text{m}$  PA). Záhřev vzorku obecně zkracuje čas potřebný k dosažení rovnováhy; v důsledku toho se zkracuje i doba sorpce.

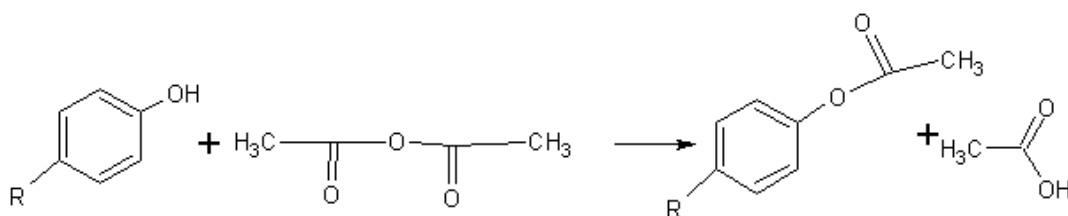


Byla využita přímá metoda SPME, označovaná zkratkou DI-SPME (Direct Immersing SPME), při které dochází přímo k ponoření vlákna do vzorku<sup>32</sup>.

### 3.4. Derivatizace

Derivatizace slouží ke snížení polariry molekuly a snížení teploty varu, čímž dochází ke zlepšení parametrů chromatografického dělení plynem. Při analýze chlorovaných fenolů může být k derivatizaci využit například anhydrid kyseliny octové. Dochází ke vzniku derivátů původních sloučenin s rozdílnými vlastnostmi<sup>33</sup>.

Sorpce méně polární látky (derivatizované) na nepolární sorbent z tak polárního rozpouštědla jako je voda, bude vždy účinnější než sorpce látky polárnější i když je použit polární sorbent. Acetylchlorfenoly se z vodného roztoku, jakožto méně polární látky, izolují snadněji než mateřské volné chlorfenoly a mají lepší chromatografické vlastnosti<sup>8</sup>.



**Obrázek 7** Obecné schéma derivatizace chlorfenolů acetanhydridem <sup>8</sup>

### 3.5. Příprava standardů 2-CP a 4-CP a stanovení metodou SPME-GC-ECD

Základní roztoky chlorfenolů byly připraveny v izopropylalkoholu <sup>22</sup> o koncentraci 500 mg/l. Z nich byly následně získány standardní roztoky o požadovaných koncentracích 0,5, 5 a 50 mg/l ředěním do vody. Pracovní podmínky pro GC-ECD a SPME jsou uvedeny v tabulkách 2 a 3.

**Tabulka 2** Pracovní podmínky pro GC-ECD.

<b>Teplota injektoru</b>	280°C
<b>Teplota detektoru</b>	350°C
<b>Nosný plyn</b>	He
<b>Průtok He</b>	2 ml/min
<b>Detektorový plyn</b>	N <sub>2</sub>
<b>Průtok N2</b>	15 ml/min
<b>Teplotní program</b>	130°C(1min) na 280°C(12°C/min)

**Tabulka 3** Pracovní podmínky pro CombiPAL AutoSampler

<b>Teplota agitátoru</b>	40°C
<b>Počet otáček za min během</b>	300 rpm
<b>Agitátor zapnutý</b>	5 s
<b>Agitátor vypnutý</b>	5 s
<b>Hloubka ponoření vlákna</b>	20 mm
<b>Doba extrakce</b>	15 min
<b>Doba desorpce</b>	5 min

### 3.5.1. Použití vlákna PDMS 100 µm

Přípravené roztoky chlorfenolů byly extrahovány použitím PDMS 100 µm vlákna a proměřeny za podmínek uvedených v tabulkách 2 a 3.

### 3.5.2. Použití vlákna PA 85 µm s okyselením

U připravených roztoků bylo nejprve upraveno pH na hodnotu 2 dále byly roztoky extrahovány použitím PA 85 µm vlákna a proměřeny za podmínek uvedených v tabulkách 2 a 3.

### 3.6. Stanovení 2-CP a 4-CP GC-ECD s využitím přímého nástřiku

Základní roztoky chlorfenolů byly připraveny v ethanolu o koncentraci 500 mg/l. Z nich byly následně získány standardní roztoky o požadovaných koncentracích 0,5, 5, 50 a 500 µg/l ředěním do ethanolu.

Nástřik vzorku v kapalně fázi byl prováděn mikrostříkačkou přes septum ze silikonové gumy uzavírající vnitřní prostor dávkovače. Pro zabránění kondenzace vzorku je důležité, aby teplota dávkovače přesahovala bod varu nejméně těkavé analyzované složky vzorku alespoň o 50°C<sup>31</sup>. Dávkovaný objem vzorku byl pokaždé 1 µl. Analýza byla provedena pomocí GC-ECD. Za podmínek uvedených v tabulce 4.

**Tabulka 4** Pracovní podmínky pro GC-ECD pro metodu s přímým nástřikem vzorku

<b>Teplota injektoru</b>	250°C
<b>Teplota detektoru</b>	300°C
<b>Nosný plyn</b>	He
<b>Průtok He</b>	1 ml/min
<b>Detektorový plyn</b>	N <sub>2</sub>
<b>Průtok N<sub>2</sub></b>	25 ml/min
<b>Teplotní program</b>	40°C na 300°C(20min)

### **3.7. Stanovení 2-CP a 4-CP GC-ECD s předchozí acetylací a LLE**

Základní roztoky chlorfenolů byly připraveny v ethanolu o koncentraci 500 mg/l. Z nich byly následně získány standardní kalibrační roztoky o požadovaných koncentracích 0,05; 0,5; 5; 7,8; 15,6; 31,25; 62,5; 125; 250 a 500 µg/l.

Poté byly chlorfenoly derivatizovány anhydridem kyseliny octové a extrahovány hexanem. Analýza byla provedena pomocí GC-ECD. Za podmínek uvedených v tabulce 4. Dávkovaný objem vzorku byl pokaždé 1µl. K vyhodnocení chromatogramů z GC-ECD byl použit program Star Chromatography Workstation, verze 6.41.

#### **3.7.1. Postup acetylace a extrakce**

Do dělicí baňky bylo přidáno 50 ml destilované vody a 2 ml roztoku standardu daného chlorfenolu. Následující kroky byly provedeny bez přerušení a v předepsaném čase. Do dělicí baňky bylo přidáno 5 ml roztoku uhličitanu draselného (koncentrace 1 mol/l) a 1 ml acetanhydridu. Směs byla intenzivně protřepávána po dobu 5 minut, aby došlo k uvolnění oxid uhličitýho. Po 10 minutách stání se ke směsi přidalo 5 ml hexanu a opět se třepalo 5 minut. Po oddělení fází se hexanová část převedla do vialky a vysušila předáním bezvodého síranu sodného<sup>34</sup>.

## 4. Výsledky a diskuze

### 4.1. Stanovení 2-CP a 4-CP metodou SPME-GC-ECD

Stanovení monochlorfenolů ve vodném roztoku bylo možné pomocí obou použitých vláken, výrazně se však lišila koncentrace, při které byly CP viditelné na chromatogramu. Pro PDMS vlákno byla nejnižší měřitelná koncentrace 50 mg/l. Pro PA vlákno po okyselení na pH 2 byla 0,5 mg/l. Pro životní prostředí jsou však limitní hodnoty v řádech jednotek  $\mu\text{g/l}$  tudíž použití této techniky stanovení není dostačující.

### 4.2. Stanovení 2-CP a 4-CP GC-ECD s využitím přímého nástřiku

Chlorované fenoly v roztoku ethanolu bylo sice touto metodou možné stanovit, v přírodě se však CP vyskytují ve vodném prostředí, pro bylo nutné zaměřit se na metody analýzy chlorfenolů z vodných vzorků.

### 4.3. Stanovení 2-CP a 4-CP GC-ECD s předchozí acetylací a extrakcí LLE

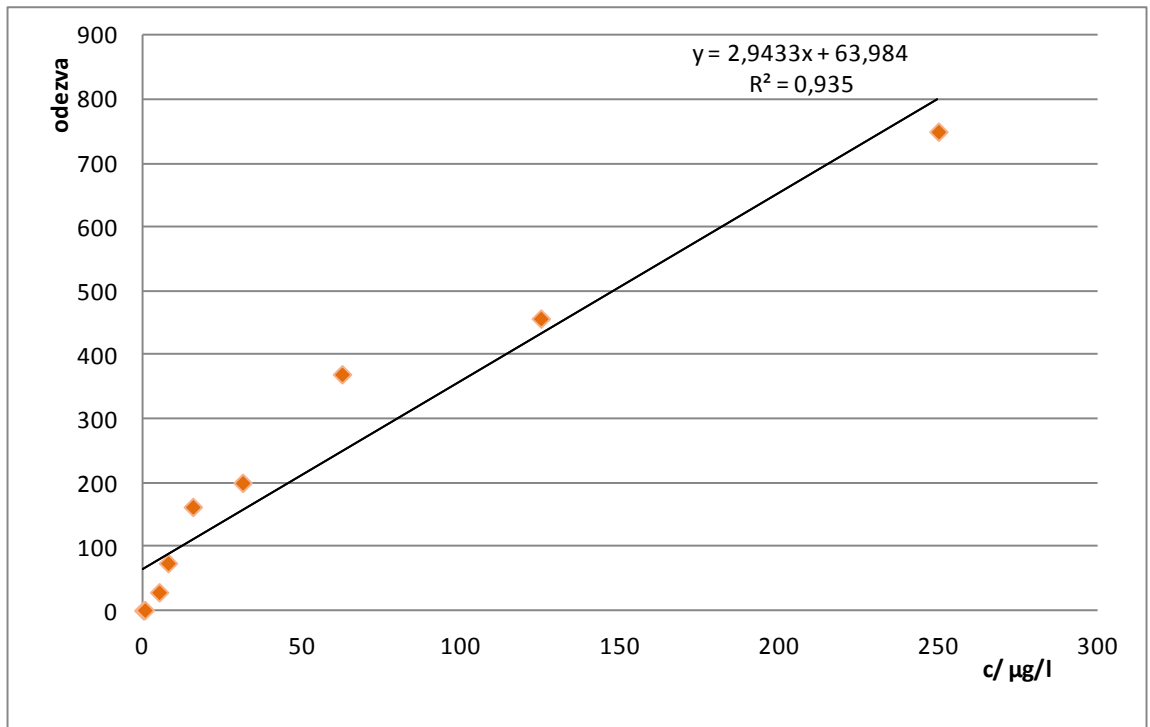
Bylo dokázáno, že chlorované fenoly je možné stanovit v jednotkách  $\mu\text{g/l}$  po jejich derivatizaci anhydridem kyseliny octové a následné extrakci s použitím plynové chromatografie s detektorem elektronového záchytu. Mez detekce byla získána jako trojnásobek poměru signál/šum ( $3xS/N$ ). Mez stanovení byla určena jako desetinásobek tohoto poměru ( $10xS/N$ ). Výsledky jsou shrnuty v tabulce 5.

**Tabulka 5** Mez detekce a mez stanovení pro 2-chlorfenol a 4-chlorfenol

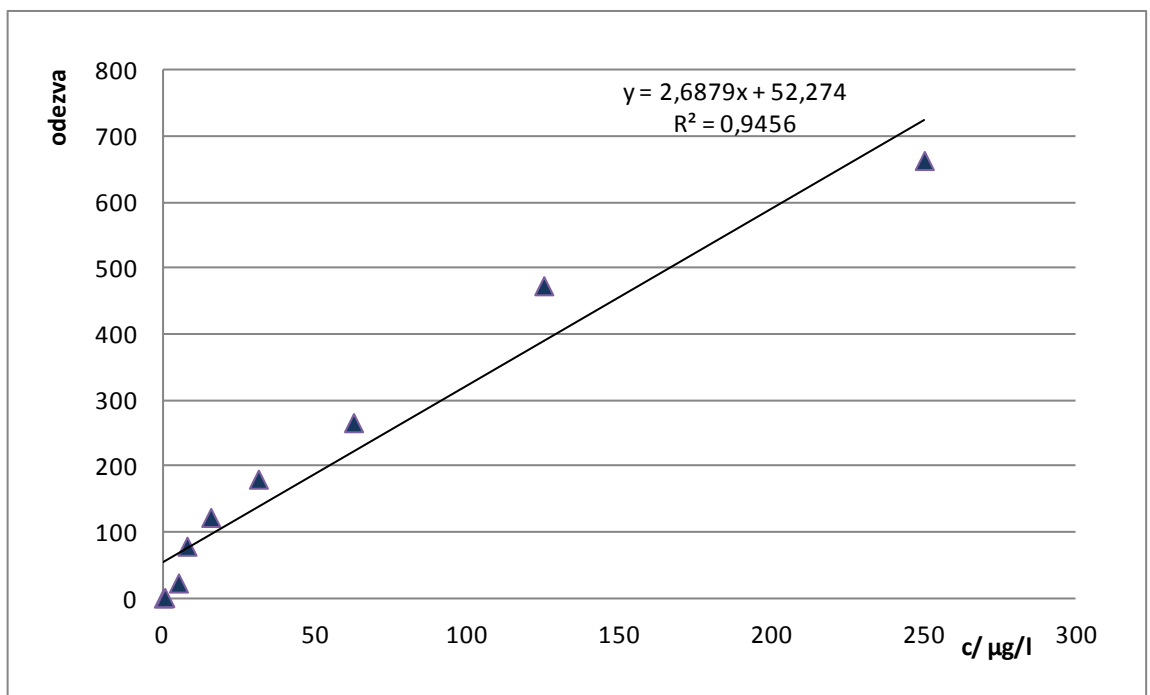
sloučenina	Mez detekce $\mu\text{g/l}$	Mez stanovení $\mu\text{g/l}$
2-CP	2,47	8,24
4-CP	3,14	10,47

Z tabulky 5 je patrné, že metoda nespĺňuje požadavky na hodnotu detekčního limitu pro pitnou vodu, budeme-li požadovat, aby detekční limit analýzy byl maximálně 10 % hodnoty uvedené v normě, standardu nebo směrnici.

Ze závislosti průměrné hodnoty odezvy, vypočtené pro 3 měření, na koncentraci 2-CP a 4-CP v modelovém vzorku, byly vyneseny kalibrační přímky, pro možnost srovnání a vypočtení koncentrace 2-CP a 4-CP z rovnice regrese. Kalibrační křivka byla pro 2-CP a 4-CP lineární v rozsahu 0,05-250  $\mu\text{g/l}$ .



**Graf 1** Kalibrační závislost odezvy na koncentraci 2-chlorfenolu



**Graf 2** Kalibrační závislost odezvy na koncentraci 4-chlorfenolu

Jak již bylo zmíněno, důležitým krokem před samotnou chromatografickou analýzou chlorfenolů je jejich separace pomocí extrakčních technik, a to z důvodu nízkých koncentrací analytů v reálných vzorcích.

Pro LLE je sice třeba velkých objemů rozpouštědla, což ale na druhou stranu umožňuje extrakci širokého spektra látek. Tato metoda je také snadno proveditelná a opakovatelná. Bylo využito této metody extrakce s následnou acetylací a stanovením pomocí GC-ECD, kde mez detekce pro monochlorfenoly byla v řádu jednotek  $\mu\text{g/l}$ . Tato metoda sice není vhodná pro stanovení chlorfenolů v pitné vodě, zato by však bylo možné stanovit chlorfenoly ve vodě odpadní, která nemá tak vysoké nároky na mez detekce ( $0,1 \text{ mg/l}$ ).

SPE metoda umožňuje také stanovit celé spektrum látek, ale odpadá problém s finanční náročností z důvodu velké spotřeby rozpouštědel. Pracuje se s menšími objemy vzorků a prekoncentrované vzorky na kolonách je snadné transportovat a skladovat. Nevýhodou zůstává nedostatečný výběr SPE kolon na trhu pro některé specifické izolace<sup>35</sup>. Prekoncentrační technika SPE spojená s DLLME a koncovou analýzou pomocí GC-ECD používaná pro stanovení chlorfenolů ve vodních vzorcích dosahuje meze detekce v rozmezí  $0,001\text{--}20 \mu\text{g/l}$ , stává se tak potenciálně vhodnou pro ultrastopové analýzy<sup>26</sup>.

SPME je často používaná metoda pro extrakci chlorfenolů ve vodách pro její jednoduchý a rychlý postup. Výhodou SPME metody je nenáročná manipulace se vzorkem při sorpci i desorpci a nízká časová náročnost. Ve spojení s GC je dosahováno meze detekce v rozmezí  $0,5\text{--}1,0 \mu\text{g/l}$ <sup>22</sup>. Vlákno C[4]/OH-TSO pro SPME extrakci s přímou analýzou chlorfenolů pomocí GC z vodních vzorků nabízí rychlou a levnou možnost stanovení s mezí detekce v rozmezí  $0,005\text{--}0,276 \mu\text{g/l}$ <sup>25</sup>.

Poslední zde uváděná metoda SME-GC-MS propojující metodu extrakce s dávkováním se jeví jako perspektivní díky své jednoduchosti, rychlosti a reprodukovatelnosti s mezí detekce  $0,049\text{--}0,081 \mu\text{g/l}$ <sup>27</sup>.

O tom jakou metodu pro analýzu chlorovaných fenolů zvolíme, rozhoduje především složení a vlastnosti analyzovaného vzorku. Záleží také, jak rychlé provedení požadujeme a v jakých mezích detekce je nutno CP stanovit. Nelze tedy jednoduše říci, která metoda je nejlepší pro stanovení CP.

## 5. Závěr

Tato bakalářská práce se skládá z teoretické a experimentální části. Teoretická část je zaměřena na obecnou problematiku chlorfenolů v životním prostředí. Bylo provedeno posouzení jejich vlivu na životní prostředí, popsány metody stanovení chlorfenolů a způsoby odstraňování z životního prostředí.

Díky své vysoké toxicitě, stabilitě a schopnosti bioakumulace jsou chlorfenoly nebezpečné pro životní prostředí a ekosystémy. Z organoleptického hlediska dokážou zcela znehodnotit pitnou vodu.

Co se týká odstraňování chlorfenolů z životního prostředí, doposud nebyla nalezena metoda, která by byla vysoce účinná, ekonomicky nenáročná a zároveň však šetrná k životnímu prostředí, jejíž průběh by byl spolehlivý a bez možnosti vzniku nebezpečných meziproduktů.

V současné době je k dispozici několik metod pro stanovení chlorfenolů ve vodných vzorcích pomocí plynové chromatografie. Jako perspektivní pro chromatografické stanovení se jeví metody extrakce v mikroměřítku z důvodů účinnosti, ekonomické nenáročnosti s mezí detekce 0,049-0,081  $\mu\text{g/l}$ .

Experimentální část se zabývá stanovením chlorfenolů s využitím dvou extrakčních technik a koncovou analýzou pomocí GC-ECD. Pro analýzu modelového 2-chlorfenolu a 4-chlorfenolu se ukázala být vhodná separační metoda derivatizace anhydridem kyseliny octové a následná extrakce do hexanu. Touto metodou bylo dosaženo detekčního limitu v řádu jednotek  $\mu\text{g/l}$ . Tento postup je rychlý, jednoduchý, levný a nedochází při něm k tvorbě emulzí, které znemožňují stanovení, proto je vhodný pro rutinní analýzy chlorovaných fenolů.

Experimentální výsledky této práce naznačují vhodnost kombinovat derivatizace chlorfenolů s následným použitím extrakční metody SPME a stanovení látek na GC-ECD, v případě složitějších směsí na GC-MS.

## 6. Použitá literatura

- (1) WHO Environmental Health Criteria 93. *Chlorophenol Other than Pentachlorophenol*. Geneva: WHO, **1989**.
- (2) Rammamoorthy, S.; Rammamoorthy, S. *Chlorinated Organic Compounds in the environment*; CRC: New York, **1997**, s.370.
- (3) Vlková, L.; Církva, V. Chlorované fenoly a způsoby jejich degradace. *Chemické listy* **2005**, 99, 125-130.
- (4) Czaplicka, M. Sources and transformations of chlorophenols in the natural environment. *Science of the Total Environment*, **2004**, 322, 21-39.
- (5) Kostrhounová, R.; Jančář, L.; Sommer, L. UV spektrofotometrické stanovení směsi fenolu a chlorfenolů ve vodách s použitím projekce do latentních struktur a Kalmanova filtru. *Chemické listy*, **2003**, 98, 269-276.
- (6) Rusek, V. *Základy toxikologie a úvod do problematiky hygieny a bezpečnosti práce v chemické laboratoři*; Ústav ochrany životního prostředí, Univerzita Pardubice, **2001**, s. 125.
- (7) Horák, J.; Linhart, I.; Klusoň, P. *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky*; VŠCHT: Praha, **2004**, s. 187.
- (8) Jursíková, K.; Janda, V. Analýza chlorfenolů ve vodách mikroextrakcí tuhou fází a plynovou chromatografií s hmotnostně spektrometrickou detekcí. *Chemické listy*, **1999**, 93, 803-805.
- (9) <http://home.icpf.cas.cz/cirkva/Home%20page/EOC-PCDD-vice.htm>, platné ke dni 16.5.2015.
- (10) Horák, T.; Čulík, J.; Kellner, V.; Jurková, M.; Čejka, P. Využití SPE při stanovení chlorfenolů ve varní vodě a pivu. *Kvasný průmysl*, **2008**, 54, 2-5.
- (11) Janda, V; Pech, P; Pechová, M. Dezinfekce vody a její nežádoucí vedlejší účinky. *Kvasný průmysl*, **2004**, 11-12, 335-340.
- (12) Pavlíková, I. *Ochrana vod a půd*; Studijní opora, **2008**, s. 173.
- (13) Czaplicka, M; Kaczmarczyk, B. Infrared study of chlorophenols and products of their photodegradation. *Talanta*, **2006**, 70, 940-949.
- (14) Tesařová, E.; Vozňáková, Z.; Podehradská, J.; Popl, M. Optimalizace podmínek pro izolaci a plynově chromatografické stanovení fenolů v tuhých vzorcích. *Chemické listy*, **1999**, 93, 334-337.

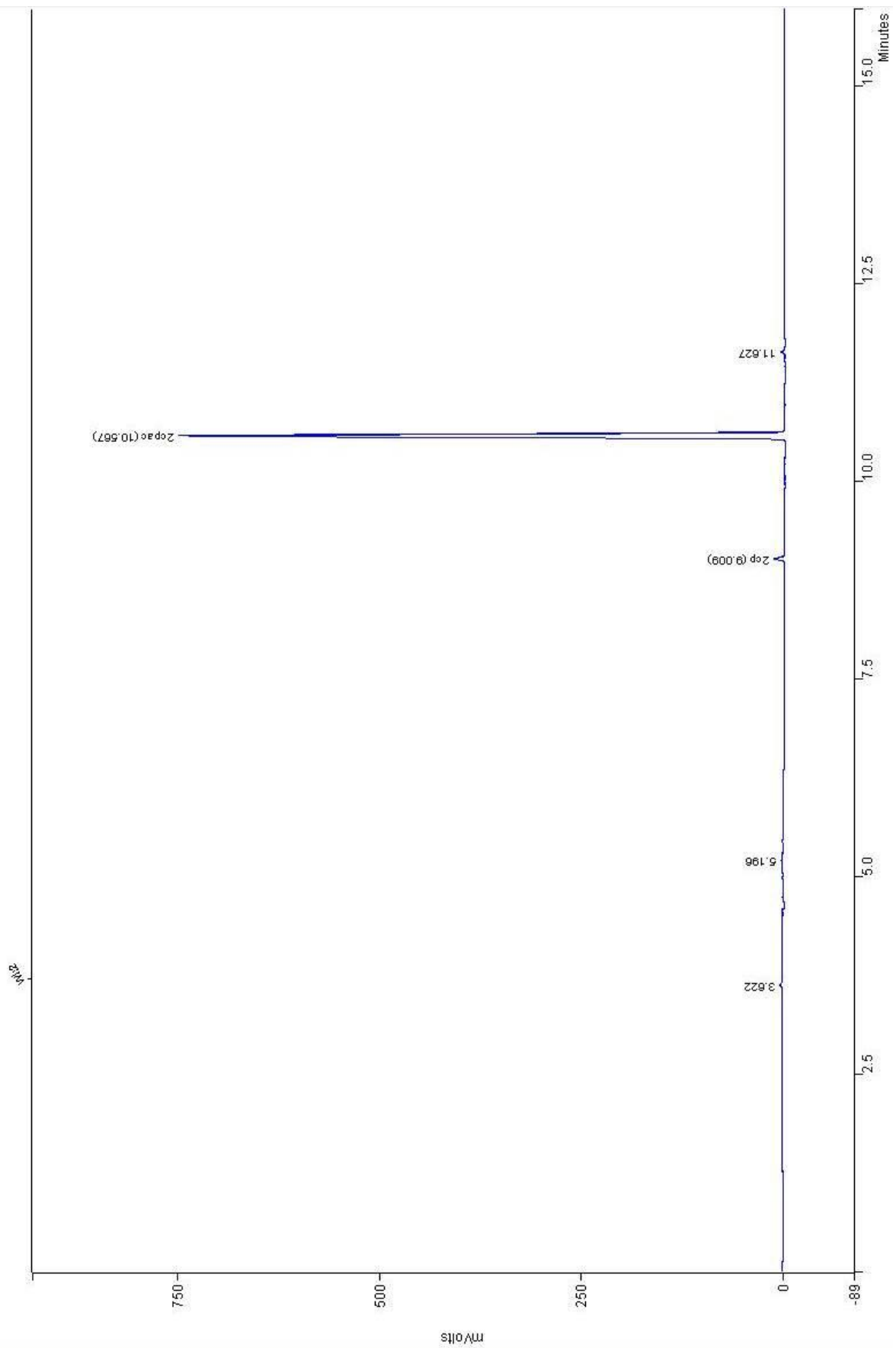


- (15) Schnaak, W.; Kuchler, Th.; Kujawa, M.; Henschel, K.P.; Subenbach, D. Organic contaminants in sewage sludge and their ecotoxicological significance in the agricultural utilization of sewage sludge. *Chemosphere*, **1997**, 35, 5-11.
- (16) Morales, S.; Canosa, P.; Rodríguez, I.; Rubí, E.; Cela, R. Microwave assisted extraction followed by gas chromatography with tandem mass spectrometry for the determination of triclosan and two related chlorophenols in sludge and sediments. *Journal of Chromatography A*, **2005**, 1082, 128-135.
- (17) Alcock, R.E.; Jones, K.C. Pentachlorophenol (PCP) and Chloranil as PCDD/F sources to sewage sludge and sludge amended soils in the UK. *Chemosphere*, **1997**, 35, 2317-2330.
- (18) Hoekstra, E.J.; de Weerd, H.; de Leer, E.W.B.; Brinkman, U.A.Th. Natural Formation of Chlorinated Phenols, Dibenzo-p-dioxins, and Dibenzofurans in Soil of a Douglas Fir Forest. *Environmental Science & Technology*, **1999**, 33, 2543-2549.
- (19) Khalil, M.A.K.; Rasmussen, R.A.; French, J.R.J.; Holt, J.A. The Influence of Termites on Atmospheric Trace Gases: CH<sub>4</sub>, CO<sub>2</sub>, CHCl<sub>3</sub>, N<sub>2</sub>O, CO, H<sub>2</sub>, and Light Hydrocarbons. *Journal of Geophysical Research*, **1990**, 95, 3619-3634.
- (20) Wittsiepe, J.; Kullmann, Y.; Schrey, P.; Selenka, F.; Wilhelm, M. , Myeloperoxidase-catalyzed formation of PCDD/F from Chlorophenols. *Chemosphere* **2000**, 40, 963-968.
- (21) Djozan, D.; Bahar, S. Monitoring of Phenol and 4-Chlorophenol in Petrochemical Sewage Using Solid-Phase Microextraction and Capillary Gas Chromatography. *Chromatographia*, **2003**, 58, 637-642.
- (22) Silva, S.L.; Alves, A.; Santos, L. Uncertainty Measurement of Chlorophenols and PCBs Analyzed in Aqueous Media by SPME-GC-ECD. *Journal of Chromatographic Science*, **2009**, 47, 103-109
- (23) Al-Janabi, K.W.S.; Alazawi, F.N.; Mohammed, M.I.; Kadhum, A.A.H.; Mohamad, A.B. Direct Acetylation and Determination of Chlorophenols in Aqueous Samples by Gas Chromatography Coupled with an Electron-Capture Detector. *Journal of Chromatographic Science*, **2012**; 50, 564-568
- (24) Janda, V.; Videaň, I. Analýza těkavých halogenovaných uhlovodíků ve vodách mikroextrakcí tuhou fází a GC-MS. *Chemické listy*, **1998**, 92, 751-755.

- (25) Li, X.; Zeng, Z.; Zhou, J. High thermal-stable sol–gel-coated calix[4]arene fiber for solid-phase microextraction of chlorophenols. *Analytica Chimica Acta*, **2004**, 509, 27-37.
- (26) Fattahi, N.; Samadi, S.; Assadi, Y.; Hosseini, M. R. M. Solid-phase extraction combined with dispersive liquid–liquid microextraction-ultra preconcentration of chlorophenols in aqueous samples. *Journal of Chromatography A*, **2007**, 1169, 63–69.
- (27) Bagheri, H.; Saber, A.; Mousavi, S.R. Immersed solvent microextraction of phenol and chlorophenols from water samples followed by gas chromatography–mass spektrometry. *Journal of Chromatography A*, **2004**, 1046, 27-33.
- (28) Pitter, P. *Hydrochemie*; VŠCHT: Praha **2009**, s. 579.
- (29) MATĚJŮ, V. *Kompendium sanačních technologií*; Vodní zdroje Ekomonitor, spol. s.r.o., **2006**, s. 255.
- (30) Klouda, P. *Moderní analytické metody*, Ostrava:Pavel Klouda, **2003**. s. 132.
- (31) Opekar, F.; Jelínek, I.; Rychlovský, P.; Plzák, Z. *Základní analytická chemie*; Nakladatelství Karolinum: Praha, **2010**; s. 1-204.
- (32) [https://fvhe.vfu.cz/informace-o-fakulte/sekce-ustavy/uvozp/teorie\\_spme.pdf](https://fvhe.vfu.cz/informace-o-fakulte/sekce-ustavy/uvozp/teorie_spme.pdf), platné ke dni 16.5.2015.
- (33) Kovács, A.; Kende, A.; Mörtl, M.; Volk, G.; Rikker, T.; Torkos, K. Determination of phenols and chlorophenols as trimethylsilyl derivatives using gas chromatography–mass spektrometry. *Journal of Chromatography A*, **2008**, 1194, 139-142.
- (34) Česká technický norma, 12673, *Jakost vod-Stanovení některých vybraných chlorfenolů metodou plynové chromatografie*, **2000**, s.24.
- (35) <https://web.natur.cuni.cz/~pcoufal/extrakce.pdf>, platné ke dni 16.5.2015.

## **7. Seznam příloh**

**Příloha č. 1** Chromatogram 2-CP acetát stanovený metodou GC–ECD s předchozí acetylací a LLE



**Příloha 1** Chromatogram 2-CP acetát stanovený metodou GC-ECD s předchozí acetylací a LLE