

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

Fakulta chemická

Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí

Mgr. Romana Kostrhounová

**STANOVENÍ FENOLU A CHLORFENOLŮ VE VODÁCH
S POUŽITÍM SPEKTROFOTOMETRIE UV/VIS A HPLC PO
PŘEDCHOZÍM ZKONCENTROVÁNÍ NA PEVNÉ SORBENTY**

**DETERMINATION OF PHENOL AND CHLOROPHENOLS IN
SURFACE WATER USING SPECTROPHOTOMETRY UV/VIS
AND HPLC AFTER PREVIOUS PRECONCENTRATION
BY SOLID PHASE EXTRACTION**

ZKRÁCENÁ VERZE PHD THESIS

Obor: Chemie životního prostředí
Školitel : Prof. RNDr. Lumír Sommer, DrSc. FCH FCH VUT Brno
Oponenti : Prof. RNDr. Ivan Holoubek, CSc. PřF MU v Brně
RNDr. Lubomír Čáp, CSc. UP Olomouc

Datum obhajoby : 17. prosince 2002

KLÍČOVÁ SLOVA

fenol, chlorfenoly, spektrofotometrie, multivariatní kalibrace, vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC), prekoncentrace na pevných sorbentech (SPE)

KEY WORDS

Phenol, Chlorophenols, Spectrophotometry, Multivariate Calibration, High Performance Liquid Chromatography (HPLC), Solid Phase Extraction (SPE)

MÍSTO ULOŽENÍ PRÁCE

areálová knihovna FCH VUT, Purkyňova 118, Brno

© Romana Kostrhounová, 2003

ISBN 80-214-2305-6

ISSN 1213-4198

OBSAH

1 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	4
1.1 Analytické metody stanovení	4
1.2 Spektrofotometrie UV/VIS	5
1.2.1 Stanovení fenolů 4-aminoantipyrinem (4-AAP)	5
1.2.2 Stanovení fenolů MBTH	6
1.2.3 Stanovení fenolů v UV oblasti spektra	6
1.3 Separace a prekoncentrace CPs	7
1.3.1 HPLC	8
1.3.2 Solid Phase Extraction	8
2 CÍL PRÁCE	9
3 HLAVNÍ VÝSLEDKY PRÁCE	9
3.1 Optimalizace reakce fenolu s 4-aminoantipyrinem	9
3.1.1 Optimální podmínky stanovení	10
3.1.2 Kalibrační funkce fenolu pro jednotlivá oxidační činidla	11
3.1.3 Reaktivita chlorfenolů s 4-AAP	11
3.2 Optimalizace reakce fenolu s MBTH	12
3.2.1 Optimalizace reakčních podmínek v alkalickém prostředí	12
3.2.2 Optimalizace reakčních podmínek v kyselém prostředí	13
3.3 Stanovení CPs v UV oblasti spektra	14
3.3.1 Multikomponentní analýza	14
3.4 HPLC	18
3.5 Prekoncentrace CPs v nedisociované formě	20
3.5.1 Vliv objemu vzorku	20
3.5.2 Optimalizovaný postup	20
3.5.3 Analýza povrchové vody.....	21
3.6 Prekoncentrace CPs formou iontových asociátů	22
3.6.1 Vliv koncentrace tenzidu na návratnost sorpce	22
3.6.2 Vliv pH	23
3.6.3 Vliv objemu vzorku	23

3.6.4	<i>Optimalizace metody</i>	24
3.6.5	<i>Analýza povrchové vody</i>	24
4	ZÁVĚR	25
5	LITERATURA	29
6	SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ	29

ABSTRACT

Chlorophenols (CPs) are toxic reactive compounds which are formed in chlorination processes, during combustion of chlorinated organics and pesticides and easily pollute the environment, especially waters.

Some of them may have carcinogenic, mutagenic and teratogenic properties. The bioaccumulation ability of CPs is considered as medium and increases with a number of chlorine atoms in the molecule. According to the US EPA and European Community, phenol and chlorophenols are classified as priority pollutants.

Spectrophotometry is one of the analytical methods used for the determination of chlorophenols in environmental samples. It has been practised usually in two variants – in the visible part of spectrum with 4-aminoantipyrine (4-AAP) or 2-hydrazone-3-methylbenzothiazoline (MBTH) and in the UV part of spectrum by using multicomponent calibration.

The multivariate calibration and PLS program (Partial Least Squares) were employed to evaluate data for a variable number of calibration solutions and wavelengths. The prediction errors of evaluated concentrations of the individual components in unknown solutions depend on the structure of the statistic plan of the calibration set used, the number of calibration solutions and the selected weighted set of wavelengths. Method was carried out for determination of phenols in drinking and surface waters.

CPs are often determined by HPLC with a photometric detection in the UV range. The sensitivity of this detection mode is low and therefore some preconcentration step is needed for the determination of CPs at trace level. Further increase in sensitivity can be achieved by the application of narrow-bore HPLC column.

Solid phase extraction (SPE) of phenol and 15 chlorophenols in acid and alkaline medium was optimized. Various sorbents (Accubond C18, Separon SGX C18 or Amberlite XAD 2) were tested for separation and preconcentration of phenol and CPs. The preconcentration based on the sorption in the molecular form or in the form of ion associates with cationic surfactants was studied in preference and such procedures were used for their determination in river waters.

1 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

V současné době se věnuje značná pozornost analytické chemii fenolů, resp. chlorfenolů (CPs), které ve značné míře vstupují do životního prostředí. CPs jsou odpadními produkty chloračních procesů, dosud jsou vyráběny i jako prostředky pro konzervaci dřeva. Jsou produkovány při výrobě pesticidů, případně mohou vznikat při jejich metabolizaci. Tvoří se rovněž při spalování organických látek obsahujících chlor [1,2].

Primárně jsou chlorfenoly označovány jako kontaminanty vod a půd, v menší míře se vyskytují v atmosféře. Detekované množství CPs lze zachytit i v dešťových a sněhových srážkách, a také exhalátech. Z půd jsou CPs vyplavovány do podzemních a povrchových vod, kde se sorbují v nedisociované formě na huminové látky a do sedimentů s perzistencí po mnoho let [3,4].

Fenoly jsou toxické sloučeniny, u některých z nichž byly prokázány mutagenní, teratogenní a karcinogenní vlastnosti. Bioakumulace CPs je hodnocena jako střední a vzrůstá s rostoucím počtem atomů chloru v molekule fenolu.

Eliminace CPs ze životního prostředí probíhá biologickou či nebiologickou degradací. Degradace ve vodách se děje nejčastěji oxidací, fotolýzou či biodegradací. Rozklad fenolů lze urychlit ozářením vzorku ultrafialovým zářením (< 320 nm), či účinkem chemických sloučenin (např. peroxidem vodíku) [5]. Biodegradace probíhá účinkem mikroorganismů, převážně vlivem bakterií (*Rhodococcus chlorophenolics*), či hub a plísní (*Aspergillus* a *Penicillium*). Všeobecně probíhá hůře degradace výše chlorovaných fenolů a chlorfenolů substituovaných v poloze meta [6].

S ohledem na rizika spojená v přítomnosti CPs v životním prostředí jsou vybrané chlorfenoly zařazeny do seznamu prioritních polutantů US Environmental Protection Agency (US EPA) a Evropské Unie (EU).

1.1 Analytické metody stanovení

S rostoucím výskytem CPs a jejich využitím se klade stále větší důraz na rychlou a citlivou analýzu. Často se používají metody optické, zejména spektrofotometrie UV/VIS, která je citlivá, ale neumožňuje stanovení jednotlivých fenolů ve složitějších směsích, ve kterých se ve vzorcích životního prostředí vyskytují. Z tohoto důvodu se obvykle používané metody neobejdou bez separace.

Ze separačních metod se osvědčily metody chromatografické, zejména GC a HPLC, které spojují výhody separační a identifikační techniky. Protože se však CPs vyskytují v reálných vzorcích ve velmi nízkých koncentracích, je třeba účinnou separační metodu spojit s vhodnou prekoncentrační technikou. Nejefektivnější metodou zkoncentrování chlorfenolů se jeví extrakce na pevnou fázi ve spojení s příslušnou chromatografickou technikou. Mezi nejčastěji používané sorbenty patří chemicky modifikované silikagely či polymerní sorbenty.

1.2 Spektrofotometrie UV/VIS

Pro spektrofotometrii jsou nejpoužívanější metody stanovení na bázi azo- a indolových barviv, barevných komplexních sloučenin a výrazné absorpce fenolů v UV oblasti spektra v alkalickém prostředí.

Při kritickém zhodnocení metod a podrobném studiu mechanismu reakcí byl sledován cíl nalézt optimální experimentální podmínky pro stanovení fenolů ve vzorcích životního prostředí.

1.2.1 Stanovení fenolů 4-aminoantipyrinem (4-AAP)

Reakce fenolu s činidlem 4-AAP probíhá v alkalickém prostředí v přesně stanovených mezích pH za přítomnosti oxidačního činidla a poskytuje červenofialové barvivo indofenolového typu.

Reakce je ovlivněna polohou substituentů vůči –OH skupině na aromatickém kruhu. U homologů se substituovanou p- polohou má zbarvení podstatně menší intenzitu, než u homologů se substituovanou o- a m- polohou, neboť činidlo se váže na aromatické jádro v p- pozici.

Významný vliv na průběh reakce má pH, jehož hodnota musí být udržována v přesně stanovených mezích v rozsahu $\pm 0,1 - 0,2$ pH jednotek. Rozhodující je i použitý tlumivý roztok. V nedostatečně tlumených roztocích probíhá výrazná změna pH v průběhu reakce, což ovlivňuje konečné zbarvení produktů.

Časová závislost vývoje zbarvení je závislá na použitém oxidačním činidle. V případě hexakynoželezitanu draselného je maximální intenzity zbarvení dosaženo během několika sekund, v případě peroxidisíranu draselného během desítek minut.

Barevná intenzita zbarvení se měří při vlnové délce 510 nm, v případě extrakce do chloroformu při vlnové délce 460 nm [7,8].

1.2.2 Stanovení fenolů MBTH

Reakce fenolu s činidlem MBTH (2-hydrazon-3-methylbenzothiazolin) probíhá v kyselém i zásaditém prostředí v přítomnosti oxidačního činidla v para poloze fenolové sloučeniny, nebo v orto poloze, pokud je p- obsazena.

V alkalickém prostředí probíhá reakce za přítomnosti oxidačního činidla hexakvanoželezitanu draselného. Hodnota pH je upravována v požadovaných mezích $9,0 \pm 0,5$ Britton-Robinsonovým tlumičem. Problémem je srážení meziproductů MBTH v čistě vodném alkalickém prostředí. Ten se řeší přidávkem vodou mísitelného organického rozpouštědla (např. ethanolu), které rozpouští oxidační produkty MBTH v reakční směsi a dochází tím ke stabilizaci produktu [9].

V kyselém prostředí se jako oxidačního činidla používá síranu ceričitoamonného v prostředí kyseliny sírové (0,4 – 5,0 %). Barevný intenzivně červený produkt se stabilizuje přidávkem tlumiče (NaOH + H₃BO₃ + EDTA) a ethanolu ve vzájemném poměru 1 : 1 [10].

Absorpční maximum reakčních produktů se pohybuje v rozmezí vlnových délek 495 – 610 nm v závislosti na struktuře sledované látky. Ke zvýšení citlivosti je možné extrahovat zbarvení do chloroformu s téměř 100 % návratností.

1.2.3 Stanovení fenolů v UV oblasti spektra

Aromatické sloučeniny s elektronovými přechody $\pi-\pi^*$ a auxochromními skupinami (-OH, -NH₂) vykazují v UV rozdílná spektra v závislosti na pH roztoku. Je to způsobeno reakcí mezi n- elektronovým párem kyslíkového atomu a π elektronovým systémem aromatického kruhu fenolů.

Z experimentálního studia vyplývá vhodnost stanovení CPs v UV oblasti spektra v bazickém prostředí. S rostoucí hodnotou pH reakčního prostředí se projevuje bathochromní efekt a absorpční maxima se posouvají do oblasti vyšších vlnových délek. Současně narůstá hodnota molárního absorpčního koeficientu ve srovnání s výsledky dosaženými při pH 2. V alkalické oblasti bylo doporučeno prostředí 0,1 mol/l NaOH a 1,0 mol/l NaOH [11].

Aplikace multikomponentní analýzy

Pro vyhodnocení koncentrací v multikomponentních přeurčených systémech se osvědčila metoda Partial Least Squares (PLS), někdy také nazývána projekcí do latentních struktur.

Základním úkolem PLS je současné nalezení koncentrací komponent v neznámém vzorku z naměřených hodnot signálů (absorbance). Metoda pracuje ve dvou krocích – 1. kalibrace (nalezení vztahu mezi naměřenými hodnotami absorbancí a koncentracemi komponent

u známého kalibračního systému), 2. *predikce* (určení koncentrací jednotlivých komponent v neznámém vzorku na základě modelu nalezeného v 1. fázi kalibrace).

Základním předpokladem správnosti výsledků získaných metodou PLS je shoda zjištěné koncentrace komponenty s její skutečnou hodnotou. Tuto shodu můžeme vyjádřit pomocí CRPE a MRPE.

CRPE – Component Relative Prediction Error, relativní chyba stanovení dané komponenty

$$CRPE_j = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^t (c_{ij} - \hat{c}_{ij})^2}{\sum_{i=1}^t c_{ij}^2}} \cdot 100 \quad [\%]$$

MRPE - Mean Relative Prediction Error, střední chyba stanovení pro všechny komponenty a vzorky

$$MRPE = \left[\sum_{i=1}^t \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^m (c_{ij} - \hat{c}_{ij})^2}{\sum_{j=1}^m c_{ij}^2}} \right] \cdot t^{-1} \cdot 100 \quad [\%]$$

t – počet testovaných roztoků

m - počet komponent (složek ve směsi)

c_{ij} – daná koncentrace komponenty (mol/l)

\hat{c}_{ij} – vypočítaná koncentrace komponenty (mol/l)

Výsledná chyba stanovení jednotlivých komponent je závislá na počtu kalibračních roztoků, na výběru vlnových délek a zejména na tvaru statistického plánu kalibračního souboru.

Podrobný popis výpočtu jednotlivých chyb a struktury statistických plánů kalibračních souborů popisuje práce [12,13].

1.3 Separace a prekoncentrace CPs

Chlorfenoly se vyskytují v povrchových i odpadních vodách jako složité směsi a jejich stanovení se neobejde bez účinné separační techniky. Pro analýzu CPs se dobře osvědčila HPLC, spojující vysokou separační účinnost s možností off-line propojení s prekoncentrační technikou SPE.

1.3.1 HPLC

Metoda HPLC pro stanovení CPs nejčastěji pracuje v systému s reversními fázemi. Jako mobilní fáze se volí vodné roztoky organických rozpouštědel (acetonitril, methanol, tetrahydrofuran). Základními vlastnostmi ovlivňujícími výběr chromatografického systému jsou v případě chlorfenolů jejich polarita a schopnost disociace. Pro separaci CPs je nutno pH mobilní fáze upravovat přidávkem kyseliny (octová, fosforečná) nebo pufru (acetátový, fosfátový) o pH 2,5 – 5,0 z důvodů potlačení disociace fenolů. Jako stacionární fáze se nejčastěji používají chemicky vázané fáze na bázi silikagelu. [14,15].

Nejčastějším typem detekce používané pro stanovení CPs je detekce v UV oblasti spektra. Absorpční maxima fenolů leží v oblasti 230 nm, 270 – 290 nm a 305 nm (pentachlorfenol). Vlnová délka 230 nm umožňuje detekovat všechny chlorfenoly, ale nevýhodou je současná vysoká absorpce balastních látek obsažených ve vzorku. Z důvodů odstranění interference balastních látek se volí vlnová délka 280 nm. Nevýhodou je však snížení detekčních limitů ve srovnání s hodnotami získanými pro 230 nm.

1.3.2 Solid Phase Extraction

Pro zkoncentrování CPs a jejich separaci od rušivých prvků matrice je velmi efektivní extrakce na pevnou fázi. Pro prekoncentraci přichází v úvahu dva typy sorpcí. První typ je sorpce v nedisociované formě, tj. v kyselém prostředí. Druhou metodou je sorpce formou iontových asociátů v alkalickém prostředí. V obou případech se jako sorbenty používají hydrofobní chemicky modifikované silikagely (oktyl-, oktadecyl-) či polymerní sorbenty na bázi styrendivinylbenzenových kopolymerů (Amberlite XAD 2, XAD 4).

Prekoncentrace v nedisociované formě

Disociace CPs se potlačuje přidávkem silnějších kyselin, hodnota pH vzorku se upravuje v rozmezí 2,5 – 5,0. Zvýšení iontové síly přidávkem vysolovacích činidel (NaCl) zvyšuje výtěžnost izolačního postupu.

Kondicionace sorbentu je prováděna organickými rozpouštědly (methanol, acetonitril) a následně solventem, ve kterém je rozpuštěna extrahovaná látka, obvykle vodou upravenou na požadované pH. K eluci analytu jsou používána vhodná eluční rozpouštědla (methanol, acetonitril, aceton) v off-line zapojení nebo mobilní fáze v on-line zapojení s HPLC [16,17].

Prekoncentrace tvorbou iontových asociátů

Při sorpci CPs se využívá k tvorbě asociátů reakce mezi fenolátovým aniontem a alkylamoniovými solemi nebo kationaktivními tenzidy. U tohoto typu tenzidů je účinnou hydrofilní skupinou kation a hydrofobní část tvoří uhlovodíkový řetězec různého typu. S rostoucí koncentrací tenzidu v daném rozpouštědle se začne projevovat amfifilnost molekul tenzidu na větší částice.

Sorpce formou iontových asociátů probíhá v alkalickém prostředí, kdy nastává disociace fenolů. Kondicionace sorbentu se provádí organickým rozpouštědlem a následně roztokem iontově párového činidla v submicelární koncentraci. K eluci jsou používána organická rozpouštědla s obsahem 1% kyseliny octové [18,19].

2 CÍL PRÁCE

V předkládané práci bylo studováno a optimalizováno spektrofotometrické stanovení fenolu a vybraných chlorfenolů ve viditelné oblasti spektra s činidly 4-aminoantipyrin (4-AAP) a 2-hydrazon-3-methylbenzothiazolin (MBTH). Byly optimalizovány určující podmínky reakce a optimální parametry metody. Byla studována možnost multikomponentního stanovení fenolů s multivariatní kalibrací v alkalickém prostředí pomocí metody PLS v UV oblasti spektra.

Dále byla studována metoda HPLC směsí fenolu a 15 chlorfenolů na koloně malého průměru ve spojení s detektorem s diodovým polem. Bylo optimalizováno složení a gradient mobilní fáze, teplota kolony a nastříkovaný objem vzorku.

Pro separaci a prekoncentraci fenolu a CPs bylo použito nabohacení CPs metodou SPE v kyselém a alkalickém prostředí v molekulové formě nebo ve formě iontového asociátu s kationaktivním tenzidem. Jako sorbenty byly použity modifikovaný silikagel C18 a makroporózní sorbent Amberlite XAD 2 na bázi kopolymeru styrenu a divinylbenzenu.

Metody stanovení fenolu a CPs byly testovány na povrchových vodách se standardními přísadkami fenolů.

3 HLAVNÍ VÝSLEDKY PRÁCE

3.1 Optimalizace reakce fenolu s 4-aminoantipyrinem

Průběh reakce fenolu s činidlem 4-aminoantipyrinem (4-AAP) je závislý na pH reakčního prostředí, na použitém typu oxidačního činidla a také na koncentračním poměru

4-AAP : oxidační činidlo. V práci byla studována čtyři oxidační činidla : hexakynoželezitan draselný, peroxodisíran draselný, peroxodisíran amonný a chloramin T.

Analytické výsledky byly vyhodnocovány vždy ze tří paralelních měření, meze stanovitelnosti a směrodatné odchylky výsledků byly vypočítány z kalibračních křivek dle vztahů uvedených v literatuře [19]. Upravený Sandellův index vyjadřuje koncentraci analytu v $\mu\text{g/ml}$ pro absorpenci 0,01.

3.1.1 Optimální podmínky stanovení

Reakce fenolu s činidlem 4-AAP probíhala v 50 ml vzorku při koncentraci 4-AAP 0,6 mmol/l. V případě použití hexakynoželezitanu draselného bylo optimální pH $10 \pm 0,2$ a koncentrace $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 1,5 mmol/, barevná intenzita produktu byla snímána okamžitě po přidavku oxidovadla. Při použití peroxodisíranu draselného činila optimální koncentrace $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 3,0 mmol/l, reakce probíhala při pH $9,0 \pm 0,2$ a maximální intenzity zbarvení bylo dosaženo po 20 minutách. Oxidační činidlo peroxodisíran amonný bylo přidáváno v koncentraci 3,0 mmol/l, reakce probíhala při pH $9,5 \pm 0,2$ a absorbance produktu byla měřena 60 min po přidavku $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$. V případě chloraminu T činila optimální koncentrace oxidačního činidla 3,0 mmol/l, pH roztoku bylo před reakcí upravováno kyselinou chlorovodíkovou na hodnotu $4,0 \pm 0,2$ a absorbance produktu byla měřena 10 min po přidavku chloraminu T.

Optimální podmínky pro jednotlivá oxidační činidla jsou zkráceně uvedeny v tabulce 1, $S_{R,rel}$ byla vypočítána pro koncentraci fenolu 10 mg/l.

Tab. 1 : Optimální podmínky reakce fenolu s 4-AAP pro použitá oxidační činidla

oxidační činidlo	pH	t (min)	λ_{max} (nm)	poměr 4-AAP : ox. činidlo	citlivost ϵ (l/mol/cm) $\cdot 10^{-3}$	$S_{R,rel}$ (%)
$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	10,0	okamžitě	505	1 : 2,5	12,6	0,13
$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$	9,0	20	505	1 : 5	12,2	0,67
$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	9,5	60	510	1 : 5	12,2	0,20
chloramin T	4,0	10	512	1 : 5	11,4	2,50

3.1.2 Kalibrační funkce fenolu pro jednotlivá oxidační činidla

Kalibrační funkce byly nasnímány za optimálních podmínek pro každé oxidační činidlo v koncentračním rozsahu fenolu 2,0 – 12,0 mg/l.

Tab. 2: Kalibrační závislosti fenolu pro jednotlivá oxidační činidla

oxidační činidlo	regresní rovnice ($\mu\text{g/ml}$)	korelační koeficient	Sandellův index ($\mu\text{g/ml}$)	mez stanovitelnosti ($\mu\text{g/ml}$)		směrodatná odchylka s_{xi} ($\mu\text{g/ml}$)
				$c_{\text{lim } 1}$	$c_{\text{lim } 2}$	
$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	$y = 0,1296 x + 0,0219$	0,9992	$7,29 \cdot 10^{-2}$	$1,96 \cdot 10^{-1}$	$6,75 \cdot 10^{-2}$	$2,18 \cdot 10^{-1}$
$\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$	$y = 0,1238 x + 0,0419$	0,9997	$7,55 \cdot 10^{-2}$	$2,77 \cdot 10^{-1}$	$8,22 \cdot 10^{-2}$	$2,49 \cdot 10^{-1}$
$(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$	$y = 0,1237 x + 0,0361$	0,9996	$7,70 \cdot 10^{-2}$	$3,95 \cdot 10^{-1}$	$9,25 \cdot 10^{-2}$	$2,53 \cdot 10^{-1}$
chloramin T	$y = 0,1213 x + 0,0864$	0,9993	$7,79 \cdot 10^{-2}$	$4,25 \cdot 10^{-1}$	$1,05 \cdot 10^{-1}$	$2,88 \cdot 10^{-1}$

Nejvhodnějším oxidačním činidlem pro stanovení fenolu s 4-AAP se jeví $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Produkt reakce vzniká okamžitě a je stabilní nejméně 60 min. Pro toto oxidovadlo bylo dosaženo nejvyšší citlivosti (12600 l/mol/cm) a současně nejnižších mezí stanovitelnosti ($6,75 \cdot 10^{-2} - 1,96 \cdot 10^{-1} \mu\text{g/ml}$).

3.1.3 Reaktivita chlorfenolů s 4-AAP

Reakce chlorfenolů s činidlem 4-AAP probíhala za optimálních podmínek nalezených pro oxidační činidlo $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Byly sestrojeny kalibrační křivky v rozsahu 2,0 – 12,0 mg/l.

Ze skupiny monochlorfenolů probíhá reakce nejefektivněji s 2-CP, u kterého dosahuje Sandellův index (SI) hodnoty $8,03 \cdot 10^{-2} \mu\text{g/ml}$, ve srovnání s 4-CP, jehož reaktivita je nejnižší ($\text{SI} = 2,34 \cdot 10^{-1} \mu\text{g/ml}$). Ve skupině dichlorfenolů probíhá reakce nejlépe s 2,3-DCP ($\text{SI} = 1,32 \cdot 10^{-1} \mu\text{g/ml}$), který má substituenty v poloze o- a m- vůči $-\text{OH}$ skupině. S činidlem nejméně ochotně reaguje 2,4-DCP ($\text{SI} = 5,05 \cdot 10^{-1} \mu\text{g/ml}$), který má druhý Cl substituent vázán v poloze p- vůči $-\text{OH}$ skupině. Ze skupiny trichlorfenolů je reaktivita největší u 2,3,6-TCP ($\text{SI} = 4,23 \cdot 10^{-1} \mu\text{g/ml}$), 2,3,5-TCP s činidlem 4-AAP prakticky nereaguje, stejně jako PCP.

3.2 Optimalizace reakce fenolu s MBTH

3.2.1 Optimalizace reakčních podmínek v alkalickém prostředí

V alkalickém prostředí byl jako oxidační činidlo použit hexakynoželezitan draselný. Pro dané oxidační činidlo byly optimalizovány všechny reakční parametry. Vyhodnocování výsledků bylo prováděno způsobem popsaným v kap. 3.1.

Optimalizovaný postup probíhal v 10 ml vzorku. Ke 3 ml amoniakálního tlumiče o pH 9,0 bylo přidáno 5 ml vodného roztoku fenolu a 0,5 ml roztoku MBTH o výsledné koncentraci 0,2 mmol/l. Po 5 minutách od smíchání reaktantů bylo přidáno 0,5 ml $K_3[Fe(CN)_6]$ o výsledné koncentraci 0,4 mmol/l a vzniklý fialový produkt byl stabilizován 1 ml Et-OH, jehož výsledná koncentrace v roztoku byla 10%.

Kalibrační křivka je lineární v rozsahu 5 – 25 mg/l (0,053 – 0,265 mmol/l) fenolu. Při koncentraci fenolu vyšší než 25 mg/l dochází k zakřivení kalibrační funkce. Z roztoku se vylučuje sraženina MBTH, která je zbarvena produkty reakce ulpívajícími na jejím povrchu.

Tab. 3: Kalibrační závislost fenolu po reakci s MBTH v alkalickém prostředí

λ_{\max} (nm)	$\epsilon \cdot 10^{-3}$ (l/mol/cm)	regresní funkce	korelační koeficient	Sandellův index ($\mu\text{g/ml}$)	mez stanovitelnosti ($\mu\text{g/ml}$)		směrodatná odchylka ($\mu\text{g/ml}$)
					c_{lim1}	c_{lim2}	
517	1,2	$y=0,0117x + 0,0113$	0,9992	$7,20 \cdot 10^{-1}$	$9,32 \cdot 10^{-1}$	$5,10 \cdot 10^{-1}$	$3,11 \cdot 10^{-1}$

Citlivost stanovení ($\epsilon = 1\,240$ l/mol/cm) je velmi malá i pro stanovení koncentrací fenolu 25 mg/l, resp. 0,265 mmol/l. Maximální přípustná koncentrace fenolu v povrchových vodách činí 0,002 mg/l, resp. $2,125 \cdot 10^{-8}$ mol/l. V našem případě byla nejnižší použitelná koncentrace při kalibraci metody 5,0 mg/l. Upravený Sandellův index pro tuto metodu dosahuje koncentrace 0,72 mg/l (resp. $\mu\text{g/ml}$), tj. $7,650 \cdot 10^{-6}$ mol/l. Využití reakce fenolu s MBTH v alkalickém prostředí je pro stanovení fenolu v environmentálních vzorcích prakticky nepoužitelné.

Optimalizovaný postup byl také testován na vybraných CPs, a to vždy na jednom zástupci ze skupiny chlorfenolů, tj. na 2-CP, 2,3-DCP a 2,3,6-TCP. Reaktivita klesá s rostoucím počtem atomů Cl v molekule CPs. Vzniká produkt růžového zbarvení, které však velmi rychle mizí a v průběhu 1 min se stává roztok bezbarvým. Cl substituent pravděpodobně způsobuje nestabilitu produktu a reakci proto nelze použít ani pro stanovení CPs.

3.2.2 Optimalizace reakčních podmínek v kyselém prostředí

V kyselém prostředí bylo jako oxidační činidlo použito síranu ceričitoamonného v prostředí kyseliny sírové. Pro dané oxidační činidlo byla provedena optimalizace reakčních parametrů, komponent a především byl sledován vliv neiontových tenzidů. Osvědčil se tenzid Tween 20 (polyoxyethylensorbitan monolaurate). Vyhodnocování výsledků bylo prováděno způsobem popsáním v kap. 3.1.

Optimalizovaný postup probíhal v 10 ml vzorku. K 1 ml roztoku Tween 20 o výsledné koncentraci 1,0 mmol/l byl přidán 1 ml činidla MBTH o konečné koncentraci 0,2 mmol/l a 5 ml vodného roztoku fenolu. Po 5 minutách od smíchání reaktantů byl přidán 1 ml roztoku síranu ceričitoamonného o výsledné koncentraci 0,4 mmol/l v prostředí 0,075 mol/l H_2SO_4 a 2 ml ethanolu, jehož celkové množství v roztoku činilo 20 %. Absorbance produktu byla proměřena po 15 minutách.

Kalibrační křivka byla sestrojena pro koncentraci fenolu v rozmezí 0,05 – 5,00 mg/l. Parametry kalibrační funkce jsou uvedeny v tabulce 4.

Tab. 4: Kalibrační závislost fenolu po reakci s MBTH v kyselém prostředí

λ_{\max} (nm)	$\epsilon \cdot 10^{-3}$ (l/mol/cm)	regresní funkce	korelační koeficient	Sandellův index ($\mu\text{g/ml}$)	mez stanovitelnosti ($\mu\text{g/ml}$)		směrodatná odchylka ($\mu\text{g/ml}$)
					c_{lim1}	c_{lim2}	
495	14,5	$y=0,1411x + 0,0671$	0,9998	$1,25 \cdot 10^{-2}$	$6,23 \cdot 10^{-2}$	$3,37 \cdot 10^{-2}$	$3,64 \cdot 10^{-2}$

Reaktivita chlorfenolů s MBTH

Reakce chlorfenolů s činidlem MBTH probíhala za optimálních podmínek nalezených pro fenol. Byly sestrojeny kalibrační křivky v rozsahu 0,01 – 5,0 mg/l (monochlorfenoly), 0,05 – 5,0 mg/l (dichlorfenoly) a 1,0 – 10,0 mg/l (trichlorfenoly).

Ze skupiny monochlorfenolů projevuje největší reaktivitu s MBTH 2-CP, u kterého dosahuje Sandellův index (SI) hodnoty $4,09 \cdot 10^{-2} \mu\text{g/ml}$, ve srovnání s 4-CP, jehož reaktivita je nejnižší (SI = $6,99 \cdot 10^{-2} \mu\text{g/ml}$). Ve skupině dichlorfenolů probíhá reakce nejlépe s 2,3-DCP (SI = $9,69 \cdot 10^{-2} \mu\text{g/ml}$), který má substituenty v poloze o- a m- vůči –OH skupině. S činidlem nejhůře reaguje 2,6-DCP (SI = $1,11 \cdot 10^{-1} \mu\text{g/ml}$). Ze skupiny trichlorfenolů podstupuje reakci nejsnáze 2,3,6-TCP (SI = $2,75 \cdot 10^{-1} \mu\text{g/ml}$), nejhůře 2,3,5-TCP (SI = $7,89 \cdot 10^{-1} \mu\text{g/ml}$). S činidlem nereaguje PCP, který má substituovány všechny polohy Cl substituenty.

3.3 Stanovení CPs v UV oblasti spektra

Fenol a chlorfenoly vykazují v UV oblasti rozdílná spektra v závislosti na pH roztoku. V práci byla studována závislost hodnoty molárního absorpčního koeficientu (ϵ) na hodnotě pH reakčního prostředí v rozmezí pH 2,0 – 11,0 a dále v prostředí 0,1 mol/l NaOH a 1,0 mol/l NaOH.

S rostoucím pH a s postupnou disociací fenolického hydroxylyl dochází u fenolu a jednotlivých CPs k nárůstu hodnot ϵ (l/mol/cm). Příkladem může být fenol – při pH 2,0 dosahuje ϵ hodnoty 1450 l/mol/cm, při pH 11,0 narůstá na 2410 l/mol/cm a v prostředí 1,0 mol/l NaOH dosahuje hodnoty 2940 l/mol/cm. Současně nastává bathochromní posun λ_{\max} (nm) absorpčního maxima do oblasti vyšších vlnových délek. U fenolu lze pozorovat posun z 269,0 nm (pH 2,0) k 288,0 nm (1,0 mol/l NaOH). Pro studium bylo proto využito prostředí 1,0 mol/l NaOH.

3.3.1 Multikomponentní analýza

Pro stanovení směsi fenolů a jejich screening ve vodách byla použita spektrofotomerická analýza s multivariatní kalibrací v přeurčených systémech, s použitím Partial Least Squares (PLS).

Volba vlnových délek je závislá na tvaru absorpčních spekter jednotlivých komponent. Fenol a CPs vykazují ve spektru dvě absorpční maxima – v oblasti 230 nm a 280 - 320 nm v závislosti na počtu atomů chloru v molekule CPs. Pro PLS bylo zvoleno druhé absorpční maximum v oblasti vyšších vlnových délek. Při vlnové délce 230 nm se spektra jednotlivých CPs značně překrývají a absorbuje řada dalších organických látek obsažených ve vodách. Měření hodnot absorbance bylo prováděno při 24 vlnových délkách v rozmezí 274 – 320 nm po 2 nm.

V práci byly testovány dva systémy CPs : *systém A* - Ph + 2-CP + 2,6-DCP + 2,3,6-TCP (poskytující nejvyšší odezvu signálu z dané skupiny CPs) a *systém B*- Ph + 2-CP + 3-CP + 4-CP (nejčastěji se vyskytující v reálných vzorcích). Koncentrační rozsah CPs se pohyboval v rozmezí 100 – 10 μ mol/l v prostředí 1,0 mol/l NaOH a 1,0 mmol/l EDTA, s použitím PLS pro různý počet kalibračních roztoků a různé statistické plány kalibračních roztoků s použitím dvou centrálních bodů při vyhodnocení absorpčních křivek a jejich 1. derivací [12].

Analýza modelové směsi A

Optimalizace byla zaměřena na tři základní body, a to na tvar kalibračního setu, polohu centrálního bodu a koncentrační rozsah kalibračního setu.

V práci byly nejprve porovnány chyby predikce pro zvolené kalibrační sety Complete Factorial Design - CFD (17 roztoků), Fractional Factorial Design - FFD (9 roztoků) a Box

Behnken Plan – BBP (13 roztoků) a za použití aritmetického (leží uprostřed kalibračního setu – tj. 55 $\mu\text{mol/l}$) a geometrického (posiluje oblast nižších koncentrací – tj. 31,6 $\mu\text{mol/l}$) centrálního bodu. Pro testování byly použity 4 testovací roztoky (test set) s koncentracemi ve $\frac{3}{4}$ (77,5 $\mu\text{mol/l}$) a $\frac{1}{4}$ (32,5 $\mu\text{mol/l}$) celkového rozsahu koncentrací. Složení kalibračních setů a test setu je uvedeno v tabulce 5.

Tab. 5 : Statistické plány kalibračních a testovacích roztoků

roztok	komponenta				roztok	komponenta			
	1	2	3	4		1	2	3	4
		(a)				(b)			
1	+	+	+	+	1	+	+	+	+
2	+	+	+	-	2	+	+	-	-
3	+	+	-	+	3	+	-	+	-
4	+	+	-	-	4	+	-	-	+
5	+	-	+	+	5	-	+	+	-
6	+	-	+	-	6	-	+	-	+
7	+	-	-	+	7	-	-	+	+
8	+	-	-	-	8	-	-	-	-
9	-	+	+	+	9	0	0	0	0
10	-	+	+	-					
11	-	+	-	+			(c)		
12	-	+	-	-	1	0	+	+	0
13	-	-	+	+	2	+	0	+	+
14	-	-	+	-	3	-	0	+	-
15	-	-	-	+	4	0	-	+	0
16	-	-	-	-	5	+	+	0	+
17	0	0	0	0	6	-	+	0	-
					7	+	-	0	+
					8	-	-	0	-
		(d)			9	0	+	-	0
1	+0,5	-0,5	-0,5	+0,5	10	+	0	-	0
2	-0,5	+0,5	+0,5	-0,5	11	-	0	-	-
3	-0,5	-0,5	+0,5	-0,5	12	0	-	-	0
4	+0,5	+0,5	-0,5	+0,5	13	0	0	0	0

Kalibrační roztoky : CFD (a), FFD (b), BBP (c), testovací roztoky (d)

Symbols: + horní hladina koncentrace (100 $\mu\text{mol/l}$), - spodní hladina koncentrace

(10 $\mu\text{mol/l}$), 0 centrální bod CB (55 $\mu\text{mol/l}$, 31,6 $\mu\text{mol/l}$), +0.5 $\frac{3}{4}$ koncentrační škály

(77,55 $\mu\text{mol/l}$), $-0,5 \frac{1}{4}$ koncentrační škály (32,5 $\mu\text{mol/l}$)

Pro výběr tvaru kalibračního setu a polohy centrálního bodu je rozhodující míra shody vypočtených koncentrací složek, charakterizovaná relativními chybami predikce MRPE a CRPE [%], s jejich skutečnými hodnotami. Po srovnání relativních chyb predikce pro kalibrační sety vychází nejlépe CFD, kdy dosahuje hodnota MRPE pro všechny komponenty a roztoky hodnoty 5,2 %, ve srovnání s FFD (8,4 %) a BBP (7,1 %) pro aritmetický centrální bod. Pro geometrický centrální bod dosahuje MRPE následujících hodnot - 11,6 % (CFD), 15,4 % (FFD) a 12,7 % (BBP). Z těchto výsledků je patrné, že pro další analýzy je výhodné pracovat s kalibračním plánem CFD se 17 kalibračními roztoky a aritmetickým centrálním bodem, který leží uprostřed koncentrací kalibračního setu.

Tab. 6: Srovnání relativních chyb predikce test setu pro různé kalibrační statistické plány v systému A

kalib. plán	aritmetický centrální bod					geometrický centrální bod				
	CRPE [%]				MRPE [%]	CRPE [%]				MRPE [%]
	fenol	2CP	2,6DCP	2,3,6TCP		fenol	2CP	2,6DCP	2,3,6TCP	
CFD	4,8	5,6	5,2	4,6	5,2	11,1	11,9	12,9	11,0	11,6
FFD	7,1	8,9	8,4	8,5	8,4	14,2	16,4	16,9	14,6	15,4
BBP	7,4	7,8	7,9	7,1	7,7	11,7	12,9	12,9	12,6	12,7

Dále byl testován koncentrační rozsah kalibračního setu, a to ve dvou variantách : vyšší rozsah (100 – 10 $\mu\text{mol/l}$) a nižší rozsah (50–10 $\mu\text{mol/l}$) při použití CFD a aritmetického centrálního bodu. Hodnoty MRPE pro vyšší rozsah koncentrací nabývají hodnoty 5,2 %, pro nižší rozsah 5,1 %. Jsou to hodnoty srovnatelné, ale pro další analýzy byl zvolen nižší rozsah, který lépe vystihuje reálné obsahy CPs.

Metoda byla ověřena na reálných vzorcích pitné, povrchové a huminové vody. V případě pitné vody dosahuje hodnota MRPE 8,2 %, povrchová voda 7,8 % a huminová voda 9,2 %.

Analýza modelové směsi B

Pro stanovení Ph a monochlorfenolů byly vybrány optimální podmínky nalezené pro systém A, tj. CFD se 17 kalibračními roztoky, nižší rozsah koncentrací (50-10 $\mu\text{mol/l}$) a aritmetický centrální bod (30 $\mu\text{mol/l}$). Testovací set obsahoval 4 roztoky stejného složení jako v systému A ($1/4$ - 20 $\mu\text{mol/l}$, $3/4$ - 40 $\mu\text{mol/l}$). Relativní chyby predikce MRPE dosáhly hodnoty 15,8 %, což je způsobeno vysokým stupněm překrytí absorpčních spekter jednotlivých analytů.

Tyto chyby je možné snížit vyhodnocením 1.derivace absorpčních spekter studovaných CPs, které zpřesňují polohu absorpčního maxima ve srovnání s nederivovaným signálem. Metoda byla přímo ověřena na reálných vzorcích povrchové a huminové vody a umělé huminové vody připravené z nízkomolekulární huminové kyseliny MAR 244.

Tab. 7 : Relativní chyby predikce pro vzorky povrchové, huminové a umělé huminové vody pro hodnoty absorbance a 1. derivace v systému B

typ vody	absorbance					1. derivace				
	CRPE [%]				MRPE [%]	CRPE [%]				MRPE [%]
	fenol	2-CP	3-CP	4-CP		fenol	2-CP	3-CP	4-CP	
povrchová	19,4	22,7	24,1	19,4	21,7	15,6	18,0	18,5	15,0	16,4
huminová	18,8	22,2	22,4	18,7	20,7	16,4	17,9	19,3	15,4	16,9
MAR 244	17,5	21,3	21,0	16,4	19,4	15,0	18,2	17,7	14,8	16,2

Hodnoty MRPE při vyhodnocení nederivovaného signálu se pohybují v rozmezí 21,7 -19,4 %. Po 1. derivaci absorbance a vyhodnocení dat dochází ke snížení MRPE v rozmezí hodnot 16,9 - 16,2 %.

3.4 HPLC

HPLC separace fenolu a CPs byla prováděna na koloně malého průměru Supelcosil LC PAH 250 x 2,1 mm plněné silikagelem o velikosti částic 5 µm modifikovanými oktadecylovými řetězci.

Nejlepších výsledků bylo dosaženo při gradientové separaci s mobilní fází 10 mmol/l fosfátový tlumič o pH 3,5 – metanol (35% v/v metanol po dobu 3,5 min, lineární gradient do 100% v/v metanolu ve 27. min, metanol po dobu 3 min; průtok 0,35 ml/min) při teplotě 18°C. Nastříkaná objem vzorku činil 15 µl, při nástřiku 20 µl již docházelo k deformaci chromatografických píků.

Chlorfenoly byly detekovány na základě retenčních časů a na základě jejich spekter naměřených v UV oblasti při vlnových délkách 230 nm a 280 nm. Kvantifikace analytů byla provedena metodou externí kalibrace při koncentracích CPs v rozmezí 0,1 µg/ml – 10,0 µg/ml. Meze detekce byly určeny pro poměr signál/šum S/N=3, meze stanovitelnosti pro poměr S/N=5. Úroveň šumu byla stanovena metodou ASTM (ASTM E 685-93, American Society for Testing and Materials).

Meze detekce se pohybují v rozmezí 0,09 µg/ml (PCP) – 0,80 µg/ml (Ph) při detekci 230 nm a v rozmezí 0,57 µg/ml (2,4-DCP) – 1,51 µg/ml (2-CP) při detekci 280 nm. Meze stanovitelnosti leží v rozsahu 0,16 µg/ml (PCP) – 1,33 µg/ml (Ph) při 230 nm, pro vlnovou délku 280 nm se pohybují v rozsahu 0,96 µg/ml (2,4-DCP) – 2,52 µg/ml (2-CP).

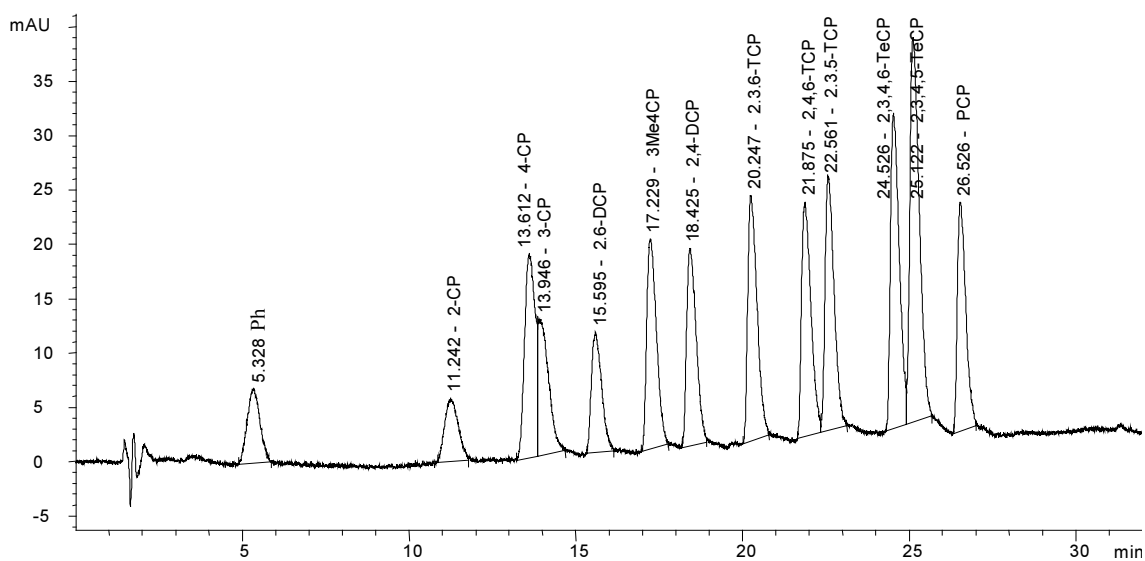
Vzhledem k tomu, že se při celkovém počtu 16-ti testovaných analytů nepodařilo vždy dosáhnout jejich úplné separace, byly připraveny dva pracovní roztoky standardů označené jako směs A a směs B. Separace je nedostatečná u dvojic 2,3-DCP/3-Me-4-CP, 2,4-DCP/2,5-DCP a 2,3,4-TCP/2,4,6-TCP.

Směs A : Ph, 2-CP, 4-CP, 3-CP, 2,6-DCP, 3-Me-4-CP, 2,4-DCP, 2,3,6-TCP, 2,4,6-TCP, 2,3,5-TCP, 2,3,4,6-TeCP, 2,3,4,5-TeCP a PCP

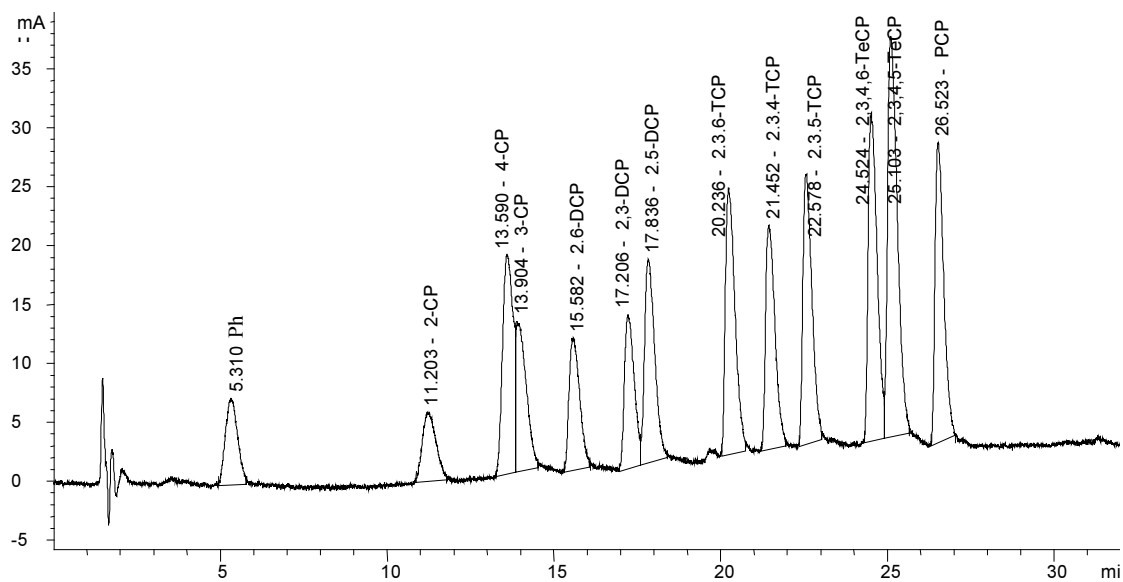
Směs B : Ph, 2-CP, 4-CP, 3-CP, 2,6-DCP, 2,3-DCP, 2,5-DCP, 2,3,6-TCP, 2,3,4-TCP, 2,3,5-TCP, 2,3,4,6-TeCP, 2,3,4,5-TeCP a PCP

Chromatogramy směsí A a B o koncentraci analytů 10 µg/ml uvádí obr.1. Analýza byla provedena za optimalizovaných podmínek složení mobilní fáze a gradientu, při detekci 230 nm, teplotě kolony 18°C a nástřiku 15 µl.

A



B



Obr. 1 : Chromatogramy směsí chlorfenolů A a B

3.5 Prekoncentrace CPs v nedisociované formě

Prekoncentrace fenolu a chlorfenolů v nedisociované formě probíhala v kyselém prostředí, ve kterém je potlačena disociace CPs. Metoda byla testována na dvou typech sorbentů – na modifikovaném silikagelu Accubond C18 a na makroporézním kopolymeru styrendivinylnbenzenu Amberlite XAD 2.

Kolonka se sorbentem byla kondicionována 5 ml acetonitrilu, 5 ml metanolu a 5 ml 10% roztoku vysolovacího činidla o pH 3,0. Po vlastní sorpci byl sorbent promyt 1 ml destilované vody (Accubond C18) nebo 2,5 ml směsi H₂O/MeOH 90:10 (Amberlite XAD2). Eluce analytů byla prováděna acetonitrilem - v případě Accubond C18 objemem 5 ml, v případě Amberlite XAD 2 objemem 6 ml. Eluát byl odpařován pod proudem dusíku na 1 ml a následně analyzován na koloně Supelcosil LC PAH 250 x 2,1 mm.

3.5.1 Vliv objemu vzorku

Vliv objemu vzorku na návratnost byl sledován v rozsahu 25 – 200 ml. Acidita vzorku byla upravena 1% H₃PO₄ a pro zvýšení iontové síly roztoku bylo přidán 10 % NaCl.

Pro fenol sorbovaný na Accubond C18 je optimální objem vzorku 25 ml (83,2%). Pro ostatní stanovované CPs je optimální 100 ml vzorku, kde bylo dosaženo nejvyšších návratností od 2-CP (z 71,5 % nárůst na 80,2 %) až po PCP (z 58,3 % pro 25 ml nárůst na 70,6 % pro 100 ml).

Při SPE na Amberlite XAD 2 je objem vzorku závislý na typu analytu. Pro fenol (Ph) a monochlorfenoly je optimální objem 25 ml, s rostoucím objemem vzorku dochází k jejich vymývání z kolony a návratnost rapidně klesá (Ph z 98,2 % až na 26,7 %) Naopak pro výše chlorované fenoly návratnost s rostoucím objemem vrůstá do objemu 100 ml, a poté nastává pokles. Pro analýzu vzorků byl tedy zvolen objem 100 ml, hodnoty návratností (R %) pro monochlorfenoly jsou sice nižší v porovnání s menšími objemy, ale při tomto množství vzorku byly dosaženy nejvyšší návratnosti CPs pro výše chlorované fenoly.

3.5.2 Optimalizovaný postup

Optimalizovaný postup sorpce v nedisociované formě na sorbentech Accubond C18 a Amberlite XAD 2 je uveden v tabulce 8.

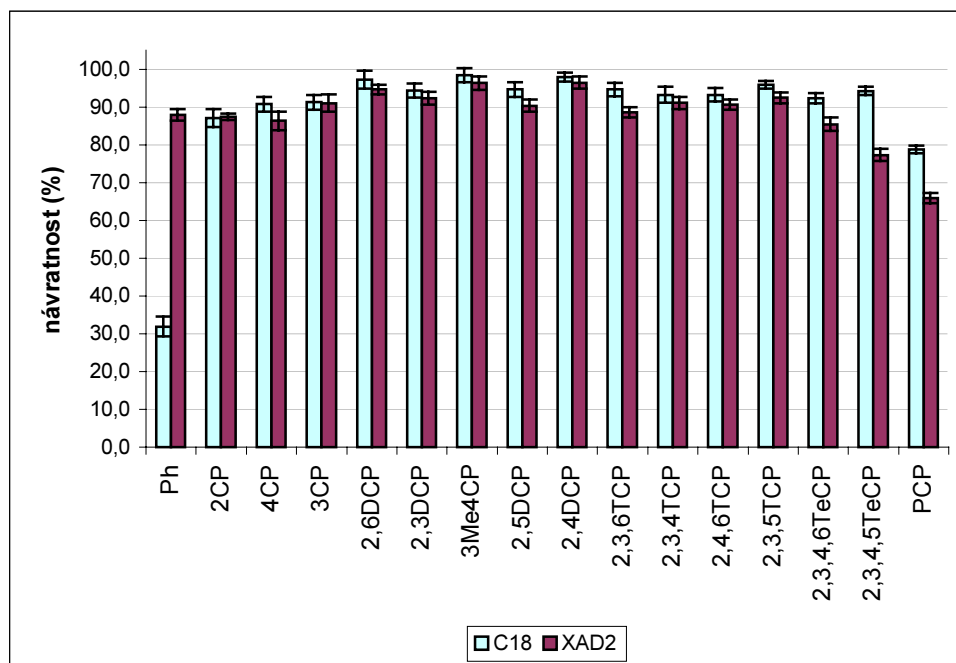
Tab. 8 : Optimalizované podmínky SPE v nedisociované formě

SPE	Sorbent	
	Accubond C18, 500 mg	Amberlite XAD2, 250 mg
kondicionace	5 ml acetonitril	5 ml acetonitril
	5 ml metanol	5 ml metanol
	5 ml 1% KCl, pH 3,0	5 ml 1% NaCl, pH 3,0
aplikace vzorku	100 ml, pH 3,0	100 ml, pH 3,0
	10 g KCl	10 g NaCl
promytí	1 ml H ₂ O, pH 3,0	2,5 ml H ₂ O/MeOH 90:10 v/v pH 3,0
eluce	5 ml acetonitril	6 ml acetonitril

3.5.3 Analýza povrchové vody

Byla testována sorpce fenolu a CPs z povrchové vody odebírané z vodního toku Svratka (Brno, Pisárky). Vzorek o objemu 100 ml byl obohacen standardním roztokem CPs na výslednou koncentraci chlorfenolů 0,05 mg/l, SPE byla provedena dle postupu uvedeného v tabulce 8. Eluát byl odpařen pod proudem dusíku na objem 0,2 ml. Alikvot 15 µl byl nastříknut na chromatografickou kolonu Supelcosil LC PAH 250 x 2,1 mm.

Srovnání návratností sorpce CPs pro oba testované sorbenty po detekci 230 nm je uvedeno na obr. 2.



Obr. 2 : Návratnost SPE na Accubond C18 a Amberlite XAD 2 pro vzorek povrchové vody

Nejnižších hodnot návratností pro sorbent Accubond C18 bylo dosaženo u Ph (31,9 %), nejvyšších u 3-Me-4-CP (98,4 %). Meze detekce dosahují nižších hodnot při vlnové délce 230 nm, a to v rozmezí 0,57 µg/l (PCP) až 9,60 µg/l (Ph). Pro vlnovou délku 280 nm se meze detekce pohybují v rozmezí 0,84 µg/l (PCP) až 12,56 µg/l (Ph).

Nejnižší hodnoty návratností pro sorbent Amberlite XAD2 byly nalezeny pro PCP (65,9 %), nejvyšší pro 3-Me-4-CP (96,3%). Nižších hodnot mezi detekce bylo dosaženo při vlnové délce 230 nm a to v rozsahu 1,09 µg/l (PCP) až 6,21 µg/l (Ph). Pro vlnovou délku 280 nm se pohybují meze detekce v rozmezí 2,82 µg/l (PCP) až 9,95 µg/l (Ph).

Ze srovnání mezi detekce získaných pro oba sorbenty pro vlnovou délku 230 nm je patrné, že vhodným sorbentem pro analýzy fenolů v nedisociované formě je, s výjimkou fenolu, silikagel Accubond C18.

3.6 Prekoncentrace CPs formou iontových asociátů

Prekoncentrace CPs formou iontových asociátů probíhala v alkalickém prostředí, kdy nastává disociace molekuly fenolu za vzniku fenolátového aniontu, s kationaktivním tenzidem chloridem cetyltrimethylamonnia (CTMACl). Sorpce byly testovány na dvou typech sorbentů : na modifikovaném silikagelu Separon SGX C18 a makroporézním kopolymeru styrendivinybenzenu Amberlite XAD 2.

Kolonka se sorbentem byla kondicionována 5 ml acetonitrilu, 5 ml metanolu, 5 ml destilované vody, 5 ml roztoku tenzidu CTMACl a 1 ml destilované vody. Po vlastní sorpci byl sorbent promyt 1 ml vody (Separon SGX C18) nebo 1 ml směsi H₂O/MeOH 95:5 v/v (Amberlite XAD2). Eluce analytů z obou sorbentů byla prováděna 5 ml metanolu. Eluát byl odpařován pod proudem dusíku na objem 1 ml a následně analyzován na koloně Vydac 250 x 2,1 mm vnitřního průměru.

3.6.1 Vliv koncentrace tenzidu na návratnost sorpce

Velmi důležitým parametrem pro návratnost sorpce je koncentrace použitého tenzidu CTMACl. CPs o koncentraci 1,0 mg/l byly sorbovány ze 100 ml vzorku v přítomnosti CTMACl v rozmezí koncentrace 0,075 – 2,5 mmol/l. Hodnota pH byla upravena 1 % amoniakem na pH 8,0. Nejvyšších hodnot návratností bylo dosaženo při koncentraci CTMACl 0,25 mmol/l. Při nižších i vyšších koncentracích tenzidu, než je uvedené optimum, se hodnoty návratností snižují a současně se při koncentraci CTMACl vyšší než 1,0 mmol/l snižuje při HPLC analýze rozlišení píků kritické dvojice (3-CP + 4-CP). Při koncentraci 5,0 mmol/l CTMACl nejsou píky dvojic

4-CP/ 3-CP a 2,4,6-TCP / 2,3,5-TCP separovány a pík 2,6-DCP je deformovaný. To znamená, že vysoký obsah tenzidu v nastříkovaném vzorku negativně ovlivňuje HPLC separaci analytů.

Hodnoty návratností se při optimální koncentraci CTMACl pohybují pro sorbent Separon SGX C18 v rozmezí 45,3 % (fenol) – 92,2 % (2,3,6-TCP), pro sorbent Amberlite XAD 2 v rozmezí 63,4 % (2-CP) – 92,3 % (2,3,6-TCP).

3.6.2 Vliv pH

Vliv hodnoty pH vzorku byl testován v rozmezí pH 7,5 – 9,0. Tento rozsah byl dán potřebou dosáhnout disociace fenolických analytů. Vzorek obsahoval 0,25 mmol/l CTMACl, analyty byly eluovány vždy 5 ml metanolu. Ostatní podmínky byly shodné s předchozími experimenty.

Hodnota pH vzorku významně ovlivňuje návratnost fenolu a chlorfenolů a to ve studovaném rozsahu pH až o 20 %. Pro sorbent Separon SGX C18 je nejvhodnější pH vzorku 8,5, pro sorbent Amberlite XAD 2 pH 9,0. Hodnoty návratností se pro sorbent Separon SGX C18 při pH 8,5 pohybují v rozmezí 53,5 % (fenol) až 92,4 % (2,3,5-TCP), pro sorbent Amberlite XAD2 v rozmezí 75,0 % (2-CP) až 96,4 % (2,3,6-TCP).

3.6.3 Vliv objemu vzorku

Vliv objemu vzorku na návratnost sorpce byl sledován v rozsahu 25 – 200 ml. Alkalita vzorku byla upravena na pH 8,5 (Separon SGX C18) nebo pH 9,0 (Amberlite XAD2).

Pro fenol a CPs sorbované ve formě iontového asociátu na sorbentu Separon SGX C18 je optimální objem vzorku 50 ml, s rostoucím objemem vzorku dochází k jejich částečnému vymývání z kolony a poklesu návratnosti o cca 10%. Výjimkou je fenol, u kterého se návratnost rapidně snižuje z 82 % na 29 %. Nejvyšších návratností při objemu 50 ml bylo dosaženo u 3-Me-4-CP (91,8 %), nejnižších u 2-CP (76,4 %).

Rovněž při SPE na Amberlite XAD2 je optimální objem vzorku 50 ml. Pokles návratnosti s dalším nárůstem objemu vzorku je výraznější než u kolonek plněných oktadecylovým silikagelem. Pokles návratnosti fenolu však není tak značný jako v předchozím případě (z 90 % na 64%) a celková úroveň výtěžností je vyšší než u SPE na modifikovaném silikagelu. Nejvyšších návratností bylo dosaženo u 2,3,5-TCP (96,2 %), nejnižších u 2-CP (78,8%).

3.6.4 Optimalizace metody

Optimalizovaný postup sorpce v nedisociované formě na sorbentech Separon SGX C18 a Amberlite XAD 2 je uveden v tabulce 9.

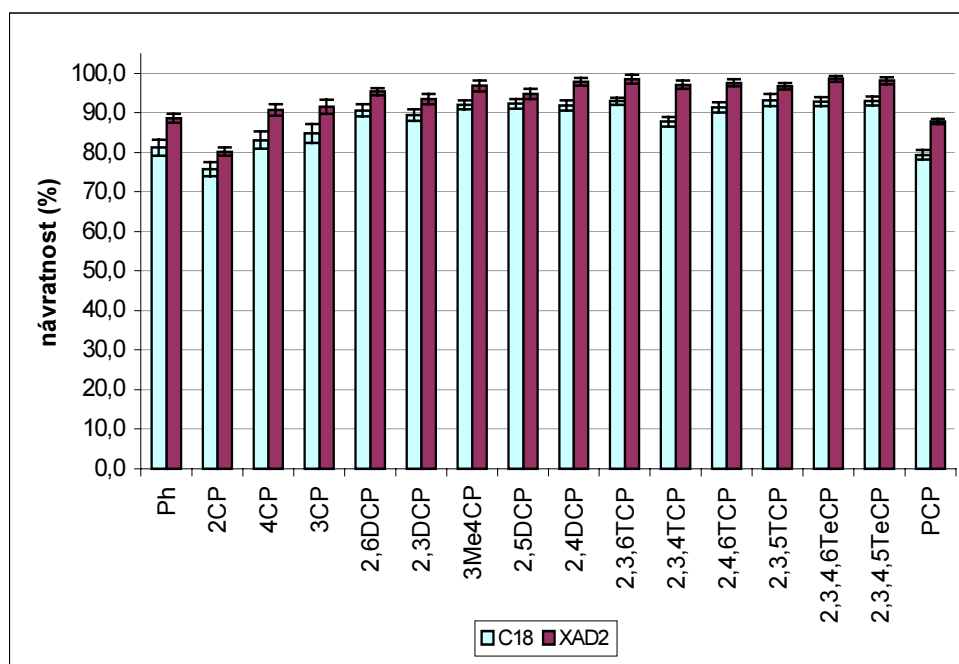
Tab. 9 : Optimalizované podmínky SPE ve formě iontových asociátů

SPE	Sorbent	
	Separon SGX C18, 500 mg	Amberlite XAD2, 250 mg
kondicionace	5 ml acetonitril	5 ml acetonitril
	5 ml metanol	5 ml metanol
	5 ml H ₂ O	5 ml H ₂ O
	5 ml CTAMCl (0,25 mmo/l)	5 ml CTAMCl (0,25 mmo/l)
	1 ml H ₂ O	1 ml H ₂ O
aplikace vzorku	50 ml, pH 8,5	50 ml, pH 9,0
	CTAMCl (0,25 mmo/l)	CTAMCl (0,25 mmo/l)
promytí	1 ml H ₂ O	1 ml H ₂ O/MeOH 95:5 v/v
eluce	5 ml metanol	5 ml metanol

3.6.5 Analýza povrchové vody

Byla testována sorpce fenolu a CPs z povrchové vody odebírané z vodního toku Lhotka (přírodní park Lysicko). Vzorek o objemu 50 ml byl obohacen standardním roztokem CPs na výslednou koncentraci chlorfenolů 0,1 mg/l, SPE byla provedena dle postupu uvedeného v tabulce 8. Eluát byl odpařen pod proudem dusíku na objem 1,0 ml. Alikvot 15 μ l byl nastříknut na chromatografickou kolonu Vydac 250 x 2,1 mm.

Srovnání návratností sorpce CPs pro oba testované sorbenty po detekci 230 nm je uvedeno na obr. 3.



Obr. 3 : Návratnost SPE Separon SGX C18 a Amberlite XAD 2 pro vzorek povrchové vody

Nejnižších hodnot návratností pro sorbent Separon SGX C18 bylo dosaženo u 2-CP (75,8%), nejvyšších pro 2,3,5-TCP (93,2%). Meze detekce dosahují nižších hodnot při vlnové délce 230 nm, a to v rozsahu 2,57 $\mu\text{g/l}$ (PCP) až 14,7 $\mu\text{g/l}$ (2-CP). Pro vlnovou délku 280 nm se pohybují meze detekce v rozmezí 9,6 $\mu\text{g/l}$ (3-Me-4-CP) až 31,2 $\mu\text{g/l}$ (2-CP).

Nejnižší hodnoty návratností pro sorbent Amberlite XAD2 byly nalezeny pro 2-CP (80,2 %), nejvyšší pro 2,3,4,6-TeCP (98,6%). Nižších hodnot mezi detekce bylo dosaženo při vlnové délce 230 nm a to v rozsahu 1,17 $\mu\text{g/l}$ (PCP) až 11,1 $\mu\text{g/l}$ (2-CP). Pro vlnovou délku 280 nm se pohybují meze detekce v rozmezí 8,2 $\mu\text{g/l}$ (3-Me-4-CP) až 18,8 $\mu\text{g/l}$ (2-CP).

4 ZÁVĚR

V předložené disertační práci byly studovány spektrofotometrické, separační a prekoncentrační techniky pro stanovení fenolu a chlorfenolů v povrchových vodách.

Ze spektrofotometrických metod ve viditelné oblasti byla optimalizována metoda stanovení fenolů s 4-aminoantipyrinem (4-AAP). Reakce fenolu s 4-AAP probíhá v zásaditém prostředí za přítomnosti vhodného oxidačního činidla. V naší práci jsme posuzovali celkem 4 oxidovadla, a to $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ a chloramin T. Po nalezení optimálních podmínek pro

jednotlivá oxidovadla a po jejich vzájemném srovnání jsme dospěli k závěru, že optimálním oxidačním činidlem pro stanovení CPs s 4-AAP je $K_3[Fe(CN)_6]$. Citlivost metody dosahuje pro fenol hodnoty ε 12550 l/mol/cm pro λ_{max} 505 nm, ve srovnání s chloraminem T, který dává ε 11380 l/mol/cm. Upravený Sandellův index vyjadřující koncentraci fenolu pro absorbační 0,01 nabývá hodnoty $7,29 \cdot 10^{-2}$ $\mu\text{g/ml}$. Meze stanovitelnosti vypočítané z kalibračních křivek nabývají hodnot $1,96 \cdot 10^{-1}$ $\mu\text{g/ml}$, resp. $6,75 \cdot 10^{-2}$ $\mu\text{g/ml}$.

Nevýhodou této metody je nízká reaktivita p-substituovaných fenolů. Ze skupiny monochlorfenolů nejhůře reaguje s činidlem 4-AAP 4-CP. Ve srovnání s 2-CP (substituent v o- poloze vůči –OH skupině) nastává pokles citlivosti ze 16000 l/mol/cm na 5500 l/mol/cm. Ze skupiny dichlorfenolů nejhůře reaguje 2,4-DCP, z trichlorfenolů prakticky vůbec nereaguje 2,3,5-TCP a samozřejmě PCP, který má substituovány všechny polohy Cl substituenty. Z chlorfenolů dosahuje nejnižšího Sandellova indexu 2-CP ($8,03 \cdot 10^{-2}$ $\mu\text{g/ml}$), nejvyššího 2,4,6-TCP ($11,97 \cdot 10^{-1}$ $\mu\text{g/ml}$).

U činidla MBTH není reakce ovlivněna polohou substituentů vůči –OH skupině v molekule fenolu. Reakce může probíhat v alkalickém i kyselém prostředí. V alkalickém prostředí je optimální přítomnost alkalického tlumiče o pH 9,0 a oxidační činidlo $K_3[Fe(CN)_6]$. Činidla MBTH a $K_3[Fe(CN)_6]$ jsou ve vzájemném koncentračním poměru 1:2. Nevýhodou této reakce je však příliš nízká citlivost. Sandellův index pro fenol byl $7,20 \cdot 10^{-1}$ $\mu\text{g/ml}$. Reaktivita MBTH s CPs byla ověřována na zástupcích CPs, vždy na jednom z dané skupiny, a to na 2-CP, 2,3-DCP a 2,3,6-TCP. Všechny produkty CPs s činidlem byly nestálé a k odbarvení dochází během několika sekund. Z těchto důvodů nelze metodu použít pro stanovení chlorfenolů v reálných vzorcích.

V kyselém prostředí reaguje MBTH s fenolem v přítomnosti oxidačního činidla síranu ceričitoamonného v prostředí kyseliny sírové. Ke stabilizaci produktu se do roztoku přidává 1,0 mmol/l neiontový tenzid Tween 20. Barevná intenzita zbarvení je stabilní 10 min po přidavku všech reaktantů. MBTH a síran ceričitoamonný jsou ve vzájemném koncentračním poměru 1:2. Hydrolyza oxidačního činidla ve vodném roztoku se potlačuje přidávkem H_2SO_4 o výsledné koncentraci 0,075 mol/l (0,4%).

Reaktivita MBTH v kyselém prostředí byla ověřena na fenolu. Sandellův index nabývá koncentrace $1,25 \cdot 10^{-2}$ $\mu\text{g/ml}$ (4-AAP $7,29 \cdot 10^{-2}$ $\mu\text{g/ml}$). Z monochlorfenolů nejméně citlivě reaguje 4-CP ($\varepsilon = 13470$ l/mol/cm), z dichlorfenolů 2,6-DCP ($\varepsilon = 11410$ l/mol/cm), z trichlorfenolů 2,3,5-TCP ($\varepsilon = 2150$ l/mol/cm), pentachlorfenol s činidlem nereaguje. Z CPs Sandellův index dosahuje nejnižších hodnot u 2-CP ($4,09 \cdot 10^{-2}$ $\mu\text{g/ml}$) a nejvyšších hodnot u 2,3,5-TCP ($7,89 \cdot 10^{-1}$ $\mu\text{g/ml}$). Hodnoty jsou zde srovnatelné s činidlem 4-AAP. Výhodou MBTH ovšem zůstává fakt, že reaguje

i s para substituovaným fenoly. Zvýšenou citlivost lze např. pozorovat u 4-CP – 13 470 l/mol/cm (s 4-AAP pouze 5 490 l/mol/cm).

Bylo testováno multikomponentní stanovení vybraných CPs v UV oblasti spektra v prostředí 1,0 mol/l NaOH metodou PLS. Byly analyzovány dvě sady fenolů : sada A – fenol + 2-CP + 2,6-DCP + 2,3,6-TCP, tedy fenolů, které poskytují nejvyšší odezvu signálu vždy z dané skupiny CPs, a dále sada B – fenol + monochlorfenoly, tedy CPs, které se nejčastěji vyskytují v reálných vzorcích. Bylo optimalizováno složení kalibračního setu, výběr centrálního bodu a koncentrační rozsah kalibračního setu. Optimálním se ukázal úplný faktorový plán (CFD) kalibračního setu, centrální bod v oblasti aritmetického průměru mezních hladin koncentrací kalibračního setu a nižší rozsah koncentrací kalibračního setu zvolený na základě reálných koncentrací CPs ve vodách. Výhodným se také ukázalo využití 1. derivace základního signálu, zejména v sadě B s podstatně vyšším překryvem absorpčních spekter komponent.

Hodnoty relativních chyb predikce koncentrací fenolu a chlorfenolů v jednotlivých vzorcích vod dosahovaly v závislosti na systému a druhu vody hodnot 4,2 %- 28,1 % pro obsah fenolu 0,9 – 9,4 mg/l, monochlorfenolů 1,25 – 12,8 mg/l, 2,6-DCP 1,63 – 16,3 mg/l a 2,3,6-TCP 2,0 – 19,7 mg/l ve směsích.

Pro stanovení chlorfenolů ve směsích byla použita metoda HPLC v systému s obrácenými fázemi a ve spojení s fotometrickým detektorem. V disertační práci byla optimalizována metoda HPLC na koloně malého průměru Supelcosil LC PAH 250 x 2,1 mm vnitřního průměru plněné silikagelem o velikosti částic 5 µm modifikovanými oktadecylovými řetězci. K detekci byl použit detektor s diodovým polem.

Nejllepších výsledků bylo dosaženo při gradientové separaci s mobilní fází 10 mmol/l fosfátový tlumič o pH 3,5 – metanol (35% v/v metanol po dobu 3,5 min, lineární gradient do 100% v/v metanolu ve 27. min, metanol po dobu 3 min; průtok 0,35 ml/min) při teplotě 18 °C. Analyty byly monitorovány při vlnových délkách 230 ± 30 a 280 ± 30. Na kolonu bylo nastříkáváno maximálně 15 µl vzorku. Za uvedených podmínek lze separovat a kvantifikovat celkem 16 chlorovaných fenolů. Meze detekce (S/N=3) CPs se pohybují od 0,09 do 0,80 µg/ml (230 nm) případně od 0,57 do 1,44 µg/ml (280 nm).

V disertační práci byla studována a vyhodnocena prekoncentrace fenolu a CPs v nedisociované formě v kyselém prostředí a ve formě iontových asociátů fenolátového aniontu s kationaktivním tenzidem CTMACl v alkalickém prostředí na sorbentech na bázi modifikovaného silikagelu a makroporézního styrendivinybenzenového kopolymeru XAD 2.

Optimální sorpce v nedisociované formě probíhala ze 100 ml roztoku v přítomnosti KCl (Accubond C18) či NaCl (Amberlite XAD 2) jako vysolovacího činidla průtokem

2 ml/min. Kondicionace sorbentu byla provedena 5 ml MeCN, 5 ml MeOH a následně 5 ml 10% KCl (C18) či 10% NaCl (XAD 2) o pH 3,0. Promytí sorbentu bylo provedeno 1 ml destilované vody upravené 1% kys. fosforečnou na pH 3,0 (Accubond C18) nebo 2,5 ml směsi H₂O/MeOH 90:10 v/v (Amberlite XAD2). Jako eluční činidlo byl pro oba sorbenty použit acetonitril a to v objemech 5 ml (C18) a 6 ml (XAD 2). Eluát byl odpařen pod proudem dusíku na výsledný objem 0,2 ml a alikvot 15 µl nastříknut na chromatografickou kolonu Suplecasil LC PAH 250 x 2,1 mm vnitřního průměru.

Návratnosti Ph a CPs pro vzorek povrchové vody se pro sorbent Accubond C18 pohybují v rozmezí 31,9 % (Ph) – 98,4 % (3-Me-4-CP). Meze detekce dosahují nižších hodnot při vlnové délce 230 nm, a to v rozsahu 0,57 µg/l (PCP) až 9,60 µg/l (Ph), při které vykazují CPs vyšší intenzitu signálu ve srovnání s vlnovou délkou 280 nm. Při použití sorbentu Amberlite XAD 2 byly nejnižší hodnoty výtěžností nalezeny pro PCP (65,9%), nejvyšší pak pro 3-Me-4-CP (96,3%). Hodnoty mezí detekce se pohybují v rozmezí 1,09 µg/l (PCP) až 6,21 µg/l (Ph) při vlnové délce 230 nm. Ze srovnání obou sorbetnů tedy vyplývá, že pro prekoncentrace fenolu je vhodné použít polymerní sorbent Amberlite XAD 2, který má pro tyto analyty vyšší retenci než silikagel C18. Pro stanovení chlorfenolů, které jsou z toxikologického hlediska významnější, je naopak vhodné pracovat s modifikovaným silikagelem C18.

V alkalickém prostředí probíhala optimální sorpce z 50 ml vzorku v přítomnosti 0,25 mmol/l CTMACl a hodnotě pH 8,5 (Separon SGX C18) či pH 9,0 (Amberlite XAD 2) průtokem 2 ml/min. Kondicionace sorbentu byla provedena 5 ml MeCN, 5 ml MeOH, 5 ml H₂O, 5 ml CTMACl (0,25 mmol/l) a následně 1 ml H₂O. Promytí sorbentu bylo provedeno 1 ml destilované vody (SGX C18) nebo 1 ml směsi H₂O/MeOH 95:5 v/v (Amberlite XAD2). Jako eluční činidlo byl pro oba sorbenty zvolen metanol a to o objemu 5 ml. Eluát byl odpařen pod proudem dusíku na výsledný objem 1 ml a alikvot 15 µl nastříknut na chromatografickou kolonu Ydac 250 x 2,1 mm vnitřního průměru.

Návratnosti fenolu a CPs pro vzorek povrchové vody se pro sorbent Separon SGX C18 pohybují v rozmezí 75,8 % (2-CP) – 93,2 % (2,3,5-TCP). Meze detekce dosahují nižších hodnot při vlnové délce 230 nm, a to v rozsahu 2,70 µg/l (PCP) až 14,7 µg/l (2-CP). Při použití sorbentu Amberlite XAD 2 byly nejnižší hodnoty výtěžností nalezeny pro 2-CP (80,2%), nejvyšší pak pro 2,3,4,6-TeCP (98,6%). Hodnoty mezí detekce se pohybují v rozmezí 1,7 µg/l (PCP) až 11,1 µg/l (2-CP) při vlnové délce 230 nm. Ze srovnání hodnot návratností a mezí detekce pro oba sorbenty vyplývá, že při prekoncentraci fenolů ve formě iontových asociátů je vhodné pracovat s polymerním sorbentem Amberlite XAD 2.

5 LITERATURA

1. T. Korba, M. Popl: *Chem. Listy* **87**, 332-347 (1993).
2. P. Pitter: *Hydrochemie*, VŠCHT, Praha 1999, str. 315-333.
3. WHO Environmental Health Criteria 93 : *Chlorophenols Other than Pentachlorophenol*, WHO, Geneva 1989, str.11-26, 57-62, 100-119, 135-141, 152, 156.
4. I. Holoubek, I. Holoubková, uspořadatelé: *Osud organických polutantů v prostředí*, Sborník TOCOEN 90, Brno 1990, str. 126.
5. M. Popl, J. Fährich: *Analytická chemie životního prostředí*, VŠCHT, Praha 1995, str. 167-168.
6. I. Holoubek: *TOCOEN Report No. 50*, Tocoen s.r.o, Brno 1991.
7. H. O. Friestad, D. E. Ott, F. A. Gunter: *Anal. Chem.* **41(13)**, 1750 – 1754 (1969).
8. D. Svobodová, J. Gasparič: *Mikrochim. Acta* **I**, 384 – 390, 1971.
9. J. Gasparič, D. Svobodová, M. Pospíšilová: *Mikrochim. Acta* **I**, 241 – 250, 1977.
10. P. Koppe, F. Dietz, J. Traud: *Z. Anal. Chem.* **285**, 1-19 (1977).
11. B. K. Afghan, P. E. Belliveau, R. H. Larose, J. F. Ryan: *Anal. Chim. Acta* **71**, 355 – 366, (1974).
12. R. Štěpánková, L. Jančář, L. Sommer : *Chem. listy*, v tisku.
13. L. Jančář, J. Preisler, L. Sommer : *Coll. Czech. Chem. Commun* **58**, 1509-1524 (1993).
14. D. Puig, D. Barceló: *Anal. Chim. Acta* **311**, 63 – 69 (1995).
15. E. Pocurull, R. M. Marcé, F. Borrull: *Chromatographia* **41 (9/10)**, 521 - 526 (1995).
16. J. Frébortová, V. Tatarkovičová: *Analyst* **119**, 1519-1523 (1994).
17. I. Baranowska, C. Piezsko, A.M. Grossman : *Chem. Anal.* **42**, 845-854 (1997).
18. E. Pocurull, G. Sánchez, F. Borrull, R.M. Marcé: *J. Chromatogr. A* **696**, 31-39 (1995).
19. R. Kostrhounová, A. Hrdlička, L. Sommer: *Microchim. Acta*, v tisku

6 SEZNAM VLASTNÍCH PUBLIKACÍ

Časopisecké vědecké publikace

1. Kostrhounová, R., Hrdlička, A., Sommer, L.: Solid Phase Extraction of Phenol and Chlorophenols on Octadecylsilica and Amberlite XAD2 sorbents in the Presence of Cationic Surfactant, *Microchim. Acta*, v tisku.
2. Kostrhounová, R., Hrdlička, A., Sommer, L.: Simple HPLC Determination of Phenol and Chlorophenols in Mixtures after Previous Preconcentration by Solid Phase Extraction on modified Silica and XAD 2 Sorbents, *Chem. Anal.*, v tisku.

3. Štěpánková, R., Jančář, L., Sommer, L.: UV spektrofotometrické stanovení směsí fenolu a chlorfenolů ve vodách s použitím Partial Least Squares a Kalmanova filtru. *Chem. Listy*, v tisku.

Příspěvky ve sbornících

1. Štěpánková, R., Jančář, L., Sommer, L.: Příspěvek ke stanovení chlorfenolů metodou spektrofotometrie UV/VIS. Sborník konference 52. *Sjezd chemických společností, České Budějovice 2000. Chem. Listy 2000*, vol. 94, p. 966. ISSN 0009-2770.
2. Štěpánková, R., Sommer, L., Jančář, L.: Determination of chlorophenols in environmental samples by ultraviolet absorption. Sborník konference *Industrial Toxicology 2001*, p. 186, Bratislava 2001. ISSN 1335-3160, ISBN 80-968011-5-5.
3. Štěpánková, R., Hrdlička, A., Sommer, L.: HPLC separace chlorfenolů na koloně malého průměru pro stanovení v povrchových vodách. Sborník č. 2 konference 53. *Zjazd chemických spoločností*, p. 48-49, Banská Bystrica 2001. ISBN 80-89029-23-X.
4. Štěpánková, R., Hrdlička A., Sommer L.: HPLC of chlorophenols on a narrow-bore column with previous off-line solid phase extraction for the determination in river waters. Sborník konference *Workshop Technologies and Processes for Sustainable Development and Pollution Reduction/Prevention*, p. 327 – 329, Brno 2002. ISBN 80-214-2151-7.
5. Štěpánková, R., Hrdlička A., Sommer L.: SPE of ion-associates of chlorophenols and their HPLC determination in river water. Sborník konference 54. *Sjezd chemických společností, Brno 2002, Chemi. Listy 2002*, vol 96, p. 481. ISSN 0009-2770.
6. Štěpánková, R., Hrdlička A., Sommer L.: Solid Phase Extraction and Narrow Bore Column HPLC of Phenol and Chlorophenols in River Waters. Sborník konference *2nd Meeting of Chemistry & Life*, Brno 2002, *Chem. Listy 2002*, vol 96, p. 317 – 319. ISSN 0009-2770.
7. Kostrhounová, R., Hrdlička A., Sommer L.: Determination of Chlorophenols by HPLC after Preconcentration in the Form of Ion Associates in River Waters. Sborník konference *Secotox 2002*, p. 85, Brno 2002. ISBN 80-210-2971-4.