

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Analýza 4-chlorfenolů v odpadních vodách
Diplomová práce

2024

Bc. Eliška Pánková

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

Analysis of 4-chlorophenols in wastewater
Master thesis

2024

Bc. Eliška Pánková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Eliška Pánková**
Osobní číslo: **C22378**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Analýza 4-chlorfenolů v odpadních vodách**
Téma práce anglicky: **Analysis of 4-chlorophenols in Wastewater**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

1. Vypracujte literární rešerši se zaměřením na toxikologii 4-chlorfenolu a jeho vlivu na živý organismus. Prostudujte si mechanismy chlorace a dechlorace.
2. V odborné literatuře najděte současné poznatky o derivatizačních technikách při analýze vzorku, instrumentální analýze a možnostech užití detektorů.

Experimentální část:

1. Zpracování vzorků odpadních vod, zaměření na přípravu vzorku před analýzou.
2. Zavedení metody plynové chromatografie s plamenově ionizační detekcí pro analýzu 4-chlorfenolů.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Martina Špryncová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **22. prosince 2023**

Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

LS.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Analýza 4-chlorfenolů v odpadních vodách jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 10.5.2024

Eliška Pánková v. r.

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala své vedoucí diplomové práce paní Ing. Bc. Martině Špryncové Ph.D. za její vedení, trpělivost a konstruktivní kritiku. Dále děkuji své rodině a Ing. Martinu Zelinkovi za jejich velkou podporu během mého studia.

ANOTACE

Práce se zaměřuje na stanovení 4-chlorfenolu v dichlormethanových extraktech pomocí plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem. Chlorfenoly se do přírody dostávají jako perzistentní látky z průmyslové aktivity člověka. Využití pak zejména nacházejí v dezinfekčních prostředcích a pesticidech. Jejich dlouhodobé používání však přináší vážná zdravotní a environmentální rizika, včetně negativních dopadů na životní prostředí. Nově vyvíjené technologie umožní efektivní odstraňování halogenovaných aromatických sloučenin. Problém se týká hlavně odpadních vod, které jsou vypouštěny do okolní krajiny. Jejich odstraňování je pak prevencí vzniku některých onemocnění.

KLÍČOVÁ SLOVA

4-chlorfenol, plynová chromatografie, plamenově ionizační detektor, odpadní vody

TITLE

Analysis of 4-chlorophenols in wastewater

ANNOTATION

The work focuses on the determination of 4-chlorophenol in dichloromethane extracts by gas chromatography with flame ionization detector. Chlorophenols enter nature, as persistent substances, from industrial activity. They are mainly used in disinfectants and pesticides. Their long-term use poses serious health and environmental risks, including negative environmental impacts. New technologies under development will enable the effective removal of halogenated aromatic compounds. The problem is mainly related to waste water discharged into the surrounding landscape. Removing them is a way of preventing the development of certain diseases.

KEYWORDS

4-chlorophenol, gas chromatography, flame ionization detector, wastewater

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: Chlor-alkalická elektrolýza solanky	14
Obrázek 2: Rovnice reakce kyseliny trichlorisokyanurové s vodou.....	15
Obrázek 3: Obecná struktura chlorovaných bisfenolů	17
Obrázek 4: (1) 2,4-chlorfenol, (2) 2,3,4,5,6-chlorfenol, (3) 2,4,5,-chlorfenol, (4) 2-chlorfenol, (5) 4-chlorfenol	17
Obrázek 5: Obecné schéma čistírny odpadních vod	18
Obrázek 6: Dva redukční mechanismy 4-chlorfenolu	20
Obrázek 7: Počáteční rozklad 4-chlorfenolu (hydrochinonová dráha) katalyzovaný CphC-I..	23
Obrázek 8: Schéma cyklu monooxygenázy CYP450	27
Obrázek 9: Předpokládaná metabolická cesta 4-CP za přítomnosti CYP450	28
Obrázek 10: Dechlorace 4-CP třemi flavin-dependentními enzymy ze systému HadA.....	29
Obrázek 11: Obecné schéma biotransformace	31
Obrázek 12: Schéma působení hormonálních disruptorů	35
Obrázek 13: Schéma instrumentace GC	37
Obrázek 14: Schéma instrumentace HPLC	38
Obrázek 15: Schéma plamenově ionizačního detektoru.....	41
Obrázek 16: Schéma instrumentace detektoru elektronového záchytu	43
Obrázek 17 Schéma instrumentace hmotnostní spektrometrie.....	44
Obrázek 18: Imerzní metoda mikroextrakce na tuhou fázi	47
Obrázek 19: Aplikace vzorku pomocí 6-cestného ventilu	48
Obrázek 20: Pík nederivatizovaného standardu 4-chlorfenolu (20 µg/l). Detekce t_m 280 °C a t_R 26,2 minuty.	57
Obrázek 21: Pík silylderivátu 4-chlorfenolu detekovaného t_m 300 °C a t_R 14,5 minuta.	59

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Chemické a fyzikální vlastnosti 4-chlorfenolu [74]	26
Tabulka 2: Struktura organických rozpouštědel a derivatizačních činidel	50
Tabulka 3: Pipetované objemy dichlormethanu a roztoku 4-chlorfenolu o koncentraci 20 µg/l pro vytvoření bodů kalibrační řady o objemech 3 ml	52

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Závislost koncentračních bodů nederivatizovaných standardů 4-chlorfenolu.	57
Graf 2: Srovnání ploch píků silyderivátu při výběru optimálního objemu standardu.	60
Graf 3: Kalibrační řada derivatizovaných standardů 4-chlorfenolu	62
Graf 4: Znázornění směrodatné odchylky vůči průměrným hodnotám ploch píků jednotlivých koncentrací bodů kalibrační řady.	63

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

4-CP	4-chlorfenol
AVG	Aritmetický průměr (z angl. arithmetic mean – average)
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
CRF	Relativní centrifugační síla (z angl. relative centrifugal force)
CYP450	Cytochrom P450
ECD	Detektor elektronového záchytu (z angl. electron capture detector)
ERK	Extracelulárním signálem regulovaná kináza
FAD	Flavin adenin dinukleotid
FID	Plamenově ionizační detektor (z angl. flame ionization detector)
FMO	Flavinové monooxygenázy
GC	Plynová chromatografie (z angl. gas chromatography)
HPLC	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (z angl. high-performance liquid chromatography)
LC	Kapalinová chromatografie (z angl. liquid chromatography)
LOD	Limit detekce (z angl. limit of detection)
LOQ	Limit stanovitelnosti (z angl. limit of quantification)
MALDI	Matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace
MS	Hmotnostní spektrometrie (z angl. mass spectrometry)
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NF κ B	Nukleární faktor κ B
ROS	Reaktivní formy kyslíku (z angl. reactive oxygen species)

SNP	Jednonukleotidový polymorfismus (z angl. single nucleotide polymorphism)
SPME	Extrakce na tuhou fázi (z angl. solid phase micro extraction)
STD	Směrodatná odchylka (z angl. standard deviation)
TMS	Tetramethylsilan
UGT	Uridin-5-difosfátglukuronyltransferáza
UV	Ultrafialové záření (z angl. ultraviolet)
VIS	Viditelné světlo

OBSAH

1	TEORETICKÁ ČÁST.....	14
1.1	CHLOR	14
1.1.1	Využití a výskyt.....	15
1.2	VÝZNAMNÉ SLOUČENINY CHLORU	16
1.2.1	Kyselina chlorovodíková a fosgen.....	16
1.2.2	Polychlorované bifenyly a naftaleny	16
1.2.3	Chlorfenoly	17
1.3	ČIŠTĚNÍ ODPADNÍCH VOD A ODBOURÁVÁNÍ 4-CHLORFENOLU	18
1.3.1	Pd ⁰ /Al ₂ O ₃ katalyzátor	19
1.3.2	Cu ⁰ a Cu/Fe bimetalický katalyzátor	20
1.3.3	Raneyův nikl	21
1.3.4	Homogenní a heterogenní Fentonův systém.....	21
1.3.5	Fotokatalytická oxidace	22
1.3.6	Adsorpce na aktivní uhlí s modifikovanými aminovými skupinami	22
1.3.7	Imobilizované bakteriální buňky	23
1.3.8	Biokatalyzátory	23
1.4	EKOLOGIE A LEGISLATIVA PRO OCHRANU VODNÍCH ZDROJŮ.....	24
1.4.1	Zákony a vyhlášky související s čištěním vod a prevencí kontaminace...24	
1.5	MECHANISMUS BIOTRANSFORMACE 4-CHLORFENOLU	25
1.5.1	První fáze biotransformace 4-chlorfenolu	26
1.5.2	Druhá fáze biotransformace 4-chlorfenolu	30
1.6	EXPOZICE.....	32
1.6.1	Akutní intoxikace 4-chlorfenolem	33
1.6.2	Chronická intoxikace 4-chlorfenolem jako hormonálním disruptorem....34	
1.7	INSTRUMENTÁLNÍ ANALÝZA	35
1.7.1	Plynová chromatografie.....	36
1.7.2	Kapalinová chromatografie.....	38
1.8	DERIVATIZAČNÍ ČINIDLA V ANALÝZE 4-CHLORFENOLU	40
1.8.1	Acetylační činidla	40

1.8.2	Silylační činidla	40
1.9	DETEKTORY PLYNOVÉ CHROMATOGRAFIE PRO DETEKCI 4-CHLORFENOLU	41
1.9.1	Plamenově ionizační detektor	41
1.9.2	Detektor elektronového záchytu	42
1.9.3	Hmotnostní detektor	43
1.10	ZPŮSOBY EXTRAKCE 4-CHLORFENOLU ZE VZORKU	45
1.10.1	Mikroextrakce kapalina-kapalina	46
1.10.2	Mikroextrakce na tuhou fázi	46
1.10.3	Extrakce kapalina-plyn	47
2	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	49
2.1	CHEMIKÁLIE A PŘÍSTROJOVÉ POMŮCKY	49
2.1.1	Použité komponenty plynové chromatografie	51
2.2	PŘÍPRAVA KALIBRAČNÍ ŘADY, DERIVATIZACE A TEPELNÉ PROGRAMY	51
2.2.1	Úprava vzorku 4-chlorfenolu acetylací	53
2.2.2	Úprava vzorku 4-chlorfenolu silylací	54
3	VÝSLEDKY	56
3.1	OPTIMALIZACE ANALÝZY NEDERIVATIZOVANÝCH STANDARDŮ 4-CHLORFENOLU ...	56
3.2	OPTIMALIZACE ANALÝZY A DERIVATIZACE 4-CHLORFENOLU ACETYLACÍ	58
3.3	OPTIMALIZACE ANALÝZY A DERIVATIZACE 4-CHLORFENOLU SILYLACÍ	59
3.4	MĚŘENÍ KALIBRAČNÍ ŘADY 4-CHLORFENOLU	61
3.5	METODA VNITŘNÍHO STANDARDU	63
3.6	MĚŘENÍ KONCENTRACÍ NEZNÁMÝCH VZORKŮ 4-CHLORFENOLU	64
4	DISKUSE	66
5	ZÁVĚR	68

ÚVOD

Chlorfenoly se do životního prostředí dostávají lidskou aktivitou. Problematika ekologie a zachování rázu krajiny pro budoucnost úzce souvisí s tématem odstraňování halogenderivátů z odpadních vod. Všechny chlorfenoly jsou známé pro svou toxicitu. Proto je jejich používání legislativou omezeno pouze na výjimečné případy. Problémem je, že vznikají jako vedlejší produkt organických syntéz v chemickém průmyslu a následně jsou společně s ostatním odpadem vypuštěny do přírody, kde se hromadí ve velkém množství. Jejich zvýšenou koncentraci můžeme detekovat v okolí měst. Kvůli jejich škodlivému vlivu, nejen na ekosystém, je snaha odpadní vody přečišťovat ještě před vypuštěním do okolní krajiny.

Existuje několik metod odbourávajících 4-chlorfenol a jiné chlorfenoly, které se využívají jako nástroje čištění odpadních vod. Jsou to materiály, ve kterých se molekuly chlorfenolů přeměňují na ekologicky nezávadné. Metody čištění spočívají v chemických, fyzikálních a biologických procesech. Zároveň je kladen důraz na to, aby metody odstraňování chlorfenolů byly rovněž ekologicky odbouratelné a použité materiály netoxické.

4-chlorfenol je jedním z potencionálních karcinogenů a endokrinních disruptorů. Mezi jeho nežádoucí vlastnosti patří schopnost ukládat se do tukové tkáně. To může mít za následek dlouhotrvající zdravotní problémy. Při akutní intoxikaci právě touto látkou dochází k selhávání jater. V nejméně závažném případě dochází k poškození centrálního nervového systému. Poslední roky je tedy snaha o prevenci vystavení touto látkou.

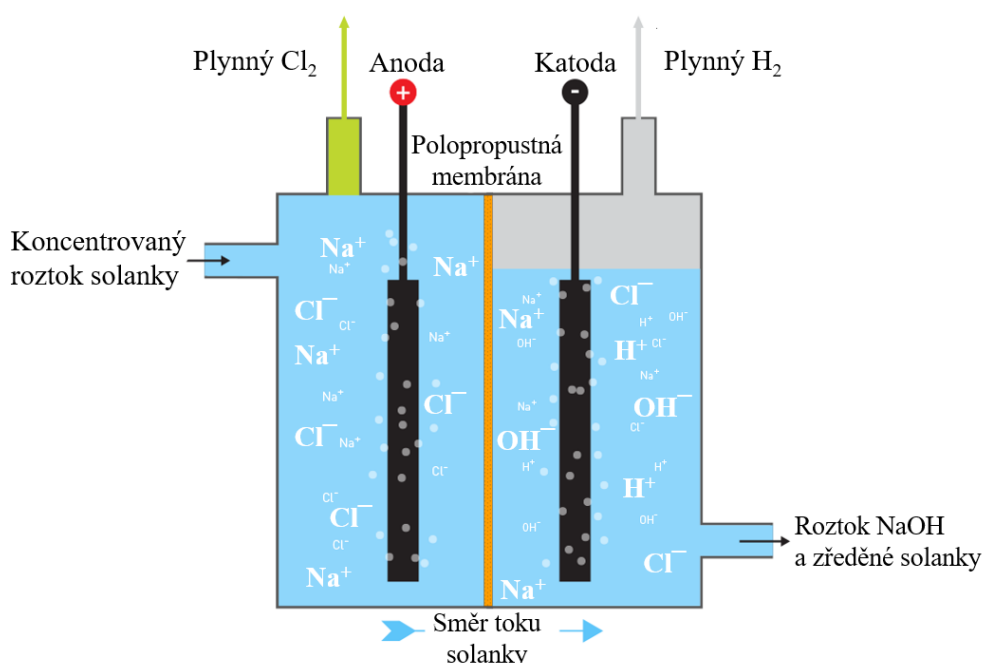
V této diplomové práci jsme cílili na detekci a kvantifikaci 4-chlorfenolů v dichlormethanových extraktech vytvořených z odpadních vod. Snahou bylo najít účinný postup úpravy vzorku před analýzou a vytvořit tak kalibrační řadu pomocí připravených standardů o známé koncentraci. Z nasbíraných dat pak vypočítat koncentrace 4-chlorfenolu v neznámých vzorcích. Metoda plynové chromatografie ve spojení s plamenově ionizačním detektorem by tak mohla být jednoduchou a levnou metodou stanovení 4-chlorfenolu.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Chlor

Elementární chlor je chemický prvek, který se značí Cl a atomovým číslem 17 [1]. V periodické tabulce prvků ho můžeme najít mezi halogeny společně s fluorem nebo bromem [1]. Při pokojové teplotě se jedná o žlutozelený plyn, který je velmi reaktivní, a proto se využívá jako oxidační činidlo [2]. Díky takto velké reaktivitě se chlor na zemi vyskytuje ve formě iontových chloridových sloučenin [2].

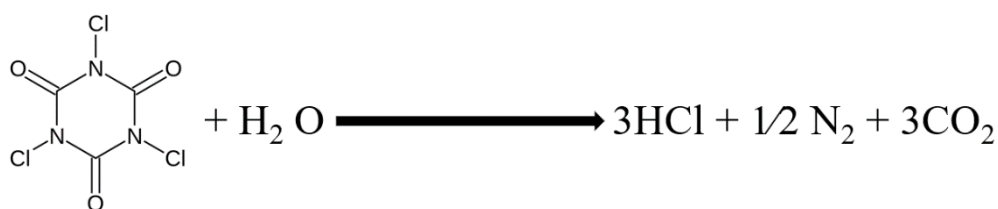
Elementární chlor se vyrábí elektrolýzou solanky, a to konkrétně za použití chlor-alkalického procesu [3]. V reaktoru při elektrolýze se využívá dvou elektrod ponořených do solného roztoku, mezi kterými proudí elektrický proud [4]. Celá konstrukce reaktoru je popsána na Obrázku 1 [5]. Během samotné elektrolýzy solanky putují nabité ionty přes polopropustnou membránu k náboji odpovídajícím elektrodám [4]. Kladně nabité ionty se pohybují k záporně nabité elektrodě [4]. Naopak záporně nabité ionty putují ke kladně nabité elektrodě [4]. Použitím polopropustné membrány zajistíme oddělení elektrod, a tím zabráníme rekombinaci iontů [3].



Obrázek 1: Chlor-alkalická elektrolýza solanky [5]

1.1.1 Využití a výskyt

Elementární chlor je jako součást různých substancí používaných v komerčních bělidlech, průmyslových činidlech, či výrobě plastů a dezinfekcí [6]. Plynný chlor je pro běžné použití nevhodný, a proto se používají chlorné sloučeniny, které tento plyn v reakci s vodou produkují [6]. Oblíbenou formou jsou chlorné granuláty nebo tablety s obsahem kyseliny trichlorisokyanurové [7]. Reakce probíhající při dezinfekci bazénové vody za použití kyseliny trichlorisokyanurové, je znázorněna na Obrázku 2 [8].



Obrázek 2: Rovnice reakce kyseliny trichlorisokyanurové s vodou [8]

Kyselina trichlorisokyanurová je donorem chloridových iontů působící jako dezinfekční činidlo [7]. Během působení dezinfekčních molekul chloru vynikají další produkty, mezi které patří kyselina chlorovodíková, kyselina chlorná a chloraminy [7]. Chloraminy dráždí oči a způsobují nepříjemný zápach [6]. Proto je používání chlorných sloučenin při dezinfekci vod v některých státech regulován kvůli toxicitě [6]. Akutní expozice plynným chlorem může vést i k příznakům akutní obstrukce dýchacích cest, sípání, kašláni, nepříjemného tlaku na hrudi či dušnosti a ve vážných případech akutní respirační tísní [9]. Na kůži chlor způsobuje velké podlité puchýře, podobné popáleninám [9].

V biochemii lidského těla se chlor vyskytuje v gastrointestinálním traktu, jako složka žaludečních kyselin [10]. Kyselina chlorovodíková se nachází v žaludku a aktivuje enzymy, které štěpí makroživiny i mikroživiny obsažené v potravě [11]. Kyselé prostředí navíc působí jako ochranný mechanismus proti patogenním mikroorganismům [11]. Chloridové ionty jsou také obsaženy v pankreatické šťávě a pomáhají neutralizovat natrávenou potravu přecházející z žaludku do tenkého střeva [10].

Ionty chloru jsou důležité pro správnou funkci nervového systému, zejména v mechanismu přenosu nervových signálů [12]. Receptory pro neurotransmiter kyselinu gama-aminomáselnou jsou propustné pro chloridové ionty [12]. Tento mechanismus umožňuje regulaci nervových signálů a udržuje jejich rovnováhu [11].

1.2 Významné sloučeniny chloru

Chlorové sloučeniny, jako je například chlorid sodný nebo chloroform, jsou důležité v mnoha odvětvích lidské činnosti [6]. Například v průmyslu, v potravinářství, jako konzervační látky a ve zdravotnictví [9]. Tyto sloučeniny jsou často nezbytné pro dosažení efektivity, účinnosti a bezpečnosti v mnoha procesech a aplikacích [6]. Chlorované sloučeniny mají také vážné negativní dopady na lidské zdraví i životní prostředí [9].

1.2.1 Kyselina chlorovodíková a fosgen

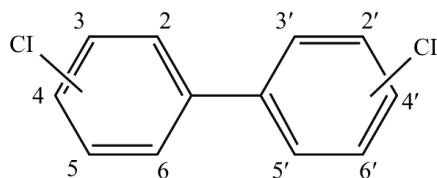
Kyselina chlorovodíková se používá běžně v potravinářství, textilním průmyslu, kovoprůmyslu a gumárenském průmyslu [13]. Najdeme ji, ale běžně i v jednotlivých domácnostech, kde se používá například k udržení pH v bazénech [13]. Při jejím úniku do půdy rychle reaguje s vodou a hydrolyzuje [14]. Tím může kontaminovat podzemní vody nebo rozpustit některé materiály [14]. Při vystavení očí nebo pokožky kyselinou u člověka dochází k jejich podráždění, popáleninám, nebo trvalé ztrátě zraku [14]. Akutní toxicita na živý organismus u kyseliny chlorovodíkové stojí na principu denaturace proteinů, a to může vést až ke koagulační nekróze [14].

Fosgen je za normální teploty a tlaku bezbarvý plyn [15]. Jelikož fosgen podléhá hydrolyze za vzniku kyseliny chlorovodíkové, způsobuje nepříjemné podráždění a popáleniny [16]. Pokud je člověk vystaven malým koncentracím tohoto plynu, dochází k podráždění očí nebo hrdla [16]. Při akutní expozici větším množstvím fosgenem se objevuje kašel a dušnost [16]. Jedním z nejhorších scénářů je u postižené osoby plicní edém, který se objevuje od 1 hodiny až po 24 hodinách [16]. Neexistuje žádné účinné antidotum proti otravě fosgenem [15].

1.2.2 Polychlorované bifenyly a naftaleny

Polychlorované bifenyly jsou skupinou průmyslových chemikálií, které můžeme najít jako kontaminanty životního prostředí [17]. Jejich obecná struktura je zobrazena na Obrázku 3 a skládá se z bifenyly chlorovaného v jedné nebo více polohách [18]. U osob vystavených vysokým dávkám polychlorovaným bifenyly se mohou objevit kožní onemocnění, jako

je akné a vyrážky [19]. Některé expozice mohou vést až k podráždění nosu, plic, gastrointestinálním potížením, změnám na játrech a v krvinkách [19].

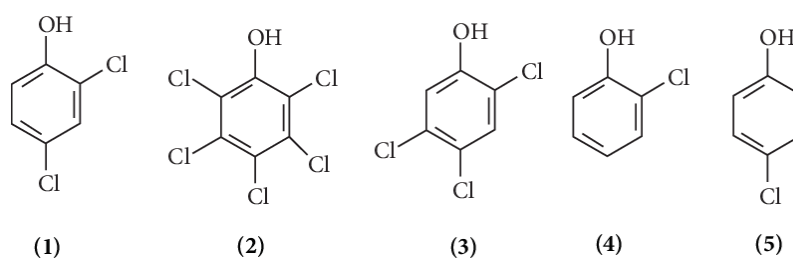


Obrázek 3: Obecná struktura chlorovaných bisfenolů [18]

Polychlorované naftaleny vykazují značnou toxicitu a jsou příčinou chlorakné, které je kožní reakcí na halogenované organické sloučeniny, žloutenky nebo rakoviny [20]. Po expozici polychlorovanými naftaleny je typické poškození jater, ledvin, reprodukčního systému, plic, slinivky břišní a sleziny [21]. Čím více jsou chlorované, tím vyšší toxicitu vykazují [20]. Ukládají se zejména v tucích, nervové tkáni a játrech [21].

1.2.3 Chlorfenoly

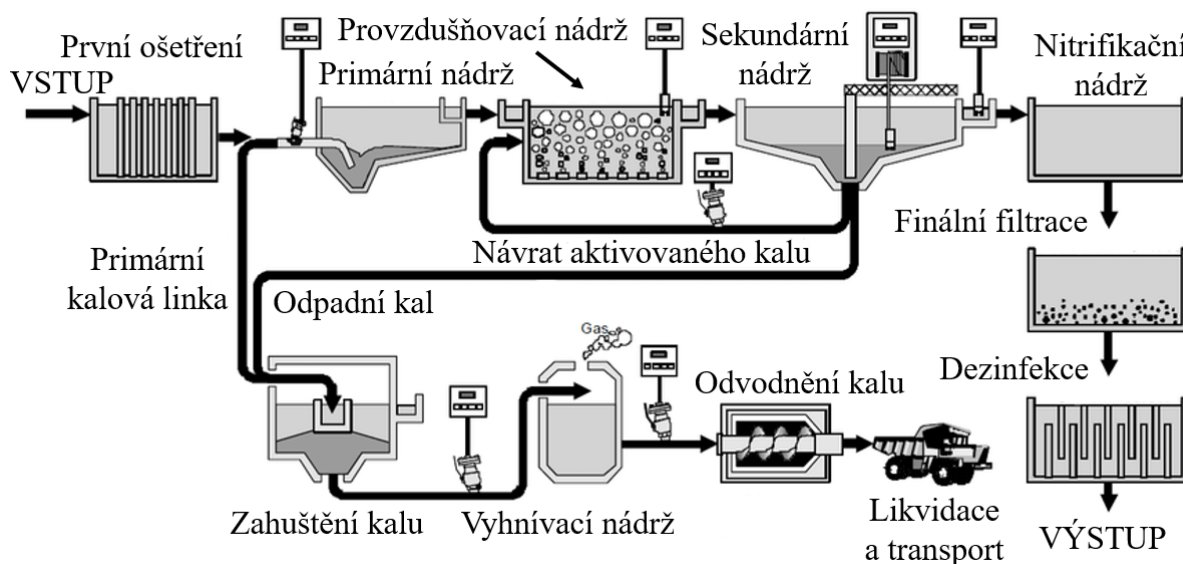
S chlorfenoly se můžeme setkat, jako s dezinfekčními prostředky a pesticidy [22]. Zároveň je jejich používání kritizováno kvůli vysoké toxicitě včetně estrogenních, mutagenních a karcinogenních účinků [23]. Mají také negativní vliv na životní prostředí [23]. Některé chlorfenoly byly v mnoha zemích zakázány, nebo bylo omezeno jejich používání kvůli potenciálně karcinogenním a toxickým účinkům [22]. S rozvojem alternativních technologií a snahou o ochranu životního prostředí se využití chlorfenolů postupně snižuje [23]. Struktura chlorfenolů znázorněna na Obrázku 4 [24].



Obrázek 4: (1) 2,4-chlorfenol, (2) 2,3,4,5,6-chlorfenol, (3) 2,4,5,-chlorfenol, (4) 2-chlorfenol, (5) 4-chlorfenol [24]

1.3 Čištění odpadních vod a odbourávání 4-chlorfenolu

Ochrana vod je jedním z nejdůležitějších úkolů v ochraně životního prostředí [25]. Kvalitu povrchových vod ovlivňují zdroje znečištění, mezi které patří města, průmyslové zóny nebo objekty zemědělské výroby [26]. Takto použitá voda se nazývá odpadní a je vypuštěna do povrchových vod [26]. Dále pak takto vypuštěná voda způsobuje nejen nevalný ráz krajiny, ale především vnáší do životního prostředí organické látky, toxiny, patogenní mikroorganismy a další kontaminanty ovlivňující ekosystém [25]. Jeden z možných způsobů prevence znečištění, je pak technologie čističky odpadních vod, která je znázorněna na Obrázku 5 [27].



Obrázek 5: Obecné schéma čistírny odpadních vod [27]

Klasické mechanické a biologické čištění odpadních vod nedokáže zcela eliminovat všechny znečišťující látky [28]. Proto je výskyt kontaminujících látek v životním prostředí velkou oblastí zájmu [28]. Odpadní vody rozdělujeme do několika kategorií [26]. Vody splaškové, které se produkují v bytech obyvatel [26]. Dalšími jsou vody průmyslové, které vznikají v průmyslových oblastech a posledními kategoriemi jsou vody dešťové a balastní [26]. Čističky odpadních vod jsou i přes všechny komplikace považovány za nejdůležitější umělou bariéru zabraňující vstupu kontaminantů do životního prostředí [28].

Surové odpadní vody jsou čištěny jednoduchými, nebo kombinovanými desinfekčními procesy [29]. Díky těmto procesům můžeme vyrábět vysoce kvalitní regenerovanou vodu, a tím řešit problémy s jejím nedostatkem [29]. Pro bezpečné opětovné použití vyčištěné odpadní vody nejen v zemědělském zavlažování je aplikace desinfekčních procesů minimálním požadavkem na kvalitu vody [30].

Mezi nejběžnější dezinfekční technologie patří především použití chloru [31]. Ten je silné oxidační činidlo a reaguje s organickou hmotou [32]. Během těchto procesů se vytváří škodlivé vedlejší chlorované produkty, které mohou být potencionálně nepříznivé k vodnímu prostředí a lidskému zdraví [32].

Dechlorace nejen 4-CP může být prováděna na olověných katalyzátorech, které jsou zachyceny na nosiči vytvořeného z Al_2O_3 , grafitu, AlF_3 nebo bimetalickými katalyzátory [33]. Jedním z problémů, který omezuje životnost katalyzátoru, je deaktivace způsobená kyselinou chlorovodíkovou [34]. Ta vzniká při dechloraci ve vodném prostředí [34].

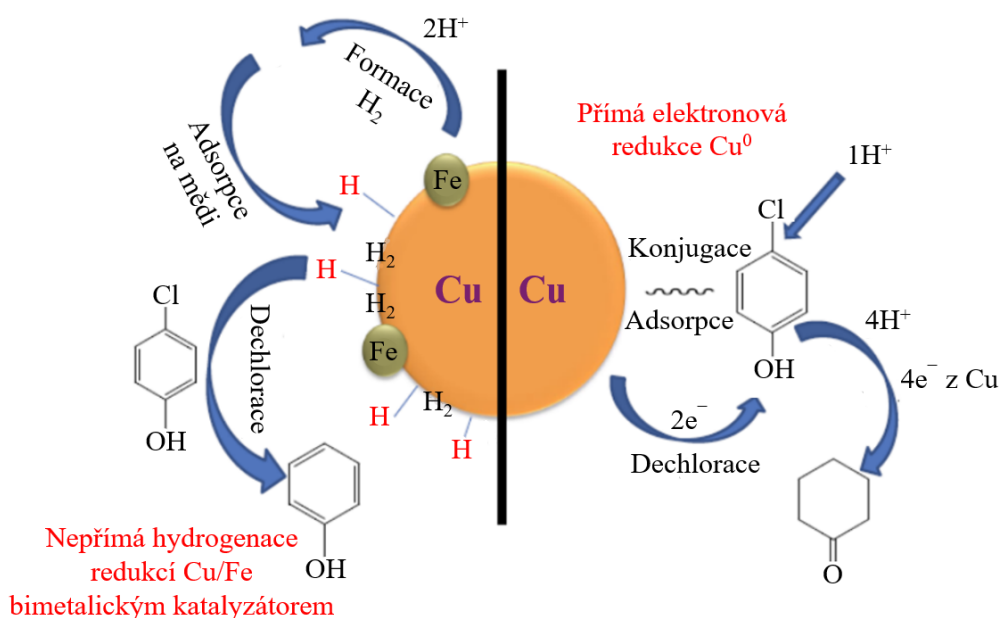
1.3.1 $\text{Pd}^0/\text{Al}_2\text{O}_3$ katalyzátor

Katalyzátor $\text{Pd}^0/\text{Al}_2\text{O}_3$ se používá pro hydrodechloraci 4-CP [35]. Jako zdroj aktivních forem kyslíku při katalýze olovnatým katalyzátorem se používá tetrahydridoboritan sodný nebo voda nasycená vodíkem [35]. Dehydrochlorace je zprostředkována pomocí získaného plynného vodíku a přeměňuje meziprodukty až na cyklohexanon [36]. Produkty reakce s tetrahydridoboritanem sodným jsou toxikologicky neškodné, což je považováno za jejich velkou výhodu [37]. Avšak jeho nejvyšší účinnost se týká alkyhalogenidů [36]. Reakce se sloučeninami obsahující benzenové jádro, a tudíž probíhají pomalu [37].

Reakce za přítomnosti $\text{Pd}^0/\text{Al}_2\text{O}_3$ katalyzátoru se provádí ve vsádkovém reaktoru vybaveném míchadlem, se vstupem a výstupem plynu [38]. Po uzavření reaktoru je přiváděn plynný vodík, aby se vytvořil kyslík [39]. Dalším krokem je přidání práškového katalyzátoru, který je po 2 hodinách následovaný přidáním roztoku 4-CP o koncentraci 1000 mg/l [39]. Vzorky jsou periodicky odebírány v určitých časových intervalech a měřeny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) [40]. Odstranění 4-CP se ukázalo do 1 hodiny při koncentraci $\text{Pd}^0/\text{Al}_2\text{O}_3$ o 1 % [39].

1.3.2 Cu⁰ a Cu/Fe bimetalický katalyzátor

Typ bimetalického katalyzátoru Cu/Fe vykazuje velmi vysokou reduktivní a dechlorační reaktivitu pro 4-CP ve vodném médiu [41]. Vykazuje typicky nepřímou hydrogenační dechloraci s hlavním produktem fenolu [42]. V porovnání s monometalickým Cu⁰ katalyzátorem, který vykazuje přímou elektronovou redukcí na hlavní produkt cyklohexanon, podmiňoval Cu/Fe menší dechlorační aktivitu [41]. Měď je tedy důležitým katalyzátorem díky své schopnosti působit jako donor elektronů při rozkladu 4-CP [43]. Systém rozkladu 4-CP popisuje Obrázku 6 [41]. Avšak její nevýhodou je vlastnost být potencionálně dobrým galvanickým urychlovačem koroze, a proto se obvykle váže s jinými kovy [43].



Obrázek 6: Dva redukční mechanismy 4-chlorfenolu [41]

Cu⁰ redukuje přímo na benzenovém kruhu díky jeho π elektronům [43]. Tento jev se potvrdil díky výkyvům pH reakce [43]. Pokud je pH nízké, tak k degradaci 4-CP nedochází, protože větší H⁺ zabraňuje reakci s katalyzátorem [43]. Na základě analýzy lze tedy navrhnout dechlorační mechanismy Cu a Cu/Fe [42]. Pokud je v reakci přítomné Fe působí jako katalyzátor pro Cu, za vzniku atomárního vodíku, který reaguje s 4-CP v roztoku a konečným produktem je cyklohexanon [41].

1.3.3 Raneyův nikl

Tento katalyzátor se ukázal, jako ekologicky přívětivý a účinný katalyzátor, který fungoval bez použití externího redukčního činidla [44]. Raneyova slitina Al/Ni se používá jako redukční činidlo v zásaditém prostředí hydroxidu sodného [45]. Bylo zjištěno, že redukční vlastnosti slitiny jsou vyšší v alkalickém prostředí zředěného hydroxidu sodného, schopného redukovat aromáty, nebo v některých případech štěpit vazbu mezi dvěma uhlíky [46]. Hliník se ze slitiny uvolňuje a vzniká plynný vodík za vzniku porézního Raneyova niklu s velkým povrchem [45]. Hydrogenace probíhá v dalším kroku na povrchu katalyzátoru [46].

Dechlorace 4-CP pomocí tohoto katalyzátoru spočívá v kinetice prvního řádu s rychlostní konstantou $0,017 \text{ min}^{-1}$ při $50 \text{ }^\circ\text{C}$ a přidavkem triethylaminu [44]. Výsledkem se ukázalo významné ovlivnění reaktivity nebo selektivity hydrodechlorace [47]. Dechlorace v nepřítomnosti redukujícího činidla podporuje kyselé až neutrální pH prostředí [44]. Při použití externího redukčního činidla spolu s katalyzátorem vzniká jako vedlejší produkt kyselina chlorovodíková, což zpomaluje rychlost dechlorace [48]. Různé druhy a mechanismy působení triethylaminu u chlorfenolů naznačují snadnější dechloraci v methanolu nebo ethanolu [47].

Raneyův nikl byl porovnán s katalyzátory jako Fe^0/Cu^0 , Al^0/Fe^0 , Pd/C a Fe^0 s modelovou aromatickou sloučeninou 4-CP [47]. Používaná koncentrace katalyzátorů byla 1 g/l spolu s počáteční koncentrací 4-CP 30 mg/l ve vodném roztoku a teplotě $30 \text{ }^\circ\text{C}$ [44]. Po 24 hodinách jsou bimetalické katalyzátory, mezi které řadíme Fe^0/Cu^0 , Al^0/Fe^0 a Fe^0 , schopny dechlorovat 40 % 4-CP [44]. U katalyzátoru Pd/C se jedná o 100% účinnost a u Raneyova niklu 84% účinnost odstraňovat 4-CP [44].

1.3.4 Homogenní a heterogenní Fentonův systém

Bylo zjištěno, že k odstranění fenolů, chlorfenolů nebo bisfenolů pomocí homogenní Fentonovi reakce je vhodné kyselé pH [49]. Nevýhodou této metody je u chlorfenolů jejich odstraňování pouze z 80 % [49]. Aby bylo dosaženo lepší degradace, je zapotřebí přidat více železnatých solí, což vede k vysokému obsahu rozpuštěného železa ve vodě [50].

Při použití heterogenního Fentonova systému, který je iniciován železným materiálem na uhlíkovém nosiči, je materiál degradován i ve vysokých koncentracích až 2 g/l 4-CP v průmyslových vodách [51]. Systém vykazuje skvělé výsledky i při znečištění vysokými

koncentracemi SO_4^{2-} [51]. Heterogenní Fentonův systém je pokročilý oxidační proces a je používán právě k degradaci žáruvzdorných odpadních vod, mezi které patří i 4-CP [50]. Na rozdíl od homogenního Fentonova systému má heterogenní systém své výhody v recyklovatelnosti, v použití v širokém rozsahu pH, snadné separaci pevné látky od kapaliny a absenci vzniku železného kalu [52].

Železný katalyzátor Fentonova systému na uhlíkovém nosiči je vyráběn metodou impregnace za mokra [53]. Vykazuje vyšší účinnost při rozkladu 4-CP za přítomnosti peroxidu vodíku [51]. Optimálními podmínkami se ukazují být 270 minut při 30 °C a počátečním pH 3 [53]. To zaručuje 88% účinnost při degradování 4-CP za přítomnosti, ve Fentonově systému vzniklého, hydroxylového radikálu a zároveň vykazuje vlastnosti stabilního katalyzátoru [53].

1.3.5 Fotokatalytická oxidace

Procesy fotolytické oxidace s použitím polovodičových materiálů jsou slibná alternativa odbourávání 4-CP, jelikož lze chlorované fenoly zcela odstranit až na CO_2 pomocí vhodných fotokatalyzátorů za přítomnosti UV světla [54]. Jako polovodič lze použít oxid titaničitý, jehož velkou výhodou je vysoká účinnost a kapacita pro degradaci odolných toxických látek [55].

Dalším polovodičem, který lze použít, je oxid zirkoničitý o koncentraci 0,3 – 5 % [56]. Tento oxid má mnoho výhod oproti jiným materiálům, jako je vysoká absorpční kapacita znečišťujících látek přítomných ve vodě [55]. Principem fotokatalytické oxidace odstraňování 4-CP spočívá v adsorpci na oxid zirkoničitý ve tmě a fotodegradaci za přítomnosti světla [54].

1.3.6 Adsorpce na aktivní uhlí s modifikovanými aminovými skupinami

Nasyntetizované práškové aktivní uhlí s modifikovanými aminovými skupinami je používáno pro jeho schopnost naadsorbovat a odstranit 4-CP ve vodném prostředí [57]. Povrchová adsorpce aktivním uhlím je vzhledem k jednoduchosti, cenové dostupnosti a netoxicitě vyhovující ekologickou variantou pro čištění pitné vody [58].

Aktivní uhlí můžeme vyrábět z různých materiálů a ukázalo se jako velmi účinný adsorbent pro mnoho anorganických a organických sloučenin [58]. Jako maximální adsorpční kapacita se ukázala 316,1 mg/g s vysokou afinitou ke 4-CP [57].

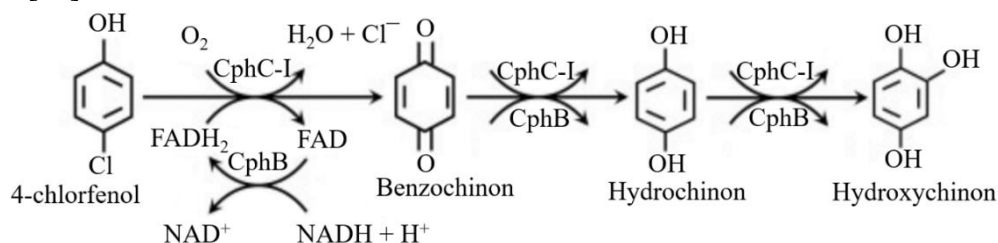
1.3.7 Imobilizované bakteriální buňky

Alternativní ekologickou možností, jak odstraňovat chlorfenoly, je pomocí imobilizovaných bakterií na podkladu [59]. Technika biochemické degradace je založena na enzymech degradujících kontaminanty a jejich přeměně na metabolické produkty [59]. Proces přeměny kontaminantů imobilizovanými bakteriemi se realizuje v sádkových reaktorech a to za pomoci *Pseudomonas testosteroni*, která odstraňuje přednostně 2-chlorfenol během 3 dní, a to při počáteční koncentraci 5 mg/l [60]. Dalšími použitelnými mikroorganismy jsou *Bacillus flexus*, *P. putida*, *P. aeruginosa* a *Agrobacterium radiobacter* [60].

Další možnou kombinací mikroorganismů, kterými lze odstraňovat 4-CP biodegradací, jsou *Pseudomonas* sp. kmene CF600 a *Stenotrophomonas maltophilia* [59]. Tyto dvě skupiny bakterií jsou schopné transformovat fenolové sloučeniny za přítomnosti benzoátu sodného [59]. Obsahují několik oxidačních enzymů, jako jsou monooxygenázy Cph-I a CphC-II ze skupiny flavinových monooxygenáz [61]. Nevýhodou tohoto způsobu je jeho délka působení, která může být i 100 dní, a proto se používá u 4-CP kontaminovaných zemin [59].

1.3.8 Biokatalyzátory

Jedná se o imobilizované enzymy na přírodním nosiči [61]. Používají se bakteriální enzymové systémy monooxygenáz CphC-I nebo dioxygenáz CphA-I [62]. Tyto enzymové systémy vykazují vysokou aktivitu i při opakovaném používání [61]. 4-CP byl postupně oxidován vícenásobným enzymovým komplexem prostřednictvím hydrochinonové dráhy popsané na Obrázku 7 [63]. Tyto enzymy využívají hydrochinon jako substrát bez využití NADPH (nikotinamidadenindinukleotidfosfát) a k 4-CP vykazují velkou afinitu [62]. Inaktivace takovýchto enzymů je největším problémem při použití v životním prostředí kvůli nestabilní teplotě a pH okolního prostředí, díky kterým může docházet k denuraci proteinů [62].



Obrázek 7: Počáteční rozklad 4-chlorfenolu (hydrochinonová dráha) katalyzovaný CphC-I [63]

1.4 Ekologie a legislativa pro ochranu vodních zdrojů

V ekologii odpadních vod Česká republika prosazuje opatření v ochraně vodního prostředí a udržitelnosti hospodaření s vodními zdroji [64]. Důležitými aspekty této problematiky je snaha minimalizovat znečištění odpadních vod a zajišťovat jejich řádné čištění před vypuštěním do povrchových vodních toků či podzemních zdrojů pitné vody [64]. Česká republika se řídí legislativou a nařízeními EU [65]. Důležitou součástí ekologie odpadních vod je také výzkum a inovace v oblasti čištění vod a její úpravy, které směřují k efektivnějšímu a udržitelnějšímu čištění [65].

1.4.1 Zákony a vyhlášky související s čištěním vod a prevencí kontaminace

Zákon č. 254/2001 Sb., o vodách stanovuje obecné principy ochrany a hospodaření s vodami [65]. Obsahuje ustanovení o ochraně vodních ekosystémů a kvality vody včetně opatření proti znečištění odpadních vod [66]. Tento zákon stanovuje základní principy, které musí být dodržovány při správě a ochraně vodních zdrojů [65]. Patří sem principy, jako je prevence a kontrola znečištění, udržitelnost využívání vod, ochrana před negativními účinky povodní a sucha, a také zlepšování stavu a kvality vodního prostředí [66].

Zákon stanovuje některé důležité povinnosti a opatření, která mají být provedena k dosažení těchto cílů [65]. Patří sem například povinnost vypracování a pravidelné aktualizace plánů hospodaření s vodami, monitorování stavu vodního prostředí a kvality vod, přijímání opatření k omezení a prevence znečištění odpadních vod [67]. Tento zákon také stanovuje povinnosti orgánů veřejné správy v oblasti ochrany vodních zdrojů a upravuje postupy pro řešení sporů a porušení právních předpisů v této oblasti [65]. Je základním právním rámcem pro ochranu vodního prostředí v České republice a hraje klíčovou roli při zajištění udržitelného využívání vodních zdrojů pro současné i budoucí generace [65].

Nařízení vlády č. 352/2010 Sb., o emisních limitních hodnotách stanovuje emisní limity pro znečišťující látky uvolňované do vodního prostředí z různých zdrojů, včetně odpadních vod [68]. Do této skupiny spadají i chlorfenoly [67]. Horní hranice maximální koncentrace 4-CP a ostatních substituovaných fenolů v odpadních vodách je 30 mg/l [67]. V pitné vodě pak nesmí koncentrace přesáhnout 0,5 µg/l [68].

Nařízení č. 22/2015 Sb., o vyhlášení některých látek za prioritní látky pro vodní prostředí identifikuje látky, které jsou považovány za prioritní z hlediska ochrany vodního prostředí a mohou být obsaženy v odpadních vodách [69]. Tyto látky podléhají zvláštnímu monitorování a regulaci [67].

1.5 Mechanismus biotransformace 4-chlorfenolu

Chlorfenoly jsou běžnými kontaminanty životního prostředí, které se používají v mnoha odvětvích průmyslu, jako je výroba zemědělských chemikálií, léčiv, pesticidů nebo barviv [22]. Tyto sloučeniny mohou být původcem mnoha histologických či genetických abnormalit u lidí i zvířat [22]. Chlorfenoly způsobují v buňkách oxidační stres generováním reaktivních forem kyslíku (ROS), které indukují lipoperoxidaci a oxidativní poškození DNA spolu s inhibicí antioxidantních systémů [70]. Dochází k poškození jater, mozku, gastrointestinálního traktu a horních cest dýchacích [70]. Chlorfenoly jsou zároveň považovány za velmi nebezpečné pro lidskou pokožku [71]. V některých případech intoxikace u lidí byla hlášena methemoglobinémie, hemolytická anémie nebo hyperbilirubinémie [71].

Xenobiotika, jako 4-CP, jsou hlavním důvodem k obavám po celém světě [72]. Globální nárůst průmyslových a zemědělských aktivit, vedl k jejich zvýšené produkci [22]. V minulosti byl 4-CP využíván hlavně kvůli svým fungicidním a baktericidním vlastnostem, jako je impregnace dřeva, výroba sterilních ob vazů, dezinfekce nebo používání pesticidů [72]. Během odbourávání xenobiotik mohou vznikat více toxické meziprodukty, což vede až k rakovinnému bujení [22]. Proto je snaha pochopit osud chlorfenolů v životním prostředí [22].

Struktura 4-CP je založena na fenolovém aromatickém jádru, které má na 4. uhlíku vázaný atom chloru [73]. Přirozeně, tedy při normální teplotě a tlaku, se vyskytuje ve formě pevného krystalu s teplotou tání okolo 42 °C [73]. Látka je rozpustná ve vodě a organických rozpouštědlech [72]. Vlastnosti 4-CP jsou popsány v Tabulce 1 [74].

Tabulka 1: Chemické a fyzikální vlastnosti 4-chlorfenolu [74]

Bod tání	42-45 °C	Zápach	Fenolický
Bod varu	220 °C	Rozpustnost ve vodě	2,7 g/100 ml
Hustota	1,306 g/ml	Citlivost	Na vzduch
Index lomu	1,5579	Stabilita	Stabilní; Nestabilní s anhydridy, oxidačními činidly, železem
pKa	9,18		
Barva	Bílá/Světle žlutá		

1.5.1 První fáze biotransformace 4-chlorfenolu

Jedná se o metabolický proces odbourávání endogenních a exogenních látek, který probíhá především v játrech, ale může probíhat i v jiných typech tkání [75]. Proces biotransformace probíhá v sérii reakcí, které postupně mění strukturu metabolizovaných látek [76]. Během této kaskády reakcí se může stát, že přeměňovaná látka zmírní nebo naopak zvyšuje svoji toxicitu [76]. To se může stát i u jinak netoxických substrátů [77].

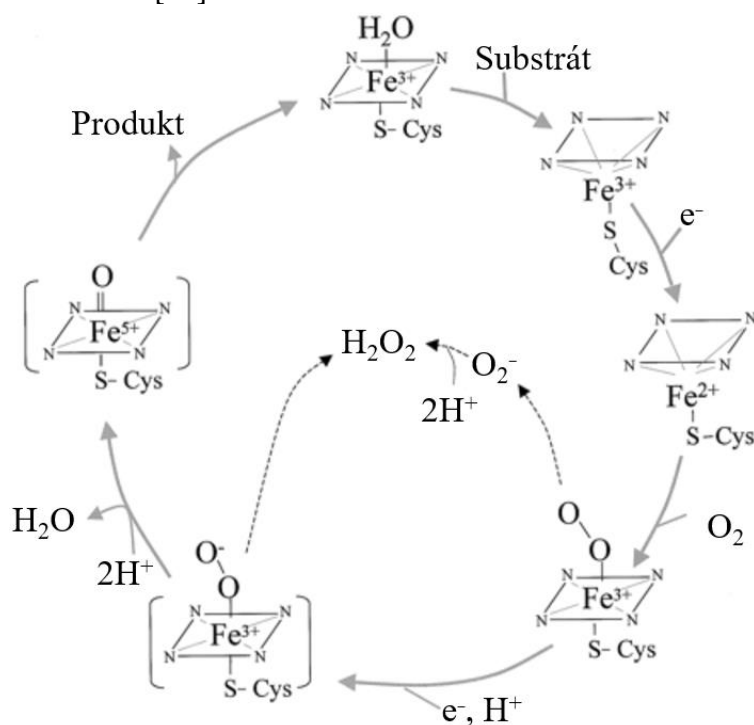
Cesta biotransformace se dělí na 2 fáze [76]. První fáze spočívá v přeměně substrátu oxidací, jež zároveň zavádí reaktivní skupinu do xenobiotik [78]. Lipofilní molekuly zůstávají neionizované při fyziologickém pH a tato fáze z nich udělá ve vodě rozpustné metabolity, které vstupují do druhé fáze [75].

Chlorfenoly jsou velkým problémem kvůli jejich perzistenci, bioakumulaci a vysoké toxicitě, které vykazují aktivitu podobnou hormonům v organismu [79]. Díky těmto schopnostem jsou chlorfenoly považovány za potencionální endokrinní disruptory [79]. Po vstupu do lidského těla mohou chlorfenoly soutěžit o vazebná místa na receptorech transtyretinu a hormonů štítné žlázy, což vede k porušení chodu metabolismu, ale také k ovlivnění celého endokrinního systému [77].

Enzymové systémy v první fázi biotransformace určují schopnost organismu, jak se vypořádat s xenobiotiky [78]. Monooxygenázy cytochromu P450 (CYP450) představují jeden ze stěžejních způsobů odbourávání exogenních látek [78]. Tyto enzymy jsou na membráně vázané hemmonoxygenázy známé pro svou schopnost vložit jeden atom kyslíku do výjimečně širokého spektra substrátů a zároveň druhý atom redukovat na vodu [80]. Avšak

některé substráty včetně mnoha organohalogenovaných a nitrosloúčenin představují malou až nulovou možnost oxidace [80]. Proto je možné za hypoxických podmínek provádět eliminačně redukční reakce, a tím provádět dehalogenace [80].

Enzymy CYP450 se vyskytují přirozeně v různých tkáních a formách [78]. Genetické jednonukleotidové polymorfismy (SNP) vedou k přirozeně snížené, nebo zvýšené schopnosti metabolizovat [75]. Mezi rizikové faktory schopnosti metabolizovat exogenní látky, patří environmentální toxiny, drogy, alkohol či kouření [75]. Enzymy CYP450 substráty oxidují nebo peroxidují nespecificky podle substituovaných skupin [81]. Některé isoformy CYP450 jsou specifické ve výběru přeměňované molekuly [81]. Zejména v endoplazmatickém retikulu, katalyzují velké množství chemických reakcí a mohou využívat téměř neomezený počet biologicky vyskytujících se sloučenin [81]. Schéma katalytického systému CYP450 cyklu je znázorněno na Obrázku 8 [82].

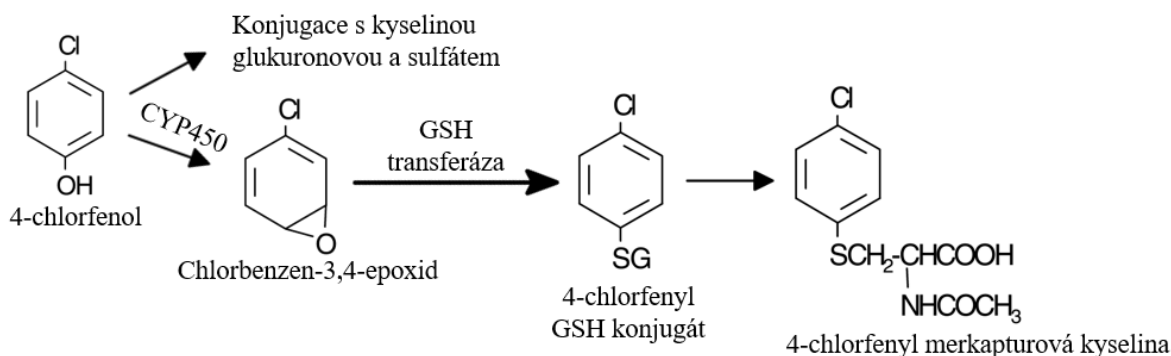


Obrázek 8: Schéma cyklu monooxygenázy CYP450 [82]

Enzymy CYP450 jsou obecně vysoce reaktivními radikálovými oxidanty kationtu železa [77]. Přispívají k transformaci xenobiotik na méně či více toxické metabolity [77]. Díky variantě enzymu CYP3A4 je epoxidace dvojné vazby využívána na různé substráty, jako jsou olefiny a aromatické uhlovodíky [83]. Epoxidy, které během reakce vznikají, mohou následně reagovat s DNA a proteinovými aminokyselinami, kde zároveň dochází k jejich poškození [84].

V dalším kroku pak substráty podléhají enzymatické nebo neenzymatické hydrolýze v kyselějších buněčných fázích, čímž vznikají dihydroxylované metabolity se sníženou toxicitou [84]. Takovým metabolitem může být i hydrochinon nebo halochinon [85]. Nicméně epoxidové a hydrochinonové metabolity mají vysokou reaktivitu s makromolekulami prostřednictvím kovalentní modifikace, a proto je není jednoduché zachytit [85].

4-CP vůči různým druhům CYP450 působí různými mechanismy [86]. U varianty enzymu CYP2E1 bylo uvažováno jako o možném způsobu řešení nealkoholické steatohepatitidy [86]. Při použití toxinu 4-nitrofenolu, který se váže na CYP2E1, má 4-CP díky své lipofilitě vyšší afinitu k aktivnímu místu tohoto enzymu [86]. To má za následek zablokování a inhibici enzymu s 60% účinností [86]. Předpokládaný průběh biotransformace 4-CP za přítomnosti enzymů CYP450 je pospsána na Obrázku 9 [87].



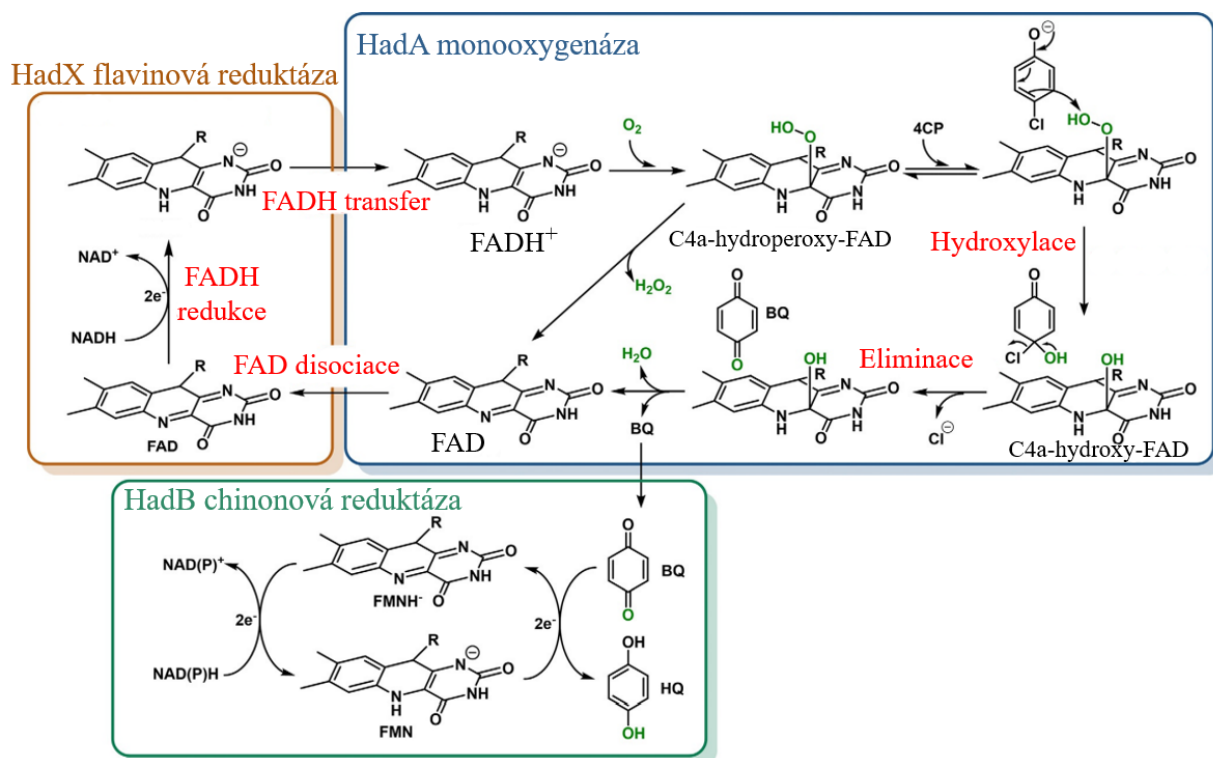
Obrázku 9: Předpokládaná metabolická cesta 4-CP za přítomnosti CYP450 [87]

Kontinuální produkce reaktivních forem kyslíku se zdá být jedním z nejdůležitějších výsledků spotřeby NADPH, což znamená, že tyto enzymy významně přispívají k buněčné produkci volných radikálů odvozených od kyslíku [81]. Důsledkem této generace volných radikálů odvozených od CYP450 je zvýšení aktivity redox-senzitivního transkripčního faktoru, NF- κ B a expresi vaskulární buněčné adhezní molekuly [88].

Do biotransformace se zapojuje mimo enzymů CYP450 i menší rodina flavinových monooxygenáz (FMO) [89]. Tento typ enzymů pro svoji katalýzu dehalogenace využívá flavin adenin dinukleotid (FAD) jako prostetickou skupinu [89]. Enzymy FMO používají také společně s FAD kosubstráty, jako je koenzym NADPH s kyslíkem [90]. Monooxygenázové systémy CYP i FMO mohou mít afinitu ke stejnému substrátu, ale ne vždy vytváří stejné produkty [90].

Flavin dependentní dehalogenázy ze skupiny FMO využívají flavin jako kofaktor ke katalýze štěpení vazby uhlík halogen v halogenovaných sloučeninách [91]. Takové sloučeniny se do organismu dostávají jako perzistentní látky znečišťující prostředí [22]. Dehalogenázy systému FMO jsou rozděleny do 3 tříd [89]. Jedná se o skupiny enzymů flavin dependentních kyslík dehalogenáz, flavin dependentních redukčních dehalogenáz a neredoxní flavin dependentních dehalogenáz [91].

FMO se účastní katalytického mechanismu pomocí dvou redoxních dějů [92]. U těchto dějů záleží na typu enzymu a kterou reakci přesně katalyzují [92]. V prvním kroku katalytického cyklu dochází k redukcí FAD dvěma elektrony z koenzymu NADPH [93]. Takto redukovaný flavin reaguje s molekulárním kyslíkem a poskytuje flavin-hydroperoxid, jež následně reaguje s nukleofilem [93]. Tento děj probíhá velmi rychle a jeho vedlejším produktem je voda [90]. Navrhovaný reakční mechanismus se substrátem 4-CP je popsán na Obrázku 10 [91].



Obrázek 10: Dechlorace 4-CP třemi flavin-dependentními enzymy ze systému HadA [91]

Flavoproteiny poskytují NADP⁺, který vystupuje jako kompetitivní inhibitor koenzymu NADPH [93]. NADP⁺ je důležitý při reakci FADH₂ s kyslíkem, protože zabraňuje zvýšené produkci peroxidu vodíku [93]. FMO se vyskytuje ve zvýšených koncentracích

v endoplazmatickém retikulu některých tkání, kde je zvýšená produkce superoxidového radikálu nebo peroxidu vodíku [90].

Enzymatická aktivita byla potvrzena pouze u FMO1, FMO2 a FMO3 [94]. V lidských játrech se nachází isoforma FMO3, zatímco FMO1 se nachází přednostně v ledvinách [94]. V průběhu života se jejich exprese mění, přičemž k největším rozdílům dochází během těhotenství, kde je zvýšená koncentrace FMO1 [94].

Mezi typické substráty pro FMO1 patří např. fenthion, který působí jako inhibitor cholinesterasy [90]. Dalším je methimazol používaný jako thyreostatikum [90]. Genetické SNP ovlivňují rychlost reakce odbourávání [94]. Jedná se o variace DNA sekvence, kdy se liší pouze o jediný nukleotid a v současné době identifikujeme přibližně dvacet variant [94].

FMO2 katalyzuje oxygenaci velkého množství polutantů životního prostředí obsahujících síru nebo organofosfátové sloučeniny [89]. Naopak také katalyzuje přeměnu thiomocoviny a kyseliny sulfenové, které podléhají redoxní reakci následovanou konjugací s glutathionem, která vede ke zvýšenému oxidačnímu stresu z důvodu vyčerpání redukováného glutathionu a NADPH [90]. Proto lze předpokládat, že jedinci s rozdílným SNP, a tím zvýšenou aktivitou FMO2, jsou odolnější vůči otravě organofosfáty [89].

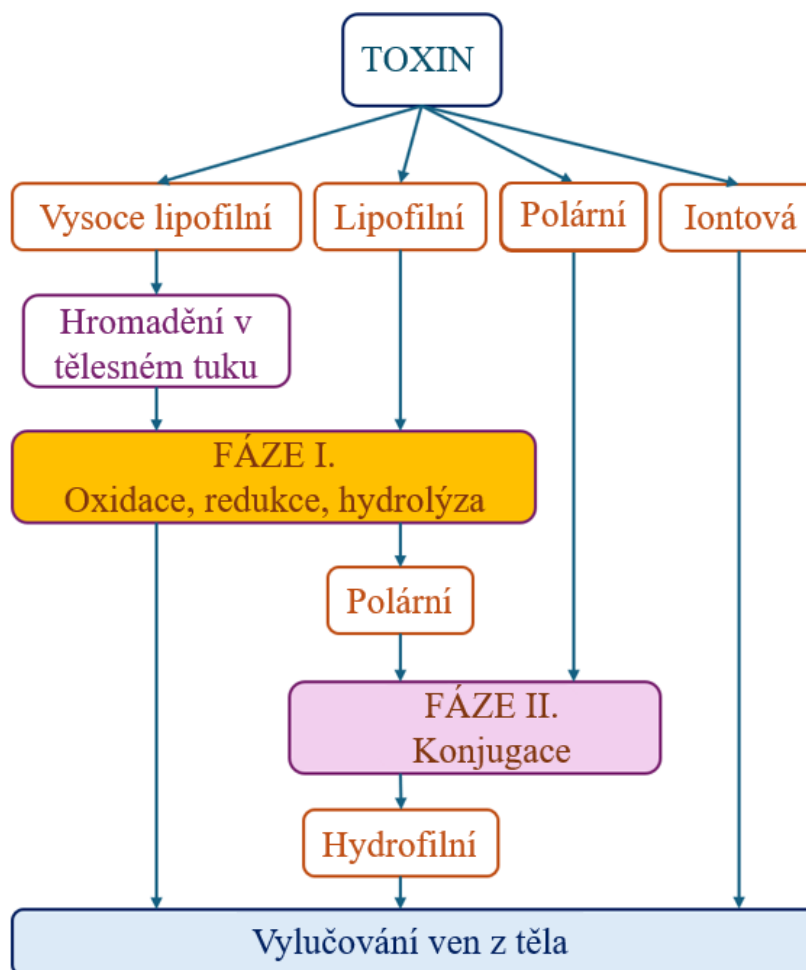
FMO3 je hlavním typem těchto monooxygenáz v lidských jaterních buňkách, a to především primárních, sekundárních a terciálních aminů [95]. Aminy podléhají N-oxygenaci za tvorby hydroxylaminu a následovaným vznikem oximu [95]. Avšak jeden z nejvýznamnějších rolí FMO3 je metabolismus (S)-nikotinu, trimethylalaninu nebo tamoxifenu [94].

1.5.2 Druhá fáze biotransformace 4-chlorfenolu

Druhá fáze biotransformace 4-CP zahrnuje procesy konjugace, které zvyšují jeho rozpustnost a usnadňují eliminaci z těla [76]. Tyto konjugace nejčastěji probíhají prostřednictvím enzymatických reakcí, jako je glukuronidace, sulfatace a další [96]. V případě glukuronidace je 4-CP konjugován s glukuronátovou skupinou za účasti enzymu UDP-glukuronyltransferázy, čímž vzniká 4-chlorfenol-glukuronid, který je snáze vylučován močí nebo žlučí [97]. Sulfatace, další důležitý proces druhé fáze biotransformace, zahrnuje přenos sulfátové skupiny na 4-CP pomocí sulfotransferáz, což vytváří 4-chlorfenol-sulfát, který

je také snáze vylučován z těla [98]. Tyto reakce jsou klíčové pro detoxikaci 4-chlorfenolu a ochranu těla před jeho potenciálními toxickými účinky [76].

Druhá fáze poskytuje velký polární metabolit přidáním endogenních hydrofilních skupin za vzniku ve vodě rozpustných struktur [76]. Mezi takové reakce patří methylace, glukuronidace, acetylace, sulfatace, konjugace s glutathionem nebo konjugace s aminokyselinami [76]. Glukuronidace je nejběžnější konjugační cestou kvůli dostupnosti kyseliny glukuronové a rozmanitosti funkčních skupin, se kterými se může kombinovat [97]. Uridin-5-difosfát glukuronyltransferázy (UGT) se účastní biotransformace spousty léčiv nebo endogenních sloučenin, jako jsou bilirubin a tyroxin [97]. Druhá fáze biotransformace především snižuje polaritu metabolizovaných látek [99]. Obecné schéma biotransformace je popsáno na Obrázku 11 [99]



Obrázek 11: Obecné schéma biotransformace [99]

UGT je enzym s širokými substrátovými specifitami [99]. Na metabolické eliminaci endogenních látek se podílejí různé izoformy tohoto enzymu [100]. Jedním z příkladů může být izoenzym UGT podílející se na glukuronidaci hormonů štítné žlázy s označením UGT1A1 v játrech, UGT1A8 a UGT1A10 v jejunu [101]. Polymorfismus enzymů ovlivňuje metabolické chování [101]. Díky této komplexnosti a všestrannosti je důležitou součástí metabolismu endogenních látek, jako je bilirubin, steroidní hormony, serotonin a žlučové kyseliny [97].

V případě metabolizace 4-CP je proces založen na tvorbě 4-chlorfenol-glukuronidu, což je metabolit, který je mnohem snáze vylučován z těla nežli samotný 4-CP [76]. UDP-glukuronyltransferáza katalyzuje přenos glukuronátové skupiny z uridin-5-difosfát glukuronátu na hydroxylovou skupinu 4-CP, a tím se vytvoří konjugovaný produkt [99]. Proces glukuronidace 4-CP zvyšuje jeho rozpustnost ve vodě, což usnadňuje jeho vylučování žlučí [97].

Sulfatace probíhá podobně jako glukuronidace a je také součástí druhé fáze biotransformace [96]. Sulfotransferázy katalyzují přenos sulfátové skupiny z molekuly fosfoadenosylsulfátu na hydroxylovou skupinu 4-CP [98]. Tím vzniká konjugovaný produkt, který je obvykle mnohem více rozpustný ve vodě než samotný 4-CP a snáze se odstraní z organismu močí [76].

Fyzikální a chemické vlastnosti substrátů, jejich struktura a chemické vlastnosti mohou ovlivnit schopnost sulfotransferáz přeměňovat substráty v produkty [96]. Rozličné typy izoenzymů sulfotransferáz mají různou specifickou k substrátům [98]. Například přítomnost hydroxylových nebo aminových skupin může zvýšit nebo snížit afinitu mezi molekulou substrátu a izoenzymu [98]. Jako substráty pro sulfotransferázy mohou být označeny jako různá xenobiotika, léčiva, hormony a další endogenní látky [76].

1.6 Expozice

4-CP je organická sloučenina používaná v dezinfekčních prostředcích, herbicidech, pesticidech a v dalších průmyslových procesech [70]. Nebezpečí spojené s touto látkou spočívá v její schopnosti způsobovat rozsáhlé poškození tkání, zejména v důsledku jejího dráždivého účinku na dýchací cesty, kůži a vnitřní orgány [71].

1.6.1 Akutní intoxikace 4-chlorfenolem

Akutní intoxikace 4-CP je vážným zdravotním stavem, který je způsobený vystavením se toxické látce o relativně vysokých koncentracích v krátkém časovém období [71]. Vystavení 4-CP může nastat inhalací par nebo aerosolu, požitím ústy nebo absorpcí pokožkou [71]. Symptomy akutní intoxikace se projevují podrážděním očí, nosu a hrdla, dušností, nauzeou, zvracením, bolestmi hlavy, závratěmi a křečemi. V závažných případech může dojít i k selhání jater a ledvin [70].

Aby došlo ke zmírnění akutní intoxikace 4-CP musí dojít k odstranění látky z okolí postiženého [102]. U intoxikovaného pacienta podporujeme dýchání, kardiovaskulární systém a detoxikaci organismu, zároveň se snažíme o zmírňování symptomů [103]. To, v případě hospitalizace, může znamenat podávání aktivního uhlí nebo jiných adsorbentů 4-CP v trávicím traktu nebo intravenózní podávání tekutin a léků ke zmírnění symptomů a podpoře funkce jater nebo ledvin [102].

Mechanismus poškození jater při intoxikaci se díky SNP může u jednotlivých jedinců lišit [94]. Během působení 4-CP na organismus dochází k tvorbě oxidativního stresu, který způsobuje tvorbu ROS [70]. ROS poškozují buněčné struktury, což ve vážných případech vede k selhávání jater [103]. Oxidativní stres vznikající díky 4-CP v buňkách má také schopnost ovlivňovat funkci mitochondrií [104]. Porucha mitochondriální funkce vede k narušení energetického metabolismu buňky a k jejímu poškození [104].

4-CP je schopný aktivovat imunitní systém [105]. Jeho expozice vede k imunitní odpovědi v játrech, která může přispět k zánětu a poškození hepatocytů [105]. Zánět je jedním z možných faktorů v patogenezi intoxikace [106]. Imunitní odpověď zahrnuje zapojení různých buněčných a molekulárních mechanismů [106]. Aktivovány jsou makrofágy a dendritické buňky, které mají schopnost upozornit ostatní buňky imunitního systému na přítomnost cizích látek v organismu [107]. Prezentace antigenu dendritickými buňkami nebo makrofágy vyvolává onu imunitní odpověď, která zahrnuje produkci prozánětlivých cytokinů a chemokinů, jako je například interleukin-6 nebo tumor nekrotizující faktor alfa [107].

Součástí imunitní odpovědi je také adaptivní imunitní systém, který zahrnuje aktivaci T a B-lymfocytů [107]. Lymfocyty, jako buňky imunitního systému, mohou rozpoznat specifické části 4-CP a reagovat na ně produkcí protilátek, nebo reakcí cytotoxických

T-lymfocytů [106]. Imunitní reakce adaptivní imunity je důležitá pro eliminaci 4-CP z těla, ale zároveň může přispět k zánětu a tkáňovému poškození [105].

1.6.2 Chronická intoxikace 4-chlorfenolem jako hormonálním disruptorem

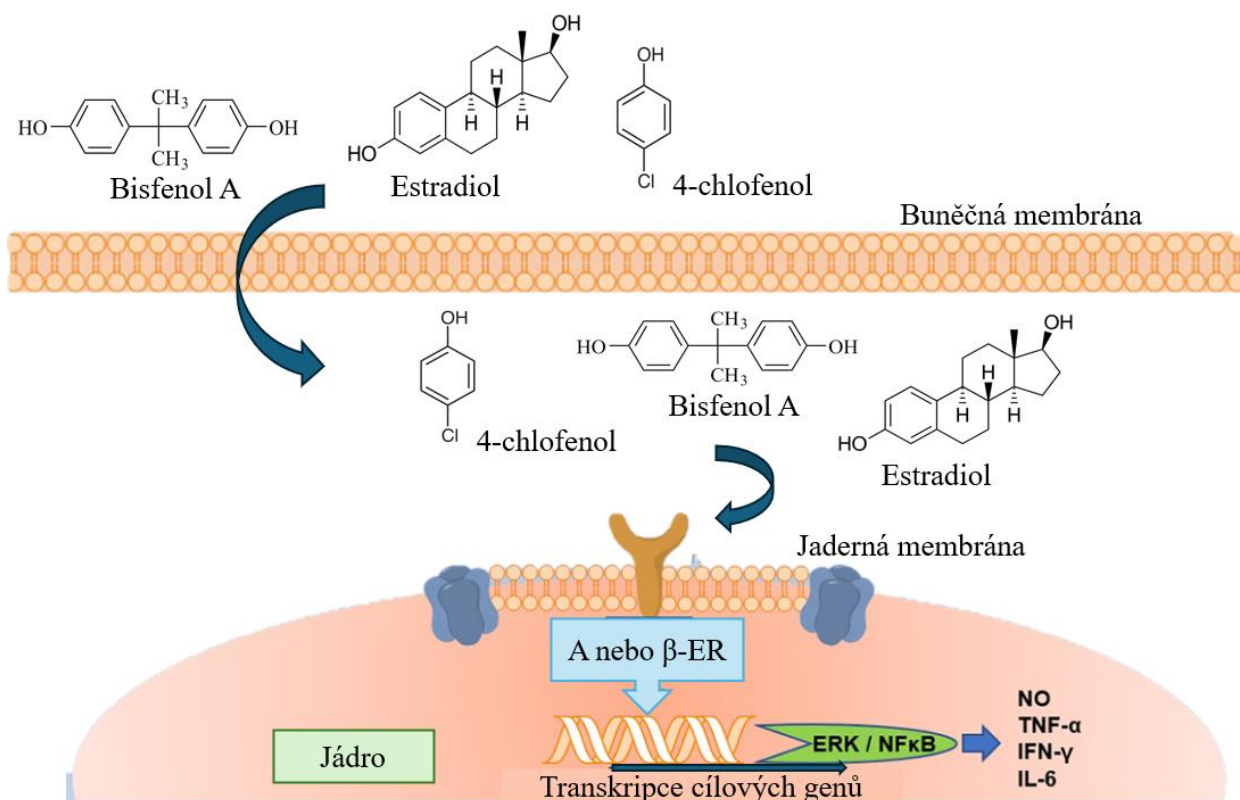
Jako hormonální disruptor má 4-CP schopnost ovlivňovat hormonální systém u člověka [108]. S rozvojem industrializace nastalo velké vypouštění chemikálií narušujících endokrinní systém organismů včetně savců [109]. Mezi tyto kontaminanty řadíme nejen chlorfenoly společně s 4-CP, ale také bisfenol A nebo nonylfenol [110]. Tyto organické látky mají estrogenní účinky a díky tomu mohou napodobovat nebo blokovat účinky estrogenů v těle [108]. To má za následek různé důsledky, včetně poruch v reprodukčním systému, změn v sexuálním vývoji a dalších negativních efektů na zdraví [108].

4-CP se běžně vyskytuje v průmyslových odpadních vodách z výroby pesticidů, papíru, buničiny nebo vzniká při samotné dezinfekci vody [109]. Bisfenol A najdeme hlavně u polykarbonátů, epoxidových pryskyřic, polysulfonových pryskyřic a v mnoha dalších polymerních materiálech [110]. Nonylfenol se naopak vyskytuje v tekutých substancích, jako jsou neiontově povrchově aktivní látky a přísady do maziv [110]. Jeden z možných způsobů odstranění hormonálních disruptorů jsou pokročilé oxidační procesy založené na tvorbě volných radikálů při normální teplotě a tlaku [108].

Vazba 4-CP na estrogenní receptory je jedním z hlavních mechanismů účinku 4-CP jako hormonálního disruptoru [111]. Estrogenní receptory jsou proteiny, které reagují s tělu přirozenými estrogenními hormony [112]. 4-CP může tuto vazbu napodobovat nebo ji blokovat, což narušuje normální funkci estrogenního systému [111]. Takové narušení normální funkce estrogenního receptoru vede k různým poruchám v metabolických procesech, jako je hormonální nerovnováha [112].

Dalším mechanismem účinku 4-CP je ovlivnění enzymatických procesů v těle [78]. 4-CP ovlivňuje aktivity enzymů souvisejících s metabolismem hormonů, jako jsou enzymatické systémy monooxygenáz CYP450 a FMO [88]. 4-CP interferuje s hormonálními drahami a signálními mechanismy, které regulují fyziologické procesy v těle [88]. Tyto interakce mohou mít dalekosáhlé důsledky, včetně změn v růstu a vývoji reprodukčních orgánů, regulaci menstruačního cyklu a dalších hormonálně řízených funkcí [111]. Tímto způsobem ovlivňuje rychlost a efektivitu metabolismu estrogenů a dalších hormonů [111].

Na Obrázku 12 je stručně popsán mechanismus hormonálního ovlivňování fungování estrogenových cest nejen 4-CP [111]. Dochází k reakci s estrogenovým receptorem α a β [113]. Taková interference může aktivovat geny pro extracelulárním signálem regulovanou kinázu (ERK) a nukleární faktor κ B (NF κ B), které generují produkci prozánětlivých cytokinů a oxidu dusnatého [113].



Obrázek 12: Schéma působení hormonálních disruptorů [111]

1.7 Instrumentální analýza

Chlorfenoly jsou zařazené jako celosvětové kontaminanty životního prostředí, a proto je snaha vyvinout co nejlepší metody jejich detekce [114]. Cílem analýz je zachytit i stopové množství chlorfenolů [115]. Instrumentální analýza nederivatizovaných molekul se provádí kapalinovou chromatografií (LC), plynovou chromatografií (GC), nebo kapilární elektroforézou [116]. Chromatografické systémy se používají v kombinaci s detektory na principu ultrafialového nebo viditelného spektra světla (UV-VIS), fluorescencenčního detektoru, elektrochemického detektoru, nebo hmotnostní spektrometrie (MS) [114].

Pro analýzu chlorfenolů metodou GC se běžně používá příprava vzorku pomocí derivatizace [115]. Pro derivatizaci se využívají acetylační a silylační činidla, jejichž deriváty lze detekovat pomocí plamenově ionizačního detektoru (FID), detektoru elektronového záchytu (ECD), nebo MS [114].

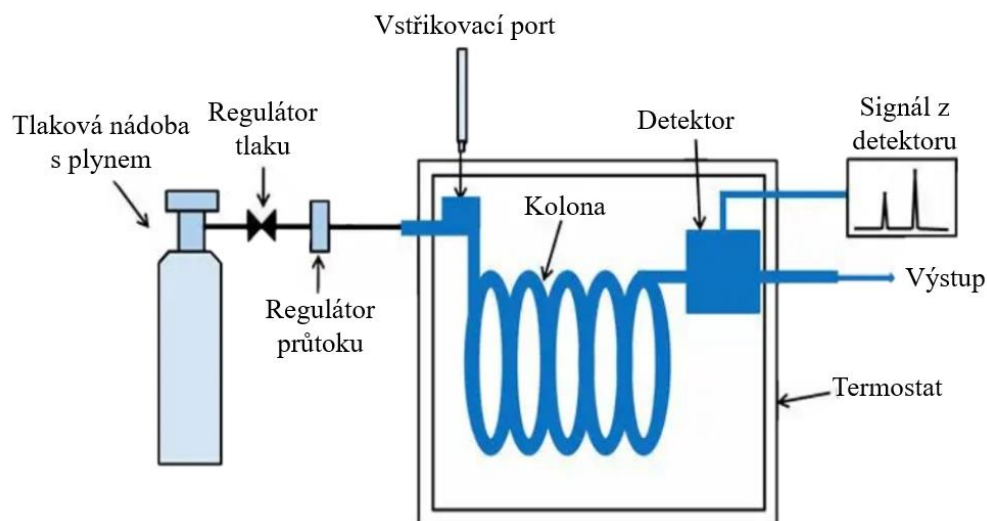
Vyvinutí vhodné analytické metody je předpokladem pro získání spolehlivých a přesných dat během měření [116]. Současné výzkumné úsilí se proto zaměřuje na aplikaci účinných strategií [116]. Každá diskutovaná metoda s příslušným analyzátozem má své výhody a nevýhody [114]. Avšak hlavní důraz by měl být kladen na cíl experimentu, jeho rychlost, ale také na přípravu vzorku nebo cenu celkové analýzy [117].

Metody jako GC-FID byly přijaty pro standardní analýzu mnoha polutantů, protože je dostatečně citlivá pro měření monoaromatických sloučenin [116]. Tyto techniky avšak mají mnohé nevýhody, jako je nekompatibilita s přímými analýzami ve vodných vzorcích a časově náročné přípravné kroky před analýzou [117].

1.7.1 Plynová chromatografie

GC je vyspělým a nepostradatelným analytickým nástrojem [118]. Principem analyzátoru je oddělování složek směsi analyzovaného vzorku pomocí proudu plynu, jako mobilní fáze, na základě afinity k fázi stacionární a bodu varu analytu [119]. Stacionární fázi do kolony vybíráme podle vlastností analytu, přičemž se může jednat o pevnou či kapalnou látku s polárními či nepolárními vlastnostmi [118]. V koloně se látky pohybují různou rychlostí a na základě teplotního programu dochází k oddělování jednotlivých složek [119].

Látky, které mají vyšší afinitu ke stacionární fázi, se pohybují pomaleji a tráví více času v koloně, zatímco látky s nižší afinitou ke stacionární fázi se pohybují rychleji a kolonu opouštějí dříve [118]. Existuje několik variant GC, zahrnující různé typy kolon, detektorů a nosných plynů umožňující analyzovat širokou škálu vzorků s různými vlastnostmi [119]. Na Obrázku 13 je popsáno stručné schéma GC [120]. Při výběru vhodné varianty GC je důležité zohlednit povahu vzorku, požadovanou citlivost detekce a další specifické požadavky analýzy [121]. Detekce a analýza separovaných látek se provádí pomocí detektoru, který měří jejich přítomnost a množství [121].



Obrázek 13: Schéma instrumentace GC [120]

Moderní GC analyzátoři jsou vybaveny širokou škálou detektorů včetně MS, FID, tepelně vodivostního detektoru a mnoha dalších, což umožňuje detekci a kvantifikaci různých typů látek s vysokou citlivostí a specificitou [121]. Ke zvolenému detektoru jsou často kombinovány různé typy kolon a nosných plynů pro dosažení optimálních výsledků analýzy [119]. Mezi nejběžněji používané nosné plyny patří helium, které je preferováno pro svou inertnost, vysokou tepelnou odolnost a rychlost difuze, což přispívá k rychlé separaci látek v koloně [118]. Dalším je dusík, který je také inertní a nachází uplatnění tam, kde není možné použít helium [122]. V některých případech lze použít i vodík, který je hojně využíván v kombinaci s FID díky své vysoké hořlavosti, což umožňuje citlivou detekci analytů [121]. Méně často využívaný je pak argon, který nachází uplatnění především v aplikacích vyžadujících inertní plyn s vyšší hustotou než helium, nebo v případech, kdy se pracuje s vysokým tlakem [122].

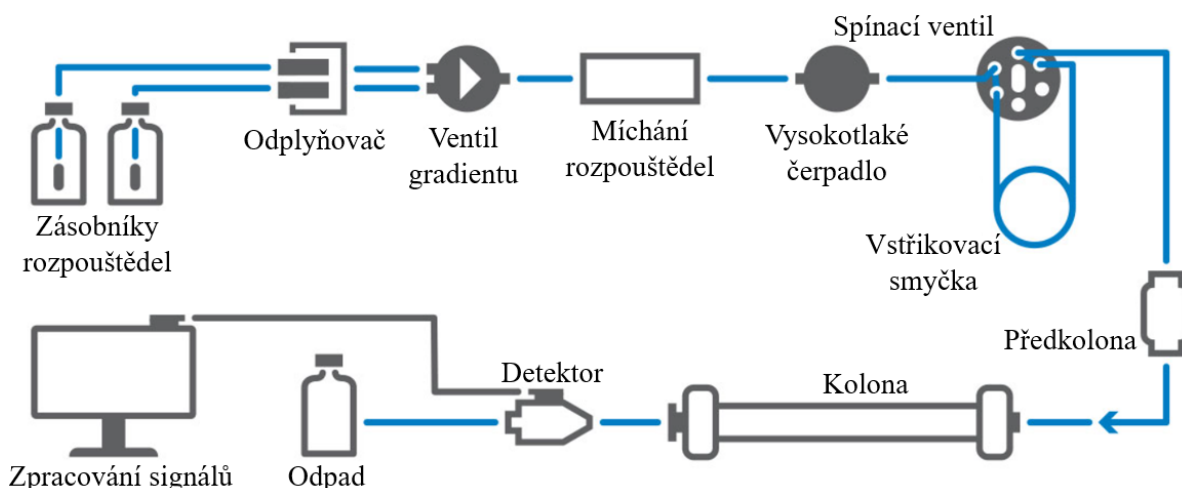
Při výběru kolony uvažujeme o několika možných variantách, které se liší svými vlastnostmi, a tím i použitím [119]. Kapilární kolony o vnitřním průměru v řádech mikrometrů poskytují vysokou rozlišovací schopnost a jsou vhodné pro separaci malých molekul [121]. Náplňové kolony obsahují pevnou stacionární fázi a mohou být vyrobeny z materiálů, jako jsou polymery nebo kovové či křemíkové sloučeniny [118]. Kolony s pevnou fází mají stacionární fázi pevně připojenou k vnitřní stěně kapiláry, což zajišťuje stabilitu a reprodukovatelnost oddělovacího procesu [121].

Kombinací nosných plynů a kolon je možné dosáhnout optimálních podmínek pro oddělení a analýzu různých složek analytů metou GC [119]. Optimalizace jednotlivých komponent je klíčová pro dosažení citlivé a selektivní analýzy [118]. Taková analýza umožňuje dosažení přesných analytických výsledků a poskytuje cenné informace pro různé aplikace, včetně farmacie, potravinářství, environmentálního monitorování a dalších oblastí [123].

Výsledkem analýzy na GC je chromatogram [119]. Je to grafické znázornění signálů z detektoru, kde je využito závislosti intenzity signálu na čase [124]. Takové nastavení závislosti poskytuje informace o složení a množství jednotlivých látek v analyzované směsi [124]. Díky tomuto principu se GC stala široce využívanou technikou v chemickém průmyslu, potravinářském průmyslu, medicíně a vědeckém výzkumu [118].

1.7.2 Kapalinová chromatografie

LC je separační technika, která umožňuje oddělit složky směsi na základě jejich interakce s pevnou stacionární a mobilní fází, jako kapalinou [125]. Dnes již běžnější formou se stala HPLC [125]. Principem metody je vstřikování vzorku do chromatografického systému, kde mobilní fáze unáší vzorek přes stacionární fázi, která je fixována na pevném podkladu v koloně [126]. Na Obrázku 14 je znázorněno schéma instrumentace HPLC [127]. Během průchodu analytu kapalinovým systémem se složky vzorku oddělují podle jejich schopnosti se vázat k mobilní a stacionární fázi [126]. Látky s větší afinitou k mobilní fázi migrují rychleji a jsou eluovány dříve, zatímco látky s větší afinitou k stacionární fázi zůstávají déle v systému [125].



Obrázek 14: Schéma instrumentace HPLC [127]

Detektory umístěné na výstupu chromatografu zaznamenávají složky směsi ve vzorku a generují signály, které jsou následně zpracovávány pomocí softwaru [125]. Na základě naměřených signálů detektorem se vytváří chromatogram, který poskytuje informace o složení a množství jednotlivých látek v analyzovaném vzorku [128]. Existuje několik variant kapalinové chromatografie, z nichž každá má své specifické vlastnosti a využití [129].

Mobilní fáze, jako jsou organická rozpouštědla včetně methanolu, acetonitrilu nebo ethanolu, jsou často využívány při analýze organických látek [125]. Dále se používají vodné roztoky, které jsou vhodné pro separaci polárních látek [128]. Svoji možnost použití jako mobilní fáze si našly také směsi organických rozpouštědel a vodních roztoků, které umožňují optimalizaci separace různých typů látek [129].

Stacionární fáze určuje interakci s látkami rozpuštěné v mobilní fázi, která je klíčová pro dělení složek ve vzorku [125]. Nejběžněji tvoří stacionární fázi hydrofobní materiál, a to dovoluje použití kolony pro separaci nepolárních látek [128]. Dalším typem jsou hydrofilní materiály vhodné pro separaci hydrofilních látek [126]. Ve speciálních případech je možné použít i smíšené fáze, která kombinuje vlastnosti reverzní a normální fáze a umožňuje širší rozsah separace analytu [125]. Nejběžnějším typem materiálu pro stacionární fázi v LC a HPLC je silikonový polymer, který je modifikovaný organickými skupinami, jako jsou octadecylsilan nebo oktadecylsilan [126]. Dalšími možnostmi materiálů vhodných pro použití jako stacionární fáze je silicagel, oxid hlinitý a různé další polymery s jejich modifikace [128].

Kombinace různých materiálů a chemických modifikací umožňuje optimalizovat separační podmínky pro konkrétní typy analytů a aplikací [130]. Důležité je vybrat stacionární fázi, která je kompatibilní s analyzovanými látkami a zaručuje tak přesné a spolehlivé oddělení složek vzorku [125]. Správná volba stacionární fáze je klíčová pro dosažení úspěšné HPLC analýzy a získání přesných analytických výsledků [128].

Kombinace mobilních a stacionárních fází umožňuje analytikům optimalizovat podmínky separace pro různé typy vzorků a aplikací LC v praktickém využití [130]. Flexibilita, kterou metoda nabízí ve výběru mobilních a stacionárních fází, je klíčová pro dosažení přesných a spolehlivých výsledků analýzy ve vědeckém výzkumu, farmacii, potravinářství a dalších oblastech [125].

1.8 Derivatizační činidla v analýze 4-chlorfenolu

Derivatizační činidla vhodná pro chlorfenoly se používají pro přeměnu a zvýraznění chemických skupin ve strukturách molekuly za účelem jejich snadné identifikace a kvantifikace [131]. Deriváty 4-CP mají vylepšené analytické vlastnosti včetně stability [132]. Tyto deriváty jsou lépe analyzovatelné separačními metodami GC a HPLC [131]. Toho se využívá při přesné kvantifikaci 4-CP v životním prostředí [131].

1.8.1 Acetylační činidla

Acetanhydrid je odvozen od kyseliny octové odstraněním vody [133]. Jedná se o bezbarvou, průhlednou a hořlavou kapalinu s charakteristickým octovým zápachem [133]. Používá se pro acetylaci 4-CP díky své schopnosti reagovat s hydroxylovou skupinou na benzenovém jádře [131]. Vytváří se acetylovaný derivát, který má lepší vlastnosti pro analýzu [131]. Acetylace umožňuje snazší oddělení analytu od ostatních látek ve vzorku a zvyšuje citlivost detekce, což umožňuje přesnější kvantifikaci [133].

Mechanismus acetylace 4-CP začíná reakcí na jeho hydroxylové skupině, která se chová jako elektrofil a je schopna přijímat acetylovou skupinu [133]. Během procesu se vytváří meziprodukty [131]. V několika krocích dochází k reakci se zásadou, kterou může být pyridin nebo acetonitril schopný odstranit proton z hydroxyly na 4-CP [132]. Na konci reakce dochází k vytvoření acetylovaného derivátu [131].

1.8.2 Silylační činidla

Silylační činidla jsou chemikálie, které se používají k derivatizaci molekul analytů s hydroxylovou skupinou [132]. Obecná struktura těchto činidel zahrnuje tři methylskupiny navázané na křemík [131]. Na tyto methylové skupiny se mohou vázat další funkční skupiny, které určují specifické vlastnosti silylačního činidla [131]. Funkční skupiny silylačních činidel mohou zahrnovat chloridy, trifluoracetamidové nebo acetamidové skupiny [132].

Tetramethylsilan (TMS), N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) a N-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamid se využívají k silylaci hydroxylové skupiny, která je obsažena i ve struktuře 4-CP [132]. Umožňují reakci a přeměnu hydroxylových skupin na deriváty, a tím vznikají lepší vlastnosti pro analýzu chromatografickými metodami [131].

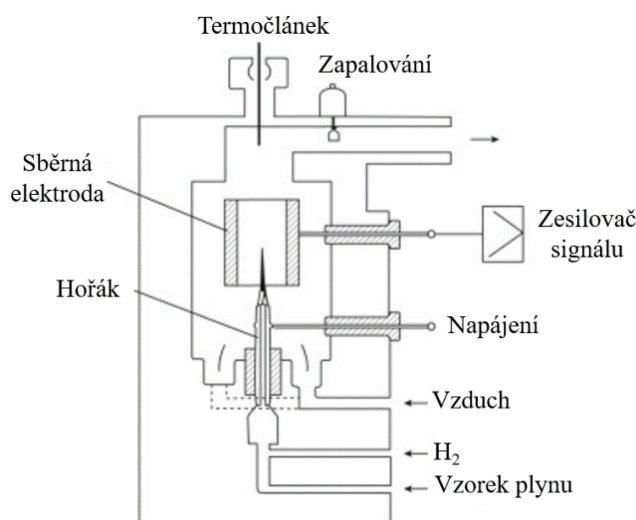
Dalšími silylačními činidly jsou Bis(trimethylsilyl)acetamid, který se především používá k silylaci karboxylových kyselin a TMS [132].

1.9 Detektory plynové chromatografie pro detekci 4-chlorfenolu

Při výběru vhodného detektoru pro analýzu 4-CP metodou GC musíme vzít v potaz vlastnosti analyzovaného vzorku a parametry samotné metody [134]. Cílem je zachytit přítomnost molekuly s vysokou citlivostí a specificitou [135]. Při analýze pomocí GC jsou nejčastěji používány detektory jako MS, ECD a FID [135]. Můžeme uvažovat, ale i o jiných variantách detektorů pro analýzu [135]. Při výběru mezi těmito detektory je třeba vzít v úvahu specifické potřeby aplikace, finanční možnosti a požadovanou úroveň citlivosti a selektivity [134]. Detektor musí být také kompatibilní s ostatními komponentami analyzátoru, jako je samotný chromatograf obsahující kolonu a dostupnost softwarové podpory [134].

1.9.1 Plamenově ionizační detektor

FID je jedním z nejběžněji používaných detektorů u GC [136]. Jeho princip spočívá v detekci uhlovodíků a dalších organických sloučenin, které jsou spalovány v plameni vodíku [137]. Při průchodu analytů plamenem vodíku dochází k jejich oxidaci a tvorbě iontů [136]. Takto vzniklé ionty jsou následně detekovány pomocí elektrického pole, což vede ke generování elektrického signálu [136]. Velikost vytvořeného signálu je přímo úměrná koncentraci analytů v chromatografickém systému [137]. Celé schéma FID je znázorněno na Obrázku 15 [138].



Obrázek 15: Schéma plamenově ionizačního detektoru [138]

Jednou z výhod FID je jeho vysoká citlivost a univerzálnost pro širokou škálu organických sloučenin [139]. Další výhodou FID je jeho nízká citlivost na vzdušnou vlhkost a nečistoty, což umožňuje spolehlivou a konzistentní analýzu i za proměnlivých podmínek [137]. Naopak detektor není vhodný pro analýzu vysoce polárních látek [136].

Odezva FID je výsledkem spalování organických sloučenin na plameni tvořeného spalováním vodíku a vzduchu [137]. Žhavicí svíčka, která se na okamžik zapne při startu, slouží jako zapalovač plamene [136]. Válcová kolektorová elektroda umístěná v krátké vzdálenosti nad plamenem sbírá částice náboje aplikací napětí mezi špičkou trysky a kolektorovou elektrodou [137]. Potenciál musí být dostatečně velký, aby se zajistilo úplné shromáždění nabitých částic a tvorbě signálu [139]. V závislosti na konstrukci detektoru se shromažďují buď elektrony nebo kationty [136].

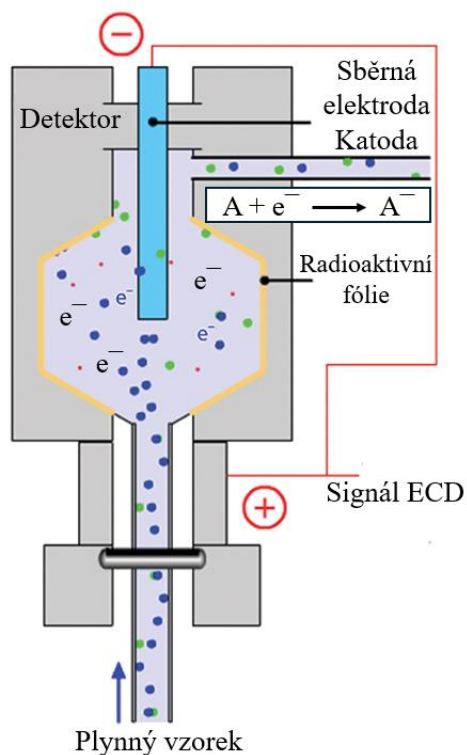
Nejběžnější zesilovače signálu vzniklého v detektoru jsou ty se schopností invertovat proud na napětí, kde měřený proud prochází přes vysoký odpor [137]. Limit detekce FID se udává podle tepelného šumu [136]. Ten je na pozadí minimalizován aktivními filtry [139]. Horní hranice rozsahu odezvy je ovlivněna především velikostí plamene, předpětím na kolektorové elektrodě a geometrií detektoru [136].

1.9.2 Detektor elektronového záchytu

Principem ECD je průchod elektrického proudu skrz vzorek plynu, který je analyzován [136]. Plyn se vzorkem prochází ionizační komorou, kde je vystaven slabému proudění elektronů, generovaných radioaktivním zářičem, a ty vytvářejí ionty v analyzovaném plynu s analytem [140]. Pokud je v plynu přítomna látka s vysokou afinitou k elektronům, absorbuje elektrony z ionizovaného plynu, což vede ke snížení proudu elektronů v detektoru [137]. Toto snížení proudu je pak detekováno a interpretováno jako přítomnost analytu [136].

ECD je velmi citlivý na látky s vysokou afinitou k elektronům, jako jsou halogenované sloučeniny a některé dusíkaté látky [135]. Jeho vysoká citlivost a selektivita ho činí vhodným pro analýzu stopových množství v plynných vzorcích [140]. V kombinaci GC-ECD se celé zařízení pro analýzu skládá z několika klíčových částí [140]. Na začátku analýzy je ionizační komora, kde dochází k ionizaci analyzovaného plynu [135]. Tato komora obvykle obsahuje trubici nebo komoru naplněnou inertním plynem, jako je argon, a je vybavena radioaktivními

zářiči, nebo jinými zdroji elektronů [136]. Po ionizaci plynu se analyzovaný vzorek plynule pohybuje do analytické komory, kde se nacházejí elektrody, které měří proud elektronů procházející komorou [136]. Signál z detektoru je pak zpracováván za použití zesilovače, filtry a analogově-digitálními převodníky a výsledná odezva signálu je zobrazena po zpracování pomocí softwaru kompatibilního se zařízením [136]. Stručné schéma ECD je znázorněno na Obrázku 16 [141].



Obrázek 16: Schéma instrumentace detektoru elektronového zachytu [141]

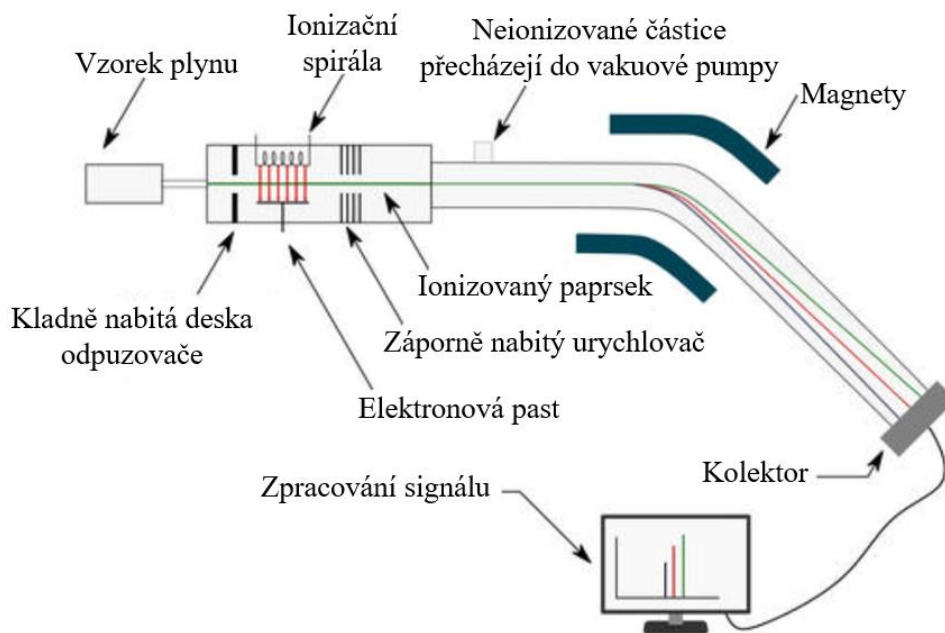
1.9.3 Hmotnostní detektor

MS je detekční metoda, která určuje hmotnost atomů, iontů či izotopové složení částic a struktur jednotlivých molekul [142]. Detektor funguje na principu výpočtu poměru hmotnosti a náboje [143]. Během analýzy vzorku dochází v detektoru k jeho ionizaci a tvorbě nabitých molekul či fragmentů [142].

Na začátku analýzy je vzorek umístěn do přístroje k odpaření [143]. Díky tomuto kroku se vzorek rozloží na jednotlivé složky a uvolní je do plynné fáze [137]. Vzniklý plyn, ve kterém jsou přítomny analyty, se následně ionizuje [134]. Postupem ionizace vzorku je dopad elektronového paprsku na analyzovanou molekulu, což má za následek vytvoření iontů [143].

Následně dochází k urychlení vytvořených iontů následované jejich vstupem do detektoru, kde jsou odděleny podle poměru hmotnosti k náboji v elektromagnetickém poli [142]. Poté, co jsou jednotlivé ionty detekovány kvantitativní metodou, která měří intenzitu signálu založeného na množství iontů, je každý iont zpracován MS a software poskytuje informace o hmotnosti nabitě částice [142].

MS detektory se skládají ze tří modulů [144]. První modul je zdroj nabitých iontů, který umožňuje převést molekuly plynu na ionty [143]. Druhým modulem je hmotnostní analyzátor, kde dochází ke třídění iontů podle jejich hmotnosti pomocí elektromagnetického pole [144]. Třetím modulem je detektor schopný měřit hodnotu množství, a tak poskytuje data pro výpočet četnosti každého iontu v reálném čase [144]. Stručné schéma MS je znázorněno na Obrázku 17 [145].



Obrázek 17 Schéma instrumentace hmotnostní spektrometrie [145]

Technika MS má jak kvalitativní, tak kvantitativní využití [142]. Mezi její aplikace patří identifikace neznámých látek, určování izotopového složení prvků v molekule a stanovení struktury sloučeniny z fragmentace analytu [144]. Další použití zahrnují kvantitativní stanovení složek ve směsích nebo studium chemie iontů v plynné fázi [134]. MS je nyní rutinně používána v analytických laboratořích, které studují fyzikální, chemické nebo biologické vlastnosti chemických sloučenin [142].

Jedna z moderních variant MS je matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace (MALDI) [146]. Jedná se o techniku MS ionizace, která se používá v analýze biomolekul, jako jsou proteiny, peptidy, oligonukleotidy a sacharidy [147]. MALDI je založen na použití matrice, která pomáhá ionizovat vzorek a umožňuje jeho analyzování [146]. Princip přípravy vzorku pro analýzu spočívá ve smíchání vzorku s matricí, která snadno ionizuje laserovým zářením [147]. Takto připravená směs je aplikována na pevný podklad a nechává se zaschnout. Poté je povrch vzorku vystavován krátkým pulzům laserového záření [147].

Laserové záření produkované MALDI indukuje desorpci a ionizaci molekul ve vzorku [146]. Matrice absorbuje energii laserového paprsku a předává ji vzorku, což způsobuje odpaření vzorku ve formě iontů [147]. To umožňuje uvolnění iontů bez významné fragmentace molekul [147]. Vytvořené ionty jsou následně urychleny elektrickým polem a vstupují do MS, kde jsou odděleny podle jejich hmotnosti a náboje, což umožňuje jejich identifikaci a kvantifikaci [146]. Detekované ionty pak tvoří hmotnostní spektrum, které poskytuje informace o hmotnosti a hojnosti iontů ve vzorku [146].

Interpretace hmotnostních spekter umožňuje identifikaci chemických sloučenin, jejich složení a strukturu [144]. Prvním krokem je identifikace iontů ve spektru, které zahrnuje rozpoznání základních iontů a jejich fragmentů vznikajících během procesu ionizace [148]. Následně jsou hmotnosti identifikovaných iontů určeny z polohy píku na hmotnostní ose spektra a tyto hmotnosti se obvykle porovnávají s teoretickými hmotnostmi známých sloučenin pomocí databází hmotnostních spekter [148]. Na základě znalosti hmotnosti a fragmentace iontů je možné odvodit strukturu analyzovaných sloučenin [144]. V některých případech může být také užitečné porovnat získaná spektra s referenčními spektry známých sloučenin pro potvrzení identifikace nebo zjištění podobnosti mezi vzorky [148].

1.10 Způsoby extrakce 4-chlorfenolu ze vzorku

Extrakce 4-CP je proces, který se používá k separaci z různých materiálů, ve kterých se hledaná molekula nachází [149]. Proces extrakce je důležitý nejen kvůli odstranění této látky z odpadních vod, ale také kvůli prevenci environmentální kontaminace a zdravotních rizik [150]. Existuje několik metod extrakce 4-CP, z nichž každá má své výhody, ale i omezení [149]. Jedna z běžných metod je pomocí organických rozpouštědel, jako

je například hexan [151]. Využívá se rozdílné rozpustnosti 4-CP ve vodě a v organickém rozpouštědle [151].

Další možností je extrakce pomocí pevných adsorbentů, které jsou schopny selektivně vázat extrahovanou molekulu [149]. Tento postup se často používá v případech, kdy je potřeba látku odstranit z velkého objemu vody [151]. Je důležité brát v úvahu i environmentální dopady samotného procesu extrakce na absorbenty [150]. Efektivní odstraňování odpadů a použití ekologicky šetrných metod jsou důležité pro minimalizaci negativního dopadu na životní prostředí [150].

1.10.1 Mikroextrakce kapalina-kapalina

Mikroextrakce kapalina-kapalina je miniaturizovaná technika předúpravy vzorku, která využívá velmi malé objemy extrakčního rozpouštědla [152]. Jednoduchost provozu, rychlost, malý objem vzorku a nízká cena jsou některé výhody extrakční metody [152]. Avšak kapalná extrakce se potýká s problémy, jako je výběr rozpouštědla [153].

Výběr extrakčního rozpouštědla by měl být založen na ekologických principech, aby se zvýšila ekologická odbouratelnost [150]. Typickými příklady rozpouštědel s těmito vlastnostmi jsou hluboká eutektická rozpouštědla [150]. Ta vykazují vlastnosti podobné iontovým kapalinám a zahrnují nehořlavost, nízký tlak par, nízkou toxicitu, možnost recyklace, vysokou chemickou a tepelnou stabilitu a také schopnost rozpouštět širokou škálu anorganických a organických sloučenin [154]. Přesto jsou běžněji využívanějšími rozpouštědly pro mikroextrakci hexan nebo acetonitril [154].

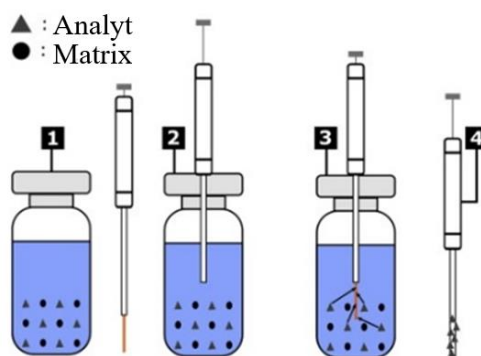
Při extrakci pomocí rozpouštědla z vodného roztoku obsahujícího chlorfenoly se obě složky smíchají při teplotě 25 °C a nechají stát 1 hodinu [150]. Takto připravená směs se centrifuguje po dobu 15 minut pro oddělení fází [150]. Vzorky jsou vytvořeny z fáze obsahující chlorfenoly [152]. Ta je odsáta pomocí jehlové stříkačky a koncentrace stanovovaných molekul je zachycena chromatograficky s výběrem vhodného detektoru [153].

1.10.2 Mikroextrakce na tuhou fázi

Mikroextrakce na tuhou fázi (SPME) je oblíbená pro svoji jednoduchost a nenáročnost na množství vzorku [155]. Účinnost extrakce je dána několika faktory, mezi které patří výběr vlákna z pevného fázového materiálu [156]. Takové vlákno může být pokryto různými

sorbenty, jako jsou polymery, nebo kovové sloučeniny [155]. Materiály vybíráme podle charakteru analyzované látky [156].

Metoda má několik způsobů provedení [155]. Při imerzní formě postupu se vlákno ponoří přímo do vzorku [156]. Postup je popsán na Obrázku 18 [157]. U metody extrakce kapalina-plyn (v angl. headspace) se vlákno umístí nad povrch vzorku a analyt difunduje ze vzorku do plynné fáze, kde se zachytí na povrchu vlákna [155]. Po absorpci na vlákno se analyt musí desorbovat [156]. To se provádí pomocí chromatografického systému, kde jsou z vlákna desorbované analyty následně analyzovány [156]. Velkou výhodou této extrakční metody je ta, že nepotřebuje nijak významnou úpravu vzorku [155].



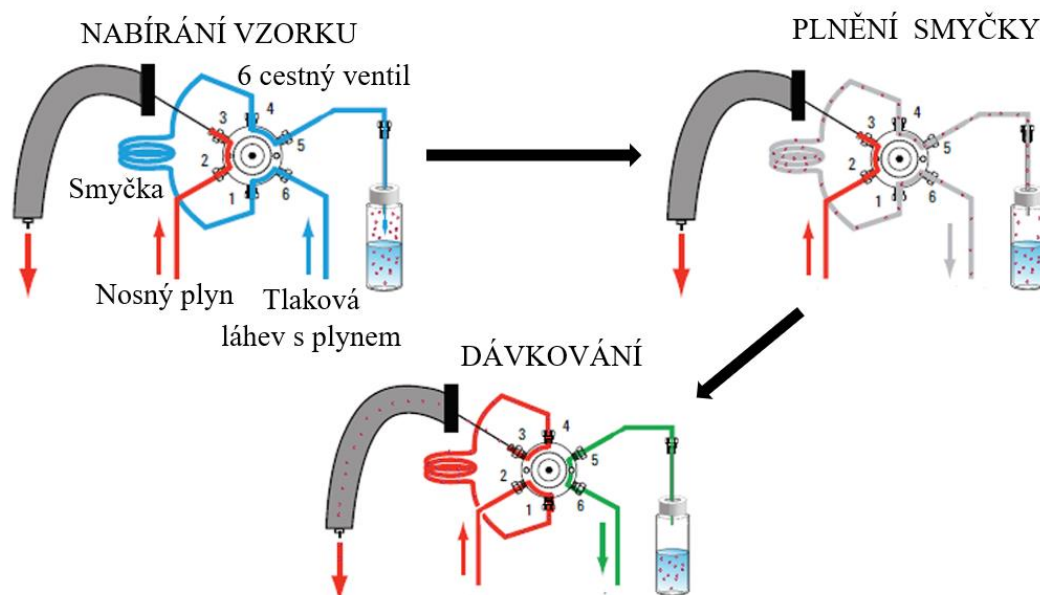
Obrázek 18: Imerzní metoda mikroextrakce na tuhou fázi [157]

Při analýze chlorfenolů byly sledovány teploty mezi 50 °C až 90 °C [158]. Teplotní rozmezí je vybíráno na základě znalostí o vlastnostech analytu a adsorbentu tuhé fáze [156]. Nižší teplota podporuje sorpci zkoumané molekuly na vlákno a vyšší teplota jí desorbuje z vlákna [156]. Pro monochlorfenoly, mezi které patří i 4-CP, je optimální teplota mezi 60 °C a 70 °C [158]. U polychlorovaných fenolů je to mezi 70 °C a 80 °C [158]. Je to dáno nižší těkavostí více chlorovaných fenolů [156]. K tomu, aby přecházeli do plynné fáze, je zapotřebí vyšších teplot [158].

1.10.3 Extrakce kapalina-plyn

Extrakce headspace se používá pro analýzu plynů nebo těkavých látek obsažených v pevných nebo kapalných vzorcích [159]. Jedná se o snadno proveditelnou a obvykle automatizovanou metodu [160]. K analýze se používají látky nacházející se nad kapalinou ve vzdušném prostoru nad vzorkem [160].

Příprava vzorku spočívá v tom, že se analyzovaná kapalina uzavře v hermeticky utěsněné zkumavce [159]. Následně se zahřeje na potřebnou teplotu, při které se stanovovaná látka začne vypařovat a začne se hromadit nahoře v uzavřené nádobě, kde ji zachytíme [159]. Zachycená molekula je buď již v systému přivedena k analýze, v rámci automatického analyzátoru, nebo ji odebereme a manuálně převedeme vhodným způsobem [160]. Celý systém analýzy probíhá většinou pomocí GC nebo LC spojené s detektorem [160]. Způsob dávkování do LC nebo HPLC pomocí 6-cestného ventilu je popsáno na Obrázku 19 [161]. Headspace extrakce je užitečná pro analýzu látek, které jsou termicky nestabilní, nebo nereagují s rozpouštědlem. S touto metodou se proto můžeme setkat hlavně ve farmacii nebo potravinářství. [159]



Obrázek 19: Aplikace vzorku pomocí 6-cestného ventilu [161]

Extrakce headspace se používá i pro stanovení alkoholu v krvi díky specifickým vlastnostem ethanolu [162]. Jedno z možných provedení extrakce je zavření vzorku do uzavřeného prostoru, kde proudí inertní plyn [163]. Takovým plynem může být vodík nebo helium [162]. Tento proces umožňuje těkavým látkám ve vzorku přecházet z kapalné fáze do plynné a volně pokračovat k analýze na GC popřípadě LC [162].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Cílem této práce bylo najít optimální podmínky pro přípravu a analýzu 4-CP v dichlormethanových extraktech metodou GC-FID. Analýze byly podrobeny neznámé vzorky získané z odpadních vod, na kterých bylo prováděno katalytické odbourání 4-CP. Halogenované fenoly, jenž se do životního prostředí dostávají lidskou průmyslovou aktivitou, se ukázaly jako sloučeniny s negativním vlivem na živé organismy. Za účelem prevence dopadu na ekosystém je snaha najít efektivní způsob jejich detekce a odstraňování.

2.1 Chemikálie a přístrojové pomůcky

a) Nepochární rozpouštědla

- Acetonitril, p.a. (PENTA, Ing. Petr Švec, Praha, ČR)
 - Balení 1000 ml, obsah 50-54 %, hustota 786 kg/m³, M = 41,05 g/mol
- Dichlormethan, p.a., nestabilizovaný (PENTA, Ing. Petr Švec, Praha, ČR)
 - Balení 1000 ml, obsah 100 %, hustota 1330 kg/m³, M = 84,93 g/mol
- n-hexan, p.a. (PENTA, Ing. Petr Švec, Praha, ČR)
 - Balení 1000 ml, obsah 100%, hustota 661 kg/m³, M = 86,18 g/mol

b) Standardy:

- 3-chlorfenol, čistý (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
 - Balení 250 g, obsah 65-69 %, hustota 1270 kg/m³, M = 128.56 g/mol
- 4-chlorfenol, čistý (Sigma Aldrich, Steinheim, Německo)
 - Balení 5 g, obsah 100 %, hustota 1310 kg/m³, M = 128.56 g/mol

c) Chemikálie pro derivatizaci:

- Acetanhydrid (PENTA, Ing. Petr Švec, Praha, ČR)
 - Balení 1000 ml, obsah 80-85 %, hustota 1080 kg/m³, M = 102,09 g/mol
- Uhličitan draselný (PENTA, Ing. Petr Švec, Praha, ČR)
 - Balení 100 g, obsah 70-75 %, hustota 2410 kg/m³, M = 138,21 g/mol
- BSTFA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Německo)
 - Balení 5,16 ml, obsah 100 %, hustota 969 kg/m³, M = 257,40 g/mol
- TMS (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Německo)
 - Balení 100 ml, obsah 35-39 %, hustota 648 kg/m³, M = 88.22 g/mol

d) Sušidlo:

- Síran železnatý, bezvodý (Lach-Ner, s.r.o., Neratovice, ČR)
 - Balení 500 g, obsah 100 %, hustota 2840 kg/m³, M = 151,908 g/mol

e) Stlačené plyny

- Helium: He 5.0, UN 1046, (Linde Gas a.s., Praha, ČR)
- Vzduch: O₂ 20 %, N₂ 80 %, UN 1956 (Linde Gas a.s., Praha, ČR)
- Dusík: N₂ 4.0, UN 1066, (Linde Gas a.s., Praha, ČR)
- Vodík: H₂ 5.0, UN 1049, (Linde Gas a.s., Praha, ČR)

Tabulka 2: Struktura organických rozpouštědel a derivatizačních činidel

Název chemikálie	Struktura	Název chemikálie	Struktura
n-hexan		Acetanhydrid	
Dichlormethan		Acetonitril	
4-chlorfenol		3-chlorfenol	
TMS		BSTFA	

Použité pomůcky:

- Automatické pipety (Eppendorf, Hamburk, Německo)
- Centrifuga MPW-340 (Mechanika Precyzna, Varšava, Polsko)
- Dělicí baňka (SIMAX, Sázava, Česká republika)
- Kádinky s objemy do 150 ml (SIMAX, Sázava, Česká republika)

- GC systém 7890A (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
- Chromatografické krimpovací vialky s hliníkovými uzávěry (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
- Insety do chromatografických vialek (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
- Krimpovací kleště (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- Kolona HP-5 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- Mikrozkušavky (Eppendorf, Leipzig, Německo)
- Odměrné banky o objemech 50 ml, 100 ml, 250 ml a 500 ml (SIMAX, Sázava, Česká republika)
- Plastové špičky na automatické pipety (Eppendorf, Leipzig, Německo)
- Termoblok s odpařovacím zařízením Pierce Reacti-Therm 18821 (Thermo Scientific, Asheville, NC, USA)
- Zkušavky PYREX (Barloworld Scientific Group Limited, Stone, Velká Británie)
- Skleněné zkušavky (Sartorius, Ústí nad Labem, Česká republika)
- Vortex Relax Top (Heidolph, Schwabach, Německo)

2.1.1 Použité komponenty plynové chromatografie

Použitá kolona HP-5 (30 m x 0,32 mm x 0,25 μ m) od americké firmy Agilent Technologies je naplněna (5%-fenyl)-methylpolysiloxanem, což jí dodává nepolární vlastnosti pro univerzální použití a širokou škálu aplikací. Její výhodou je dle dodavatele vysoký teplotní limit až 350 °C. Během analýzy je možné kolonu proplachovat rozpouštědlem.

Použitým detektorem byl FID, který má svoji výhodu v univerzálnosti a snadném použití. Detektor reaguje prakticky na jakoukoli organickou sloučeninu a generuje malý nebo žádný signál pro běžné nosné plyny. Maximální provozní teplota během analýzy je 450 °C. Jedná se o rychlý a velmi citlivý detektor GC systému.

2.2 Příprava kalibrační řady, derivatizace a tepelné programy

Prvním krokem bylo připravit kalibrační řadu o koncentracích 0,25; 0,5; 1; 2; 3; 5; 8; 10; 15 a 20 μ g/l. Rozhodlo se o nízkých koncentracích standardů kvůli předpokladu nízkých koncentrací neznámých vzorků. Pro tento účel byl připraven roztok standardu 4-CP o koncentraci 500 mg/l ve 100 ml odběrné baňce navážením 0,05 g na analytických vahách

a doplněným dichlormethanem. Z tohoto roztoku bylo převedeno 500 μl do 500 ml odběrné baňky, aby vznikl roztok o koncentraci 500 $\mu\text{g/l}$. Dalším krokem ředící řady bylo připravit 50 ml roztoku o koncentraci 20 $\mu\text{g/l}$ v odměrné baňce převedením 2 ml 4-CP o koncentraci 500 $\mu\text{g/l}$. Celá ředící řada standardu 4-CP byla rozpuštěna v dichlormethanu. Poslední ředění bylo použito jako výchozí pro vytvoření kalibrační řady. Poměry dichlormethanu a roztoku 4-CP jsou popsány v Tabulce 3. Celkový objem jednoho připraveného roztoku standardu kalibrační řady byl 3 ml.

Tabulka 3: Pipetované objemy dichlormethanu a roztoku 4-chlorfenolu o koncentraci 20 $\mu\text{g/l}$ pro vytvoření bodů kalibrační řady o objemech 3 ml

Výsledná koncentrace [$\mu\text{g/l}$]	Objem dichlormethanu [μl]	Objem roztoku 4-CP (20 $\mu\text{g/l}$) [μl]
0,25	2962	38
0,5	2925	75
1	2850	150
2	2700	300
3	2550	450
5	2250	750
8	1800	1200
10	1500	1500
15	750	2250
20	0	3000

Pro měření kalibrační řady nederivatizovaných standardů se 300 μl jednotlivých roztoků 4-CP převedlo do vialek s vloženým inzertem. Vialky se uzavřely pomocí krimpovacích kleští a patřičně popsaly číslem v kalibrační řadě, koncentrací a datem vytvoření. Takto připravená kalibrační řada byla proměřena pomocí GC-FID.

Tepelný program nederivatizovaných vzorků:

Nosný plyn: He 1 ml/minutu

Nástřík vzorku: 1 μ l Splitless Mode

Teplota injektoru: 250 °C

Teplota detektoru: 250 °C

50 °C (1 minuta) \rightarrow 15 °C/minuta \rightarrow 300 °C (3 minuty)

Doba analýzy 29 minut

Čas detekování 4-CP v 26,5 minutě při teplotě 280 °C

Analýzu bylo poté možno zkrátit.

260 °C (1 minuta) \rightarrow 5 °C/minuta \rightarrow 280 °C (12 minuty)

Doba analýzy 21 minut

Čas detekování 4-CP v 17,3 minutě

Nevýhodou nederivatizovaných vzorků byla malá citlivost používané metody. Po analýze celé kalibrační řady se jevily všechny píky stejné a nesouvisející se zvyšující se koncentrací standardů. Proto byla použita v dalších analýzách úprava 4-CP derivatizací.

2.2.1 Úprava vzorku 4-chlorfenolu acetylací

Pro provedení derivatizace acetylací standardu 4-CP byl namíchán roztok bezvodého uhličitanu draselného o koncentraci 1 mol/l. Tento roztok se používal pro úpravu pH reakční směsi. Příprava roztoku uhličitanu draselného o objemu 100 ml spočívala v navážení 13,8344 g a doplněním odměrné baňky demineralizovanou vodou.

Samotný postup derivatizace spočíval v přípravě reakční směsi roztoku napipetováním 4-CP rozpuštěného v dichlormethanu (2 ml), uhličitanu draselného o koncentraci 1 mol/l (5 ml), anhydridu (1 ml) a demineralizované vody (50 ml) do dělicí baňky. Acetylace probíhala tedy v zásaditém vodném prostředí, kde mohl acetanhydrid lépe hydrolyzovat, a tím i reagovat s hydroxylovou skupinou na benzenovém jádře 4-CP. Reakční směs byla protřepávána v dělicí baňce 5 minut, aby lépe reagovala a následně byla 5 minut ponechána v klidu. Následovalo přidání hexanu o objemu 5 ml jako extrakčního činidla. Následně byla směs protřepávána 5 minut. Nepochlupná část byla posléze oddělena od vodné části a vysušena bezvodým síranem železnatým. Zhotovený vzorek standardu byl převeden do vialky a proměřen pomocí GC-FID.

Následnou miniaturizací bylo možné zrychlit přípravu celé kalibrační řady. Všechny používané objemy bylo možno zmenšit na čtvrtinu a vzorky se mohly zpracovávat ve skleněných uzavíratelných zkumavkách. Pro lepší oddělení fází bylo využito centrifugy, kde reakční směs strávila 5 minut s relativní centrifugační silou (RCF) 5000. Po oddělení fází bylo možno oddělit nepolární část automatickou pipetou a převést do vialky s inzertem. Vialka byla uzavřena, popsána a předložena k analýze s příslušným tepelným programem na GC-FID.

Výsledek zhotovení derivatizace acetylací 4-CP byl nevyhovující, z důvodu reakce ve vodném prostředí. Derivatizace by musela probíhat v bezvodém prostředí za přítomnosti činidla schopného přijmout vodíkový proton. Po proměření všech bodů kalibrační řady byly všechny píky stejné a metodu derivatizace jsme tudíž vyhodnotili jako neúčinnou.

Tepelný program derivatizovaných vzorků acetylací ve vodném prostředí:

Nosný plyn: He 1 ml/minutu

Nástřík vzorku: 1 μ l Split mode (1:5)

Teplota injektoru: 250 °C

Teplota detektoru: 280 °C

120 °C (1 minuta) \rightarrow 20 °C/minuta \rightarrow 300 °C (3 minuty)

Doba analýzy 24 minut

Čas detekování 4-CP ve 19,3 minutě

Analýzu bylo poté možno zkrátit. Tento program se následně ukázal účinný na všechny typy vzorků.

160 °C (2 minut) \rightarrow 15 °C/minuta \rightarrow 300 °C (10 minuty)

Doba analýzy 20,3 minuty

Čas detekování 4-CP ve 17,5 minutě

2.2.2 Úprava vzorku 4-chlorfenolu silylací

Pro derivatizaci byly použity molekuly TMS nebo BSTFA, které specificky reagují s hydroxylovou skupinou na molekule 4-CP. Proto bylo velmi důležité, aby reakce probíhala v bezvodém prostředí a nevznikaly tak vedlejší produkty, zároveň bylo důležité stáří derivatizačního činidla pro optimální průběh reakce.

Do zkumavky bylo napipetováno 50 μ l standardního roztoku 4-CP o známé koncentraci nebo neznámého vzorku o stejném objemu. Zkoumaný objem byl odpařen proudem dusíku.

Po odpaření roztoku bylo přidáno 20 µl acetonitrilu a 50 µl TMS nebo BSTFA. Takto připravená reakční směs 2 hodiny reagovala při 60 °C. Po uplynutí reakčního času bylo do zkumavky napipetováno 100 µl hexanu. Připravené vzorky bylo možné převést pomocí pipety do vialek. Vialky byly příslušně popsány a předloženy k analýze na GC-FID.

Tepelný program derivatizovaných vzorků silylací:

Nosný plyn: He 1 ml/minutu

Nástřík vzorku: 0,5 µl Split mode (1:5)

Teplota injektoru: 280 °C

Teplota detektoru: 300 °C

160 °C (2 minuta) → 15 °C/minuta → 300 °C (10 minuty)

Doba analýzy 21,3 minut

Čas detekování 4-CP v 17,5 minutě

Analýzu bylo poté možno zkrátit.

300 °C (12 minut) → 20 °C/minuta → 320 °C (2 minuty)

Doba analýzy 17,5 minuty

Čas detekování 4-CP ve 14,5 minutě

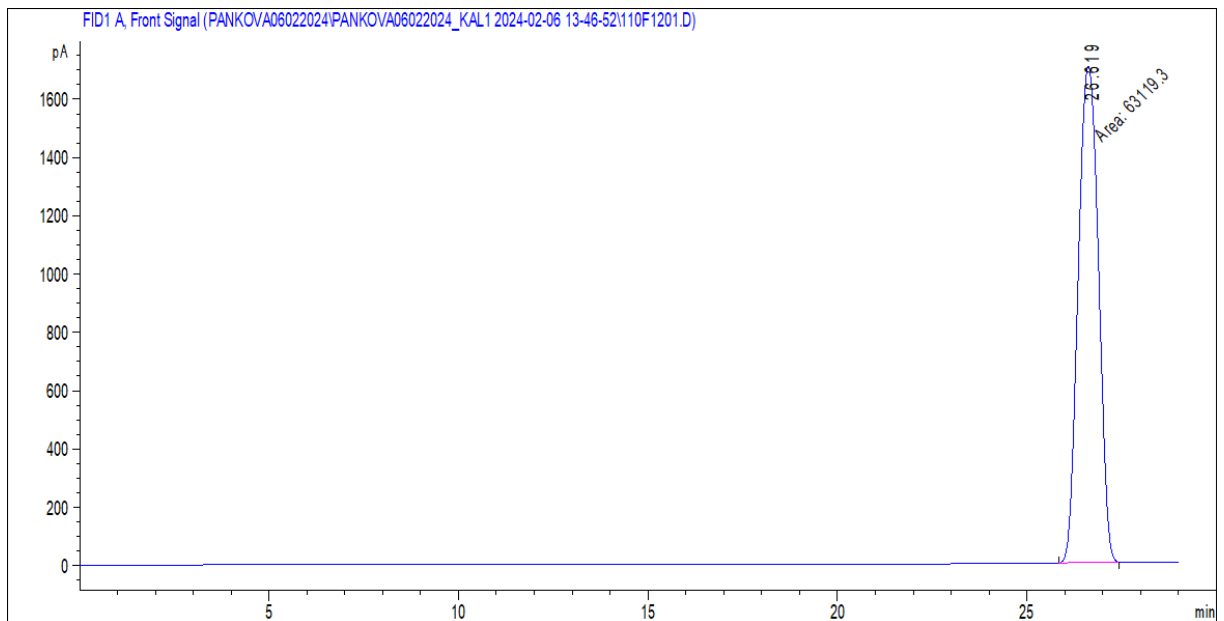
3 VÝSLEDKY

4-CP spolu s ostatními chlorfenoly jsou běžnými kontaminanty životního prostředí. Pokud je jim vystaven člověk může docházet k hormonálně podmíněným onemocněním. Jako způsob jejich detekce se ukázaly účinné chromatografické metody v kombinaci s vhodným výběrem kolony a detektoru.

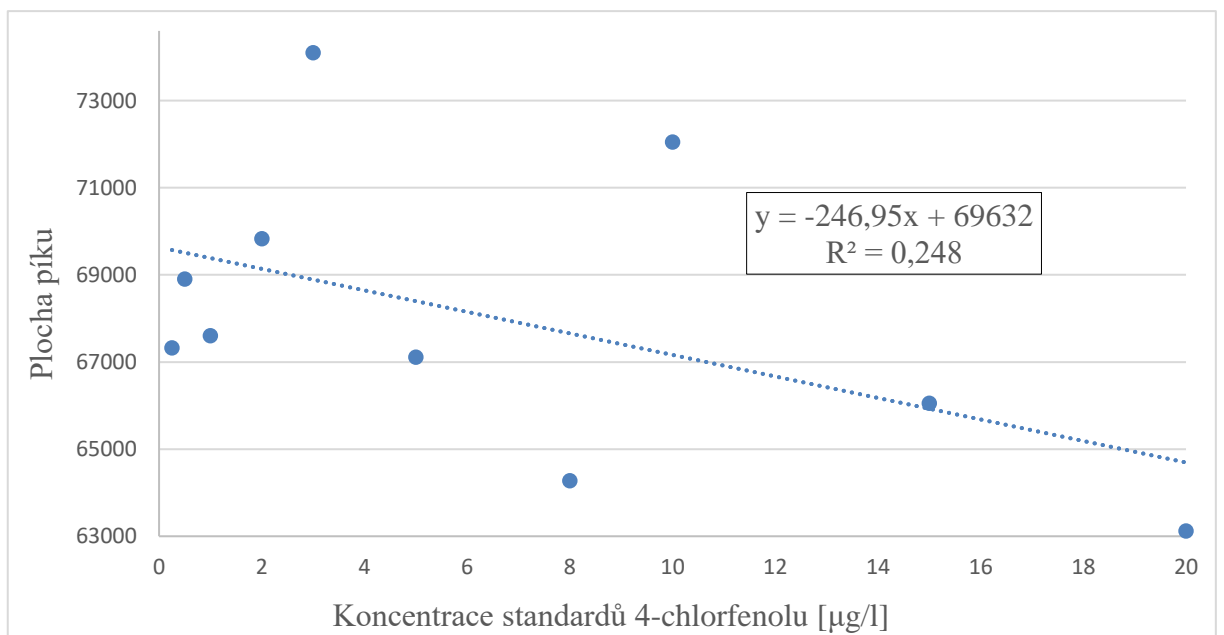
V této práci byl použit GC systém společně s kolonou HP-5 a FID. Metoda byla porovnávána pomocí literatury s ostatními způsoby analýzy. GC-FID je po většinou používána jako orientační metoda k metodě GC-MS a pro samostatnou analýzu chlorfenolů je pak čteněji využívána metoda GC-ECD. Výhodou FID je univerzálnost, nízký šum pozadí a cena. Mikrokolona HP-5 je plněná (5%-fenyl)-methylpolysiloxanem, který ji dodává nepolární vlastnosti a schopnost interagovat s analytem na základě jeho vlastností. GC-FID má potenciál být levnou, rychlou a přesnou metodou. Z těchto důvodů proběhla její optimalizace pro analýzu 4-CP.

3.1 Optimalizace analýzy nederivatizovaných standardů 4-chlorfenolu

Nederivatizované vzorky standardů byly připravovány podle Tabulky 3. Z takto připravených roztoků standardů byla pro první měření vybrána koncentrace standardu 4-CP 20 µg/l o připraveném objemu 3 ml, ze kterého bylo převedeno 300 µl do vialek s inzerty, které byly předloženy k analýze na GC-FID. Výsledný pík je zobrazen na Obrázku 20. Z prvotních výsledků měření samostatného standardu bylo usuzováno, že analyt bude možno detekovat 4-CP i bez jakékoliv úpravy. Proto byla vytvořena kalibrační řada o 10 vzrůstajících koncentrací. Po proměření kalibrační řady a přezkoumání výsledků analýzy bylo zjištěno, že nederivatizované standardy nejsou vhodné pro analýzu 4-CP. Závislost plochy píků na koncentraci nederivatizovaných standardů je znázorněna na Grafu 1. Graf zobrazuje nevyhovující výsledky měření kalibrační řady 4-CP, kde hodnoty neodpovídají připraveným koncentracím. Pro ověření správnosti byla celá kalibrace ještě jednou proměřena. Opětovná analýza ukázala stejné výsledky a bylo rozhodnuto o použití postupů derivatizace vzorků 4-CP nalezených v literatuře.



Obrázek 20: Pík nederivatizovaného standardu 4-chlorfenolu (20 µg/l). Detekce t_m 280 °C a t_R 26,2 minuty.



Graf 1: Závislost koncentračních bodů nederivatizovaných standardů 4-chlorfenolu.

3.2 Optimalizace analýzy a derivatizace 4-chlorfenolu acetylací

První volbou byla derivatizace acetylací. Postup nalezený v literatuře sliboval hydrolyzu acetanhydridu a jeho následnou reakci s hydroxylovou skupinou ve struktuře 4-CP. Opět se využilo standardu 4-CP o koncentraci 20 µg/l. Problém nálezného postupu derivatizace standardů byla časová náročnost přípravy před analýzou. Proto byla po několika pokusech zavedena miniaturizace, a tím zmenšení použitých objemů činidel na čtvrtinu. Objem reakční směsi byl pipetován do uzavíratelných skleněných zkumavek. To umožnilo posléze více bodů kalibrační řady najednou. Původní postup vyžadoval 25 minut na derivatizaci jednoho vzorku standardu. Díky zmenšení objemu bylo také možné použít pro lepší oddělení vodné fáze od nepolární centrifugu. Výsledky analýzy dvou způsobů derivatizace jedné koncentrace standardu 4-CP v malém i velkém objemu činidel byly stejné. To vedlo k závěru vyhovujícímu postupu miniaturizace i derivatizace.

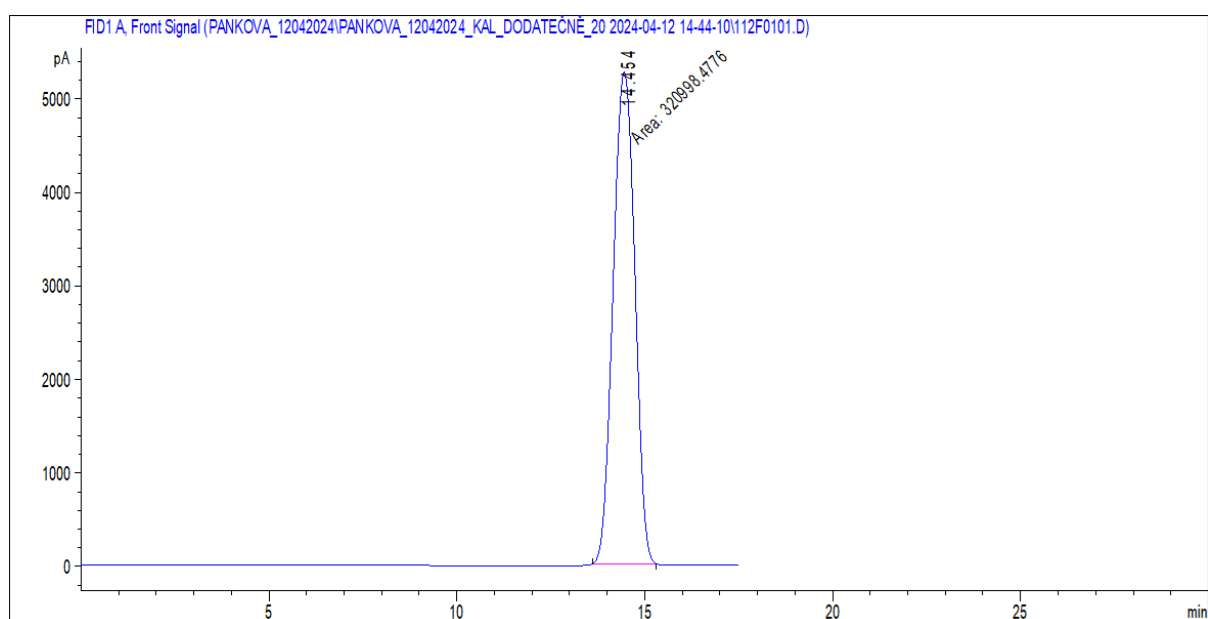
Pro analýzu acetylovaných derivátů 4-CP bylo využito GC s detektorem FID. Po derivatizaci byly viděny ostré a vyšší píky, jelikož výsledky měření jednoho standardu ukazovaly velkou odezvu v podobě ostrých i vyšších píků, než bylo naměřeno u nederivatizovaných standardů. Při určování vhodného teplotního programu byly zprvu acetylované standardy měřeny v tepelném gradientu. Z literatury bylo jisté, že bude zapotřebí vyšších teplot. Pro detekci bylo nakonec využito vyšší teploty 300 °C.

Pro přípravu kalibrační řady koncentrací 4-CP bylo využito zmenšených objemů. Naměřené výsledky vypověděly, oproti informacím z literatury, že tendence píků neodpovídala zvětšující se koncentraci, nýbrž zůstaly stejné, což vedlo k závěru, že derivatizace acetylací je pro stanovení 4-CP nevhodná. Důvodem nepodařené acetylce bylo pravděpodobně použití vodného prostředí pro derivatizační reakci. Acetanhydrid nemůže reagovat s hydroxylovou skupinou na 4-CP v demineralizované vodě. Derivatizační reakci by bylo nutno provádět v nepolárním prostředí za přítomnosti činidla schopného přijmout vodíkový proton. Z tohoto důvodu byl zvolen jiný způsob derivatizace molekuly 4-CP. S pomocí literatury byly vybrány pro další optimalizaci silylační činidla.

3.3 Optimalizace analýzy a derivatizace 4-chlorfenolu silylací

K dalšímu pokusu o derivatizaci 4-CP byla zvolena silylační činidla, která mají ve své struktuře alespoň jeden atom křemíku. V literatuře se jednalo o jednu z nejpoužívanějších metod přípravy vzorků před analýzou. Pro derivatizační reakci byla vybrána konkrétně silylační činidla TMS a BSTFA. Podle výsledků v literatuře měly činidla pro reakci na hydroxylové skupině v bezvodém prostředí optimální podmínky.

První pokus o vytvoření silylderivátu 4-CP proběhl za přítomnosti molekuly TMS. Derivatizační reakce probíhala po inkubaci 24 hodin za přítomnosti 10 μl dusíkem vysušeného standardu 4-CP o koncentraci 20 $\mu\text{g/l}$ společně s 10 μl acetonitrilu a 20 μl TMS. Po převedení derivatizovaného standardu do vialek k analýze a jejich proměření byla získána, v porovnání s píky nederivatizovaného 4-CP, lepší odezva. Výsledek měření je zobrazen na Obrázku 21. Po zopakování celého postupu a opětovné analýze jsme ale dosáhly výsledků opačných. To vedlo k posouzení stáří činidla. Což vedlo k závěru, že pro vyšší účinnost reakce musí být derivatizační činidlo nové.

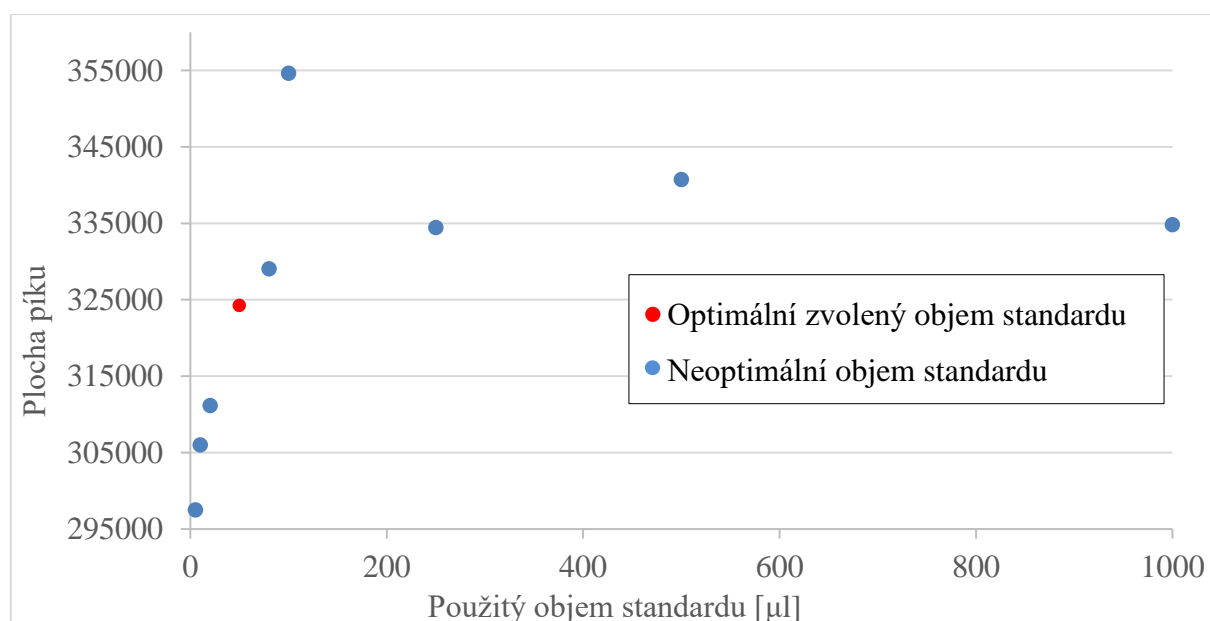


Obrázek 21: Pík silylderivátu 4-chlorfenolu detekovaného t_m 300 °C a t_R 14,5 minuta.

Při použití nového činidla BSTFA byl zopakován stejný postup jako u TMS. Po inkubaci 24 hodin za pokojové teploty byla derivatizace nevyhovující, jelikož BSTFA v přebytku krystalizovalo. V literatuře byl nalezen postup derivatizace 4-CP tímto novým

silylačním činidlem, který vyžadoval kratší dobu inkubace a přidání rozpouštědla před analýzou. Úprava spočívala ve 2 hodinové reakční době při 60 °C a napipetování 10 µl standardu vysušeného proudem dusíku, 10 µl acetonitrilu a 20 µl BSTFA do skleněné zkumavky. Po uplynutí 2 hodin se do reakční směsi přidalo 100 µl hexanu pro zvětšení objemu. Před analýzou na GC-FID byl silylderivát rozpuštěný v hexanu převeden do vialek s inzerty, které se uzavřely pomocí krimpovacích kleští a uzávěru se septem. Výsledek analýzy vedl k pozitivnímu závěru funkční přípravy vzorku standardu před analýzou.

Aby výsledky budoucí analýzy kalibrační řady standardů dávaly co nejlepší odezvy, došlo k vyzkoušení různých obdobných variant postupů silylace 4-CP. Prvním krokem bylo najít optimální objem použitého vysušeného standardu. Podle literatury bylo rozhodnuto o používání 50 µl BSTFA společně s 20 µl acetonitrilu. Ještě před přidáním derivatizačního činidla se do skleněných zkumavek napipetovalo 5, 10, 20, 50, 80, 100, 250, 500 a 1000 µl standardu 4-CP o koncentraci 20 µg/l, které se vysušily proudem dusíku. Po uplynulé době inkubace se reakční směs naředila 100 µl hexanu a předložila ve vialkách k analýze. Nejlepší odezvy se dosáhlo u 50 µl standardu, který je zobrazen v Grafu 2 červeným bodem, vysušeného dusíkem ku 50 µl BSTFA a 20 µl acetonitrilu společně se 100 µl hexanu přidaného na konci před analýzou. Tento výsledek se zároveň shodoval i s výsledky v literatuře. Vyšší objemy standardu 4-CP než 80 µl vykazovaly nehomogenní a nepřesné odpovědi v podobě odlišných velikostí ploch píků.



Graf 2: Srovnání ploch píků silylderivátu při výběru optimálního objemu standardu.

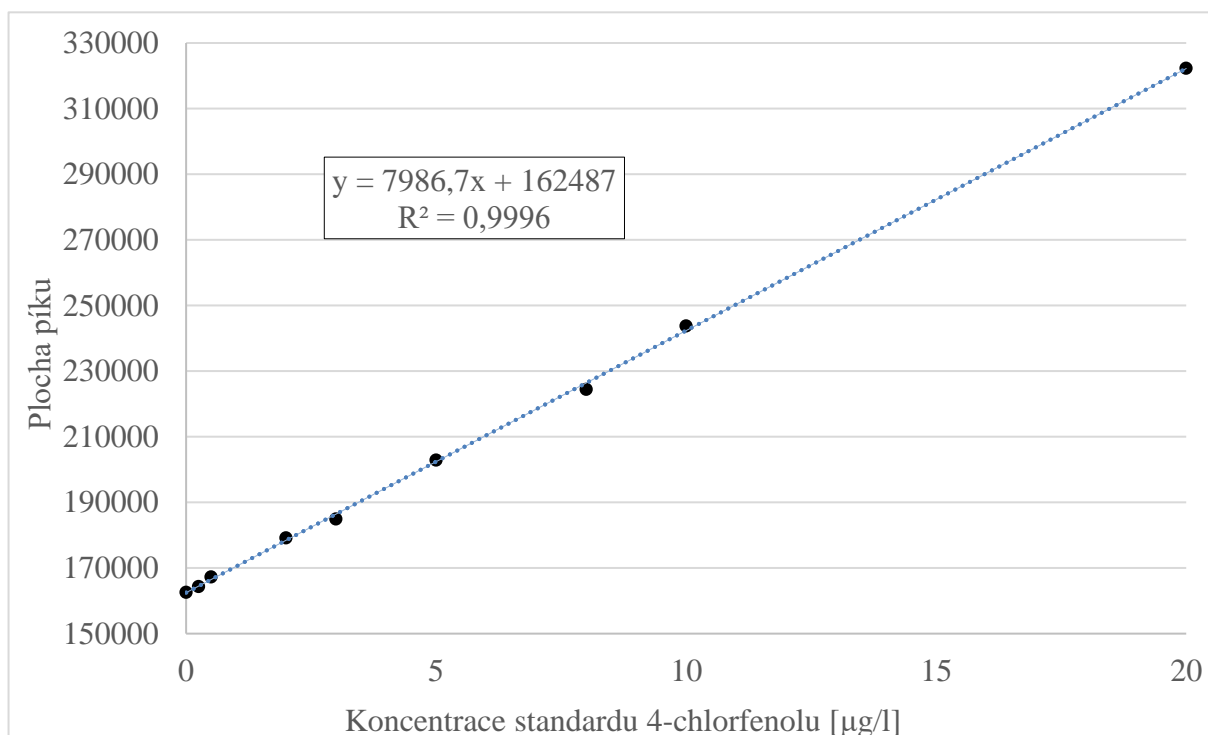
Rovněž bylo provedeno srovnání materiálu, ve kterém byla derivatizační směs po dobu 2 hodin inkubována. Pro zjednodušení postupu analýzy se uvažovalo o používání plastových zkumavek Eppendorf vyrobených z polypropylenu. Proto proběhlo porovnání odezvy vytvořených silylderivatů ve zkumavkách skleněných a plastových. Do obou typů zkumavek bylo napipetováno 50 μl standardu o koncentraci 20 $\mu\text{g/l}$, který se vysušil plynným dusíkem. Následně bylo přidáno 50 μl BSTFA a 20 μl acetonitrilu. Po 2 hodinách inkubace, 60 °C a s přidavkem 100 μl hexanu byla reakční směs převedena k analýze. Analýza ukázala, že derivatizovaný standard ve skleněných zkumavkách dával lepší odezvu v podobě větších píků než ten ve zkumavkách plastových. Proto bylo rozhodnuto o dalším využívání pro inkubaci zkumavek skleněných.

Další proměnná, která mohla konečný výsledek ovlivnit, bylo rozpouštělo přidávané na konci 2 hodinové inkubace. V literatuře bylo důvodem přidání rozpouštědla zvětšení objemu vzorku naderivatizovaného standardu před předložením k analýze. Během analýz byl ale pozorován vliv objemu rozpouštědla a jeho druhu na velikost píku. Celkem byla vyzkoušena rozpouštědla dichlormethan, acetonitril a hexan v objemech 100 a 150 μl při derivatizaci koncentrace 4-CP 20 $\mu\text{g/l}$. Do reakční směsi bylo použito 50 μl BSTFA, 50 μl standardu a 20 μl acetonitrilu. Změna nastala na konci 2 hodinové inkubace, kdy se měnil druh a objem rozpouštědla. Podle naměřených výsledků analýz bylo jako rozpouštědlo vybrán hexan, jehož odezva byla lepší než u ostatních rozpouštědel. U objemu rozpouštědel 150 μl pak vznikaly větší ale také u všech stejné píky. Proto se rozhodlo o optimálním objemu hexanu 100 μl .

3.4 Měření kalibrační řady 4-chlorfenolu

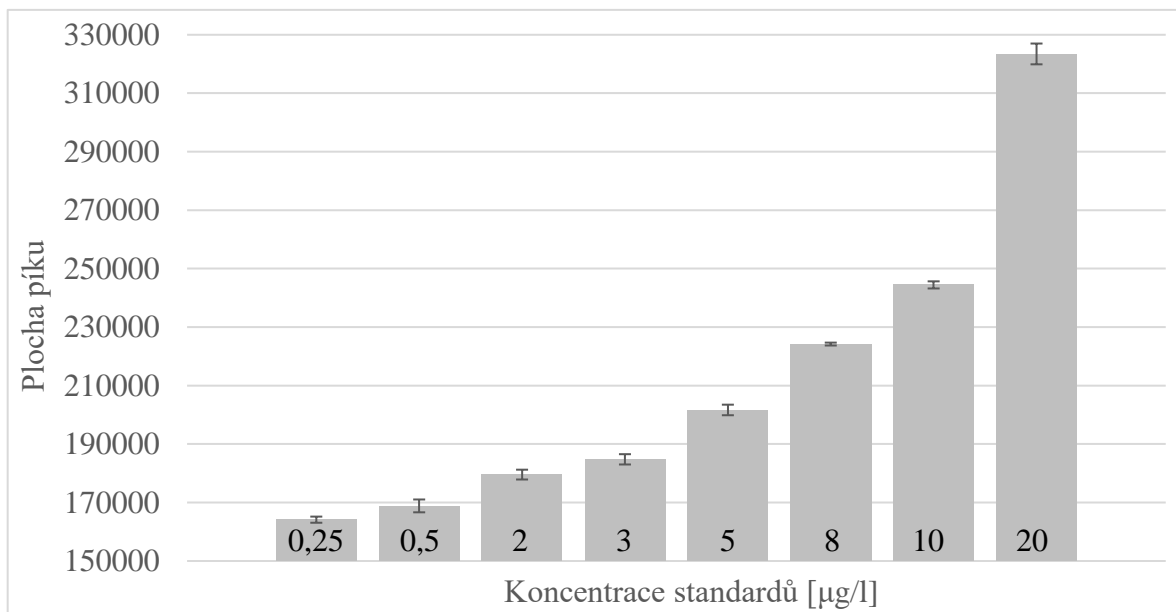
Ze všech naměřených hodnot a výsledků vycházejících z literatury se vytvořily optimální podmínky pro derivatizaci standardů 4-CP kalibrační řady. Do skleněné uzavíratelné zkumavky PYREX bylo napipetováno 50 μl vzorku standardu o známé koncentraci kalibrační řady rozpuštěného v dichlormethanu. Celkový objem byl odpařen proudem dusíku a do zkumavky bylo následně přidáno 20 μl acetonitrilu a 50 μl BSTFA. Tato reakční směs byla zahřívána při 60 °C 2 hodiny. Po uplynutí inkubace bylo do směsi přidáno 100 μl hexanu. Výsledná směs byla napipetována do vialek s inzerty a byla proměřena na GC-FID. Po vyhodnocení výsledků bylo rozhodnuto vynechat z kalibrační řady koncentrace 1 $\mu\text{g/l}$

a 15 µg/l kvůli špatné reakci na příslušné deriváty, a tudíž nesouvisejícím píkům. Kalibrační řada derivatizovaných standardů 4-CP je znázorněna v Grafu 3.



Graf 3: Kalibrační řada derivatizovaných standardů 4-chlorfenolu

Během měření lineární závislosti kalibrační řady byl každý bod změřen 10 krát za sebou pro určení směrodatné odchylky. Směrodatná odchylka byla použita, jako statistický ukazatel, k vyjádření míry variability naměřených hodnot vzhledem k jejich průměru. Čím vyšší byla směrodatná odchylka, tím vyšší rozptyl hodnot byl kolem průměru. Maximální směrodatná odchylka byla u koncentrace standardu kalibrační řady 0,5 µg/l a to 1,4424 %. Pomocí Grafu 4 byla znázorněna směrodatná odchylka v rámci jednotlivých průměrných hodnot ploch píků bodů kalibrační řady. Z grafu bylo usouzeno, že odchylka je nevýznamná, a tudíž variabilita naměřených hodnot byla nízká a blízko průměru. Což vedlo k závěru, že naměřené hodnoty jsou konzistentní a přesné.



Graf 4: Znázornění směrodatné odchylky vůči průměrným hodnotám ploch píků jednotlivých koncentrací bodů kalibrační řady.

Limit detekce (LOD) a limit stanovitelnosti (LOQ) jsou důležité parametry pro určení účinnosti analytické metody. Z jejich hodnoty můžeme odvodit další postup při optimalizaci metody a vylepšit vlastnosti pro analýzu. LOD určuje nejnižší koncentraci analytu, kterou můžeme metodou detekovat, aniž by nám výsledky ovlivnil šum. LOQ je nejnižší možná koncentrace analytu ve vzorku, která dovoluje kvantitativní hodnocení.

Vypočítaný LOD, jehož hodnota byla 0,20 µg/l, vypovídá o schopnosti metody detekovat velmi nízké koncentrace analytu. Což bylo vyhodnoceno jako pozitivní vlastnost metody GC-FID. Nejnižší koncentrace standardu kalibrační řady byla 0,25 µg/l, protože byly očekávány neznámé vzorky s nízkými koncentracemi analytu. Vypočítaná hodnota LOQ 0,63 µg/l udává schopnost metody nad touto hodnotou kvantifikovat 4-CP s vyšší mírou jistoty a přesnosti.

3.5 Metoda vnitřního standardu

Jako další možností stanovení koncentrace standardů nebo neznámých vzorků byla vyzkoušena metoda vnitřního standardu. Z literatury bylo vyvozeno, že lze použít halogenderiváty fenolu jako vnitřní standard. Byl tedy vybrán 3-chlorfenol kvůli jeho podobné struktuře jako zkoumaný 4-CP. Zvolená koncentrace byla 5 µg/l. Derivatizovaný standard 3-chlorfenolu, který podstoupil stejný proces derivatizace, dával při analýze téměř totožný pík,

jako derivatizovaný 4-CP o koncentraci 5 µg/l. Při pokusu o použití 3-chlorfenolu jako vnitřního standardu byl pík neznámého vzorku překryt píkem vnitřního standardu. Takový výsledek byl vyhodnocen jako nevhodný, a to vedlo k závěru, že 3-chlorefnol nelze použít jako vnitřní standard.

3.6 Měření koncentrací neznámých vzorků 4-chlorfenolu

Neznámé vzorky byly zpracovány stejným postupem jako vzorky standardů kalibrační řady o známé koncentraci. Do skleněné uzavíratelné zkumavky bylo napipetováno 50 µl neznámého vzorku společně s 50 µl BSTFA a 20 µl acetonitrilu. Reakční směs se posléze nechala inkubovat po dobu 2 hodin při 60 °C. Takto připravená reakční směs byla po uplynutí inkubační doby byla naředěna 100 µl hexanu a převedla do vialek s inzerty. Vialky byly uzavřeny, příslušně popsány a proměřeny v sérii za stejných podmínek jako kalibrační řada. Jednotlivé píky byly zachyceny ve 14,5 minutě při teplotě 300 °C. Velikosti píků byly porovnány s kalibrační řadou standardů a hodnoty ploch píků přepočítány na koncentraci. Jelikož neznámé vzorky prošly odbouráním 4-CP pomocí katalyzátorů, očekávaly se nízké koncentrace. Všechny vypočítané hodnoty neznámých vzorků jsou znázorněny v Tabulce 4.

Tabulka 4: Vypočítané koncentrace neznámých vzorků 4-chlorfenolu získaných extrakcí z odpadních vod.

Označení vzorku	Vypočítaná koncentrace [µg/l]
2706bk1	0,21
2706bk2	0,21
2706bk3	0,21
2706bk4	1,56
2706bk5	7,76

Tabulka 4: Vypočítané koncentrace neznámých vzorků 4-chlorfenolu získaných extrakcí z odpadních vod.– Pokračování

Označení vzorku	Vypočítaná koncentrace [$\mu\text{g/l}$]	Označení vzorku	Vypočítaná koncentrace [$\mu\text{g/l}$]
3006bk1	14,24	1206bk1	0,24
3006bk2	6,98	1206bk2	0,21
3006bk3	5,77	1206bk3	0,21
3006bk4	5,14	1206bk4	6,85
3006bk5	7,12	1206bk5	4,41
3006bk6	7,59	1206bk6	6,41
3006bk7	8,13	1206bk7	5,49
3006bk8	5,32	1206bk8	3,27
3006bk9	6,64	1206bk9	5,92
3006bk10	7,12	1206bk10	0,98
3006bk11	8,34	1206bk11	0,22
3006bk12	8,14	1206bk12	3,20
3006bk13	8,15	1206bk13	4,98
3006bk14	5,63	1206bk14	0,21

4 DISKUSE

Diplomová práce měla za cíl stanovení 4-CP v odpadních vodách. Pro analýzu jsme použily dichlormethanové extrakty vod, které prošly katalytickou přeměnou a odbouráním tohoto halogenovaného fenolu. Jelikož je 4-CP velmi toxický je vynakládána snaha o jeho detekci a odbourání. Některé práce se zaměřují na analýzu nederivatizovaných molekul. Pro změření neupravené molekuly 4-CP bylo zapotřebí více času v teplotním programu [149]. Proto se metoda GC-FID po většinou používá jako orientační k metodě GC-MS, jako způsob zhodnocení úspěšnosti derivatizace [149]. Po úspěšné derivatizaci by se pík 4-CP neměl podařit zachytit [149]. Proto proběhla optimalizace analýzy nederivatizovaného 4-CP. První naměřené hodnoty vypovídaly, že standardy rozpuštěné v dichlormethanu nebudou vyhovující pro další analýzu. Po proměření celé kalibrační řady standardů o vzrůstající koncentraci bylo dosaženo závěru, že metoda není dostatečně citlivá. Naměřené hodnoty neodpovídaly vzrůstající koncentraci 4-CP.

První pokus o derivatizaci 4-CP byl proveden acetylací. Pomocí literatury byl vyzkoušen postup, kde se využívalo derivatizační činidlo acetanhydrid [131]. Acetylderiváty tak vznikaly ve vodném zásaditém prostředí [131]. Po posouzení závislosti koncentračních bodů bylo jisté, že výsledek derivatizace byl neodpovídající závislosti koncentraci standardů. Proto byla snaha najít způsob, jak acetylaci uskutečnit. V literatuře byl nalezen jiný postup acetylce 4-CP, který fungoval na jiném principu derivatizace [132]. Bylo zjištěno že ve vodném prostředí acetylderiváty nemohou vznikat [132]. Reakce acetanhydridu s molekulou 4-CP v bezvodém prostředí probíhala za účasti triethylaminu, jako činidla schopného přijmout vodíkový proton, a derivatizační reakce tak mohla probíhat na hydroxylové skupině 4-CP [132]. Na tomto základě bylo vybráno jiné derivatizační činidlo s podobnými vlastnostmi.

Silylační činidla se ukázala jako vhodnou variantou pro derivatizaci 4-CP. Reakce s hydroxylovou skupinou na molekule je specifická a nesmí být prováděna ve vodném prostředí [149]. Silylační činidla mají také svoje výhody v podmínkách při kterých reagují, jelikož jsou schopné derivatizovat molekulou 4-CP i při pokojové teplotě [149]. Pro pokus o vytvoření silylderivátů byly vybrány molekuly TMS a BSTFA, podle naměřených hodnot odezvy v literatuře [122]. Vyzkoušený první postup využíval malých objemů [162].

Po porovnání našich výsledků analýz bylo rozhodnuto o používání derivatizačního činidla BSTFA pro vytvoření kalibrační řady [162]. Zároveň byla pozorována závislost plochy píku na objemech použitých činidel [122]. Stejně jako v literatuře byl vhodný objem derivatizačního činidla 50 μl , aby se dosáhlo vyšší účinnosti derivatizace [122]. Tento zvolený objem BSTFA, v našem případě, nejlépe reagoval za přítomnosti 50 μl vysušeného standardu 4-CP a 20 μl acetonitrilu během 2 hodinové inkubace při 60 $^{\circ}\text{C}$. Použitý postup z literatury tak byl upraven minimálně.

Po vytvoření a proměření kalibrační řady silyderivátů 4-CP byl vyhodnocen postup derivatizace jako optimální. Na rozdíl od naměřených hodnot v literatuře, kde retenční čas píku byl 11,2 minuty, naše měření ukázalo pík až ve 14,5 minutě [149]. Zároveň se předpokládala směrodatná odchylka do 4 % [149]. Analýza námi vytvořené kalibrační řady měla průměrnou hodnotu směrodatné odchylky 0,85 %. Dále byla očekávána účinnost metody LOD 0,03 $\mu\text{g/l}$ a LOQ 0,25 $\mu\text{g/l}$ [149]. Po vypočítání hodnot limitů námi optimalizované metody byly LOD 0,20 $\mu\text{g/l}$ a LOQ 0,63 $\mu\text{g/l}$. Tento rozdíl v účinnosti metody, mohl být způsoben odlišnou instrumentací, kdy výsledky v literatuře byly měřeny systémem Chrompack CP 9000 se stejnou kolonou HP-5 [149].

Metoda GC-FID se ukázala jako vhodnou pro stanovení 4-CP v dichlormethanových extraktech odpadních vod. Avšak jiné metody, zvláště pak detektory, podle literatury umí poskytnout vyšší účinnost a citlivost analýzy [156]. Zvláště pak CG-MS s příslušným optimálním vybavením poskytuje rychlejší a přesnější výsledky [156].

5 ZÁVĚR

4-CP společně s ostatními chlorfenoly jsou významnou součástí průmyslu a zemědělství. Roky jejich používání způsobilo naakumulování chlorfenolů v přírodě a znečištění vodních toků, spodních vod a půdy. To mělo za následek negativní účinky na ekosystém. Kvůli snaze o ekologičtější přístup se dnes průmysl i legislativa zaměřuje na snahu snížit používání halogenovaných fenolů a je jejich nahrazením, k přírodě šetrnými variantami.

Nové technologie a inovace umožňují efektivní odstraňování 4-CP z životního prostředí. Zvláště pak z odpadních vod, které se po použití a pročištění vracejí zpátky do krajiny. Během let se chlorované fenoly v přírodě díky své stabilitě nashromáždily a jsou tedy přítomné všude kolem různých činností člověka. Jejich nebezpečnost v životním prostředí, zvláště pak ve vodě, spočívá ve schopnosti ovlivňovat endokrinní systém člověka i zvířat. Díky tomu mohou vznikat nejrůznější hormonálně podmíněná onemocnění, což vede k o to větší snaze v rámci prevence problém s 4-CP a strukturám jemu podobným vyřešit.

Naším cílem bylo kvantifikovat 4-CP v připravených neznámých vzorcích. K měření jsme měli k dispozici GC systém s detektorem FID, který se ukázal jako vhodný pro měření a stanovování 4-CP v dichlormethanových extraktech. Dále bylo zjištěno, že nevýhodou této metody je její nestabilita a spousta faktorů, které mohly ovlivnit průběh analýzy a výsledky. Nejpřesnější kvantifikace 4-CP se nám podařilo dosáhnout do 20 hodin od vytvoření derivatizovaných molekul při porovnávání se stejně starou kalibrační řadou. V ostatních případech byly výsledky zavádějící a následně stanoveny jako chybné. Výsledkem této práce je tedy vytvoření metody ke zjištění výskytu a koncentrace 4-CP v odpadních vodách.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] PROHASKA, Thomas;, Johanna; IRRGEHER, Jacqueline; BENEFIELD, et al. Standard atomic weights of the elements 2021 (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* [online]. 2022, **94(5)**, s. 573–600. [cit. 2023-06-12]. Dostupné z: doi:10.1515/pac-2019-0603. ISSN 0033-4545.
- [2] GRIBBLE, Gordon W. Naturally Occurring Organohalogen Compounds. *Accounts of Chemical Research* [online]. 1998, **31(3)**, s. 141–152. [cit. 2023-21-09]. Dostupné z: doi:10.1021/ar9701777. ISSN 0001-4842.
- [3] CROOK, Jedidiah and Aliyar MOUSAVI. The chlor-alkali process: A review of history and pollution. *Environmental Forensics* [online]. 2016, **17(3)**, s. 211–217. [cit. 2023-06-12] Dostupné z: doi:10.1080/15275922.2016.1177755. ISSN 1527-5922.
- [4] MILLET, P. Chlor-alkali technology: fundamentals, processes and materials for diaphragms and membranes. *Handbook of Membrane Reactors* [online]. 2013, s. 384–415. [cit. 2023-21-09] Dostupné z: doi:10.1533/9780857097347.2.384
- [5] CLARK, Graeme C., Linda ELFSMARK, Stuart ARMSTRONG, et al. From “crisis to recovery”: A complete insight into the mechanisms of chlorine injury in the lung. *Life Sciences* [online]. 2023, **312**, s. 121252. [cit. 2023-23-09] Dostupné z: doi:10.1016/j.lfs.2022.121252. ISSN 00243205.
- [6] BUSCH, Marianna A. and Kenneth W. BUSCH. Bleaches and Sterilants. *Encyclopedia of Analytical Science* [online]. Vyd. 3. 2018. [cit. 2023-06-12] Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-409547-2.14033-8. ISBN 9780081019849.
- [7] GASPA, Silvia, Massimo CARRARO, Luisa PISANO, et al. Trichloroisocyanuric Acid: a Versatile and Efficient Chlorinating and Oxidizing Reagent. *European Journal of Organic Chemistry* [online]. 2019, **2019(22)**, s. 3544–3552. [cit. 2023-06-12] Dostupné z: doi:10.1002/ejoc.201900449. ISSN 1434-193X.
- [8] DIONISIO, Kathie L., Katherine PHILLIPS, Paul S. PRICE, et al. The Chemical and Products Database, a resource for exposure-relevant data on chemicals in consumer products. *Scientific Data* [online]. 2018, **5(1)**, s. 180125. [cit. 2023-30-09] Dostupné z: doi:10.1038/sdata.2018.125. ISSN 2052-4463.

- [9] WHITE, Carl W. and James G. MARTIN. Chlorine Gas Inhalation: Human Clinical Evidence of Toxicity and Experience in Animal Models. *Proceedings of the American Thoracic Society* [online]. 2010, **7(4)**, s. 257–263. [cit. 2023-09-10] Dostupné z: doi:10.1513/pats.201001-008SM. ISSN 1546-3222.
- [10] RAMSAY, Philip T. and Aaron CARR. Gastric Acid and Digestive Physiology. *Surgical Clinics of North America* [online]. 2011, **91(5)**, s. 977–982. [cit. 2024-16-03] Dostupné z: doi:10.1016/j.suc.2011.06.010. ISSN 00396109.
- [11] HUNT, Richard H., M. CAMILLERI, S. E. CROWE, et al. The stomach in health and disease. *Gut* [online]. 2015, **64(10)**, s. 1650–1668. [cit. 2024-16-03] Dostupné z: doi:10.1136/gutjnl-2014-307595. ISSN 0017-5749.
- [12] CHEN, Ichia, Shashank PANT, Qianyi WU, et al. Glutamate transporters have a chloride channel with two hydrophobic gates. *Nature* [online]. 2021, **591(7849)**, s. 327–331. [cit. 2024-16-03] Dostupné z: doi:10.1038/s41586-021-03240-9. ISSN 0028-0836.
- [13] ABDOLLAHI, M. and S. NIKFAR. Hydrochloric Acid. In: *Encyclopedia of Toxicology* [online]. Vyd. 3. 2014, s. 960–963. [cit. 2023-30-10] Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-386454-3.00735-1. ISBN 9780123864550.
- [14] LEUSTIK, Martin, Stephen DORAN, Andreas BRACHER, et al. Mitigation of chlorine-induced lung injury by low-molecular-weight antioxidants. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* [online]. 2008, **295(5)**, s. L733–L743. [cit. 2023-30-10] Dostupné z: doi:10.1152/ajplung.90240.2008. ISSN 1040-0605.
- [15] BAST, Cheryl B. and Dana F. GLASS. Phosgene. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents* [online]. Vyd. 1. 2009, s. 321–330. [cit. 2023-30-10] Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-374484-5.00023-7. ISBN 9780123744845.
- [16] AGGARWAL, Saurabh, Tamas JILLING, Stephen DORAN, et al. Phosgene inhalation causes hemolysis and acute lung injury. *Toxicology Letters* [online]. 2019, **312**, s. 204–213. [cit. 2023-06-12] Dostupné z: doi:10.1016/j.toxlet.2019.04.019. ISSN 03784274.
- [17] THOMAS, G.O. Polychlorinated Biphenyls. *Encyclopedia of Ecology* [online]. Vyd. 1. 2008, s. 2872–2881. Dostupné z: doi:10.1016/B978-008045405-4.00416-X. ISBN 9780080454054

- [18] RUIZ, Patricia. Chemical structure of PCBs. PCBs: polychlorinated biphenyls. *Toxicology and Industrial Health* [online]. 2015, **32(11)**, s. 1826. [cit. 2023-06-11] Dostupné z: https://www.researchgate.net/figure/Chemical-structure-of-PCBs-PCBs-polychlorinated-biphenyls_fig1_278046513
- [19] SERVICES, Human. Toxicological Profile for Polychlorinated Biphenyls (PCBs). *Toxicological Profiles* [online]. Vyd. 1. 2002, **759**, s. 295–346. [cit. 2023-07-11] Dostupné z: doi:10.1201/9781420061888_ch129
- [20] FERNANDES, Alwyn R., Anna KILANOWICZ, Joanna STRAGIEROWICZ, et al. The toxicological profile of polychlorinated naphthalenes (PCNs). *Science of The Total Environment* [online]. 2022, **837**, s. 155764. [2023-07-11] Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2022.155764. ISSN 00489697.
- [21] ULBRICH, Beate and Ralf STAHLMANN. Developmental toxicity of polychlorinated biphenyls (PCBs): a systematic review of experimental data. *Archives of Toxicology* [online]. 2004, **78(5)**, s. 252–268. [cit. 2023-07-11] Dostupné z: doi:10.1007/s00204-003-0519-y. ISSN 0340-5761.
- [22] IGBINOSA, Etinosa O., Emmanuel E. ODJADJARE, Vincent N. CHIGOR, et al. Toxicological Profile of Chlorophenols and Their Derivatives in the Environment: The Public Health Perspective. *The Scientific World Journal* [online]. 2013, **2013**, s. 1–11. [cit. 2023-30-10] Dostupné z: doi:10.1155/2013/460215. ISSN 1537-744X.
- [23] MORALES, S., P. CANOSA, I. RODRÍGUEZ, et al. 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* [online]. 2005, **1082(2)**, s. 128–135. [cit. 2023-08-10] Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2005.05.059. ISSN 00219673.
- [24] SHAH, Jasmin, Muhammad RASUL JAN, Mehwish IQBAL, et al. Mixed hemimicelles silica-coated magnetic nanoparticles for solid-phase extraction of chlorophenols from different water samples. *DESALINATION AND WATER TREATMENT* [online]. 2018, **112**, s. 310–318. [cit. 2024-16-03] Dostupné z: doi:10.5004/dwt.2018.22218

- [25] COLLIVIGNARELLI, Maria, Alessandro ABBÀ, Ilaria BENIGNA, et al. Overview of the Main Disinfection Processes for Wastewater and Drinking Water Treatment Plants. *Sustainability* [online]. 2017, **10(2)**, s. 86. [cit. 2023-06-12] Dostupné z: doi:10.3390/su10010086 ISSN 2071-1050.
- [26] INGVERTSEN, Simon Toft, Marina Bergen JENSEN and Jakob MAGID. A Minimum Data Set of Water Quality Parameters to Assess and Compare Treatment Efficiency of Stormwater Facilities. *Journal of Environmental Quality* [online]. 2011, **40(5)**, s. 1488–1502. [cit. 2023-06-12] Dostupné z: doi:10.2134/jeq2010.0420. ISSN 0047-2425.
- [27] POORNESH, Poornesh, Shobhan MAJUMDER, Razi MUSTAFA, et al. A Review on Working, Treatment and Performance Evaluation of Sewage Treatment Plant. *Shobhan Majumder Journal of Engineering Research and Application* [online]. 2019, **49**, s. 41–49. [cit. 2023-06-12] Dostupné z: doi:10.9790/9622-0903064149. ISSN 2248-9622.
- [28] ZIELIŃSKI, Wiktor, Ewa KORZENIEWSKA, Monika HARNISZ, et al. Wastewater treatment plants as a reservoir of integrase and antibiotic resistance genes – An epidemiological threat to workers and environment. *Environment International* [online]. 2021, **156**, s. 106641. [cit. 2024-31-01] Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2021.10664. ISSN 01604120.
- [29] ALBOLAFIO, Sofia, Alicia MARÍN, Ana ALLENDE, et al. Strategies for mitigating chlorinated disinfection byproducts in wastewater treatment plants. *Chemosphere* [online]. 2022, **288**, s. 132583. [cit. 2024-31-01] Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2021.132583. ISSN 00456535.
- [30] THE EUROPEAN UNION. Regulation (EC) No 2020/741 of the European parliament and of the council of 25 may 2020 on minimum requirements for water reuse. In: *LEX-FAOC195719* [online]. 2020. [cit. 2024-31-01] Dostupné z: <https://www.fao.org/faolex/results/details/en/c/LEX-FAOC195719/>
- [31] CUI, Qi, Hai LIU, Hong-Wei YANG, et al. Bacterial removal performance and community changes during advanced treatment process: A case study at a full-scale water reclamation plant. *Science of The Total Environment* [online]. 2020, **705**, s. 135811. [cit. 2024-31-01] Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2019.135811. ISSN 00489697.

- [32] TAK, Surbhi, Bhanu Prakash VELLANKI and Satinder AHUJA. A Review on Disinfection and Disinfection Byproducts. In: *Contaminants in Our Water: Identification and Remediation Methods* [online]. 2020, **1352**, s. 105–117. [cit. 2023-31-01] Dostupné z: doi:10.1021/bk-2020-1352.ch006. ISBN 9780841298941.
- [33] ORDÓÑEZ, Salvador, Fernando V. DÍEZ and Herminio SASTRE. Catalytic Hydrodechlorination of Chlorinated Olefins over a Pd/Al₂O₃ Catalyst: Kinetics and Inhibition Phenomena. *Industrial & Engineering Chemistry Research* [online]. 2002, **41**(3), s. 505–511. [cit. 2023-07-12] Dostupné z: doi:10.1021/ie010679v. ISSN 0888-5885.
- [34] URBANO, F.J. and J.M. MARINAS. Hydrogenolysis of organohalogen compounds over palladium supported catalysts. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical* [online]. 2001, **173**(1–2), s. 329–345. [cit. 2023-07-12] Dostupné z: doi:10.1016/S1381-1169(01)00157-1. ISSN 13811169.
- [35] SRINIVAS, S.T., L. JHANSI LAKSHMI, N. LINGAIAH, et al. Selective vapour-phase hydrodechlorination of chlorobenzene over alumina supported platinum bimetallic catalysts. *Applied Catalysis A: General* [online]. 1996, **135**(2), s. 201–207. [cit. 2023-07-12] Dostupné z: doi:10.1016/0926-860X(95)00290-1. ISSN 0926860X.
- [36] ROY, Heidi M, Chien M WAI, Tao YUAN, et al. Catalytic hydrodechlorination of chlorophenols in aqueous solution under mild conditions. *Applied Catalysis A: General* [online]. 2004, **271**(1–2), s. 137–143. [cit. 2023-07-12] Dostupné z: doi:10.1016/j.apcat a.2004.02.053. ISSN 0926860X.
- [37] PITTMAN, C. Dechlorination of polychlorobiphenyls using NaBH₄ and NaBH₄/LiCl at 120–310°C in glyme solvents. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2001, **82**(3), s. 299–311. [cit. 2023-07-12] Dostupné z: doi:10.1016/S0304-3894(01)00175-3. ISSN 03043894.
- [38] FUENTES, Carolina Andrea Bahamondes a Yuhoon HWANG. Catalytic reduction of nitrate in reverse osmosis concentrate by using Pd-Cu/activated carbon felt. *Energy & Environment* [online]. 2021, **32**(1), s. 152–167. [cit. 2024-04-02] Dostupné z: doi:10.1177/0958305X20923115. ISSN 0958-305X.

- [39] JEON, Jintae, Yuri PARK and Yuhoon HWANG. Catalytic Hydrodechlorination of 4-Chlorophenol by Palladium-Based Catalyst Supported on Alumina and Graphene Materials. *Nanomaterials* [online]. 2023, **13(9)**, s. 1564. [cit. 2024-04-02] Dostupné z: doi:10.3390/nano13091564. ISSN 2079-4991.
- [40] HUANG, Yuyao, Kunyang WANG, Liang CUI, et al. Effective hydrolysis of sodium borohydride driven by self-supported cobalt oxide nanorod array for on-demand hydrogen generation. *Catalysis Communications* [online]. 2016, **87**, s. 94–97. [cit. 2024-04-02] Dostupné z: doi:10.1016/j.catcom.2016.09.012. ISSN 15667367.
- [41] DUAN, Jiangtao, Hong ZHU, Fuyuan XU a Jianzhuang ZHAO. A new approach to 4-chlorophenol dechlorination on monometallic copper compared to its Cu/Fe bimetallic system. *Chemical Engineering Journal* [online]. 2016, **304**, s. 282–288. [cit. 2023-09-12] Dostupné z: doi:10.1016/j.cej.2016.06.089. ISSN 13858947.
- [42] LIU, Jing, Hong ZHU, Fuyuan XU, et al. Enhanced hydrodechlorination of 4-chlorophenol by Cu/Fe bimetallic system via ball-milling. *DESALINATION AND WATER TREATMENT* [online]. 2017, **64**, s. 157–164. [cit. 2024-18-01] Dostupné z: doi:10.5004/dwt.2017.20171. ISSN 1944-3986.
- [43] YIN, Lifeng, Yunrong DAI, Junfeng NIU, et al. Rapid dechlorination of chlorophenols in aqueous solution by [Ni|Cu] microcell. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2012, **209–210**, s. 414–420. [cit. 2023-09-12] Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2012.01.044. ISSN 03043894.
- [44] RAUT, Sandesh S., Rohit SHETTY, Nikhi Maria RAJU, et al. Screening of zero valent mono/bimetallic catalysts and recommendation of Raney Ni (without reducing agent) for dechlorination of 4-chlorophenol. *Chemosphere* [online]. 2020, **250**, s. 126298. [cit. 2023-09-12] Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2020.126298. ISSN 00456535.
- [45] HEGEDUS, Michal, Petr LACINA, Miroslav PLOTĚNÝ, et al. Fast and efficient hydrodehalogenation of chlorinated benzenes in real wastewaters using Raney alloy. *Journal of Water Process Engineering* [online]. 2020, **38**, s. 101645. [cit. 2024-17-01] Dostupné z: doi:10.1016/j.jwpe.2020.101645. ISSN 22147144.

- [46] LIU, Guo-Bin, Lu DAI, Xiang GAO, et al. Reductive degradation of tetrabromobisphenol A (TBBPA) in aqueous medium. *Green Chemistry* [online]. 2006, **8(9)**, s. 781. [cit. 2024-17-01] Dostupné z: doi:10.1039/b605261d. ISSN 1463-9262.
- [47] MA, Xuanxuan, Shiwei ZHOU, Cuiyun YANG, et al. The influence of triethylamine on the hydrodechlorination reactivity of chlorophenols over Raney Ni catalyst. *Catalysis Communications* [online]. 2010, **12(4)**, s. 282–285. [cit. 2024-17-01] Dostupné z: doi:10.1016/j.catcom.2010.09.023. ISSN 15667367.
- [48] WANG, Shu, Bo YANG, Tingting ZHANG, et al. Catalytic Hydrodechlorination of 4-Chlorophenol in an Aqueous Solution with Pd/Ni Catalyst and Formic Acid. *Industrial & Engineering Chemistry Research* [online]. 2010, **49(10)**, s. 4561–4565. [cit. 2023-09-12] Dostupné z: doi:10.1021/ie9005194. ISSN 0888-5885.
- [49] JAIN, Bhawana, Ajaya Kumar SINGH, Hyunook KIM, et al. Treatment of organic pollutants by homogeneous and heterogeneous Fenton reaction processes. *Environmental Chemistry Letters* [online]. 2018, **16(3)**, s. 947–967. [cit. 2024-31-01] Dostupné z: doi:10.1007/s10311-018-0738-3. ISSN 1610-3653.
- [50] WANG, Yanqiong, Hongwu WANG, Lei WANG, et al. Removal of high-concentration 4-Chlorophenol (4-CP) in wastewater using carbon-based heterogeneous catalytic oxidation: Performance and mechanism. *Journal of Cleaner Production* [online]. 2022, **346**, s. 131176. [cit. 2023-08-11] Dostupné z: doi:10.1016/j.jclepro.2022.131176. ISSN 09596526.
- [51] POULOPOULOS, S.G., M. NIKOLAKI, D. KARAMPETSOS and C.J. PHILIPPOPOULOS. Photochemical treatment of 2-chlorophenol aqueous solutions using ultraviolet radiation, hydrogen peroxide and photo-Fenton reaction. *Journal of Hazardous Materials* [online]. 2008, **153(1–2)**, s. 582–587. [cit. 2023-08-11] Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2007.09.002. ISSN 03043894.
- [52] LAI, Lyu, Chun Hu. Heterogeneous Fenton Catalytic Water Treatment Technology and Mechanism. *Progress in Chemistry* [online]. 2017, **29(9)**, s. 981-999. [cit. 2024-31-01] Dostupné z: doi:10.7536/PC170552. ISSN 981-999.

- [53] DUAN, Feng, Yuezhu YANG, Yuping LI, et al. Heterogeneous Fenton-like degradation of 4-chlorophenol using iron/ordered mesoporous carbon catalyst. *Journal of Environmental Sciences* [online]. 2014, **26**(5), s. 1171–1179. [cit. 2023-08-11] Dostupné z: doi:10.1016/S1001-0742(13)60532-X. ISSN 10010742.
- [54] MELCHOR-LAGAR, Verenice, Esthela RAMOS-RAMÍREZ, Ariadna-Alicia MORALES-PÉREZ, et al. Photocatalytic removal of 4-chlorophenol present in water using ZrO₂/LDH under UV light source. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* [online]. 2020, **389**, s. 112251. [cit. 2024-04-02] Dostupné z: doi:10.1016/j.jphotochem.2019.112251. ISSN 10106030.
- [55] HASSAN, N.S., A.A. JALIL, N.F. KHUSNUN, et al. Extra-modification of zirconium dioxide for potential photocatalytic applications towards environmental remediation: A critical review. *Journal of Environmental Management* [online]. 2023, **327**, s. 116869. [cit. 2024-04-02] Dostupné z: doi:10.1016/j.jenvman.2022.116869. ISSN 03014797.
- [56] NEPPOLIAN, Bernaurdshaw, Qiliang WANG, Hiromi YAMASHITA, et al. Synthesis and characterization of ZrO₂-TiO₂ binary oxide semiconductor nanoparticles: Application and interparticle electron transfer process. *Applied Catalysis A: General* [online]. 2007, **333**(2), s. 264–271. [cit. 2024-04-02] Dostupné z: doi:10.1016/j.apcata.2007.09.026. ISSN 0926860X.
- [57] TAZIK, Moslem, Mohammad H. DEHGHANI, Kamyar YAGHMAEIAN, et al. 4-Chlorophenol adsorption from water solutions by activated carbon functionalized with amine groups: response surface method and artificial neural networks. *Scientific Reports* [online]. 2023, **13**(1), s. 7831. [cit. 2023-08-11] Dostupné z: doi:10.1038/s41598-023-35117-4. ISSN 2045-2322.
- [58] AL-HASHIMI, Osamah, Khalid HASHIM, Edward LOFFILL, et al. A Comprehensive Review for Groundwater Contamination and Remediation: Occurrence, Migration and Adsorption Modelling. *Molecules* [online]. 2021, **26**(19), s. 5913. [cit. 2024-06-02] Dostupné z: doi:10.3390/molecules26195913. ISSN 1420-3049.

- [59] NOWAK, Agnieszka and Agnieszka MROZIK. Degradation of 4-chlorophenol and microbial diversity in soil inoculated with single *Pseudomonas* sp. CF600 and *Stenotrophomonas maltophilia* KB2. *Journal of Environmental Management* [online]. 2018, **215**, s. 216-229. [cit. 2023-09-12] Dostupné z: doi:10.1016/j.jenvman.2018.03.052. ISSN 03014797.
- [60] KHAN, Nishat, Adil Shafi GANIE, Abdul Hakeem ANWER, et al. Bioremediation of chlorophenols for the production of biogas: A green alternative. *Relationship Between Microbes and the Environment for Sustainable Ecosystem Services*[online]. Vyd. 3, 2023, s. 117–133. [cit. 2023-30-10] Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-89936-9.00015-1. ISBN 9780323899369
- [61] KWEAN, Oh Sung, Su Yeon CHO, Jun Won YANG, et al. 4-Chlorophenol biodegradation facilitator composed of recombinant multi-biocatalysts immobilized onto montmorillonite. *Bioresource Technology* [online]. 2018, **259**, s. 268–275. [cit. 2023-09-12] Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2018.03.066. ISSN 09608524.
- [62] KANG, Christina, Jun Won YANG, Wooyoun CHO, et al. Oxidative biodegradation of 4-chlorophenol by using recombinant monooxygenase cloned and overexpressed from *Arthrobacter chlorophenolicus* A6. *Bioresource Technology* [online]. 2017, **240**, 123-129. [2023-09-12] Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2017.03.078. ISSN 09608524.
- [63] CHO, Su Yeon, Oh Sung KWEAN, Jun Won YANG, et al. Identification of the upstream 4-chlorophenol biodegradation pathway using a recombinant monooxygenase from *Arthrobacter chlorophenolicus* A6. *Bioresource Technology* [online]. 2017, **245**, s. 1800-1807. [cit. 2023-09-12] Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2017.05.006. ISSN 09608524.
- [64] SCANLON, Bridget R., Sarah FAKHREDDINE, Ashraf RATEB, et al. Author Correction: Global water resources and the role of groundwater in a resilient water future. *Nature Reviews Earth & Environment* [online]. 2023, **4(5)**, s. 351–351. [cit. 2024-26-02] Dostupné z: doi:10.1038/s43017-023-00418-9. ISSN 2662-138X.

- [65] ČESKO. 254/2001 Sb. ZÁKON o vodách a o změně některých zákonů. In: *Sbírka zákonů České republiky* [online]. 2001. [cit. 2024-26-02] Dostupné z: <https://www.mzp.cz/www/platnalegislativa.nsf/%24%24OpenDominoDocument.xsp?documentId=20F9C15060CAD3AEC1256AE30038D05C&action=openDocument>
- [66] DIAZ-SOSA, Veronica R., Mireya TAPIA-SALAZAR, Jiri WANNER, et al. Monitoring and Ecotoxicity Assessment of Emerging Contaminants in Wastewater Discharge in the City of Prague (Czech Republic). *Water* [online]. 2020, **12(4)**, s. 1079. [cit. 2023-26-02] Dostupné z: doi:10.3390/w12041079. ISSN 2073-4441.
- [67] BISSELINK, B., J. BERNHARD, E. GELATI, et al. *Climate change and Europe's water resources* [online]. 2020, **35**, s. 13-14. [cit. 2024-26-02] Dostupné z: doi:10.2760/15553. ISBN 9789276103981.
- [68] ČESKO. Nařízení vlády o Plánu odpadového hospodářství České republiky pro období 2015-2024. In: *Nařízení 352/2014 Sb.* [online]. 2014. [cit. 2024-26-02] Dostupné z: <https://www.mzp.cz/www/platnalegislativa.nsf/%24%24OpenDominoDocument.xsp?documentId=1A9ED7F11A20B986C1257E2E00422918&action=openDocument>
- [69] ČESKO. Sdělení Ministerstva zahraničních věcí o sjednání Dohody o provádění Rozhodnutí Komise ze dne 9. prosince 2013, kterým se poskytuje grant z Fondu solidarity Evropské unie na financování nouzových opatření v České republice. In: *Sdělení č. 22/2015 Sb. m. s.* [online]. 2014. [cit. 2024-26-02] Dostupné z: <https://op.europa.eu/cs/publication-detail/-/publication/03be0610-d2b2-4a0d-a046-f03adfd24d48/language-cs>
- [70] GE, Tingting, Jiangyuan HAN, Yongmei QI, et al. The toxic effects of chlorophenols and associated mechanisms in fish. *Aquatic Toxicology* [online]. 2017, **184**, s. 78–93. [cit. 2023-09-12] Dostupné z: doi:10.1016/j.aquatox.2017.01.005. ISSN 0166445X.
- [71] BADANTHADKA, Murali. Chlorophenols. In: *Encyclopedia of Toxicology* [online]. 2024, **280**, s. 935–941. [cit. 2024-16-01] Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-824315-2.00621-7. ISSN 0045-6535
- [72] CZAPLICKA, Marianna. Sources and transformations of chlorophenols in the natural environment. *Science of The Total Environment* [online]. 2004, **322(1–3)**, s. 21–39. [cit. 2023-09-12] Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2003.09.015. ISSN 00489697.

- [73] THOMAS, Olivier a Marine BROGAT. Organic constituents. *UV-Visible Spectrophotometry of Waters and Soils* [online]. 2022, s. 95–160. [2023-08-11] Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-323-90994-5.00006-X. ISBN 9780323909945.
- [74] WATSON, William David. Regioselective para-chlorination of activated aromatic compounds. *The Journal of Organic Chemistry* [online]. 1985, **50(12)**, s. 2145–2148. [cit. 2023-08-11] Dostupné z: doi:10.1021/jo00212a029. ISSN 0022-3263.
- [75] MEYER, Urs A. Overview of enzymes of drug metabolism. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* [online]. 1996, **24(5)**, s. 449–459. [cit. 2023-11-12] Dostupné z: doi:10.1007/BF02353473. ISSN 0090-466X.
- [76] ALMAZROO, Omar Abdulhameed, Mohammad Kowser MIAH a Raman VENKATARAMANAN. Drug Metabolism in the Liver. *Clinics in Liver Disease* [online]. 2017, **21(1)**, s. 1–20. [cit. 2023-12-11] Dostupné z: doi:10.1016/j.cld.2016.08.001. ISSN 10893261.
- [77] SUZUKI, Go, Hidetaka TAKIGAMI, Mafumi WATANABE, et al. Identification of Brominated and Chlorinated Phenols as Potential Thyroid-Disrupting Compounds in Indoor Dusts. *Environmental Science & Technology* [online]. 2008, **42(5)**, s. 1794–1800. [cit. 2023-10-12] Dostupné z: doi:10.1021/es7021895. ISSN 0013-936X.
- [78] BEIRAS, Ricardo. Biotransformation. *Marine Pollution* [online], 2018, s. 205–214. [cit. 2023-10-12] Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-813736-9.00012-X. ISBN 9780128137369.
- [79] DING, Ning, Yingxue SUN, Tao YE, et al. Control of halophenol formation in seawater during chlorination using pre-ozonation treatment. *Environmental Science and Pollution Research* [online]. 2018, **25(28)**, s. 28050–28060. [cit. 2023-10-12] Dostupné z: doi:10.1007/s11356-018-2828-y. ISSN 0944-1344.
- [80] BEHRENDORFF, James B. Y. H. Reductive Cytochrome P450 Reactions and Their Potential Role in Bioremediation. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2021, **12**. [2024-15-01] Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2021.649273. ISSN 1664-302X.
- [81] FLEMING, Ingrid. Cytochrome P450 and Vascular Homeostasis. *Circulation Research* [online]. 2001, **89(9)**, s. 753–762. [cit. 2024-16-01] Dostupné z: doi:10.1161/hh2101.099268. ISSN 0009-7330.

- [82] DAVYDOV, Dmitri R. Microsomal monooxygenase in apoptosis: another target for cytochrome c signaling? *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 2001, **26(3)**, s. 155–160. [cit. 2024-16-01] Dostupné z: doi:10.1016/S0968-0004(00)01749-7. ISSN 09680004.
- [83] KUMAR, Devesh, Baharan KARAMZADEH, G. Narahari SASTRY, et al. What Factors Influence the Rate Constant of Substrate Epoxidation by Compound I of Cytochrome P450 and Analogous Iron(IV)-Oxo Oxidants? *Journal of the American Chemical Society* [online]. 2010, **132(22)**, s. 7656–7667. [cit. 2023-10-12] Dostupné z: doi:10.1021/ja9106176. ISSN 0002-7863.
- [84] HU, Jiajing, Yingchun CAI, Weihua LI, et al. In Silico Prediction of Metabolic Epoxidation for Drug-like Molecules via Machine Learning Methods. *Molecular Informatics* [online]. 2020, **39(8)**. [cit. 2023-10-12] Dostupné z: doi:10.1002/minf.201900178. ISSN 1868-1743.
- [85] RIETJENS, Ivonne M. C. M., Cathaline DEN BESTEN, Robert P. HANZLIK et al. Cytochrome P450-Catalyzed Oxidation of Halobenzene Derivatives. *Chemical Research in Toxicology* [online]. 1997, **10(6)**, s. 629–635. [cit. 2023-10-12] Dostupné z: doi:10.1021/tx9601061. ISSN 0893-228X.
- [86] VAN DE WIER, B., J.M. BALK, A. BAST, et al. Chemical characteristics for optimizing CYP2E1 inhibition. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2015, **242**, s. 139–144. [cit. 2023-11-12] Dostupné z: doi:10.1016/j.cbi.2015.09.024. ISSN 00092797.
- [87] NEILSON, A. H. The biodegradation of halogenated organic compounds. *Journal of Applied Bacteriology* [online]. 1990, **69(4)**, s. 445–470. [cit. 2024-15-01] Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2672.1990.tb01536.x. ISSN 0021-8847.
- [88] FLEMING, Ingrid, U. Ruth MICHAELIS, Daniel BREDEKÖTTER, et al. Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor Synthase (Cytochrome P450 2C9) Is a Functionally Significant Source of Reactive Oxygen Species in Coronary Arteries. *Circulation Research* [online]. 2001, **88(1)**, s. 44–51. [cit. 2024-16-01] Dostupné z: doi:10.1161/01.RES.88.1.44. ISSN 0009-7330.

- [89] PHILLIPS, I and E SHEPHARD. Flavin-containing monooxygenases: mutations, disease and drug response. *Trends in Pharmacological Sciences* [online]. 2008, **29(6)**, s. 294–301. [cit. 2023-15-01] Dostupné z: doi:10.1016/j.tips.2008.03.004. ISSN 01656147.
- [90] KRUEGER, Sharon K. and David E. WILLIAMS. Mammalian flavin-containing monooxygenases: structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2005, **106(3)**, s. 357–387. [cit. 2024-15-01] Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2005.01.001. ISSN 01637258.
- [91] PIMVIRIYAKUL, Panu and Pimchai CHAIYEN. Flavin-dependent dehalogenases. *The Enzymes* [online]. Vyd. 1, 2020, s. 365–397. [cit. 2024-15-01] Dostupné z: doi:10.1016/bs.enz.2020.05.010. ISBN 9780128201374.
- [92] ZUBOVA, Ekaterina, Adam POKLUDA, Hana DVOŘÁKOVÁ, et al. Exploring the Reactivity of Flavins with Nucleophiles Using a Theoretical and Experimental Approach. *ChemPlusChem* [online]. 2024, **7**, s. 1-2. [cit. 2024-15-01] Dostupné z: doi:10.1002/cplu.202300547. ISSN 2192-6506.
- [93] JOOSTEN, Vivi and Willem JH VAN BERKEL. Flavoenzymes. *Current Opinion in Chemical Biology* [online]. 2007, **11(2)**, s. 195–202. [cit. 2024-15-01] Dostupné z: doi:10.1016/j.cbpa.2007.01.010. ISSN 13675931.
- [94] FURNES, B. Evaluation of Xenobiotic N- and S-Oxidation by Variant Flavin-Containing Monooxygenase 1 (FMO1) Enzymes. *Toxicological Sciences* [online]. 2004, **78(2)**, s. 196–203. [cit. 2024-15-01] Dostupné z: doi:10.1093/toxsci/kfh079. ISSN 1096-0929.
- [95] CASHMAN, John R. and Jun ZHANG. Interindividual Differences of Human Flavin-Containing Monooxygenase 3: Genetic Polymorphisms and Functional Variation. *Drug Metabolism and Disposition* [online]. 2002, **30(10)**, s. 1043–1052. [cit. 2024-15-01] Dostupné z: doi:10.1124/dmd.30.10.1043. ISSN 0090-9556.
- [96] STANLEY, L.A. Drug metabolism. In: *Pharmacognosy* [online]. 2024, s. 597–624. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-443-18657-8.00029-3. ISBN 9780443186578

- [97] PRIMAK, Lara and Jeffrey L. BLUMER. Principles of Drug Disposition in the Critically Ill Child. In: *Pediatric Critical Care* [online]. 2006, s. 1639–1658. Dostupné z: doi:10.1016/B978-032301808-1.50113-9. ISSN 1639-1658.
- [98] SUIKO, Masahito, Katsuhisa KUROGI, Takuyu HASHIGUCHI, et al. Updated perspectives on the cytosolic sulfotransferases (SULTs) and SULT-mediated sulfation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* [online]. 2017, **81(1)**, s. 63–72. [cit. 2024-22-02] Dostupné z: doi:10.1080/09168451.2016.1222266. ISSN 0916-8451.
- [99] BRUSSEAU, M.L., I.L. PEPPER and C.P. GERBA. The Extent of Global Pollution. In: *Environmental and Pollution Science* [online]. 2019, s. 3–8. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814719-1.00001-X. ISBN 9780128147191.
- [100] YANG, Kai, Zhi-Wei FU, Yun-Feng CAO, et al. New insights for risks of chlorophenols (CPs) exposure: Inhibition of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs). *Chemosphere* [online]. 2018, **206**, s. 9–16. [cit. 2024-09-02] Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2018.04.148 ISSN 00456535.
- [101] CHOUINARD, Sarah, Olivier BARBIER and Alain BÉLANGER. UDP-glucuronosyltransferase 2B15 (UGT2B15) and UGT2B17 Enzymes Are Major Determinants of the Androgen Response in Prostate Cancer LNCaP Cells. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2007, **282(46)**, s. 33466–33474. [cit. 2024-09-02] Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M703370200. ISSN 00219258.
- [102] JAYARAJ, Ravindran, Pankajshan MEGHA and Puthur SREEDEV. Review Article. Organochlorine pesticides, their toxic effects on living organisms and their fate in the environment. *Interdisciplinary Toxicology* [online]. 2016, **9(3–4)**, s. 90–100. [cit. 2024-19-02] Dostupné z: doi:10.1515/intox-2016-0012. ISSN 1337-9569.
- [103] ZOOFAGHARI, Shafeajafar, Navid NAMAKIZADEH ESFAHANI, Amirhossein AKHAVAN SIGARI, et al. Uncommon manifestation of poisoning with a mixture of pesticides. *Clinical Case Reports* [online]. 2022, **10(2)**, s. 3. [cit. 2024-19-02] Dostupné z: doi:10.1002/ccr3.5365. ISSN 2050-0904.
- [104] MELOV, Simon, Paul A. ADLARD, Karl MORTEN, et al. Mitochondrial Oxidative Stress Causes Hyperphosphorylation of Tau. *PLoS ONE* [online]. 2007, **2(6)**, s. e536. [cit. 2024-19-02] Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0000536. ISSN 1932-6203.

- [105] MADDALON, Ambra, Arkadiusz PIERZCHALSKI, Jannike Lea KRAUSE, et al. Impact of chemical mixtures from wastewater treatment plant effluents on human immune cell activation: An effect-based analysis. *Science of The Total Environment* [online]. 2024, **906**, s. 167495. [2024-19-02] Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2023.167495. ISSN 00489697.
- [106] SUZUKI, Takafumi, Takanori HIDAKA, Yoshito KUMAGAI, et al. Environmental pollutants and the immune response. *Nature Immunology* [online]. 2020, **21(12)**, s. 1486–1495. [cit. 2023-10-12] Dostupné z: doi:10.1038/s41590-020-0802-6. ISSN 1529-2908.
- [107] MADDALON, Ambra, Mirco MASI, Martina IULINI, et al. Effects of endocrine active contaminating pesticides on RACK1 expression and immunological consequences in THP-1 cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [online]. 2022, **95**, s. 103971. [cit. 2024-19-02] Dostupné z: doi:10.1016/j.etap.2022.103971. ISSN 13826689.
- [108] XIAO, Ruiyang, Lingwei GAO, Zongsu WEI, et al. Mechanistic insight into degradation of endocrine disrupting chemical by hydroxyl radical: An experimental and theoretical approach. *Environmental Pollution* [online]. 2017, **231**, s. 1446–1452. [cit. 2024-04-02] Dostupné z: doi:10.1016/j.envpol.2017.09.006. ISSN 02697491.
- [109] BARZEGAR, Gelavizh, Sahand JORFI, Vahid ZAREZADE, et al. 4-Chlorophenol degradation using ultrasound/peroxymonosulfate/nanoscale zero valent iron: Reusability, identification of degradation intermediates and potential application for real wastewater. *Chemosphere* [online]. 2018, **201**, s. 370–379. [cit. 2024-04-02] Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2018.02.143. ISSN 00456535
- [110] CIMMINO, Ilaria, Francesca FIORY, Giuseppe PERRUOLO, et al. Potential Mechanisms of Bisphenol A (BPA) Contributing to Human Disease. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21(16)**, s. 5761. [cit. 2024-04-02] Dostupné z: doi:10.3390/ijms21165761. ISSN 1422-0067.
- [111] HUGO DEL RIO ARAIZA, Victor. Bisphenol A, an endocrine-disruptor compound, that modulates the immune response to infections. *Frontiers in Bioscience* [online]. 2021, **26(2)**, s. 4897. [cit. 2024-20-02] Dostupné z: doi:10.2741/4897. ISSN 10939946.

- [112] YU, Chang, Chi WANG, Zhengbiao LU, et al. The endocrine-disrupting potential of four chlorophenols by in vitro and in silico assay. *Chemosphere* [online]. 2019, **218**, s. 941–947. [cit. 2024-20-02] Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2018.11.199. ISSN 00456535.
- [113] KUIPER, George G. J. M., Josephine G. LEMMEN, Bo CARLSSON, J. et al. Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor β . *Endocrinology* [online]. 1998, **139(10)**, s. 4252–4263. [cit. 2024-21-02] Dostupné z: doi:10.1210/endo.139.10.6216 ISSN 0013-7227.
- [114] QUINTANA, M.C. and L. RAMOS. Sample preparation for the determination of chlorophenols. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2008, **27(5)**, s. 418–436. [cit. 2023-03-10] Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2008.03.009. ISSN 01659936.
- [115] PASUPULETI, Raghavendra Rao, Zih-Fang WANG, Wei-Jyun YA, et al. Extraction and detection of chlorophenols in water samples using deep eutectic solvent-based dispersive liquid–liquid microextraction coupled with HPLC-UV. *Microchemical Journal* [online]. 2022, **182**, s. 107843. [cit. 2023-03-10] Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2022.107843. ISSN 0026265X.
- [116] AYDIN, Dilan Camille, Julian ZAMUDIO PINERES, Fatma AL-MANJI, et al. Direct analysis of aromatic pollutants using a HPLC-FLD/DAD method for monitoring biodegradation processes. *Analytical Methods* [online]. 2021, **13(13)**, s. 1635–1642. [cit. 2024-26-02] Dostupné z: doi:10.1039/D1AY00083G. ISSN 1759-9660.
- [117] HUANG, Yujuan, Jing WEI, Jing SONG, et al. Determination of low levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by high performance liquid chromatography with tandem fluorescence and diode-array detectors. *Chemosphere* [online]. 2013, **92(8)**, s. 1010–1016. [cit. 2024-26-02] Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2013.03.035. ISSN 00456535.
- [118] KABIR, Abuzar and Kenneth G. FURTON. Applications of gas chromatography in forensic science. In: *Gas Chromatography* [online]. Vyd. 2, 2021, s. 745–791. [cit. 2024-05-03] Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-820675-1.00019-8. ISBN 9780128206751

- [119] D. PATIL, Harshal, Chandrabhan B PATIL, Vikas V. PATIL, et al. A Brief Review on Gas Chromatography. *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis* [online]. 2023, **13**, s. 47–52. Dostupné z: doi:10.52711/2231-5675.2023.00008. ISSN 2231-5675.
- [120] EVERS, Richard. Development of a Liquid Chromatography Ion Trap Mass Spectrometer Method for Clinical Drugs of Abuse Testing with Automated On-Line Extraction Using Turbulent Flow Chromatography. *School of Pharmacy and Biomedical Sciences* [online]. 2014, 151. [cit. 2024-04-03] Dostupné z: doi:10.13140/2.1.2125.1367
- [121] GRUBER, Beate, Frank DAVID a Pat SANDRA. Capillary gas chromatography-mass spectrometry: Current trends and perspectives. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2020, **124**, s. 115475. [cit. 2024-0503] Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2019.04.007. ISSN 01659936.
- [122] SARAJI, Mohammad, Hoda GHAMBARI. Suitability of dispersive liquid–liquid microextraction for the in situ silylation of chlorophenols in water samples before gas chromatography with mass spectrometry. *Analytical Science* [online]. 2015, **38**, s. 3552-3559. [cit. 2024-05-03] Dostupné z: doi: 10.1002/jssc.201500556
- [123] HE, Zilan, Baiquan CHEN, Daopin CHEN, et al. Research progress on gas chromatography columns. Wei TAO, Hailang PAN a Baoli YAO, ed. *International Conference on Precision Instruments and Optical Engineering (PIOE 2023)* [online]. 2023, s. 20. [cit. 2024-05-03] Dostupné z: doi:10.1117/12.3011043. ISBN 9781510671201.
- [124] FRANCHINA, Flavio A., Delphine ZANELLA, Lena M. DUBOIS, et al. The role of sample preparation in multidimensional gas chromatographic separations for non-targeted analysis with the focus on recent biomedical, food, and plant applications. *Journal of Separation Science* [online]. 2021, **44(1)**, s. 188–210. [cit. 2024-05-03] Dostupné z: doi:10.1002/jssc.202000855. ISSN 1615-9306.
- [125] ABDU HUSSEN, Ali. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): A review. *Annals of Advances in Chemistry* [online]. 2022, **6(1)**, s. 010–020. [cit. 2024-06-03] Dostupné z: doi:10.29328/journal.aac.1001026. ISSN 25763768.

- [126] KANU, A Bakarr. Recent developments in sample preparation techniques combined with high-performance liquid chromatography: A critical review. *Journal of Chromatography A* [online]. 2021, **1654**, s. 462444. [cit. 2024-06-03] Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2021.462444. ISSN 00219673.
- [127] IDEX Health & Science. HPLC Help Center. *Intelligent Solutions for Life* [online]. 2024. Dostupné z: <https://www.idex-hs.com/resources/resources-detail/hplc-center>
- [128] ŽUVELA, Petar, Magdalena SKOCZYLAS, J. JAY LIU, et al. Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Chemical Reviews* [online]. 2019, **119(6)**, s. 3674–3729. [cit. 2024-06-03] Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.8b00246. ISSN 0009-2665.
- [129] LOZANO-SÁNCHEZ, Jesús, Isabel BORRÁS-LINARES, Agnes SASS-KISS, et al. Chromatographic Technique: High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Modern Techniques for Food Authentication* [online]. Vyd. 2, 2018, s. 459–526. [cit. 2024-06-03] Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814264-6.00013-X. ISBN 9780128142646.
- [130] DEN UIJL, Mimi J., Peter J. SCHOENMAKERS, Bob W.J. PIROK, et al. Recent applications of retention modelling in liquid chromatography. *Journal of Separation Science* [online]. 2021, **44(1)**, s. 88–114. [cit. 2024-06-02] Dostupné z: doi:10.1002/jssc.202000905. ISSN 1615-9306.
- [131] JÍŠOVÁ, Tereza. Chlorfenoly v životním prostředí. Praha, 2015, 100 s. Bakalářská práce, Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta. Vedoucí práce Prof. RNDr. Eva Tesařová, CSc.
- [132] Yu. A. Andreev and M. S. Chernov'yants. Gas Chromatography Determination of Polychlorophenols after Derivatization with Monochloroacetic Anhydride. *Journal of Analytical Chemistry* [online]. 2012, **65(10)**, s. 1046–1052. [cit. 2024-14-04] Dostupné z: doi: 10.1134/S1061934810100060. ISSN 1061-9348
- [133] FARAJZADEH, Mir Ali, Mahdi KHEIRKHAH GHALEH, Sakha PEZHANFAR, et al. In-situ derivatisation, extraction, and preconcentration of some phenolic compounds from water and wastewater samples through cold-induced homogenous liquid-liquid extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction.

- International Journal of Environmental Analytical Chemistry* [online]. 2023, s. 1–20. [cit. 2024-14-04] Dostupné z: doi:10.1080/03067319.2023.2296592. ISSN 0306-7319.
- [134] JOHNSEN, Lea G., Peter B. SKOU, Bekzod KHAKIMOV, et al Gas chromatography – mass spectrometry data processing made easy. *Journal of Chromatography A* [online]. 2017, **1503**, s. 57–64. [cit. 2024-08-03] Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2017.04.052. ISSN 00219673.
- [135] RUIZ-MATUTE, A.I., S. RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, M.L. SANZ and A.C. SORIA. Chromatographic Technique: Gas Chromatography (GC). *Modern Techniques for Food Authentication* [online]. 2018, s. 415–458. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-814264-6.00012-8. ISBN 9780128142646
- [136] POOLE, Colin F. Ionization-based detectors for gas chromatography. *Journal of Chromatography A* [online]. 2015, **1421**, s. 137–153. [cit. 2024-06-03] Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2015.02.061. ISSN 00219673.
- [137] POOLE, Colin F. Conventional detectors for gas chromatography. *Gas Chromatography* [online]. 2021, s. 343–369. [cit. 2024-06-03] Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-820675-1.00001-0. ISBN 9780128206751.
- [138] MARTYR, A.J. and M.A. PLINT. Engine Exhaust Emissions. *Engine Testing* [online]. Vyd. 4, 2012, s. 407–450. [cit. 2024-06-03] Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-08-096949-7.00016-9. ISBN 9780080969497
- [139] BI, Chenyang, Jordan E. KRECHMER, Graham O. FRAZIER, et al. Coupling a gas chromatograph simultaneously to a flame ionization detector and chemical ionization mass spectrometer for isomer-resolved measurements of particle-phase organic compounds. *Atmospheric Measurement Techniques* [online]. 2021, **14(5)**, s. 3895–3907. [cit. 2024-06.03] Dostupné z: doi:10.5194/amt-14-3895-2021. ISSN 1867-8548.
- [140] TRANCHIDA, Peter Q. and Luigi MONDELLO. Detectors and basic data analysis. *Separation Science and Technology* [online]. 2020, **12**, s. 205–227. [cit. 2024-08-03] Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-813745-1.00006-4. ISSN 1877-1718
- [141] GANDHI, Kamal, Neelima SHARMA, Priyae Brath GAUTAM, et al. Chromatography. *Advanced Analytical Techniques in Dairy Chemistry* [online]. 2022, s. 11–83. [cit. 2024-06-03] Dostupné z: doi:10.1007/978-1-0716-1940-7_2. ISBN 978-1-0716-1940-7.

- [142] FEIDER, Clara L., Anna KRIEGER, Rachel J. DEHOOG, et al. Ambient Ionization Mass Spectrometry: Recent Developments and Applications. *Analytical Chemistry* [online]. 2019, **91(7)**, s. 4266–4290. [cit. 2024-08-03] Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.9b00807. ISSN 0003-2700.
- [143] HITES, Ronald A. Development of Gas Chromatographic Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* [online]. 2016, **88(14)**, s. 6955–6961. [cit. 2024-08-03] Dostupné z: doi:10.1021/acs.analchem.6b01628. ISSN 0003-2700.
- [144] BODZON-KULAKOWSKA, Anna and Piotr SUDER. Imaging mass spectrometry: Instrumentation, applications, and combination with other visualization techniques. *Mass Spectrometry Reviews* [online]. 2016, **35(1)**, s. 147–169. [cit. 2024-08-03] Dostupné z: doi:10.1002/mas.21468. ISSN 0277-7037.
- [145] KARL K. IRIKURA. Mass spectrometry separates fragmented molecules on the basis of mass and charge. *National institute of standards and technology* [online]. 2023. Dostupné z: <https://www.nist.gov/programs-projects/theoretical-mass-spectrometry>
- [146] LI, Dandan, Jia YI, Guobin HAN a Liang QIAO. MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Analysis and Research. *ACS Measurement Science Au* [online]. 2022, **2(5)**, s. 385–404. [cit. 2024-08-03] Dostupné z: doi:10.1021/acsmeasuresciau.2c00019. ISSN 2694-250X.
- [147] SINGHAL, Neelja, Manish KUMAR, Pawan K. KANAUIA, et al. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2015, **6**. [cit. 2024-08-03] Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2015.00791. ISSN 1664-302X.
- [148] VINAIXA, Maria, Emma L. SCHYMANSKI, Steffen NEUMANN, et al. Mass spectral databases for LC/MS- and GC/MS-based metabolomics: State of the field and future prospects. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* [online]. 2016, **78**, s. 23–35. [cit. 2024-11-03] Dostupné z: doi:10.1016/j.trac.2015.09.005. ISSN 01659936.
- [149] KOVÁCS, Ágnes, Anikó KENDE, Gábor VOLK, et al. Determination of phenols and chlorophenols as trimethylsilyl derivatives using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* [online]. 2008, **1194**, s. 139-142 [cit. 2024-11-03] Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2008.04.043.

- [150] Farajzadeh M. A., Khiavi E. B. and Feriduni B. Determination of phenolic compounds in industrial wastewaters by gas chromatography after extraction and preconcentration by microextraction procedure. *GlobalNEST* [online]. 2020, **22(1)**, s. 109-118 [cit. 2024-11-03] Dostupné z: doi:10.30955/gnj.002875.
- [151] KHAFI, Michael, Afshin JAVADI a Mohammad R. A. MOGADDAM. Combination of three-phase extraction with deep eutectic solvent-based dispersive liquid–liquid microextraction for the extraction of some antibiotics from egg samples prior to HPLC-DAD. *Microchemical Journal* [online]. 2023, **190**, s. 108652. [cit. 2024-11-03] Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2023.108652. ISSN 0026265X.
- [152] DEMEESTERE, Kristof, Jo DEWULF, Bavo DE WITTE, et al. Sample preparation for the analysis of volatile organic compounds in air and water matrices. *Journal of Chromatography A* [online]. 2007, **1153(1–2)**, s. 130–144. [cit. 2024-11-03] Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2007.01.012. ISSN 00219673.
- [153] BRINDA LAKSHMI, A., A. BALASUBRAMANIAN and S. VENKATESAN. Extraction of Phenol and Chlorophenols Using Ionic Liquid [Bmim] + [BF₄] – Dissolved in Tributyl Phosphate. *CLEAN – Soil, Air, Water* [online]. 2013, **41(4)**, s. 349–355. [cit. 2024-11-03] Dostupné z: doi:10.1002/clen.201100632. ISSN 1863-0650.
- [154] SAFAVI, Afsaneh, Raheleh AHMADI a Amir M. RAMEZANI. Vortex-assisted liquid–liquid microextraction based on hydrophobic deep eutectic solvent for determination of malondialdehyde and formaldehyde by HPLC-UV approach. *Microchemical Journal* [online]. 2018, **143**, s. 166–174. [cit. 2024-11-03] Dostupné z: doi:10.1016/j.microc.2018.07.036. ISSN 0026265X.
- [155] PAWLISZYN, Janusz. Solid Phase Microextraction. *Advances in Experimental Medicine and Biology* [online]. 2001, **488**, s. 73–87. [2023-08-10] Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4615-1247-9_6
- [156] KOVÁCS, Ágnes, Mária MÖRTL, Anikó KENDE. Development and optimization of a method for the analysis of phenols and chlorophenols from aqueous samples by gas chromatography–mass spectrometry, after solid-phase extraction and trimethylsilylation. *Microchemical Journal* [online]. 2011, **99**, s. 125-131. [cit. 2024-14-03] Dostupné z: doi: 10.1016/j.microc.2011.04.007. ISSN 0026-265X.

- [157] OUYANG, Gangfeng. Calibration. *Handbook of Solid Phase Microextraction* [online]. 2012, s. 167–199. [cit. 2023-08-10] Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-416017-0.00006-1
- [158] DE MORAIS, Paulo, Teodor STOICHEV, M. Clara P. BASTO, et al. A headspace SPME-GC-ECD method suitable for determination of chlorophenols in water samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2011, **399(7)**, s. 2531–2538. [cit. 2023-07-10] Dostupné z: doi:10.1007/s00216-010-4610-y. ISSN 1618-2642.
- [159] KOLB, Bruno a Leslie S. ETTRE. *Static Headspace–Gas Chromatography* [online]. 2006, **349(7)**, s. 271-277. [cit. 2023-07-10] Dostupné z: doi:10.1002/0471914584. ISBN 9780471749448.
- [160] ATAPATTU, Sanka N. Pollutant analysis applications of solid-phase analytical derivatizations. *Journal of Chromatography Open* [online]. 2023, **3**, s. 100080. [cit. 2024-19-03] Dostupné z: doi:10.1016/j.jcoa.2023.100080. ISSN 27723917.
- [161] AGILENT. Headspace sampling fundamentals, what is headspace. *Agilent Technologies, Inc.* [online]. 2023. [cit. 2023-07-10] Dostupné z: <https://www.agilent.com/en/product/gas-chromatography/gc-sample-preparation-introduction/what-is-headspace>
- [162] PLEBNOVÁ Magdaléna. Komplexní analýza fenolických a aromatických látek obsažených v černém bezu. 2012, 114 s. Univerzita Pardubice, Fakulta Chemicko-technologická. Vedoucí práce doc. Ing. Lenka Česlová, Ph.D.
- [163] WOJNOWSKI, Wojciech, Tomasz MAJCHRZAK, Tomasz DYMERSKI, et al. Dynamic Headspace Sampling as an Initial Step for Sample Preparation in Chromatographic Analysis. *Journal of AOAC International* [online]. 2017, **100(6)**, s. 1599–1606. [cit. 2023-07-10] Dostupné z: doi:10.5740/jaoacint.17-0206. ISSN 1060-3271.