

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

**ANALÝZA VYBRANÝCH BROMOVANÝCH FENOLŮ POMOCÍ  
ON-LINE SPOJENÍ KAPILÁRNÍ IZOTACHOFORÉZY  
S KAPILÁRNÍ ZÓNOVOU ELEKTROFORÉZOU**

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Autor: Mgr. Radim Knob  
Obor: Analytická chemie

Konzultant: doc. Vítězslav Maier, Ph.D.

**Olomouc 2012**

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA ANALYTICKÉ CHEMIE

**ANALÝZA VYBRANÝCH BROMOVANÝCH FENOLŮ POMOCÍ  
ON-LINE SPOJENÍ KAPILÁRNÍ IZOTACHOFORÉZY  
S KAPILÁRNÍ ZÓNOVOU ELEKTROFORÉZOU**

RIGORÓZNÍ PRÁCE

Autor: Mgr. Radim Knob  
Obor: Analytická chemie  
Konzultant: doc. Vítězslav Maier, Ph.D.

**Olomouc 2012**

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne .....

.....  
podpis

## SHRNUTÍ

Rigorózní práce se zabývá analýzou vybraných bromovaných fenolů ve vzorcích říčních vod pomocí on-line spojení kapilární izotachoforézy a kapilární elektroforézy.

V teoretické části je podán přehled významu a vlastností bromovaných fenolů jako zpomalovačů hoření spolu s postupy pro úpravu vzorku a technikami používanými pro jejich stanovení v různých materiálech, složkách životního prostředí, tělních tekutinách či tkáních. Další část je věnována spojení kapilární izotachoforézy a kapilární elektroforézy, je popsán jejich separační princip a aspekty on-line spojení.

Praktická část se věnuje popisu vyvinuté metody pro analýzu vybraných bromovaných fenolů (3,3',5,5'-tetrabromobisfenol A, 2-bromfenol, 3-bromfenol, 4-bromfenol, 2,4-dibromfenol, 2,6-dibromfenol, 2,4,6-tribromfenol, pentabromfenol, 4-brom-3-methylfenol) pomocí spojení kapilární izotachoforézy ve spojení s kapilární elektroforézou se spektrofotometrickou detekcí. Důraz byl kladen na nalezení vhodného elektrolytového systému umožňující on-line prekoncentraci kapilární elektroforézou a následně separaci analytů pomocí kapilární elektroforézy. Pro zabránění adsorpce analytů na povrch separačních kapilár a zlepšení návratností byl studován přídavek kyseliny naftalen-1,3,6-trisulfonové. Vyvinutá metoda byla použita pro analýzu vybraných bromovaných fenolů ve vzorcích říčních vod.

## ABSTRACT

The rigorous thesis deals with an analysis of selected brominated phenols in river water samples by on-line coupled capillary isotachopheresis and capillary electrophoresis.

In the theoretical part, the survey on importance and properties of the brominated phenols used as flame retardants is given together with sample preparation processes and analytical techniques used for their determination in materials, environmental samples, or body fluids and tissues. The next part deals with the coupling of capillary isotachopheresis and capillary electrophoresis, the separation mechanism and aspects of the hyphenation is described.

In the experimental part describes the development of the method for analysis of the selected brominated phenols (3,3',5,5'-tetrabromobisphenol A, 2-bromophenol, 3-bromophenol, 4-bromophenol, 2,4-dibromophenol, 2,6-dibromophenol, 2,4,6-tribromophenol, pentabromophenol, 4-bromo-3-methylphenol) utilizing the on-line coupled capillary isotachopheresis and capillary electrophoresis with spectrophotometric detection. A major effort was put into finding a suitable background electrolyte system to allow on-line preconcentration by capillary isotachopheresis followed by separation by capillary electrophoresis. An addition of naphthalene-1,3,6- trisulfonic acid was studied in order to prevent of analyte adsorption on the capillary surface and to improve recoveries. The developed method was applied on the analysis of the selected brominated phenols in river water samples.

# OBSAH

1. Úvod.....	7
2. Teoretická část .....	8
2.1 Bromované zpomalovače hoření.....	8
2.2 Analýza bromovaných zpomalovačů hoření.....	10
2.2.1 Úprava vzorků.....	10
2.2.2 Analytické techniky stanovení BZH.....	10
2.2.3 Výskyt bromovaných zpomalovačů hoření .....	11
2.3 Kapilární elektroforéza .....	13
2.3.1 Kapilární zónová elektroforéza.....	13
2.3.2 Izotachoforéza.....	13
2.3.4 Hydrodynamicky uzavřený systém.....	15
2.3.5 Detektory pro izotachoforézu .....	16
2.3.6 Spojení izotachoforézy a kapilární zónové elektroforézy.....	17
3. Praktická část .....	20
3.1 Instrumentace.....	20
3.2 Chemikálie .....	20
3.3 Postupy.....	21
4. Výsledky a diskuze .....	22
4.1 Separace vybraných bromovaných fenolů .....	22
4.1.1 Výběr elektrolytového systému .....	22
4.1.2 Kalibrace .....	25
4.1.3 Opakovatelnosti .....	26
4.2 Analýza vzorků vod .....	28
4.2.2 návratnosti .....	30
5. Závěr .....	32
6. Seznam použitých zkratk .....	33
7. Literatura.....	34
8. Přílohy.....	39
8.1 Příloha I.....	39

# 1. Úvod

Bromované fenoly jsou široce používanou skupinou látek využívaných jako zpomalovače hoření. Díky velké výrobě a použití v nejrůznějších produktech v posledních desetiletích byly celosvětově rozšířeny a představují látky nebezpečné pro životní prostředí pro svou toxicitu a vysokou schopnost bioakumulace.

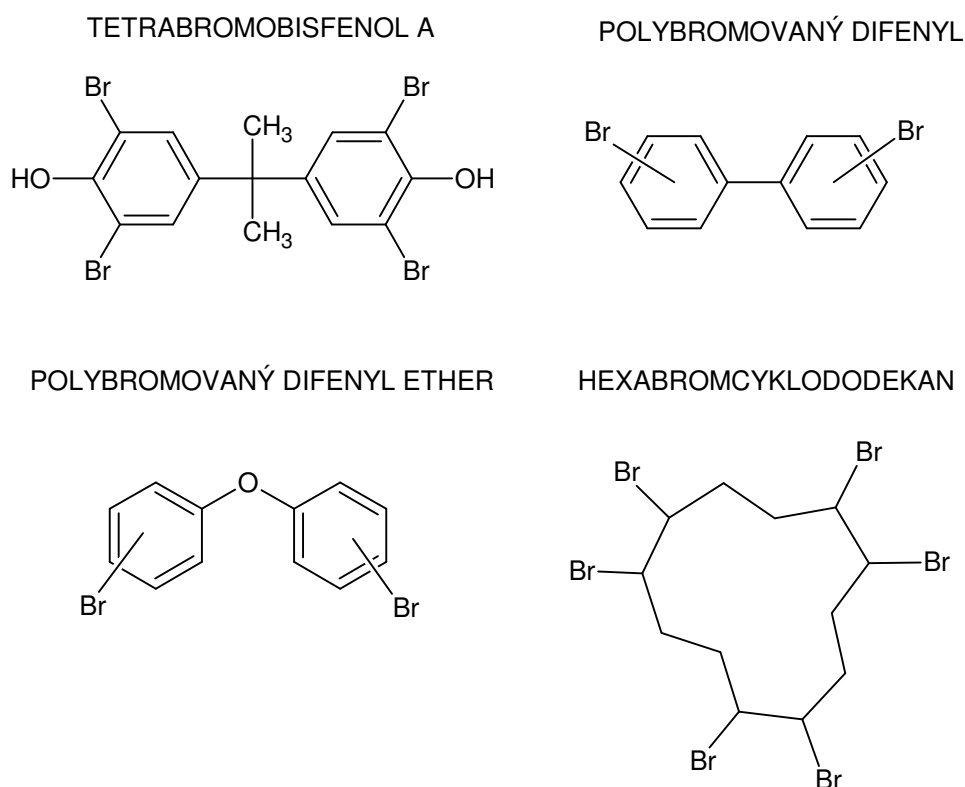
Pro monitoring jejich přítomnosti v různorodých složkách životního prostředí bylo vyvinuto množství metod. Kapalinová a plynová chromatografie jsou nejčastěji využívané techniky pro analýzu těchto látek. Před samotnou analýzou však bývá nutná úprava vzorku, což prodlužuje dobu analýzy a také zvyšuje její náklady.

Tato práce se zabývá analýzou vybraných bromovaných fenolů (3,3',5,5'-tetrabromobisfenol A, 2-bromfenol, 3-bromfenol, 4-bromfenol, 2,4-dibromfenol, 2,6-dibromfenol, 2,4,6-tribromfenol, pentabromfenol, 4-brom-3-methylfenol) ve vzorcích vod pomocí on-line spojení izotachoforézy a kapilární zónové elektroforézy (ITP-CZE). Tato technika se vyznačuje možností on-line prekoncentrace analytů z většího objemu vzorku pomocí izotachoforézy a následně vybrané složky vzorku separovat pomocí odlišného mechanismu zónové elektroforézy. Toto spojení může výrazně zjednodušit nutnost úpravy vzorku a zároveň dovoluje stanovení i stopových množství látek, což bývá obtížně dosažitelné pomocí samotné kapilární zónové elektroforézy.

## 2. Teoretická část

### 2.1 Bromované zpomalovače hoření

Bromované zpomalovače hoření (BZH) jsou strukturně rozmanitou skupinou látek používaných v komerčních výrobcích pro snížení hořlavosti syntetických polymerů. Mezi nejčastěji používané BZH patří tetrabrombisfenol A (TBBPA), polybromované difenyletery, polybromované bifenyly, bromované fenoly a hexabromcyklododekan<sup>1,2</sup>. Jejich struktury jsou znázorněny na Obr. 1. Tyto látky se používají buď jako aditiva do těchto materiálů (např. do polystyrenu<sup>1</sup>), nebo mohou být kovalentně vázány přímo v polymerní matici (např. epoxy, polykarbonátové a fenolické pryskyřice<sup>3</sup>). Vyznačují se tepelnou stabilitou obdobnou vlastnostem polymerní matrice, při zahřátí se rozkládají na produkty zpomalující či inhibující proces hoření<sup>4</sup>.



Obr. 1. Struktury nejčastěji používaných bromovaných zpomalovačů hoření.



Takto modifikované materiály nacházejí široké uplatnění zejména v obalech elektrotechniky (televize, monitory, telefony apod.), v plošných spojích, nábytku, textiliích, potrubí či konstrukčních materiálech<sup>1,5</sup>. TBBPA je v dnešní době nejvíce nasazovaným BZP, pokrývá přibližně 60% aplikací BZH<sup>6</sup>. V roce 2004 bylo celosvětově vyrobené množství odhadováno na cca 170 000 tun (cit<sup>5</sup>), TBBPA v produktech se obvykle nachází v koncentracích 10-20% (cit<sup>5</sup>) a postupně nahrazuje jiné BZP jako hexabromocyklohexan a polybromované difenylethery, které se snadněji uvolňují z polymerních matric a jejichž používání je proto zakazováno<sup>7,8</sup>. 2,4,6-tribromfenol se také využívá jako pesticid nahrazující 2,4,6-trichlorfenol užívaný pro ochranu dřeva<sup>9</sup>.

Z toxikologických studií TBPPA<sup>10,11</sup> vyplývá, že jeho akutní toxicita není vysoká, ale akumuluje se v potravinovém řetězci, zejména ve vodních organismech, a může negativně ovlivňovat endokrinní systém díky strukturální podobnosti k hormonu tyroxinu. Ogunbayo<sup>12</sup> studoval působení TBBPA na fosfolipidovou dvojvrstvu a zjistil, že se váže na membránu a ovlivňuje její vlastnosti, například že zvýšení viskozity membrány má za následek zpomalení biologických procesů.

TBBPA může být uvolňován do životního prostředí jednak tepelně<sup>13</sup> nebo pomocí UV záření degradován na nižší bromované fenoly jako pentabromofenol, 2,4,6-tribromfenol, 2,4-dibromfenol, 2,6-dibromfenol a 2-bromfenol<sup>14</sup>. Tyto BZH jsou především vyráběny průmyslově, ale některé deriváty jsou také v nízkých koncentracích tvořeny některými mořskými organismy a řasami<sup>15</sup>. Jejich přítomnost i ve velmi malé koncentraci má vliv na charakteristickou vůni a chuť jídel z mořské fauny a flory, např. u 2,6-dibromfenolu je tento chuťový práh 0,5 ng.L<sup>-1</sup> (cit<sup>16</sup>). Mohou také sloužit jako ochrana proti predátorům<sup>17</sup>.

Pro rizika je žádoucí monitorovat hladiny BZH ve složkách životního prostředí, a případně tak zabránit využívání kontaminovaných vodních zdrojů, půdy a potravin.

## 2.2 Analýza bromovaných zpomalovačů hoření

### 2.2.1 Úprava vzorků

Úprava vzorků obsahující BZH a použitá analytická technika závisí na složitosti dané matrice a na množství stanovaných látek.

Pro stanovení BZH v ovzduší jsou využívána skelná vlákna vystavená sledovanému prostředí, následně jsou extrahována methanolem<sup>18</sup>. Na vzorky vod je nejčastěji využívána extrakce tuhou fází (solid phase extraction, SPE) se stacionární fází na bázi kopolymeru methakrylátu a divinylbenzenu<sup>19</sup> nebo silikagelu modifikovaném oktadecylem<sup>20</sup>, případně mikroextrakce tuhou fází (solid phase microextraction, SPME) na vlákne pokrytém polydimethylsiloxanem<sup>21</sup>. Pro analýzu TBBPA v říční vodě byla také využita selektivní extrakce polymerem s molekulárním otiskem<sup>22</sup>.

Vzorky půd a sedimentů jsou extrahovány Soxhletovou extrakcí směsí aceton-hexan<sup>23</sup>. Superkritická fluidní extrakce CO<sub>2</sub> s toluenem<sup>24</sup> a sonifikace v isopropanolu<sup>25</sup> jsou používány pro analýzu polymerních produktů.

Úprava vzorků tělních tekutin nečastěji využívá SPE<sup>26</sup>, případně extrakce kapalina-kapalina do ethylacetátu<sup>27</sup> nebo acetonitrilu<sup>28</sup>. Soxhletova extrakce je využívána pro extrakci tkání<sup>5</sup>. Může být také využita destilace s vodní parou<sup>29</sup>.

Lopéz<sup>30</sup> porovnal více extrakčních technik: SPE, SPME, extrakci kapalina-kapalina a headspace extrakce pro analýzu bromovaných fenolů a zjistil, že SPE využívající reverzní fází na bázi kopolymeru polystyrenu-divinylbenzenu podávala nejlepší výsledky pro následnou analýzu pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS).

### 2.2.2 Analytické techniky stanovení BZH

Pro stanovení BZH je nejčastěji využíváno separačních technik, byla ovšem také vyvinuta metoda využívající radiofrekvenčního doutnavého výboje ve spojení s optickou emisní spektrometrií (rf-GD-OES)<sup>31</sup> pro rychlé stanovení obsahu bromu v polymerních matricích s limitem detekce 0,044 % bromu.

Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (GC-MS) je nejčastěji využívána pro analýzu BZH ve vzorcích životního prostředí<sup>30,32</sup>. Polární a méně

těkvavé analyty je nutné před analýzou derivatizovat<sup>33</sup>. BZH je možné také detektovat pomocí detektoru elektronového záchyty (ECD)<sup>34</sup>. Při spojení s vhodnou extrakční technikou lze dosáhnout detekčních limitů v řádu desetin  $\text{ng.L}^{-1}$  (cit<sup>31</sup>).

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC) byla využita pro analýzu BZH jak s UV detekcí<sup>29,30</sup> s detekčními limity v řádu desítek  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , tak ve spojení s hmotnostní spektrometrií<sup>19,22,36,37</sup>. Tyto metody vykazují detekční limity BZH v řádu  $\text{ng.L}^{-1}$  podle nasazeného hmotnostního analyzátoru, případně extrakční techniky. Tollbäck<sup>38</sup> porovnal detekční limity dosažené ionizací elektrosprejem a chemickou ionizací za atmosférického tlaku a zjistil, že pomocí elektrospreje lze dosáhnout 30 – 40x nižší detekční limity. Pro ionizaci těchto látek lze využít i fotoionizaci za atmosférického tlaku<sup>39</sup>. Frederiksen<sup>40</sup> porovnal metody stanovení TBBPA pomocí GC-MS a LC-MS/MS ve vzorcích tkání, lepších výsledků dosáhl pomocí LC-MS/MS, jelikož nebylo nutné TBBPA derivatizovat.

Blanco využil kapilární zónovou elektroforézu s UV detekcí jak ve vodných, tak nevodných elektrolytech pro analýzu vybraných bromovaných fenolů a TBBPA<sup>41,42</sup>. S využitím on-line zakoncentrování ve vodném prostředí bylo dosaženo detekčních limitů v řádu desítek  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Pokud byl použit methanol jako rozpouštědlo elektrolytu a vzorků, detekční limity byly desetkrát nižší. Pro analýzu reálných vzorků však bylo nutné snížit dávkovaný objem vzorku. Pro separaci BZH byla také využita micelární elektrokinetická chromatografie<sup>43</sup>, zároveň byla studována možnost on-line prekoncentrace pomocí přechodného pH rozhraní, sweepingu a prekoncentrace pomocí změny polaritý napětí během analýzy.

### 2.2.3 Výskyt bromovaných zpomalovačů hoření

Díky velké produkci během posledních desetiletí se BZH dnes nacházejí v mnoha složkách životního prostředí.

Těkvavé BZH se mohou šířit pomocí atmosféry, např. v severním Německu byla zjištěna přítomnost TBBPA v ovzduší v rozmezí od 0,04 do 0,85  $\text{pg.m}^{-3}$  (cit<sup>44</sup>). V případě uzavřených prostor, například v kancelářích, domácnostech a provozech pro recyklaci elektrospotřebičů byly nalezené koncentrace mnohem větší, řádově v desítkách  $\text{pg.m}^{-3}$  až jednotkách  $\text{ng.m}^{-3}$  (cit<sup>45</sup>). Studiemi zabývající se množstvím BZH v prachu

v domácnostech bylo zjištěno, že obsahuje především polybromované difenylethery a hexabromcyklododekan, zatímco TBBPA je zastoupen v mnohem menší míře<sup>46,47</sup>.

Lopéz<sup>30</sup> sledoval koncentrace dibromovaných fenolů v říční vodě v Nizozemí a našel 2,4-dibromfenol o koncentraci 10 ng.L<sup>-1</sup>. Množství TBBPA bylo sledováno v odpadní vodě před a za čistírnou odpadních vod v Japonsku, byly nalezeny koncentrace 130 ng.L<sup>-1</sup>, respektive 7 ng.L<sup>-1</sup> (cit<sup>19</sup>). V odpadních kalcích se nachází v množství řádově jednotek až stovek ng.g<sup>-1</sup> celosvětově<sup>5</sup>. Přítomnost BZH byla zjištěna také v půdě nedaleko továren produkujících tyto látky<sup>48</sup> nebo u skládek odpadů<sup>49</sup>.

Kontaminace povrchových vod a moří v průmyslových oblastech má za následek akumulaci BZH ve vodních organismech a rostlinách. TBBPA byl nalezen v množství 1 až 100 ng.g<sup>-1</sup> ve vzorcích bezobratlých živočichů odebraných v ústí německých řek a Severního moře<sup>5</sup>. Řádově jednotky ng.g<sup>-1</sup> byly nalezeny v rybách jak v Evropě, tak v USA<sup>5,19</sup>. BZH byly nalezeny jak ve fauně, tak flóře Arktidy<sup>50</sup> v rozmezí jednotek až stovek ng.g<sup>-1</sup> podle druhu zkoumané tkáně a oblasti. Na základě těchto údajů se předpokládá, že většina BZH může být transportována i na velmi velké vzdálenosti atmosférou.

2,4,6-tribromfenol byl nalezen v lidské krvi<sup>51</sup> a mateřském mléce<sup>52</sup>. Koncentrace TBBPA v séru populace se může velmi lišit podle lokality. Zatímco v Norsku byla nalezená koncentrace od 0,34 do 0,71 ng.g<sup>-1</sup> (cit<sup>53</sup>), v Japonsku bylo nalezeno 1,35 ng.g<sup>-1</sup> (cit<sup>54</sup>). U populace více vystavené materiálům s obsahem TBBPA, např. u počítačových techniků či pracovníků třídících elektrotechnický odpad, bylo nalezeno až 4 ng.g<sup>-1</sup> (cit<sup>55</sup>).

## 2.3 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (capillary electrophoresis, CE) představuje analytickou separační techniku využívanou pro separaci především ionogenních, ale také neutrálních látek na základě rozdílné migrace ve stejnosměrném elektrickém poli. Separace probíhá v kapiláře o vnitřním průměru nejčastěji od 25 do 75  $\mu\text{m}$  a je vyplněna elektrolytem.

Kapilární elektroforéza zahrnuje skupinu technik lišící se uspořádáním a vlastnostmi elektrolytového separačního systému: kapilární zónová elektroforéza (CZE), izotachoforéza (ITP), micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) a isoelektrická fokusace (IEF). Tato práce se týká spojení CZE-ITP, které bude dále popsáno.

### 2.3.1 Kapilární zónová elektroforéza

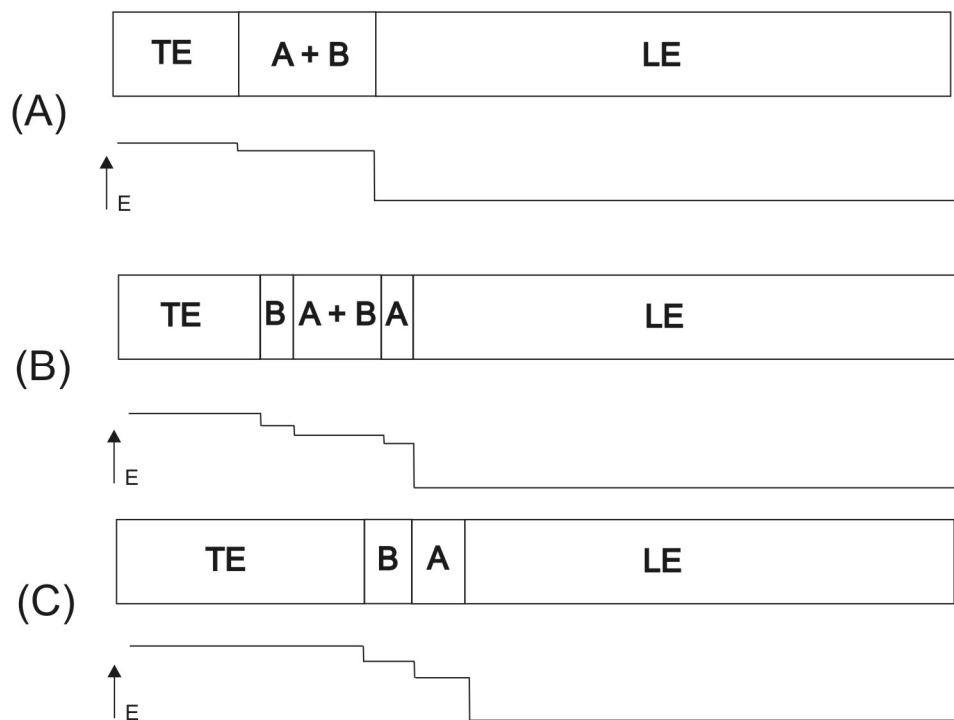
V CZE je celý objem kapiláry a elektrolytových nádobek vyplněn elektrolytem, jehož složení a vlastnosti jsou v celém systému stejné. Po nadávkování vzorku a vložení elektrického pole se složky vzorku pohybují rychlostí danou elektroforetickou mobilitou látky a intenzitou vloženého elektrického pole podle rovnice 1:

$$v = \mu \cdot E \tag{1}$$

kde  $\mu$  představuje elektroforetickou mobilitu a  $E$  intenzitu elektrického pole vloženou na kapiláru. Separace je dosaženo pomocí odlišné efektivní mobility iontů.

### 2.3.2 Izotachoforéza

ITP využívá diskontinuálního elektrolytového systému, kdy je vzorek dávkován mezi vodící elektrolyt (leading electrolyte, LE) a koncový elektrolyt (terminating electrolyte, TE) podle obrázku 2:



Obr. 2. Schéma separačního uspořádání ITP v různých krocích separace spolu se znázorněním intenzity elektrického pole v jednotlivých zónách.  
 (A) Počáteční stav po nadávkování.  
 (B) Přechodný stav po vložení elektrického pole.  
 (C) Izotachoforeticky ustálený stav.

LE je tvořen vodícím iontem stejného znaménka náboje jako separované ionty, jehož efektivní mobilita by měla být vyšší než efektivní mobilita všech separovaných složek, zatímco mobilita koncového iontu by měla být menší než efektivní mobilita separovaných složek. Po vložení elektrického napětí (často v režimu konstantního proudu) a ustavení izotachoforeticky ustáleného stavu<sup>56</sup> každá složka vytvoří vlastní zónu v pořadí závislém na jejich efektivních mobilitách a všechny složky migrují stejnou rychlostí danou migrační rychlostí vodící iontu podle rovnice 2:

$$v = \mu_{LE} \cdot E_{LE} \quad (2)$$

kde  $\mu_{LE}$  představuje elektroforetickou mobilitu vodícího iontu a  $E_{LE}$  intenzitu elektrického pole v části separační kapiláry vyplněné LE.

Výběrem vodícího a koncového iontu je určena selektivita separace pomocí ITP. Složky vzorku, jejichž efektivní mobilita je větší než mobilita vodícího iontu nebo nižší než mobilita koncového iontu, migrují podle separačního mechanismu CZE.

Jedinečným rysem ITP je schopnost zakoncentrování složek vzorku z většího dávkovaného objemu do úzkých zón podle zjednodušené Kohlraushovy regulační funkce<sup>56</sup> :

$$c_A = c_{LE} \frac{\mu_{TE}(\mu_A + \mu_Q)}{\mu_{LE}(\mu_{TE} + \mu_Q)} \quad (3)$$

kde  $c_A$  odpovídá koncentraci iontů analytu,  $\mu_A$  efektivní mobilitě analytu,  $c_{LE}$  představuje koncentraci vodícího iontu,  $\mu_{LE}$  efektivní mobilitu vodícího iontu,  $\mu_{TE}$  efektivní mobilitu koncového iontu a  $\mu_Q$  efektivní mobilitu protiontu. Tato rovnice platí pouze pro silné elektrolyty nesoucí jednotkový náboj.

Přízpusobení koncentrací složek v systému vůči vedoucímu elektrolytu platí pro všechny nabitě látky, jejichž efektivní mobilita se nachází mezi efektivními mobilitami vodícího a zakončujícího iontu. Samozaostřující efekt se uplatňuje během celé doby, kdy je vloženo elektrické napětí. V případě, kdy iont opustí svou zónu a dostane se do zóny s jinou vodivostí, změní se jeho migrační rychlost podle intenzity elektrického pole dané zóny podle rovnice 1, a iont se tak vrátí do své původní zóny. Proto je během analýzy potlačen vliv difuze vedoucí k rozmývání rozhraní zón látek<sup>56</sup> na rozdíl od jiných separačních technik.

### 2.3.4 Hydrodynamicky uzavřený systém

ITP je nejčastěji realizována v hydrodynamicky uzavřeném systému, kdy je bráněno hydrodynamickému toku elektrolytu mimo systém pomocí semipermeabilních membrán, nejčastěji z celulózy<sup>56</sup>. Je vhodné minimalizovat vznik elektroosmotického toku (electroosmotic flow, EOF)<sup>57</sup>, který by způsoboval proudění elektrolytu uvnitř kapiláry, a snižoval by tak opakovatelnost migračních časů a účinnost separace rozmýváním rozhraní zón jednotlivých složek<sup>58</sup>. EOF bývá často potlačován jednak použitím vhodného materiálu separační kapiláry, např. z polytetrafluoroethylenu (PTFE,

Teflon<sup>®</sup>), který neobsahuje žádné ionogenní funkční skupiny a zároveň je transparentní v oblasti UV záření<sup>57</sup>. Avšak díky hydrofobním vlastnostem dochází k adsorpci složek elektrolytů a vzorku, které mohou modifikovat povrch svými funkčními skupinami a znehodnotit separaci. Proto se často do použitých elektrolytů přidávají neutrální polymerní aditiva o koncentracích v řádu jednotek % (m/v) a nižších, např. hydroxyethylcelulóza (HEC)<sup>59,60</sup>, hydroxypropylmethylcelulóza<sup>60</sup>, polyvinylalkohol<sup>61</sup> aj., které zvyšují viskozitu elektrolytu a přednostně pokryjí vnitřní povrch kapiláry a mohou bránit sorpci ostatním složkám. Na rozdíl od kapilární zónové elektroforézy často prováděné v hydrodynamicky otevřeném systému lze během jedné analýzy v hydrodynamicky uzavřeném systému separovat pouze kationty, nebo anionty<sup>62</sup>.

### 2.3.5 Detektory pro izotachoforézu

Výsledný záznam separace (izotachoferogram) se vzhledově odlišuje od záznamů jiných separačních technik absencí píků, jelikož složky vzorku neprocházejí detektorem oddělené nosnou fází, ale jsou seřazeny za sebou podle klesající efektivní mobility. Vodivostní detektor, který je nejčastěji používán jako univerzální detektor pro izotachoforézu, poskytuje skokový záznam začínající hodnotou vodivosti zóny LE, následují zóny složek vzorku a je zakončen hodnotou vodivosti zóny TE (viz průběh intenzity elektrického pole na obrázku 2).

Další možností je využití spektrofotometrického UV-Vis detektoru. Záznam tohoto detektoru odráží specifickou schopnost složek absorbovat záření při sledované vlnové délce, proto záznam většinou nemusí vykazovat rostoucí hodnotu signálu jednotlivých zón jako v případě vodivostního detektoru. UV-Vis detektor může být využit pro detekci stopových látek, jejichž množství nestačí na vytvoření zóny dostatečně dlouhé, aby ji bylo možné detekovat pomocí vodivostního detektoru. I velmi krátká zóna látky absorbující v UV-Vis oblasti se projeví ostrým nárůstem absorbance, výška tohoto píku výška může být využita pro kvantifikaci. Je však nutné zajistit, aby při stanovení neinterferovaly další absorbující látky<sup>63</sup>.

ITP byla spojena on-line také s dalšími typy detektorů, jako jsou amperometrický<sup>64</sup>, fluorescenční<sup>65</sup>, laserem indukovanou fluorescencí<sup>66</sup> a také hmotnostním spektrometrem<sup>67</sup>. Možné je také off-line spojení s dalšími typy detektorů,

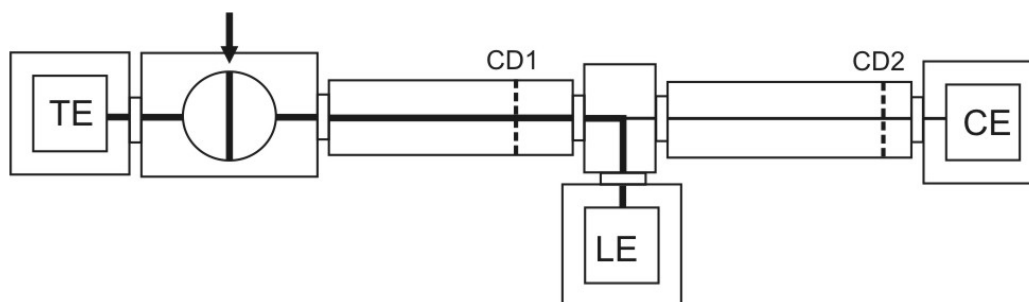


kdy je pomocí semipreparativního ventilu odebrána frakce nacházející se ve smyčce preparativního ventilu<sup>68</sup>. Frakce může být následně analyzována pomocí hmotnostní spektrometrie<sup>69,70</sup>, dvoudimenzionální gelové elektroforézy<sup>71</sup>, Ramanovy spektrometrie<sup>72</sup> nebo jinou separační technikou, např. HPLC<sup>73</sup>.

### 2.3.6 Spojení izotachoforézy a kapilární zónové elektroforézy

Obecně známou nevýhodou elektromigračních technik jsou ve srovnání s kapalinovou chromatografií vyšší limity detekce dané potřebou dávkovat krátkou zónu vzorku (v řádu jednotek procent objemu kapiláry) a krátkou optickou drahou při použití spektrofotometrické detekce<sup>62</sup>. On-line spojení izotachoforézy s kapilární zónovou elektroforézou (ITP-CZE), případně s izotachoforézou (ITP-ITP) ve dvoukolonovém uspořádání<sup>73,74</sup> dovoluje nadávkovat větší objem vzorku, zakoncentrovat jeho složky do úzkých zón díky zaostřujícímu efektu a dále je separovat na druhé koloně o menším průměru pomocí CZE nebo ITP s využitím jiného vodícího elektrolytu. Tím je umožněno významné snížení detekčních limitů, řádově až 1000x (cit<sup>62</sup>).

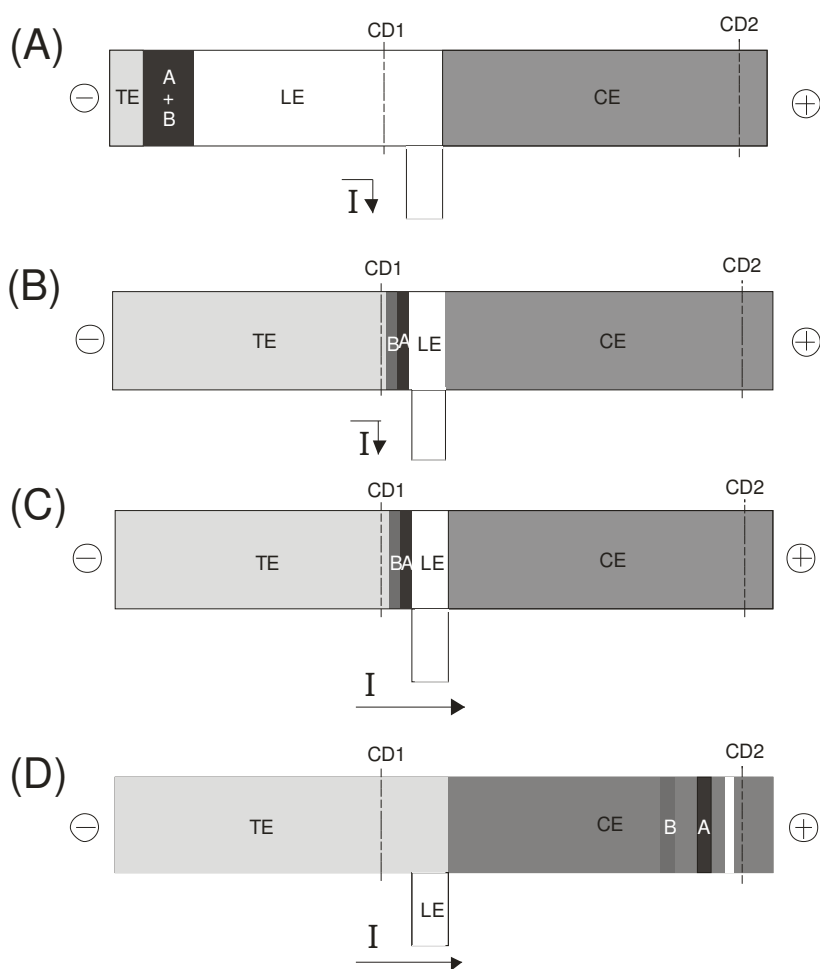
Instrumentální uspořádání tohoto separačního systému je znázorněno na obrázku 3:



Obr. 3. Uspořádání dvoukolonového systému. Komponenty zleva: elektrolytová nádobka koncového elektrolytu (TE), dávkovací ventil, předseparační kolona s vodivostním detektorem (CD1), T-spojka s elektrolytovou nádobkou vodícího elektrolytu (LE), separační kolona s vodivostním detektorem (CD2) a elektrolytová nádobka nosného elektrolytu pro CZE (CE).

Spojení dvou kolon je realizované prostřednictvím T-spojky, která spojuje obě kolony s nádobkou pro první vodící elektrolyt. Po nadávkování vzorku mezi zakončující a první vodící elektrolyt je vloženo napětí tak, aby elektrický proud procházel pouze první (předseparační) kolonou. Průchod rozhraní vodícího elektrolytu a zón vzorku je

zaznamenán na vodivostním detektoru první kolony. Jakmile rozhraní konce zóny vodícího elektrolytu a vzorku domigruje do oblasti T-spojky, vložené napětí je přepnuto tak, aby proud procházel první i druhou kolonou. Složení elektrolytu vyplňující druhou kolonu určuje mechanismus separace, tedy ITP nebo CZE. Složky vzorku migrují druhou kolonou o menším průměru a jsou detekovány detektorem na druhé koloně. Průběh separace je znázorněn na obrázku 4:



Obr 4. Průběh separace ve dvoukolonovém uspořádání ITP-CZE.

- (A) Stav po nadávkování vzorku (směs látek A a B) mezi první vodící elektrolyt a koncový elektrolyt.
- (B) Separace pomocí ITP na první koloně.
- (C) Přepnutí směru proudu na obě separační kolony, přenos látek do druhé kolony.
- (D) Separace pomocí CZE na druhé koloně.

V praxi však není možné přepnout směr proudu přesně v okamžiku, kdy první složka vzorku domigruje do spoje kolon. Přepnutí proudu je potřeba provést řádově

o několik sekund dříve, aby nedošlo ke ztrátám analytů s nejvyšší mobilitou. Proto je malé množství vodícího iontu spolu se složkami vzorku přeneseno do druhé kolony<sup>63</sup>. Díky tomu jsou zakoncentrované analyty na začátku CZE separace obklopeny krátkou zónou vodícího iontu a z druhé strany koncového iontu, což vede k dočasné migraci pomocí ITP mechanismu. Tento systém však po čase ztrácí samozaostřující efekt a dochází k postupné ztrátě kontaktu mezi jednotlivými zónami a jejich oddělování do jednotlivých zón migrujících nezávisle na ostatních podle zónové elektroforézy<sup>76</sup>. Tento proces (destacking) závisí na mobilitách, pro každou složku nastává v jiném čase, a tedy v jiné pozici v separační kapiláře.

Dvoukolonové uspořádání umožňuje v místě spojení kolon oddělit vhodným přepínáním napětí mezi první a druhou kolonou rušivé makrokomponenty matrice vzorku od minoritních složek, které mohou být v koncentraci až 10000x nižší než koncentrace makrokomponent.

Nevýhodou tohoto spojení je možnost analyzovat pouze látky nesoucí náboj. Separační systém musí být hydrodynamicky uzavřený, toto řešení je instrumentálně složitější ve srovnání s hydrodynamicky otevřeným systémem a díky nesnadnosti promytí separačního systému je náchylnější ke kontaminaci složkami vzorku, které mají tendenci se adsorbovat na vnitřní povrch komponent.

ITP-CZE nachází široké uplatnění jednak v analýze bioaktivních složek v potravinách, např. šťavelové kyseliny v pивě<sup>77</sup>, citrónové a isocitrónové kyseliny v džusech<sup>78</sup>, rosveratrolu ve víně<sup>79</sup>, potravinářských aditiv<sup>80</sup>, EDTA v majonéze<sup>81</sup> biogenních aminů v rybách<sup>82</sup> nebo karnitinu v potravinových doplncích<sup>83</sup>. Flavonoidy a fenolické kyseliny byly analyzovány v methanolických extraktech třezalky těčkované<sup>84</sup>.

Spojení ITP-CZE bylo dále využito pro analýzu farmaceutik v tělních tekutinách, například celiprololu<sup>85</sup> a orotové kyseliny<sup>86</sup> v moči, lamotriginu v lidském séru<sup>87</sup> nebo vybraných antibiotik v séru prasat<sup>88</sup>. Nasazení chirálního selektoru v CZE části bylo využito pro určení enantiomerní čistoty léčiv<sup>89</sup>.

V analýze složek životního prostředí bylo spojení ITP-CZE využito pro stanovení běžných aniontů ve vodách<sup>90</sup>. Díky velké on-line prekoncentrační schopnosti a separační účinnosti je možné také detekovat bromičnany až v koncentraci 20 nmol.L<sup>-1</sup> (cit<sup>91</sup>).

## 3. Praktická část

### 3.1 Instrumentace

ITP-CZE analýzy byly provedeny na elektroforetickém analyzátoru EA 202A (Villa-Labeco, Spišská Nova Ves, Slovensko) v dvojkolonovém uspořádání separační jednotky. Vzorky byly dávkovány autosamplerem Marathon (Spark Holland, Emmen, Nizozemí) na vnitřní dávkovací smyčku o dávkovaném objemu 30  $\mu\text{L}$ .

ITP kapilára o vnitřním průměru 800  $\mu\text{m}$  a délce 90 mm byla vyrobena z fluorovaného kopolymeru ethylenu a propylenu (FEP) a byla vybavena kontaktním vodivostním detektorem. CZE kapilára o vnitřním průměru 300  $\mu\text{m}$  a délce 240 mm byla vyrobena z FEP a byla vybavena UV detektorem Knauer K2000 (Knauer, Berlín, Německo) připojeným optickými vlákny. Efektivní délka do UV detektoru byla 180 mm. Nastavená vlnová délka byla 220 nm.

Analýzy byly provedeny vložением napětí v módu konstantního proudu, a to 200  $\mu\text{A}$  na ITP kolonu a 50  $\mu\text{A}$  na CZE kolonu. Separační napětí na CZE koloně bylo do 9 kV. Všechna měření byla opakována pětkrát, pokud není uvedeno jinak.

### 3.2 Chemikálie

Hydroxid sodný, chlorovodíková kyselina, ammediol, ethylendiamin, glycin,  $\beta$ -alanin, hydroxyethylcelulóza, naftalen-1,3,6-trisulfonová kyselina (NTS) byly získány od firem Merck (Darmstadt, Německo), Aldrich (Steinheim, Německo) a Fluka (Buchs, Švýcarsko). Všechny chemikálie byly čistoty p.a. nebo dále přečištěny obvyklými metodami.

Standardy 3,3',5,5'-tetrabromobisfenolu A (TBBPA), 2-bromfenolu (2-BP), 3-bromfenolu (3-BP), 4-bromfenolu (4-BP), 2,4-dibromfenolu (2,4-DBP), 2,6-dibromfenolu (2,6-DBP), 2,4,6-tribromfenolu (2,4,6-TBP), pentabromfenolu (PBP), 4-brom-3-methylfenolu (4-B-3-Me-P) a L-lysin byly zakoupeny u společnosti Sigma (St. Louis, MO, USA).

Byla použita deionizovaná voda (Labconco WaterPro PS water purification system, Labconco, Kansas City, MI, USA).

### 3.3 Postupy

Elektrolyty byly připraveny rozpuštěním vypočteného množství odpovídající kyseliny a báze a poté bylo přidáno vypočtené množství 1% (m/v) hydroxyethylcelulózy pro potlačení EOF. Výsledná koncentrace hydroxyethylcelulózy (HEC) v elektrolytovém systému odpovídá údajům používaným jinými autory<sup>78</sup>. V zakončujícím elektrolytu se vždy nacházelo 0,05% (m/v) HEC, vodící a nosný elektrolyt obsahovaly 0,1% (m/v) HEC. pH bylo měřeno po přípravě elektrolytu. Elektrolyty byly skladovány v exsikátoru s náplní natronového vápna, aby se omezila absorpce oxidu uhličitého ze vzduchu.

Pro výpočty efektivních mobilit byl využit software Peakmaster ver. 5.2 (cit<sup>93</sup>). Limity detekce a kvantifikace (LOD, LOQ) byly vypočteny pomocí programu QCExpert ver 2.9 (cit<sup>94</sup>).

Zásobní roztoky bromovaných fenolů o koncentraci  $1 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  byly připraveny rozpuštěním odpovídajícího množství v  $5 \times 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$  roztoku hydroxidu sodného. Nižší koncentrace bromovaných fenolů byly připraveny ředěním v deionizované vodě. Zásobní roztoky byly skladovány v ledničce a byly chráněny před denním světlem.

Vzorek vodovodní vody (Bratislava, Slovensko) byl odebrán po 15 minutách odtečení. Vzorky říčních vod Dunaje a Moravy byly získány z Výskumného ústavu vodného hospodárstva (Bratislava, Slovensko). Všechny vzorky byly zfiltrány pomocí 45  $\mu\text{m}$  membránového filtru (Millipore, Molsheim, Francie) a uskladněny v ledničce před analýzou.

## 4. Výsledky a diskuze

### 4.1 Separace vybraných bromovaných fenolů

Bromované fenoly představují skupinu látek chovajících se jako slabé kyseliny (jejich výčet, molekulové hmotnosti a  $pK_a$  jsou uvedeny v tabulce 1). Pro dosažení jejich elektroforetické separace je potřeba využít základní elektrolyt o pH dostatečně vysokém, aby bylo dosaženo jejich alespoň částečné disociaci a schopnosti migrovat v elektrickém poli.

Tabulka 1. Seznam vybraných bromovaných fenolů s jejich strukturou, molekulovou hmotností a  $pK_a$ .

název sloučeniny	struktura	$M_r$	$pK_a$	zdroj $pK_a$
2-bromfenol		173,0	8,50	[93]
3-bromfenol		173,0	9,03	[93]
4-bromfenol		173,0	9,37	[93]
2,4-dibromfenol		251,9	7,80	[41]
2,6-dibromfenol		251,9	6,60	[41]
2,4,6-tribromfenol		330,8	6,31	[41]
pentabromfenol		488,6	4,43	[41]
4-brom-3-methylfenol		187,0	9,50	[41]
3,3',5,5'-tetrabrombisfenol A		543,9	$pK_{a1} = 7,50$ $pK_{a2} = 8,50$	[41]

#### 4.1.1 Výběr elektrolytového systému

Výběr elektrolytů pro ITP-CZE byl proveden na základě uvedených acidobazických vlastností, a to nejslabší kyseliny 4-brom-3-fenolu ( $pK_a$  9,5). ITP již byla dříve využita pro separaci chlorovaných fenolů<sup>95,96</sup>, ale 2,4-dichlorfenol jako nejslabší

kyselina, která byla analyzována, je silnější kyselinou ( $pK_a$  7,9) než 4-brom-3-fenol, proto navrhovaný elektrolytový systém nemůže být využit pro separaci vybraných bromovaných fenolů.

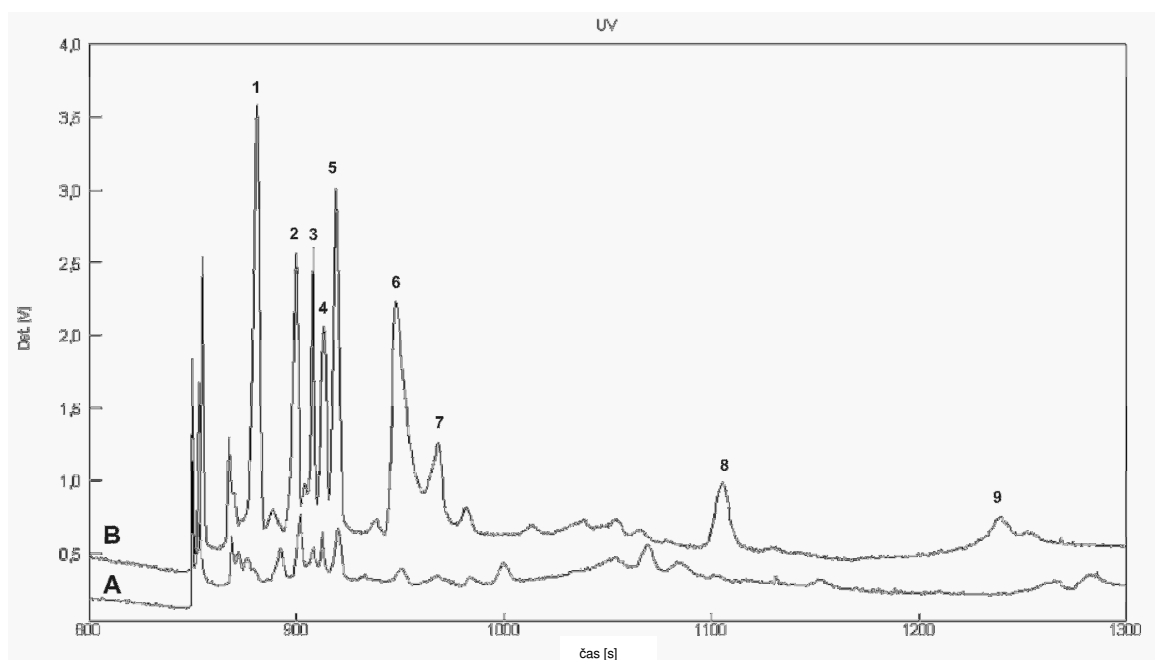
Jako vodící ion byl vybrán chloridový anion jakožto nejčastěji využívaný vodící ion pro analýzu anionů (cit<sup>91</sup>) vyznačující se vysokou iontovou mobilitou. Jako protion ve vodícím elektrolytu byl zvolen ammediol ( $pK_a$  8,78), složení vedoucího elektrolytu bylo: 10 mmol.L<sup>-1</sup> kyselina chlorovodíková a 30 mmol.L<sup>-1</sup> ammediol (pH 9,1). Jako zakončující elektrolyt byl použit 20 mmol.L<sup>-1</sup> glycin a 40 mmol.L<sup>-1</sup> ammediol (pH 9,5). Jako nosný elektrolyt pro CZE byl využit 50 mmol.L<sup>-1</sup> glycin a 50 mmol.L<sup>-1</sup> ammediol (pH 9,3). V tomto systému nebylo možné detekovat signál 4-brom-3-fenolu na detektoru CZE kolony, a to pravděpodobně z důvodu nižší efektivní mobility (v absolutní hodnotě) než byla efektivní mobilita glycinu jako zakončující iontu ( $\mu_{\text{eff}} = -12,2 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ). Pro přenesení 4-brom-3-fenolu na CZE kolonu musel být využit zakončující elektrolyt s vyšším pH, aby bylo dosaženo vyšší efektivní mobility 4-brom-3-fenolu. Proto byl využit 30 mmol.L<sup>-1</sup>  $\beta$ -alanin s 20 mmol.L<sup>-1</sup> hydroxidem sodným (pH 10,5). Efektivní mobilita  $\beta$ -alaninu ( $\mu_{\text{eff}} = -17,3 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) již byla nižší než efektivní mobilita 4-brom-3-fenolu, který byl přenesen do separačního kroku pomocí CZE.

Dále byl studován vliv složení nosného elektrolytu pro CZE na separaci vybraných bromovaných fenolů. Byly testovány elektrolyty o složení glycin - ammediol,  $\beta$ -alanin – hydroxid sodný,  $\beta$ -alanin – ethylendiamin a  $\beta$ -alanin – lysin, vždy o konstantní koncentraci anionu 25 mmol.L<sup>-1</sup> a různé koncentraci kationu, tedy o různém pH elektrolytu. Nejlepší separace vybraných bromovaných fenolů bylo dosaženo v elektrolytu o složení 25 mmol.L<sup>-1</sup>  $\beta$ -alanin a 25 mmol.L<sup>-1</sup> lysin (pH 9,6). Nižší koncentrace lysinu (20 mmol.L<sup>-1</sup>) vedoucí k nižší hodnotě pH neúměrně prodloužila migrační časy a snížila účinnost separace; vyšší koncentrace lysinu (30 mmol.L<sup>-1</sup>) vedla ke zvýšení pH a ke zhoršení separace.

Složení elektrolytového systému pro separaci vybraných bromovaných fenolů pomocí ITP-CZE je shrnuto v tabulce 2. Separace směsi vybraných bromovaných fenolů o koncentraci  $2 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$  je na obrázku 5.

Tabulka 2. Složení elektrolytového systému pro separaci vybraných bromovaných fenolů.

vodící elektrolyt		zakočující elektrolyt		nosný elektrolyt (CZE)	
vodící anion	chlorid	zakočující anion	$\beta$ -alanin	nosný anion	$\beta$ -alanin
koncentrace (mmol.L <sup>-1</sup> )	10	koncentrace (mmol.L <sup>-1</sup> )	30	koncentrace (mmol.L <sup>-1</sup> )	25
protion	ammediol	protion	sodný	protion	lysin
koncentrace (mmol.L <sup>-1</sup> )	30	koncentrace (mmol.L <sup>-1</sup> )	20	koncentrace (mmol.L <sup>-1</sup> )	25
pH	9,1	pH	10,5	pH	9,6
EOF modifikátor	HEC	EOF modifikátor	HEC	EOF modifikátor	HEC
koncentrace (%, m/v)	0,1	koncentrace (%, m/v)	0,05	koncentrace (%, m/v)	0,1



Obr. 5. Separace vybraných bromovaných fenolů o koncentraci  $2 \times 10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup>. Záznam A představuje slepý pokus, záznam B modelovou směs bromovaných fenolů.

Píky: 1 – tetrabrombisfenol A, 2 – 2,6 dibromfenol, 3 – 2-bromfenol, 4 – 2,4-dibromfenol, 5 – 2,4,6-tribromfenol, 6 – pentabromfenol, 7 – 3-bromfenol, 8 – 4-bromfenol, 9 – 4-brom-3-methylfenol



Migrační pořadí vybraných bromovaných fenolů odpovídá jejich hodnotám. 3,3',5,5'-tetrabrombisfenol A migruje navzdory nejvyšší molekulové hmotnosti jako první, jelikož nese dva záporné náboje.

Negativním jevem pozorovaným v průběhu měření byla zvyšující se koncentrace uhličitanových aniontů v separačním systému. Použité elektrolyty proto musely mít dostatečně vysokou pufrací kapacitu, aby nedocházelo ke změnám pH. Skladování elektrolytů v exsikátoru s náplní natronového vápna mělo tento jev omezit, avšak naprosto mu zabránit nejde. Výhodou spojení ITP-CZE je možnost odstranění rušících makrokomponent vzorku, v tomto případě i elektrolytového systému. Uhličitanové anionty ( $\mu_{\text{eff}} = -46,6 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ) se během ITP kroku zakoncentrují za vodíciemi chloridovými anionty a před vybranými bromovanými fenoly. Díky tomu je možné nechat velkou část zóny uhličitanů migrovat směrem mimo CZE kolonu, na kterou jsou po přepnutí proudu vpuštěny až vybrané bromované fenoly. V případě vpuštění celé zóny uhličitanů na CZE kolonu dojde k překročení kapacity této kolony a nelze dosáhnout separace vybraných bromovaných fenolů.

#### 4.1.2 Kalibrace

Kalibrace vybraných bromovaných fenolů byla provedena na šesti koncentračních hladinách v rozmezí  $3 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  až  $5 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ . Plochy píků byly korigovány na plochy endogenních látek odečtením odpovídající plochy slepého pokusu. Výsledky spolu s vypočtenými limity detekce a kvantifikace jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3. Kalibrační parametry, limity detekce (LOD) a limity kvantifikace (LOQ) pro vybrané bromované fenoly (n = 5). Hodnoty byly vypočteny z kalibračních dat pomocí softwaru QCExpert 2.9 (cit<sup>94</sup>).

analyt	rovnice kalibrační			
	závislosti (y ~ plocha píku, x ~ koncentrace $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )	$R^2$	LOD ( $\text{nmol.L}^{-1}$ )	LOQ ( $\text{nmol.L}^{-1}$ )
3,3',5,5'-tetrabrombisfenol A	$y = 50988x - 1081,6$	0,985	32,6	44,0
2,6-dibromfenol	$y = 18621x + 186,5$	0,999	16,3	24,1
2-bromfenol	$y = 11398x + 390,6$	0,998	27,8	40,9
2,4-dibromfenol	$y = 13913x + 3,9$	0,998	29,2	42,9
2,4,6-tribromfenol	$y = 35086x + 147,5$	0,999	19,1	28,2
pentabromfenol	$y = 62855x - 853,8$	0,999	14,4	21,4
3-bromfenol	$y = 17162x + 24,5$	0,997	32,3	47,3
4-bromfenol	$y = 18082x - 188,9$	0,996	27,8	38,5
4-brom-3-methylfenol	$y = 10069x + 116,7$	0,992	54,4	78,6

Nižší hodnoty koeficientů determinace pro některé bromované fenoly byly nejspíše zapříčiněny adsorpcí těchto látek během nástřiku a separace. Tento problém bude dále diskutován v části analýz vzorků vod.

#### 4.1.3 Opakovatelnosti

Opakovatelnosti migračních časů vybraných bromovaných fenolů byly studovány na dvou koncentračních hladinách:  $2 \times 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$  a  $5 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ . Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tabulka 4. Opakovatelnosti migračních časů a ploch píků vybraných bromovaných fenolů při koncentraci  $2 \times 10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup> a  $5 \times 10^{-8}$  mol.L<sup>-1</sup> (n = 8).

analyt	opakovatelnost migračního času (% RSD)		opakovatelnost plochy píku (% RSD)	
	$2 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-8}$	$2 \times 10^{-7}$	$5 \times 10^{-8}$
	mol.L <sup>-1</sup>	mol.L <sup>-1</sup>	mol.L <sup>-1</sup>	mol.L <sup>-1</sup>
3,3',5,5'-tetrabrombisfenol A	0,33	0,17	4,87	6,41
2,6-dibromfenol	0,33	0,15	2,58	5,36
2-bromfenol	0,29	0,15	4,26	6,40
2,4-dibromfenol	0,26	0,14	1,24	5,02
2,4,6-tribromfenol	0,25	0,13	1,46	4,48
pentabromfenol	0,21	0,13	2,88	6,75
3-bromfenol	0,22	0,23	3,64	7,09
4-bromfenol	0,21	0,17	2,42	6,33
4-brom-3-methylfenol	0,16	0,14	3,20	7,19

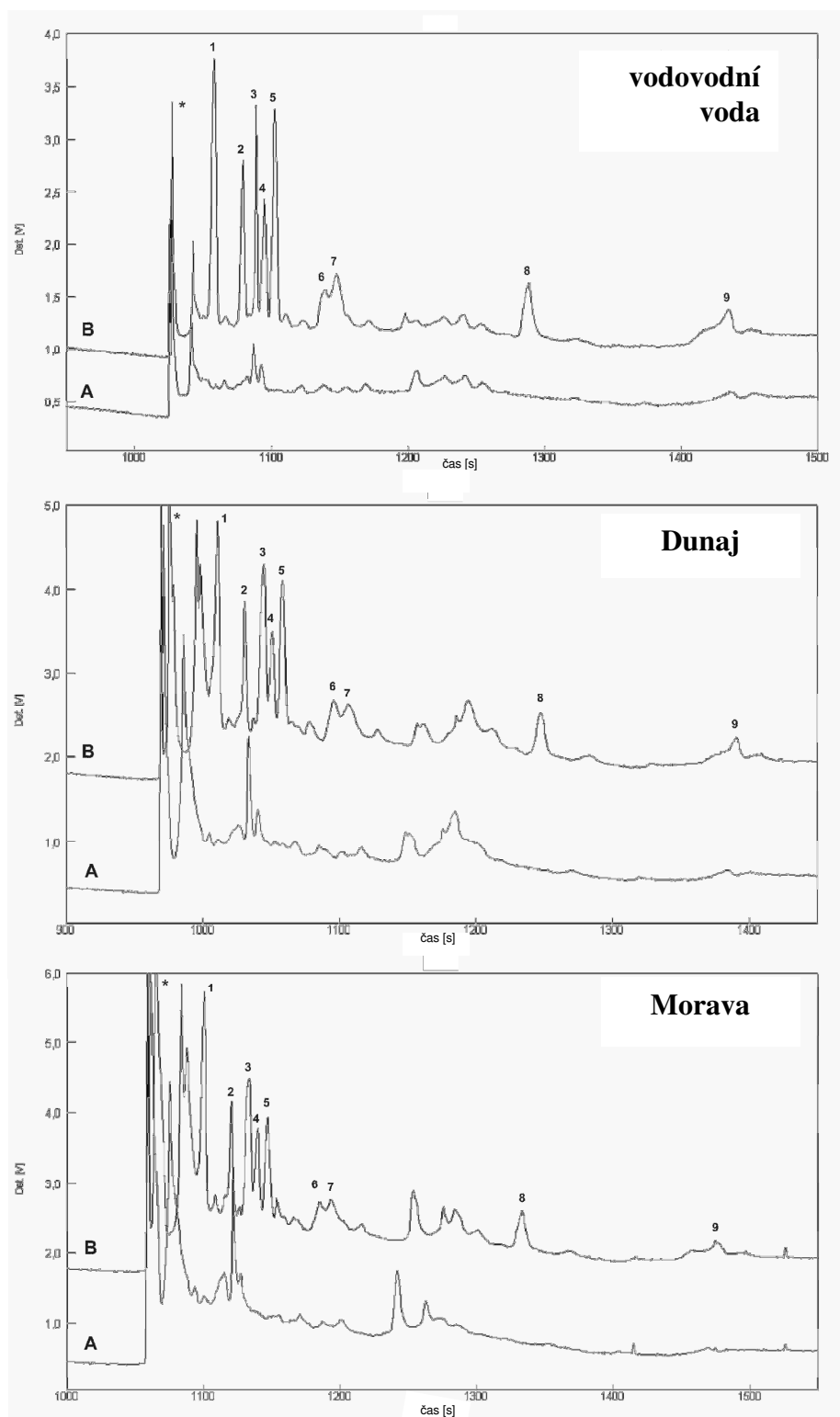
Metoda pro stanovení vybraných bromovaných fenolů vykazovala velmi dobrou opakovatelnost migračních časů, byla nižší než 0,33 % RSD. Opakovatelnost ploch píků byla v případě koncentrace  $2 \times 10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup> bromovaných fenolů nižší než 4,87 % RSD, u nižší koncentrace  $5 \times 10^{-8}$  mol.L<sup>-1</sup> menší než 7,19% RSD. Tyto hodnoty přibližně odpovídají zjištěním publikovanými dalšími autory využívající ITP-CZE (cit<sup>85,97</sup>).

## 4.2 Analýza vzorků vod

Vyvinutá metoda pro analýzu vybraných bromovaných fenolů pomocí ITP-CZE byla použita na analýzu těchto látek v obohacených vzorcích vod – jak vodovodní, tak říční. Úprava vzorku spočívala pouze ve filtraci na 45 μm membránovém filtru.

Dvoukolonové spojení ITP-CZE umožňuje odstranění makrokomponent vzorku. V případě vzorků vodovodní a říční vody toto instrumentální uspořádání dovolilo odstranit spolu s výše uvedenými uhličitany také chloridy, sírany a dusičnany, které se ve vzorcích vod nacházejí ve velkém nadbytku oproti stanovovanému stopovému množství vybraných bromovaných fenolů.

Záznamy analýz vodovodní vody a vody z Dunaje a Moravy jsou na Obrázku 6. Spodní linie (A) představuje záznam slepého pokusu, horní linie (B) odpovídá stejnému vzorku po přidání vybraných bromovaných fenolů na výslednou koncentraci  $2 \times 10^{-7}$  mol.L<sup>-1</sup>.



Obr. 6. Elektroferogramy vzorků vod. Přřazení píku a podmínky jsou stejné jako na obr. 5.

Díky přítomnosti dalších slabých kyselin ve vzorcích zejména říčních vod bylo dosaženo horší stability základní linie, jelikož i tyto slabé kyseliny byly zakoncentrovány během ITP stupně. Proto byly plochy píků korigovány pomocí odečtení odpovídající

plochy píku ve slepém pokusu. Bylo předpokládáno, že žádné bromované fenoly se nenachází ve vzorcích vod z Dunaje a Moravy. V případě analýzy reálných vzorků je obtížné odečíst plochy píků ze záznamu slepého pokusu, jelikož je nemožné získat čistý vzorek bez analytů.

#### 4.2.2 Návratnosti

Dále byly stanoveny návratnosti pomocí vzorků vod fortifikovaných vybranými bromovanými fenoly. Pravděpodobně díky adsorpci bromovaných fenolů na hydrofobní povrchy, která byla také popsána Thomsonem<sup>97</sup>, bylo dosaženo nízkých výtěžností (tabulka 5).

Pomocí přídatku  $1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  naftalen-1,3,6-trisulfonové kyseliny (NTS) k vzorku bylo dosaženo zlepšení návratnosti u většiny bromovaných fenolů ve vzorcích vod. NTS byla použita Zelenským při analýze chromanů<sup>98</sup>, které vykazovaly obdobně nízké návratnosti. NTS se přednostně sorbuje na povrchy jak během skladování, nástřiku, tak během vlastní analýzy, kdy díky vysoké efektivní mobilitě (nese tři záporné náboje) neinterferuje při stanovení bromovaných fenolů.

Porovnání návratností vybraných bromovaných fenolů bez a s přídatkem NTS je uvedeno v tabulce 5. Nízké návratnosti pentabromofenolu mohou být také způsobeny náchylností k fotodegradaci<sup>100</sup>.

Tabulka 5. Návratnosti (v %) vybraných bromovaných fenolů v různých vzorcích sledované při koncentraci  $5 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$  bez a s přidavkem  $1 \times 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$  naftalen-1,3,6-trisulfonové kyseliny (NTS) do vzorku.

analyt	vodovodní voda		Dunaj		Morava	
	-	NTS	-	NTS	-	NTS
3,3',5,5'-tetrabrombisfenol A	101,5	105,2	90,2	113,1	96,8	119,8
2,6-dibromfenol	87,4	94,7	82,1	122,7	67,8	114,4
2-bromfenol	61,2	98,1	73,6	127,2	66,3	103,5
2,4-dibromfenol	59,0	101,3	60,6	121,6	77,6	118,1
2,4,6-tribromfenol	102,4	104,5	104,3	121,7	92,2	103,2
pentabromfenol	59,7	82,2	47,8	86,9	55,9	102,1
3-bromfenol	44,5	100,5	68,9	98,8	83,7	96,8
4-bromfenol	91,3	98,9	101,8	115,0	108,9	114,7
4-brom-3-methylfenol	24,3	99,3	95,9	100,7	83,8	112,3

## 5. Závěr

V této je podán přehled bromovaných fenolů jako významných polutantů různých složek životního prostředí spolu s přístupy jejich analýzy v různých matricích pomocí různých analytických metod. V další části věnované kapilární elektroforéze a izotachoforéze jsou popsány aspekty on-line spojení těchto technik

Praktická část je věnována analýze 9 vybraných bromovaných fenolů pomocí on-line spojení ITP-CZE. Pozornost je věnována výběru elektrolytového systému pro prekoncentraci a separaci těchto analytů. Byla vyvinuta metoda pro analýzu bromovaných fenolů a metoda byla použita na stanovení vybraných bromovaných fenolů ve vzorcích vod.

Díky on-line prekoncentrační schopnosti ITP-CZE bylo možné dosáhnout velmi nízkých detekčních limitů v řádu desítek  $\text{nmol.L}^{-1}$ . Metoda také vykazovala velmi dobrou opakovatelnost migračních časů (menší než 0,33% RSD) a opakovatelnost ploch píků (menší než 7,19% RSD) na koncentrační hladině  $5 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$ . Nízké hodnoty návratnosti vybraných bromovaných fenolů byly zlepšeny přidávkem kyseliny naftalen-1,3,6-trisulfonové do vzorku.

Použití detektoru s diodovým polem by mohlo dále snížit detekční limity stanovovaných látek díky sledování absorpance při absorpčním maximu jednotlivých bromovaných fenolů. Spektrální informace jednotlivých píků by byly užitečné pro potvrzení identity.

Vyvinutá metoda byla úspěšně použita na analýzu bromovaných fenolů ve vzorcích vod. Oproti často využívané kapalinové či plynové chromatografii se vyznačuje výrazně nižšími pořizovacími a provozními náklady a jednodušší úpravou vzorku – postačuje pouze filtrace vzorku před jeho nadávkováním. Díky spojení těchto dvou technik je možné zbavit se během analýzy makrosložek jako anorganické anionty přítomné v říční vodě ve vysokých koncentracích oproti stanovovaným množstvím bromovaných fenolů, které by jinak rušily stanovení.

V Příloze I je přiložena publikovaná práce v zahraničním impaktovaném časopise *Journal of Chromatography A*.



## 6. Seznam použitých zkratek

<b>2,4,6-TBP</b>	2,4,6-tribromfenol
<b>2,4-DBP</b>	2,4-dibromfenol
<b>2,6-DBP</b>	2,6-dibromfenol
<b>2-BP</b>	2-bromfenol
<b>3-BP</b>	3-bromfenol
<b>4-B-3-Me-P</b>	4-brom-3-methylfenolu
<b>4-BP</b>	4-bromfenol
<b>BZH</b>	bromované zpomalovače hoření
<b>CZE</b>	kapilární zónová elektroforéza
<b>ECD</b>	detektor elektronového záhytu
<b>EDTA</b>	ethylendiamintetraoctová kyselina
<b>EOF</b>	elektroosmotický tok
<b>GC</b>	plynové chromatografie
<b>HEC</b>	hydroxyethylcelulóza
<b>HPLC</b>	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<b>IEF</b>	isoelektrická fokusace
<b>ITP</b>	izotachoforéza
<b>LE</b>	vodící elektrolyt
<b>LOD</b>	limit detekce
<b>LOQ</b>	limit kvantifikace
<b>MEKC</b>	micelární elektrokinetická chromatografie
<b>MS</b>	hmotnostní spektrometrie
<b>PBP</b>	pentabromfenol
<b>PTFE</b>	polytetrafluoroethylenu
<b>rf-GD-OES</b>	optická emisní spektrometrií s doutnavým výbojem
<b>RSD</b>	relativní směrodatná odchylka
<b>SPE</b>	extrakce tuhou fází
<b>SPME</b>	mikroextrakce tuhou fází
<b>TBBPA</b>	tetrabrombisfenol A
<b>TE</b>	koncový elektrolyt
<b>UV-Vis</b>	ultrafialový - viditelný

## 7. Literatura

1. Köppen R., Becker R., Jung Ch., Piechotta Ch., Nehls I.: *Anal. Bioanal.Chem.* 384, 1485 (2006).
2. World Health Organization (WHO), *Environmental Health Criteria 192, Flame Retardants: A General Introduction*, World Health Criteria, Geneva, 1997.
3. Nakajima A., Saigusa D., Tetsu N., Yamakuni T., Tomioka Y., Hishinuma T.: *Toxicol. Lett.* 189, 78 (2009).
4. Wit C.A. de: *Chemosphere* 46, 583 (2002).
5. Covaci A., Voorspoels S., Ramos L., Neels H., Blust R.: *J. Chromatogr. A* 1153, 145 (2007).
6. Law R.J., Allchin C.R., de Boer J., Covaci A., Herzke D., Lepom P., Morris S., Tronczynski J., de Wit C.A., *Chemosphere* 64, 187 (2006).
7. Law R.J., Bersuder P., Allchin C.R., Barry J.: *Environ. Sci. Technol.* 40, 2177 (2006).
8. Directive 2002/95/EC of the European Parliament and of the Council of January 27, 2003 on the restriction of the use of certain hazardous substances in electrical and electronic equipment, *Off. J. Eur. Comm. L* 37, 19 (2003).
9. Gutierrez M., Becerra J., Godoy J., Barra R.: *Int. J. Environ. Health Res.* 15, 171 (2005).
10. Kitamura S., Jinno N., Ohta S., Kuroki H., Fujimoto N.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293, 554 (2002).
11. Ghisari M., Bonefeld-Jorgensen E.C.: *Mol. Cell. Endocrinol.* 244, 31 (2005).
12. Ogunbayo O.A., Jensen K.T., Michelangeli F.: *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 1559 (2007).
13. Barontini F., Cozzani V., Marsanich K., Raffa V., Petarca L.: *J. Anal. Appl. Pyrol.* 72, 41 (2004).
14. Hakk H., Letcher R.J.: *Environ. Int.* 29, 801 (2003).
15. da Silva V.M., da Cunha Veloso M.C., de Oliveira A.S., Santos G.V., de P Pereira P.A., de Andrade J.B.: *Talanta* 68, 323 (2005).
16. Adams J.B., Lock S.J., Toward M.R., Williams B.M.: *Food Chem.* 64, 377 (1999).
17. King G.M.: *Nature* 323, 257 (1986).

18. Inoue K., Yoshida S., Nakayama S., Ito R., Okanouchi N., Nakazawa H.: *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 503 (2006).
19. Suzuki S., Hasegawa A.: *Anal. Sci.* 22, 469 (2006).
20. Llorca-Porcel J., Martinez-Sanchez G., Alvarez B., Cobollo M.A., Valor I.: *Anal. Chim. Acta* 569, 113 (2006).
21. Polo M., Llompert M., Garcia-Jares C., Gomez-Noya G., Bollain M.H., Cela R.: *J. Chromatogr. A* 1124, 11 (2006).
22. Sambe H., Hoshina K., Hosoya K., Haginaka J.: *J. Chromatogr. A* 1134, 16 (2006).
23. Morris S., Allchin C.R., Zegers B.N., Haftka J.J.H., Boon J.P., Belpaire C., Leonards P.E.G., van Leeuwen S.P.J., de Boer J.: *Environ. Sci. Technol.* 38, 5497 (2004).
24. Altwaiq A.M., Wolf M., van Eldik R.: *Anal. Chim. Acta* 491, 111 (2003).
25. Pöhlein M., Segura Llopis A., Wolf M., van Eldik R.: *J. Chromatogr. A* 1066, 111 (2005).
26. Thomsen C., Lundanes E., Becher G.: *Environ. Sci. Technol.* 36, 1414 (2002).
27. Cariou R., Antignac J.P., Marchand P., Berrebi A., Zalko D., Andre F., Le Bizec B.: *J. Chromatogr. A* 1100, 144 (2005).
28. Blanco E., Casais M.C., Mejuto M.C., Cela R.: *Anal. Chem.* 78, 2772 (2006).
29. Da Silva V.M., Da Cunha Veloso M.C., De Oliveira A.S., Santos G.V., De P.A., Pereira P., De Andrade J.B.: *Talanta* 68, 323 (2005).
30. Lopez P., Brandsma S.A., Leonards P.E.G., De Boer J.: *J. Chromatogr. A* 1216, 334 (2009).
31. Vasquez A.S., Martin A., Costa-Fernandez J.M., Encinar J.R., Bordel N., Pereiro R., Sanz-Mendel A.: *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 683 (2007).
32. Polo M., Llompert M., Garcia-Jares C., Gomez-Noya G., Bollain M.-H., Cela R.: *J. Chromatogr. A* 1124, 11 (2006).
33. Thomsen C., Horpestad Liane V., Becher G.: *J. Chromatogr. B* 846, 252 (2007).
34. Korytár P., Covaci A., Leonards P.E.G., de Boer J., Brinkman U.A.Th.: *J. Chromatogr. A* 1100, 200 (2005).
35. Quintana M.C., Iglesias V., Da Silva M.P., Hernandez M., Hernandez L.: *J. Liq. Chrom. and Relat. Tech.* 29, 87 (2006).
36. Chu S., Haffner G.D., Letcher R.J.: *J. Chromatogr. A* 1097, 25 (2005).
37. Gallart-Ayala H., Moyano E., Galceran M.T.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 21, 40939 (2007).

38. Tollbäck J., Crescenzi C., Dyremark E.: *J. Chromatogr. A* 1104, 106 (2006) 106.
39. Debrauwer L., Riu A., Jouahri M., Rathahao E., Jouanin I., Antignac J.P., Cariou R., Le Bizec B., Zalko D.: *J. Chromatogr. A* 1082, 98 (2005).
40. Frederiksen M., Vorkamp K., Bossi R.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 87, 1095 (2007).
41. Blanco E., Casais M.C., Mejuto M.C., Cela R.: *J. Chromatogr. A* 1068, 189 (2005).
42. Blanco E., Casais M.C., Mejuto M.C., Cela R.: *J. Chromatogr. A* 1071, 205 (2005).
43. Ginterová P.: *Analýza vybraných bromovaných fenolů kapilární elektroforézou. Diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc, 2009.*
44. Xie Z., Ebinghaus R., Lohmann R., Heemken O., Cabaa A., Puttmann W.: *Anal. Chim. Acta* 584, 333 (2007).
45. Sjödin A., Carlsson H., Thuresson K., Sjölin S., Bergman A., Ostman C.: *Environ. Sci. Technol.* 35, 448 (2001).
46. Stapleton H. M., Dodder N. G., Offenbergh J. H., Schantz M. M., Wise S. A.: *Environ. Sci. Technol.* 39, 925 (2005).
47. Harrad S., Ibarra C., Diamond M., Melymuk L., Robson M., Douwes J., Roosens L., Dirtu A.C., Covaci A.: *Environ. Int.* 34, 232 (2008).
48. Jin J., Peng H., Wang Y., Yang R., Cui J.: *Organohalogen Compd.* 68, 85 (2006).
49. Yu C., Hu B.: *J. Chromatogr. A* 1160, 71 (2007).
50. Wit C.A. de, Alaee M., Muir D.C.G.: *Chemosphere* 64, 209 (2006).
51. Thomsen C., Lundanes E., Becher G.: *J. Environ. Monit.* 3, 366 (2001).
52. Thomsen C., Leknes H., Lundanes E., Becher G.: *J. Anal. Toxicol.* 26, 129 (2002).
53. Thomsen C., Lundanes E., Becher G.: *Environ. Sci. Technol.* 36, 1414 (2002).
54. Nagayama J., Tsuji H., Takasuga T.: *Organohalogen Compd.* 48, 27 (2000).
55. Hagmar L., Sjödin A., Häglund P., Thuresson K., Rylander L., Bergman K.: *Organohalogen Compd.* 47, 198 (2000).
56. Boček P.: *Analytická kapilární izotachoforéza. Academia, Praha, 1987.*
57. Knob R.: *Polypyrrole-coated capillaries for capillary electrophoresis. Diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc, 2010.*
58. Schönfeld F., Goet G., Baier T., Hardt S.: *Phys. Fluids* 21 (2009).
59. Kvasnička, F., Krátká, J.: *Cent. Eur. J. Chem.* 4, 216 (2006).
60. Reijenga J.C., Abe G.V.A., Verheggen .P.E.M., Everaerts F.M.: *J. Chromatogr. A* 260, 241 (1983).
61. Pospíšilová M., Polášek M., Procházka J.: *J. Chromatogr. A* 772 , 277 (1997).

62. Kvasnička F., *Electrophoresis* 28, 3581 (2007).
63. Khaledi M.G.: *High Performance Capillary Electrophoresis*, kap. 7. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, 1998.
64. Kaniansky D., Havaši P., Marák J., Sokolík R.: *J. Chromatogr. A* 366, 153 (1986).
65. Jarofke R.: *J. Chromatogr.* 390, 161 (1987).
66. Schlenck A., Herbeth B., Siest G., Visvikis S.: *J. Lipid Res.* 40, 2125 (1999).
67. Tomáš R., Koval M., Foret F.: *J. Chromatogr. A* 1217, 4144 (2010).
68. Cifuentes A., Xu X., Kok W.T., Poppe H.: *J. Chromatogr. A* 716, 141 (1995).
69. Kenndler E., Kaniansky D.: *J. Chromatogr.* 209, 306 (1981).
70. Udseth H.R., Loo J.A., Smith R.D.: *Anal. Chem.* 61, 228 (1989).
71. Böttcher A., Schlosser J., Kronenberg F., Dieplinger H., Knipping G., Lackner K.J., Schmitz G., *J. Lipid Res.* 41, 905 (2000).
72. Ranc V., Staňová A., Marák J., Maier V., Ševčík J., Kaniansky D.: *J. Chromatogr. A* 1218, 205 (2011).
73. Hutta M., Kaniansky D., Kovalcikova E., Marak J., Chalanyova M., Madajova V., Simunicova E.: *J. Chromatogr. A* 689, 123 (1995).
74. Everaerts F.M., Verheggen T.P.E.M., Mikkers F.E.P.: *J. Chromatogr.* 169, 21 (1979).
75. Kaniansky, D., Marák, J., *J. Chromatogr.* 498, 191 (1990).
76. Křivánková L., Gebauer P., Thromann W., Mosher R.A., Boček P.: *J. Chromatogr. A* 638, 119 (1993).
77. Masar M., Zuborova M., Kaniansky D., Stanislawski B.: *J. Sep. Sci.* 26, 647 (2003).
78. Ježek J., Suhaj M.: *J. Chromatogr. A* 916, 185 (2001).
79. Kvasnička F., Kolouchová I., Voldřich M., Melzoch K.: XXXIV. Symposium o nových směrech výroby a hodnocení potravin, *Proceedings*, 365 (2003).
80. Bodor R., Zuborova M., Olvecka E., Madajova V., Masar M., Kaniansky D., Stanislawski B.: *J. Sep. Sci.* 24, 802 (2001).
81. Kvasnička F., Míková K.: *J. Food Comp. Anal.* 9, 231 (1996).
82. Voldřich M., Hrdlička J., Opatová H.: *Food Res.* 6, 99 (1988).
83. Kvasnička F., Prokorátová V., Ševčík R., Voldřich M.: *J. Chromatogr.* 1081, 60 (2005).
84. Hamoudová R., Pospíšilivá M., Spilková J.: *Electrophoresis* 27, 4820 (2006).
85. Mikuš P., Maráková K., Marák J., Planková A., Valášková I., Havránek E.: *Electrophoresis* 29, 4561 (2008).

86. Danková M., Strašík S., Molnárová M., Kaniansky D., Marák J.: *J. Chromatogr. A* 916, 143 (2001).
87. Budáková L., Brozmanová H., Kvasnička F., Grundmann M.: *Chem. Listy* 103, 166 (2009).
88. Hernández M., Aguilar C., Borrull F., Calull M.: *J. Chromatogr. B* 772, 163 (2002).
89. Marák J., Mikuš P., Maráková K., Kaniansky D., Valášková I., Havránek E.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46, 870 (2008).
90. Zelenský I., Zelenská V., Kaniansky D., Havaši P., Lednárova V., *J. Chromatogr.* 294, 317 (1984).
91. Bodor R., Kaniansky D., Masár M., Silleová K., Stanislawski B.: *Electrophoresis* 23, 3630 (2002).
92. Gas B., Jaros M., Hruska V., Zuskova I., Stedry M., *LC-GC Europe* 18, 282 (2005).
93. Trilobyte software, Pardubice, ČR, ver. 2.9.
94. Lide D. de: *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 85. vydání, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 2005.
95. Praus P., Dombek V.: *Anal. Chim. Acta* 281, 397 (1993).
96. Praus P.: *Anal. Chim. Acta* 302, 302 (1995).
97. Mikuš P., Maráková K., Marák J., Kaniansky D., Valášková I., Havránek E.: *J. Chromatogr. A* 1179, 9 (2008).
98. Thomsen C., Leknes H., Lundanes E., Becher G.: *J. Chromatogr. A* 923, 299 (2001).
99. Zelenský I., Zelenská V., Kaniansky D.: *J. Chromatogr.* 390, 111 (1987).
100. Eriksson J., Rahm S., Green N., Bergman A., Jakobsson E., *Chemosphere* 54, 117 (2004).

## 8. Přílohy

### 8.1 Příloha I

Journal of Chromatography A, 1217 (2010) 3446–3451



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/chroma](http://www.elsevier.com/locate/chroma)



## Determination of brominated phenols in water samples by on-line coupled isotachopheresis with capillary zone electrophoresis

Radim Knob<sup>a,\*</sup>, Jozef Marák<sup>b</sup>, Andrea Staňová<sup>b</sup>, Vítězslav Maier<sup>a</sup>, Dušan Kaniansky<sup>b</sup>, Juraj Ševčík<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Palacký University in Olomouc, Tr. 17. Listopadu 12, Olomouc, CZ-77146, Czech Republic

<sup>b</sup> Department of Analytical Chemistry, Faculty of Natural Science, Comenius University in Bratislava, Mlynská dolina CH-2, Bratislava 4, SK-842 15, Slovak Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 27 October 2009

Received in revised form 3 March 2010

Accepted 4 March 2010

Available online 12 March 2010

#### Keywords:

Brominated phenols

Capillary isotachopheresis

Capillary electrophoresis

On-line preconcentration

Column-coupling electrophoresis

### ABSTRACT

A method for determination of nine brominated phenols as environmental risk compounds was developed by on-line coupled capillary isotachopheresis and capillary zone electrophoresis (ITP–CZE). For ITP step,  $1 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  hydrochloric acid with  $3 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  ammonium pH 9.1 was used as the leading electrolyte, and  $3 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$   $\beta$ -alanine with  $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  sodium hydroxide pH 10.05 was used as the terminating electrolyte. As the background electrolyte for CZE separation,  $2.5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$   $\beta$ -alanine with  $2.5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  lysine pH 9.6 was used. All electrolytes contained 0.05% or 0.1% (m/v) hydroxyethylcellulose to suppress the electroosmotic flow. UV detection at wavelength 220 nm was used. Detection limits in order of tens of  $\text{nmol L}^{-1}$  were achieved. Good repeatability of migration times (less than 0.33% RSD) and good repeatability of peak areas (less than 7.19% RSD) at concentration level  $5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  were observed. Developed ITP–CZE method was applied to determination of brominated phenols in spiked tap and river water samples.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Brominated phenols (BPs) present a widely used group of flame retardant compounds because of their low cost and high efficiency. They are mainly added into polymer matrices for a purpose of inhibition or suppression of combustion process. Tetrabromobisphenol A (TBBPA) as one of the most produced compound can be found in electronic equipment, packaging, and construction materials in concentration between 10% and 20% [1]. Released TBBPA can be degraded into other brominated phenol derivatives [2].

Although BPs are mainly produced artificially, they are also created naturally by several marine organisms at very low concentrations, their presence is responsible for flavor of various sea foods [3]. Their acute toxicity is not very high, but these compounds can be accumulated in the food chain or may act as competitors of some natural hormones [4]. Therefore, BPs are considered as environmentally important group of compounds with respect to their influence on living organisms. Ogunbayo et al. [5] studied an effect of TBBPA on phospholipid bilayers and found that TBBPA highly binds to the membranes and changes their properties, e.g., increase in viscosity results in retardation of biological processes. For these reasons, their concentration levels in environment should be monitored.

López et al. [6] determined the concentrations of dibrominated phenols in river water in Netherlands and found about  $10 \text{ ng L}^{-1}$  concentration of 2,4-dibromophenol. Sellström and Jansson [7] found  $270 \text{ ng g}^{-1}$  concentration of TBBPA in a sewage sludge downstream from a plastics industry. Suzuki and Hasegawa [8] investigated the presence of TBBPA in a landfill leachate and found its concentrations ranging from  $0.3 \text{ ng L}^{-1}$  to  $540 \text{ ng L}^{-1}$ .

Methods for determination of TBBPA and its derivatives were recently reviewed by Covaci et al. [1]. For environmental analysis of BPs, GC–MS is the most frequently used analytical tool [6,9]. López et al. [6] compared several routinely used off-line sample preconcentration-extraction techniques such as liquid–liquid (LLE), solid-phase (SPE), headspace (HS) extraction or solid-phase microextraction (SPME), followed by GC–MS analysis with either electron capture negative ionization (ECNI) or electron impact (EI) as ionization techniques. For two dibrominated phenols, LODs of  $0.1 \text{ ng L}^{-1}$  were achieved using SPE–GC–ECNI–MS.

HPLC equipped with UV [3] was employed for determination of BPs in marine fishes by steam distillation–solvent extraction followed by HPLC–UV [3] analysis providing LODs in order of one hundred  $\mu\text{g L}^{-1}$ . HPLC–MS combination [10–12] was also used for analysis of BPs. Reported LODs of TBBPA were  $10 \text{ ng L}^{-1}$  in river water utilizing its isolation by molecularly imprinted polymers [12] and  $20 \text{ ng L}^{-1}$  in surface water using SPE for sample cleanup and preconcentration [11].

Blanco et al. [13,14] used aqueous and non-aqueous capillary electrophoresis (NACE) with UV detection for separation of BPs.

\* Corresponding author. Tel.: +420 585634417; fax: +420 585634433.  
E-mail address: [rknob@seznam.cz](mailto:rknob@seznam.cz) (R. Knob).

LOQs in order of tens of  $\mu\text{g L}^{-1}$  were obtained using large volume sample injection (LVSEPI) in an aqueous media. Employing LVSEPI-NACE with methanol as solvent, approximately 10 times lower LOQs were achieved. However, sample injection into 95% of capillary volume in NACE method was reported to be unsuitable for real sample analysis. Reduction of injection volume led to LOQs a little bit better than the results obtained by the aqueous LVSEPI-CZE. The possibilities of interferences from other phenol derivatives were also studied [13].

Isotachopheresis (ITP) as a not so frequently used electromigration technique in separation of halogenated derivatives of phenol was so far utilized only to the analysis of chlorophenols [15,16]. ITP possesses a unique capability of concentration of analytes from large sample volumes to narrow bands according to Kohlrausch's regulating function [17,18]. This concentration phenomenon occurs for all charged solutes, whose mobilities are between the ones of leading (LE) and terminating (TE) ion [19]. Hyphenation of electromigration methods like isotachopheresis and zone electrophoresis in column-coupling instrumentation [20,21] offers several advantages over single-column separation techniques, mainly (i) the ability to introduce large sample volumes, (ii) to focus trace analytes into narrow bands, (iii) or to remove main sample matrix constituents from the final CZE separation [22–24]. However, commercially available ITP–CZE instrumentation uses a hydrodynamically closed separation system with both advantages and disadvantages recently reviewed by Kvasnička [25].

In contrary to CZE, ITP uses a discontinuous electrolyte system. Sample is introduced between the LE and TE electrolytes and the selection of separation conditions strongly influences the selectivity of the ITP step. A negative aspect of isotachopheretic concentration phenomenon is that not only sample constituents but also trace impurities present in LE and TE at low concentration levels are concentrated. Therefore, very high demands on purity of used chemicals and water used for preparation of electrolytes are required.

In this work, a method for separation and determination of nine BPs (3,3',5,5'-tetrabromobisphenol A, 2-bromophenol, 3-bromophenol, 4-bromophenol, 2,4-dibromophenol, 2,6-dibromophenol, 2,4,6-tribromophenol, pentabromophenol, 4-bromo-3-methylphenol) was developed utilizing of column-coupling isotachopheresis and capillary zone electrophoresis (ITP–CZE) equipped with UV detector. The method was successfully applied to the analyses of BPs' spiked tap and river waters samples requiring only simple filtration.

## 2. Experimental

### 2.1. Instrumentation

Automated capillary electrophoresis analyzer EA202A (Villa-Labeco, Spišská Nová Ves, Slovak Republic) assembled in the column-coupling configuration of the separation unit was used in this work for performing the ITP–CZE runs. The samples were injected by a 30  $\mu\text{L}$  internal sample loop of the injection valve of the analyzer.

An ITP column was provided with an 800  $\mu\text{m}$  ID capillary tube made of FEP (fluorinated ethylene–propylene copolymer) and an on-column conductivity sensor. Its total length was 90 mm. A CZE column was provided with a 300  $\mu\text{m}$  ID capillary tube made of FEP of a 240 mm total length (180 mm to the detection cell).

EA202A analyzer was provided with Knauer UV detector K2000 (Knauer, Berlin, Germany) and the detection wavelength was set to 220 nm.

Constant current mode was applied on both columns, delivering 200  $\mu\text{A}$  and 50  $\mu\text{A}$  currents on ITP and CZE column, respectively.

Separation voltage observed on the CZE column was about 9 kV. All measurements were repeated five times.

Electrolytes were prepared by dissolving the calculated amount of compounds in demineralized water, and then a proper volume of stock solution of 1% (m/v) hydroxyethylcellulose (HEC) was added to suppress electroosmotic flow. pH of electrolytes was measured after preparation to ensure that pH value fits the calculated one. Electrolytes were stored in a desiccator filled with soda lime to prevent carbon dioxide absorption when not used.

LODs and LOQs were calculated by QCEXpert ver 2.5 software (TriloByte, Pardubice, Czech Republic) using direct signal method (IUPAC).

### 2.2. Chemicals

Sodium hydroxide, hydrochloric acid, ammediol, ethylenediamine, glycine,  $\beta$ -alanine, hydroxyethylcellulose, naphthalene-1,3,6-trisulfonic acid (NTS) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany), Aldrich (Steinheim, Germany) and Fluka (Buchs, Switzerland). All chemicals used were of analytical grade or additionally purified by the usual methods. The electrolyte solutions were prepared in water demineralized by a Labconco WaterPro PS water purification system (Labconco, Kansas City, MI, USA).

Standards of 3,3',5,5'-tetrabromobisphenol A (TBBPA), 2-bromophenol (2-BP), 3-bromophenol (3-BP), 4-bromophenol (4-BP), 2,4-dibromophenol (2,4-DBP), 2,6-dibromophenol (2,6-DBP), 2,4,6-tribromophenol (2,4,6-TBP), pentabromophenol (PBP), 4-bromo-3-methylphenol (4-B-3-Me-P), and lysine were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

The rest of chemicals, i.e., sodium hydroxide, hydrochloric acid, ammediol, ethylenediamine, glycine,  $\beta$ -alanine, hydroxyethylcellulose, naphthalene-1,3,6-trisulfonic acid (NTS) were obtained from Merck, Aldrich and Fluka.

### 2.3. Standard solutions

The stock solutions of BPs at concentration  $1 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> were prepared by dissolving of calculated amount in  $5 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> sodium hydroxide. Lower concentrations of BPs were prepared by appropriate dilution of their stock solutions with demineralized water. Stock solutions were stored in a fridge and protected against daylight.

For the recovery experiments, real matrices were spiked with BPs from their stock solutions at concentration levels  $2 \times 10^{-7}$  and  $5 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup>, respectively.

### 2.4. Sample preparation

Sample of local tap water was obtained after 15 min of water flow. Samples of river water sampled from Danube and Morava rivers nearby Bratislava (Slovak Republic), were obtained from Water Research and Treatment Institute (Bratislava, Slovak Republic). All water samples were filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  membrane filter (Millipore, Molsheim, France) and stored in a fridge before analysis.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Separation of standards

BPs are weak acids having quite high  $\text{pK}_a$  values with except of pentabromophenol (see Table 1). Therefore, to achieve their electrophoretic separation, pH of background electrolyte must be high enough to obtain at least partial dissociation BPs, and consequently, their migration in an electric field. When utilizing hydrodynamically closed separation system, the electroosmotic flow (EOF) must



**Table 1**List of BPs, their relative molecular mass ( $M_r$ ) and estimated  $pK_a$  value.

Compound name	Abbreviation	$M_r$	$pK_a$	$pK_a$ source
2-Bromophenol	2-BP	173.0	8.50	[30]
3-Bromophenol	3-BP	173.0	9.03	[30]
4-Bromophenol	4-BP	173.0	9.37	[30]
2,4-Dibromophenol	2,4-DBP	251.9	7.80	[13]
2,6-Dibromophenol	2,6-DBP	251.9	6.60	[13]
2,4,6-Tribromophenol	2,4,6-TBP	330.8	6.31	[13]
Pentabromophenol	PBP	488.6	4.43	[13]
4-Bromo-3-methylphenol	4-B-3-MeP	187.0	9.5.0	[13]
3,3',5,5'-Tetrabromobisphenol A	TBBPA	543.9	$pK_{a1} = 7.50$ $pK_{a2} = 8.50$	[13]

**Table 2**

Composition of electrolytes for ITP–CZE.

Leading electrolyte		Terminating electrolyte		Background electrolyte	
Leading anion	Chloride	Terminating anion	$\beta$ -Alanine	Carrier anion	$\beta$ -Alanine
Concentration (mmol L <sup>-1</sup> )	10	Concentration (mmol L <sup>-1</sup> )	30	Concentration (mmol L <sup>-1</sup> )	25
Counter ion	Ammediol	Counter ion	Sodium	Counter ion	Lysine
Concentration (mmol L <sup>-1</sup> )	30	Concentration (mmol L <sup>-1</sup> )	20	Concentration (mmol L <sup>-1</sup> )	25
pH	9.1	pH	10.5	pH	9.6
EOF suppressor	HEC	EOF suppressor	HEC	EOF suppressor	HEC
Concentration (% m/v)	0.1	Concentration (% m/v)	0.05	Concentration (% m/v)	0.1

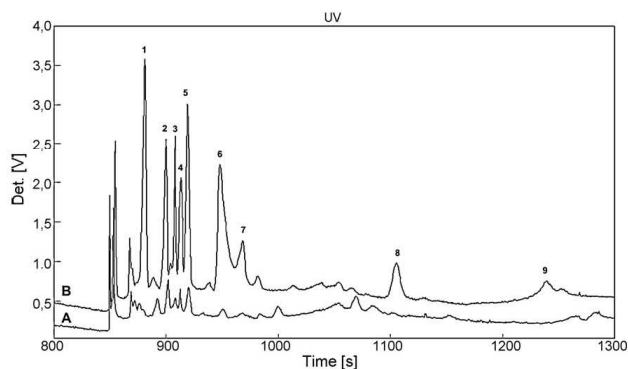
be suppresses to avoid the reduction of separation efficiency and/or disturbances of the separation process. EOF in this case does not contribute to transport analytes into a detection cell in contrast to conventional hydrodynamically opened separation system used to separation of BPs [14]. HEC (anticonvection additive) was added to all electrolytes in order to suppress EOF by increasing electrolytes viscosity and reducing the electrokinetic potential at the inner capillary wall.

Selection of electrolyte system for ITP was mainly influenced by migration of 4-B-3-MeP as the weakest acid ( $pK_a$  9.5) from nine studied BPs. Praus [15,16] separated chlorophenols by ITP, however, the weakest acid analyzed was 2,4-dichlorophenol ( $pK_a$  7.9), so suggested LE and TE electrolytes for ITP cannot be directly transferred to the separation of all selected BPs.

Chloride was selected as a leading ion as it is the most frequently used for the ITP separation of anions because of its high mobility. At first, ammediol as counter ion and glycine as terminating ion were tested, however, no signal for 4-B-3-MeP was registered in these experiments (data not shown). Therefore,

$\beta$ -alanine with lower effective mobility than glycine at pH above 10 was selected as terminating ion making 4-B-3-MeP migrate isotachophoretically and to be potentially transferred into CZE step. Concerning the background electrolyte for CZE, several systems composed of glycine–ammediol,  $\beta$ -alanine–sodium hydroxide,  $\beta$ -alanine–ethylenediamine and  $\beta$ -alanine–lysine at various ratios and pH values were tested (data not shown). The best results regarding the separation of BPs and the purity of baseline were obtained with the background electrolyte containing 25 mmol L<sup>-1</sup>  $\beta$ -alanine with 25 mmol L<sup>-1</sup> lysine (pH 9.6). Separation of BPs standard mixture at concentration  $2 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> is shown in Fig. 1. BPs are separated according to their  $pK_a$  values. TBBPA migrates as first despite of its highest relative molecular mass, because it possesses two negative charges. Decreasing pH to obtain better resolution led to unreasonably long analysis time and peak broadening. At higher pH values proper separation of BPs was not achieved. Optimized separation conditions are summarized in Table 2.

Column switching was set before the end of zone of carbonate reached bifurcation point, so LE electrolyte and all ions having



**Fig. 1.** ITP–CZE separation of standard mixture of BPs (concentration  $2 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>). Electropherogram A presents injection of terminating electrolyte, electropherogram B presents injection of standard mixture. Peak assignment: 1–TBBPA; 2–2,6-DBP; 3–2-BP; 4–2,4-DBP; 5–2,4,6-TBP; 6–PBP; 7–3-BP; 8–4-BP; 9–4-B-3-MeP. For conditions, see Table 2.

**Table 3**  
Calibration parameters, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) of BPs ( $n=5$ ).

Analyte	Calibration lines ( $y$ represents peak area, $x$ represents concentration in $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	$R^2$	LOD ( $\text{nmol L}^{-1}$ )	LOQ ( $\text{nmol L}^{-1}$ )
3,3',5,5'-Tetrabromobisphenol A	$y = 50.988x - 1081.6$	0.985	32.6	44.0
2,6-Dibromophenol	$y = 18.621x + 186.5$	0.999	16.3	24.1
2-Bromophenol	$y = 11.398x + 390.6$	0.998	27.8	40.9
2,4-Dibromophenol	$y = 13.913x + 3.9$	0.998	29.2	42.9
2,4,6-Tribromophenol	$y = 35.086x + 147.5$	0.999	19.1	28.2
Pentabromophenol	$y = 62.855x - 853.8$	0.999	14.4	21.4
3-Bromophenol	$y = 17.162x + 24.5$	0.997	32.3	47.3
4-Bromophenol	$y = 18.082x - 188.9$	0.996	27.8	38.5
4-Bromo-3-methylphenol	$y = 10.069x + 116.7$	0.992	54.4	78.6

**Table 4**  
Recoveries of BPs at  $5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  concentration level from different matrices without and with the addition of NTS ( $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) to the water samples.

Analyte	Tap water		Danube river		Morava river	
	–	NTS	–	NTS	–	NTS
3,3',5,5'-Tetrabromobisphenol A	101.5	105.2	90.2	113.1	96.8	119.8
2,6-Dibromophenol	87.4	94.7	82.1	122.7	67.8	114.4
2-Bromophenol	61.2	98.1	73.6	127.2	66.3	103.5
2,4-Dibromophenol	59.0	101.3	60.6	121.6	77.6	118.1
2,4,6-Tribromophenol	102.4	104.5	104.3	121.7	92.2	103.2
Pentabromophenol	59.7	82.2	47.8	86.9	55.9	102.1
3-Bromophenol	44.5	100.5	68.9	98.8	83.7	96.8
4-Bromophenol	91.3	98.9	101.8	115.0	108.9	114.7
4-Bromo-3-methylphenol	24.3	99.3	95.9	100.7	83.8	112.3

higher effective mobility than carbonate were removed from the CZE separation path, whereas ions having lower effective mobility than carbonate continued in their migration into the CZE step. However, a difficulty concerning work with electrolytes having high pH occurs when using ITP pre-concentration. Carbon dioxide from the atmosphere is absorbed in solutions with high pH, which leads into continuous increasing of carbonate concentration in time. Therefore, it is important to use well-buffered electrolytes to prevent larger changes in their pH values and to store electrolytes in disiccator filled with soda lime when not used. Increase in carbonate zone length can be observed during ITP step (data not shown). However, most of carbonate amount (about 99.5%) is removed from system by proper setup of column switching, so there is no interference of carbonate during the separation of BPs in the CZE step.

### 3.2. Calibration and repeatability

Calibration of BPs was performed at six concentration levels ranging from  $3 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  to  $5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ . The peak areas of the analytes were corrected, for the presence of endogenous compounds, by subtracting the corresponding area of the blank. Results together with calculated limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) are shown in Table 3.

Obtained LOQs correspond to the results achieved by Blanco et al. [13] for real sample analysis. Other techniques used for analysis of BPs, e.g., GC-MS [6,9] and LC-MS [10–12], offer much better LODs in case of targeted compound analysis in comparison to our developed ITP-CZE method but on the other hand they require complex and time-demanding sample pretreatment. However, for determination of the BPs with diverse properties, ITP-CZE method offers relatively fast and sufficiently sensitive analysis of BPs at low cost due to the on-line pre-concentration by ITP step.

Lower value of correlation coefficients of several BPs is assumed to be connected with adsorption of analytes during injection and separation and this problem will be discussed further.

Study of repeatability was performed at two concentration levels  $2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  and  $5 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  and good repeatability of migration times for all analytes with values less than 0.33% and less than 0.23%, respectively (RSD,  $n=8$ ) was obtained. These results

are in good agreement with other authors using ITP-CZE [22,26]. Repeatability of peak areas was less than 4.87% and less than 7.19%, respectively (RSD,  $n=8$ ).

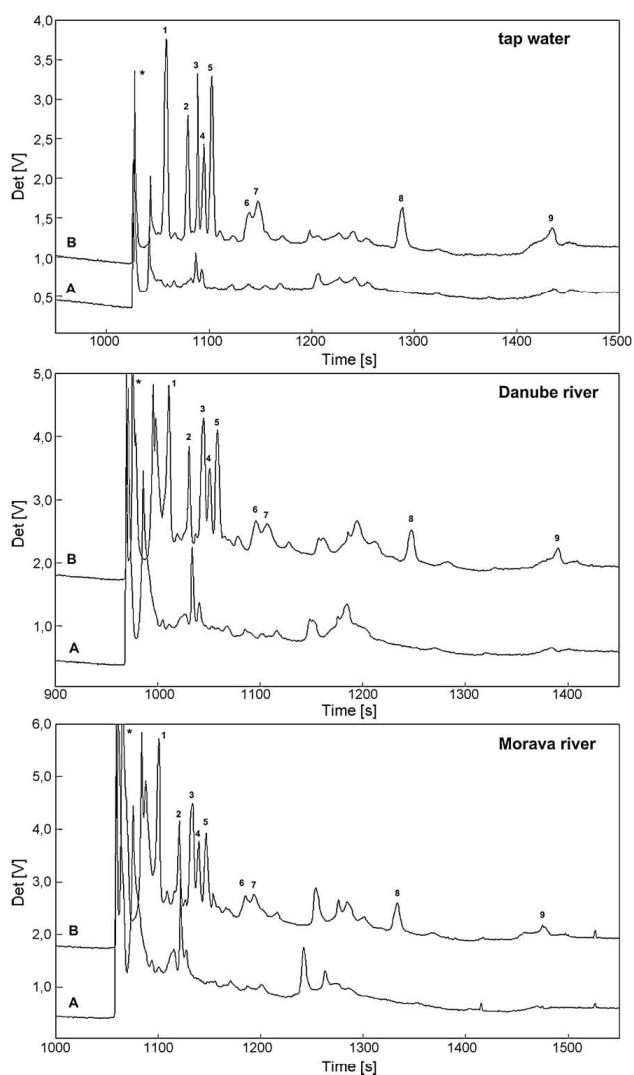
### 3.3. Real samples

The developed ITP-CZE method was applied to determination of BPs in spiked tap and river water samples. Sample pretreatment consisted only of filtration through  $0.45 \mu\text{m}$  membrane filter. As described above, column switching technique was used to remove main sample matrix constituents present in great excess regarding to concentration of spiked BPs, i.e., chloride, sulfate, nitrate, and carbonate ions in the case of river water samples. Above mentioned macroconstituents deteriorated the separation of BPs in CZE step if no removal of matrix macroconstituents was used after ITP step (data not shown).

Fig. 2 presents the analyses of three water samples, the blank runs are shown as the lower traces while the same samples spiked with BPs at  $2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  concentration level are shown as the upper traces. Poor quality of baseline under our separation conditions is caused by the presence of various very weak acids ( $\text{pK}_a$  values about 10) in the real sample at low concentration levels. These acids are also focused from the sample during the ITP stage and because of their lower effective mobilities than carbonate they are transferred from ITP step to CZE step. Therefore, peak areas of the analytes were corrected by subtracting the corresponding area of the blank. When analyzing water samples obtained from Danube and Morava rivers, no signal was observed in the positions of BPs, therefore, it is assumed that BPs are not present in these samples or their concentrations are below LOD.

In real sample analysis it is difficult to make the correction of analytes' peak areas by subtracting the corresponding area of the blank as it is impossible to obtain the blank sample. The composition of the sample could be varying depending on the sample location. The correct way for quantitative analysis should be the standard addition method.

When determining the recoveries from spiked samples, unsatisfactory results were obtained (Table 4). This can be explained



**Fig. 2.** Electropherograms of water sample blanks (A) and spiked samples (B) with spiked concentration  $2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  of BPs. Samples contained  $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  NTS to prevent adsorption of BPs on surfaces. For peak assignment, see Fig. 1. Peaks assigned by "\*" present impurities from sample and electrolyte system. Separation conditions are summarized in Table 2.

by the adsorption of BPs on the hydrophobic surfaces. It presents a significant problem because of FEP material used in the separation system. An addition of  $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  naphthalene-1,3,6-trisulfonic acid (NTS) to the sample was suggested in paper of Zelenský et al. [27] to prevent the adsorption of chromate on the same surface. NTS adsorbs preferentially onto surfaces during storage, injection, and separation avoiding greater losses of analytes during the separation process and improving their recoveries.

Therefore, we have used the same chemical constituent to prevent the adsorption of BPs present at very low concentration in our water samples. Improvements in recovery values are shown in Table 4. Low recovery values for pentabromophenol can be explained by potential decomposition due to a photodegradation [28] or by the higher affinity of pentabromophenol towards glass and FEP surfaces, respectively. Adsorption of brominated flame retardants was already reported by Thomsen et al. [29].

#### 4. Conclusions

An ITP–CZE method for determination of nine brominated phenols in water samples in automated electrophoretic analyzer provided with column-coupling technique and operating in hydrodynamically closed separation system was developed. Utilizing inherent on-line preconcentration capability of ITP low limits of detection in CZE stage with UV detector operating at 220 nm wavelength in order of tens of nanomols per liter were achieved within 22 min of analysis time. Good repeatability of migration times (less than 0.33% RSD) and good repeatability of peak areas (less than 7.19% RSD) at concentration level  $5 \times 10^{-8}$  mol L<sup>-1</sup> were observed.

Utilization of diode-array detector would improve ITP–CZE performance and flexibility of the detection by measuring absorbance at wavelength of absorption maximum of each BP. An additional information of peak spectra to identity confirmation would be useful, too.

Developed ITP–CZE method was successfully applied to determination of BPs in spiked tap and river water samples, even an adsorption of BPs caused decrease of recoveries of several BPs. Utilization of naphthalene-1,3,6-trisulfonic acid added to the sample improved recovery in most cases. ITP–CZE method can be easily used for BPs analysis on real water samples as it requires only filtration of the sample before run.

#### Acknowledgments

The authors are grateful to the Ministry of Education of the Czech Republic (grant no. 6198959216), to the Grant Agency of the Czech Republic (grant no. 203/07/P223), to the Slovak Research and Development Agency (project no. VVCE-0070-07) and the Slovak Grant Agency (grant no. 1/0882/09).

#### References

- [1] A. Covaci, S. Voorspoels, M.A.-E. Abdallah, T. Geens, S. Harrad, R.J. Law, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 346.
- [2] H. Hakk, R.J. Letcher, Environ. Int. 29 (2003) 801.
- [3] V.M. Da Silva, M.C. Da Cunha Veloso, A.S. De Oliveira, G.V. Santos, P.A. De, P. Pereira, J.B. De Andrade, Talanta 68 (2005) 323.
- [4] J.A. Dodge, Pure Appl. Chem. 70 (1998) 1725.
- [5] O.A. Ogunbayo, K.T. Jensen, F. Michelangeli, Biochim. Biophys. Acta 1768 (2007) 1559.
- [6] P. López, S.A. Brandsma, P.E.G. Leonards, J. De Boer, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 334.
- [7] U. Sellström, B. Jansson, Chemosphere 31 (1995) 3085.
- [8] S. Suzuki, A. Hasegawa, Anal. Sci. 22 (2006) 469.
- [9] M. Polo, M. Llompar, C. Garcia-Jares, G. Gomez-Noya, M.-H. BOLLAIN, R. Cela, J. Chromatogr. A 1124 (2006) 11.
- [10] S. Chu, G.D. Haffner, R.J. Letcher, J. Chromatogr. A 1097 (2005) 25.
- [11] H. Gallart Ayala, E. Moyano, M.T. Galceran, Rapid Commun. Mass Spectrom. 21 (2007) 4039.
- [12] H. Sambe, K. Hoshina, K. Hosoya, J. Haginaka, J. Chromatogr. A 1134 (2006) 16.
- [13] E. Blanco, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, J. Chromatogr. A 1068 (2005) 189.
- [14] E. Blanco, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, J. Chromatogr. A 1071 (2005) 205.
- [15] P. Praus, V. Dombek, Anal. Chim. Acta 281 (1993) 397.
- [16] P. Praus, Anal. Chim. Acta 302 (1995) 302.
- [17] J. Petr, V. Maier, J. Horáková, J. Ševčík, Z. Stránský, J. Sep. Sci. 29 (2006) 2705.
- [18] V. Hruška, B. Gaš, Electrophoresis 28 (2007) 3.
- [19] M. Urbánek, L. Křivánková, P. Boček, Electrophoresis 24 (2003) 466.
- [20] F.M. Everaerts, Th.P.E.M. Verheggen, F.E.P. Mikkers, J. Chromatogr. 169 (1979) 21.
- [21] D. Kaniánský, J. Marák, J. Chromatogr. 498 (1990) 191.
- [22] P. Mikuš, K. Maráková, J. Marák, D. Kaniánský, I. Valášková, E. Havránek, J. Chromatogr. A 1179 (2008) 9.
- [23] M. Nováková, L. Křivánková, Electrophoresis 29 (2008) 1694.
- [24] F. Kvasnička, M. Voldřich, J. Vyhnaněk, J. Chromatogr. A 1169 (2007) 239.
- [25] F. Kvasnička, Electrophoresis 28 (2008) 3581.
- [26] J. Šafa, M. Pospíšilová, J. Honegr, J. Spilková, J. Chromatogr. A 1171 (2007) 124.
- [27] I. Zelenský, V. Zelenská, D. Kaniánský, J. Chromatogr. 390 (1987) 111.
- [28] J. Eriksson, S. Rahm, N. Green, A. Bergman, E. Jakobsson, Chemosphere 54 (2004) 117.
- [29] C. Thomsen, H. Leknes, E. Lundanes, G. Becher, J. Chromatogr. A 923 (2001) 299.
- [30] D. de Lide (Editor-in-Chief), CRC Handbook of Chemistry and Physics, 85th ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, p. 8–47.