

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie



**SLEDOVÁNÍ ELEKTROCHEMICKÝCH OXIDAČNÍCH
PROCESŮ BROMOVANÝCH FENOLŮ V ON-LINE SPOJENÍ
S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce:

Bc. Lucie Kepová

Studijní obor:

Analytická chemie

Vedoucí diplomové práce:

Doc. RNDr. Petr Fryčák, Ph.D.

Olomouc 2015

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, 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

.....

Vlastnoruční podpis

Poděkování

Děkuji vedoucímu své diplomové práce doc. RNDr. Petru Fryčákovi, Ph.D. za odborné vedení při řešení této problematiky, cenné rady, trpělivost, připomínky a čas, které mi během psaní diplomové práce poskytl. Dále bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Davidu Jirovskému, Ph.D. a Mgr. Danielu Rimanovi za pomoc při zpracování a provádění experimentální části diplomové práce.

Rovněž bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za jejich podporu po celou dobu mého studia.

SOUHRN

Tato diplomová práce je zaměřena na studium elektrochemické oxidace vybraných bromovaných fenolů (4-bromfenolu, 2,4-dibromfenolu, 2,6-dibromfenolu, 2,4,6-tribromfenolu a pentabromfenolu). Elektrochemické chování bylo studováno pomocí on-line spojení elektrochemie s hmotnostním spektrometrem za použití coulometrické cely s porézní grafitovou elektrodou.

Teoretická část je rozdělena do dvou hlavních kapitol, z nichž první podává stručný popis metody EC-MS, přehled typů elektrochemických cel a elektroaktivních funkčních skupin. Druhá z kapitol uvádí informace o jednotlivých bromovaných fenolech. Jejich vlastnosti, výskyt, toxicitu a využití.

Experimentální část se zabývá především identifikací možných produktů elektrochemické oxidace. Identifikace produktů byla hlavním cílem této práce. Dále byla sledována eluční závislost. U všech zkoumaných látek docházelo k sorpci oxidačních produktů na elektrodě. Byl studován vliv složení nosné kapaliny na elektrochemickou oxidaci, kde nosné kapaliny s obsahem sodných iontů byly pro tento experiment nevhovující a u kapalin s obsahem amonných iontů byly nalezeny nitroderiváty.

SUMMARY

This thesis is focused on the study of electrochemical oxidation of selected bromophenols (4-bromophenol, 2,4-dibromophenol, 2,6-dibromophenol, 2,4,6-tribromophenol and pentabromophenol). Electrochemical behaviour was studied by on-line connection of electrochemistry and mass spectrometry using coulometric cell with porous graphite electrode.

The theoretical part is divided into two main chapters, the first gives a brief description of the EC-MS methods, types of electrochemical cells and electroactive functional groups. The second chapter presents information about bromophenols. Their qualities, occurrence, toxicity and use.

The experimental part deals with an identification of possible structural formulas of electrochemical oxidation. Identification of these products was the main goal of the thesis. The next thing observed was monitoring of dependence of elution. Sorption of oxidation products on the electrode occurred for all the compounds. The next thing studied was an influence of solvent composition on electrochemical oxidation, wherein the carrier fluid containing the sodium ions was unsuitable for this experiment and some nitroderivatives, containing ammonium ions, were found in the carrier fluid.

OBSAH

1. ÚVOD	1
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	2
2.1. ON-LINE SPOJENÍ ELEKTROCHEMIE S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ...2	
2.1.1. EC-ESI-MS.....	2
2.1.2. Elektrochemické cely	3
2.1.2.1. Retence v průtokové elektrochemické cele	3
2.1.2.2. Coulometrické cely	4
2.1.2.3. Amperometrické cely	7
2.1.3. Elektrochemická oxidace.....	10
2.1.4. Elektroaktivní funkční skupiny sloučenin	11
2.1.5. Aplikace EC-MS	12
2.2. VYBRANÉ DERIVÁTY BROMFENOLŮ	14
2.2.1. 4-bromfenol	14
2.2.1.1. Charakteristika a vlastnosti	14
2.2.1.2. Toxicita.....	15
2.2.1.3. Příprava	15
2.2.1.4. Výskyt	15
2.2.1.5. Využití.....	16
2.2.2. 2,4-dibromfenol	16
2.2.2.1. Charakteristika a vlastnosti	16
2.2.2.2. Toxicita.....	16
2.2.2.3. Výskyt	16
2.2.2.4. Využití.....	17
2.2.3. 2,6-dibromfenol	17
2.2.3.1. Charakteristika a vlastnosti	17
2.2.3.2. Toxicita.....	17
2.2.3.3. Výskyt	17
2.2.3.4. Využití.....	18
2.2.4. 2,4,6-tribromfenol.....	18
2.2.4.1. Charakteristika a vlastnosti	18

2.2.4.2.	Toxicita.....	18
2.2.4.3.	Příprava a výroba	19
2.2.4.4.	Výskyt	19
2.2.4.5.	Využití.....	20
2.2.5.	Pentabromfenol.....	20
2.2.5.1.	Charakteristika a vlastnosti	20
2.2.5.2.	Toxicita.....	20
2.2.5.3.	Výroba.....	21
2.2.5.4.	Výskyt	21
2.2.5.5.	Využití.....	21
3.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	22
3.1.	LABORATORNÍ PŘÍSTROJE	22
3.2.	CHEMIKÁLIE.....	23
3.3.	PRACOVNÍ POSTUP	23
3.2.1.	Příprava standardů	23
3.2.2.	Parametry iontového zdroje.....	23
4.	VÝSLEDKY A DISKUZE	24
4.1.	IDENTIFIKACE OXIDAČNÍCH PRODUKTŮ.....	24
4.1.1.	4-bromfenol	24
4.1.2.	2,4-dibromfenol	32
4.1.3.	2,6-dibromfenol	37
4.1.4.	2,4,6-tribromfenol.....	43
4.1.5.	Pentabromfenol.....	46
4.2.	ELUČNÍ PROFIL	48
4.3.	VLIV SLOŽENÍ NOSNÉ KAPALINY NA ELEKTROCHEMICKOU OXIDACI	50
5.	ZÁVĚR.....	53
6.	LITERATURA.....	54
7.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	59
8.	SEZNAM OBRÁZKŮ	61

9. SEZNAM TABULEK.....	63
------------------------	----

1. ÚVOD

Bromované fenoly představují široce užívanou skupinu látek zpomalující hoření. Používají se v nejrůznějších odvětvích od zpomalovačů hoření po elektroniku, textil nebo k ochraně dřeva. Jejich přítomnost není způsobena pouze antropogenními vlivy, ale jsou produkovány také mořskými organismy, především řasami. Bromfenoly se v přírodě akumulují, jsou toxické a špatně odbouratelné. Vzhledem k jejich rostoucímu užívání, a s tím souvisejícího znečištění životního prostředí stoupá zájem o vývoj nových technologií vedoucích k analýze a odbourání těchto organických polutantů. V analýze se nejčastěji uplatňuje plynová a kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem.

V odborné literatuře můžeme najít dostatečné množství publikací zabývajících se oxidačními přeměnami bromovaných fenolů, zvláště těch, které se využívají jako zpomalovače hoření. Avšak publikací věnující se oxidaci a strukturnímu složení produktů je velmi málo.

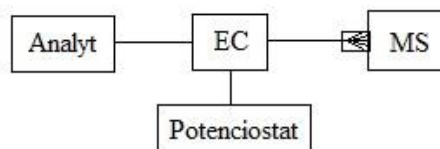
Cílem této práce je identifikovat strukturní složení produktů po předchozí oxidaci v elektrochemické cele vybraných bromovaných fenolů, konkrétně 4-bromfenolu, 2,4-dibromfenolu, 2,6-dibromfenolu, 2,4,6-tribromfenolu a pentabromfenolu. Elektrochemické chování bylo studováno pomocí on-line spojení elektrochemie s hmotnostním spektrometrem. Tato technika má široké uplatnění v různých analytických oblastech a hodí se pro studování reakčních mechanismů a k identifikaci produktů nebo meziproductů.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. ON-LINE SPOJENÍ ELEKTROCHEMIE S HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIÍ

On-line spojení elektrochemie s hmotnostní spektrometrií je poměrně nová analytická technika, která se rozšířila během posledních deseti let. Tato technika má široké uplatnění v různých analytických oblastech zahrnující on-line elektrochemickou derivatizaci pro zvýšení selektivity MS, studii reakčních mechanismů, in-vitro napodobování metabolických procesů v živých organismech a specifické štěpení proteinů nebo peptidů. On-line uspořádání (Obr. 1) je výhodné pokud chceme identifikovat labilní produkty nebo meziprodukty s krátkou životností.^{1, 2, 3, 4, 5}

Detekce pomocí MS nejen poskytuje mnohem více informací než samotná elektrochemie, ale také eliminuje její negativní vlastnosti. Kvantifikace se provádí na základě integrace hmotnostně-spektrometrických signálů namísto měření proudů, čímž se můžeme vyvarovat nestability základní linie. Jedno z nejdůležitějších analytických hledisek EC-MS je také možnost spojení s vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC).^{2, 4, 6}



Obr. 1: On-line zapojení EC-MS

2.1.1. EC-ESI-MS

Mezi nejvýznamnější studie patří přímé spojení konvenční elektrochemické cely s hmotnostní spektrometrií, kdy je analyt zaveden do iontového zdroje hmotnostního spektrometru. Elektrosprejová ionizační technika (ESI) se řadí mezi nejvhodnější techniky, která je velmi kompatibilní s elektrochemií. Ionty jsou v ESI převedeny z elektrolytu do plynné fáze pouze se slabou a jemnou fragmentací v důsledku procesu známého

jako coulombická exploze, na rozdíl od ionizace elektronem (EI) nebo jiné tvrdé ionizační techniky.^{1,2,7}

Vzhledem k tomu, že reakce probíhající v ESI jsou spojené s přenosem náboje, měla by mobilní fáze obsahovat některé těkavé složky pufry, podobné těm, které se běžně používají v EC-LC. Elektrolyty přítomné v mobilní fázi potlačují citlivost ESI-MS, zatímco těkavé organické modifikátory jako je methanol nebo acetonitril selektivitu zvyšují. Nedílnou součástí ESI techniky jsou také některá omezení, např.: klesající účinnost emise iontů se zvyšujícím se průtokem mobilní fáze. Maximální účinnosti je dosaženo při průtoku 10-100 nl/min. Nízká koncentrace elektrolytu a nízká vodivost mobilní fáze má za následek pokles odezvy elektrody, což vede ke snížení účinnosti elektrodové reakce.^{1,2,7}

2.1.2. Elektrochemické cely

Elektrochemická cely vystupuje jako elektrochemický reaktor. Většina běžných elektrochemických cel se skládá ze tří elektrod; z pracovní, referentní a pomocné elektrody. Mezi pomocnou a pracovní elektrodou se nachází oxidační potenciál. Nestabilní potenciál vznikající na pomocné elektrodě kvůli polarizačnímu efektu je kompenzován referentní elektrodou založenou na Pd/H₂. Jestliže aplikujeme on-line elektrochemickou oxidaci, při které jsou látky přeměněny na aktivnější produkty, mohou být citlivě detekovány i sloučeniny, které jsou běžně v MS neaktivní.^{1, 6, 8, 9, 10}

2.1.2.1. Retence v průtokové elektrochemické cele

Mnoho částic rozpuštěných v roztoku má tendenci adsorbovat se na povrch elektrody. V průtokové elektrochemické cele povede adsorpce na povrchu elektrody k zadržování analytu a ke zpoždění příchodu látky do hmotnostního spektrometru. Adsorpce závisí na typu zkoumané sloučeniny, složení rozpouštědla, materiálu elektrody a vkládaném potenciálu na pracovní elektrodu. V důsledku elektrostatických interakcí se budou negativně nabitě částice adsorbovat při pozitivních potenciálech a pozitivně nabitě částice při negativních potenciálech.^{11, 12}

Neutrální organické molekuly ve vodném roztoku interagují s elektrodou díky hydrofobním interakcím a adsorpci na pracovní elektrodě. Tento jev je zřetelný především u organických sloučenin s nepolárními skupinami, tedy s nízkou rozpustností ve vodě. Během vkládání pozitivního nebo negativního potenciálu jsou dipóly okolních molekul vody přitahovány k elektrodě a vytěsněny neutrálními organickými molekulami na povrchu. Adsorpce na pracovní elektrodě v čistém vodném roztoku může být způsobena retencí v elektrochemické průtokové cele. Neutrální roztok je méně náchylný k adsorpci přidáním organického modifikátoru, např. acetonitrilu.¹¹

2.1.2.2. Coulometrické cely

V coulometrii dochází k úplné elektrochemické konverzi analytu, kde je stálý proud závislý na průtokové rychlosti. Zvýšením průtoku bude vzrůstat výška píku, ale plocha píku zůstane konstantní. Coulometrická detekce je tedy absolutní metoda poskytující přímou kvantifikaci dle Faradayova zákona. Při průchodu analytu skrz elektrochemickou celu, klesá jeho koncentrace s časem podle kinetiky prvního řádu.¹³

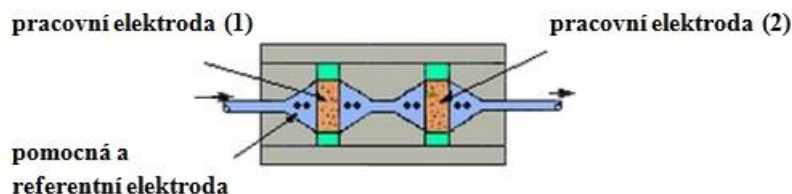
U coulometrických detektorů nastává problém, pokud jsou v eluátu přítomny pevné částice. Tyto částice způsobují vzrůst tlaku v systému. Výhoda naopak spočívá v možnosti zapojení více coulometrických cel v sérii za sebou.^{13, 16}

1) Coulometrické dvouelektrodové cely

Elektrochemické coulometrické cely patentovány ESA (*environmental science associates*) jsou nízkoobjemové analytické cely, skládající se ze dvou pracovních elektrod s velkým povrchem, čtyř pomocných a čtyř referentních elektrod. Velký povrch umožňuje při malém průtoku (<100 µl/min) vysokou elektrochemickou konverzi. Při vyšších průtocích účinnost konverze klesá dolů. První (testovací) elektroda slouží k odstranění interferujících sloučenin, druhá (analytická) elektroda slouží k detekci. Cely jsou téměř bezúdržbové a její čištění spočívá pouze v proplachování vodným nebo organickým rozpouštědlem. Nicméně může dojít k adsorpci nečistot na povrchu elektrody, které se musí odstranit manuálním čištěním.^{8, 11, 13, 18, 17}

- **Model 5010** (*Standard Analytical Cell*)

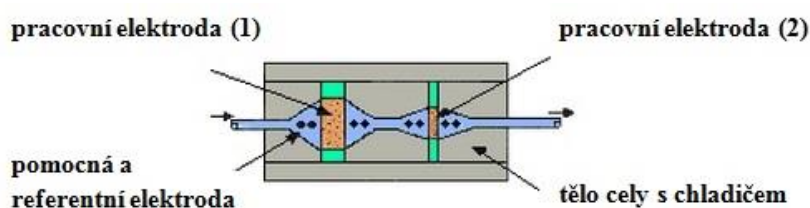
Coulometrická dvoukomorová cela Model 5010 (Obr. 2) je vyrobena z nerezové oceli. Uvnitř každé komory se nachází porézní grafitová elektroda se dvěma pomocnými a referentními elektrodami. Tato cela poskytuje vynikající stabilitu, reprodukovatelnost a velký povrch elektrod dovoluje dlouhodobý provoz bez poklesu signálu.^{13, 17, 18}



Obr. 2: Coulometrická cela ESA Model 5010A (*Standard Analytical Cell*)¹⁸

- **Model 5011** (*High Sensitivity Analytical Cell*)

Model 5011 coulometrické cely (Obr. 3) obsahuje dvě průtokové porézní grafitové elektrody v sérii za sebou. Každá z grafitových elektrod má dvě pomocné a dvě referentní elektrody. Menší povrch druhé pracovní elektrody vede ke zlepšení poměru signál/šum. Jedinečná kombinace uspořádání této cely zvyšuje odezvu a poskytuje nejvyšší citlivost, selektivitu a stabilitu.^{11, 13, 18}



Obr. 3: Coulometrická cela ESA Model 5011A (*High Sensitivity Analytical Cell*)¹⁸

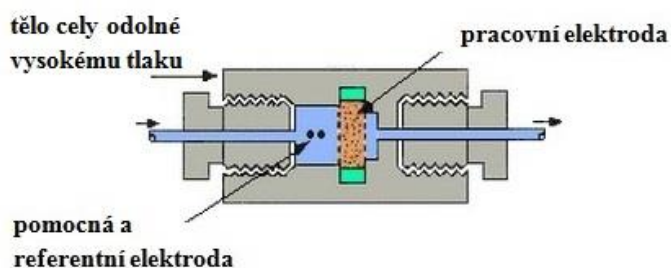
2) Coulometrické jednoelektrodové cely

Jednoelektrodové coulometrické cely jsou sestaveny stejným způsobem jako dvoelektrodové cely s rozdílem, že obsahují pouze jednu porézní pracovní elektrodu

s velkým povrchem a jsou konstruovány tak, aby vydržely vysoký tlak. Odolnost proti vysokému tlaku umožňuje připojení cely před HPLC kolonu, což je u některých aplikací velmi užitečné.¹¹

- **Model 5020 (Guard Cell)**

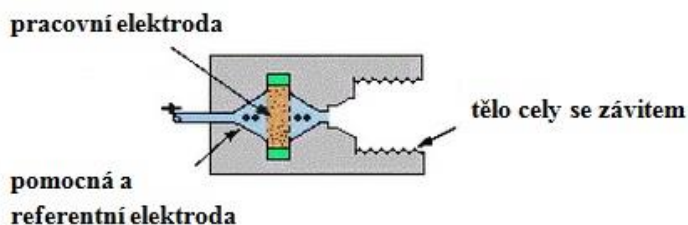
Coulometrická cela Model 5020 (Obr. 4) odolná proti vysokému tlaku obsahuje jednu porézní grafitovou elektrodu s velkým povrchem, tzn. pracovní elektrodu, s jednou pomocnou a referentní elektrodou. Porézní grafitová elektroda odstraňuje nečistoty z mobilní fáze, což vede ke snížení pozadí a k poklesu základního šumu.¹⁸



Obr. 4: Coulometrická cela ESA Model 5020 (Guard Cell)¹⁸

- **Model 5021 (Conditioning Cell)**

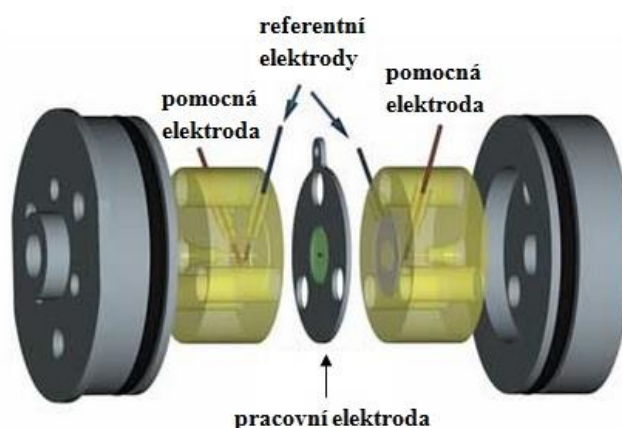
Model 5021 (Obr. 5), vyroben z nerezové oceli, se skládá z porézní grafitové elektrody se dvěma pomocnými a referentními elektrodami. Cella je navržena tak, že analyty mohou být oxidovány nebo redukovány ještě před detekcí v analytické cele. Interferující sloučeniny mohou být také oxidovány při nižších potenciálech. Toto uspořádání cely umožňuje mimořádně selektivní analýzu.^{13, 18}



Obr. 5: Coulometrická cela ESA Model 5021 (Conditioning Cell)¹⁸

- **Model 5030 (Cell)**

Model 5030 (Obr. 6) využívá osvědčenou grafitovou porézní konstrukci s nízkým průtokem (250 $\mu\text{l}/\text{min}$ nebo méně). Díky tomu je tato celda ideálně optimalizována pro začlenění do systému MS, MS-MS a LC-MS jako reaktor ke zvýšení ionizace analytu nebo k poskytnutí dat týkající se vývoje léčiv. Cella je v podstatě bezúdržbová, nevyžaduje žádné speciální roztoky pro vyplnění nebo leštění. Kombinace cely s hmotnostním spektrometrem zvyšuje citlivost, zlepšuje ionizaci a signál obtížně ionizovatelných molekul (arylaminů, fenolů, katecholů a dalších oxidovatelných molekul).¹⁸



Obr. 6: Coulometrická cela ESA Model 5030 (Cell)¹⁸

2.1.2.3. Amperometrické cely

Elektrochemická amperometrická cela obsahuje pracovní elektrodu s rovinným povrchem, kde probíhá elektrochemická konverze. Povrch elektrody je adsorpčními procesy méně ovlivněn a může být čištěn i manuálně. Abychom dospěli vysoké elektrochemické konverze, musí být ve srovnání s coulometrickou průtokovou celou užitá nízká průtoková rychlost ($\sim 10 \mu\text{l}/\text{min}$). Proto tyto cely mohou být jen stěží použity ve spojení s HPLC. Používají se zejména v experimentech dávkovaných off-line. Výhodou je možnost užití různých materiálů pracovních elektrod. Například platinové elektrody vykazují nižší adsorpci oproti skleněným uhlíkovým elektrodám a diamantové elektrody dopované borem jsou zase vysoce odolné vůči chemikáliím a nabízí větší rozsah oxidačních potenciálů.^{8, 16}

1) Amperometrické cely typu „thin-layer“

U amperometrické cely typu thin-layer vstupuje eluát do cely prostřednictvím mikroportu a proudí skrz úzký kanál do plastového těsnění nad pevnou pracovní elektrodou. Tok dále pokračuje kolem referentní a pomocné elektrody. Tělo cely je tvořeno ze dvou pevných bloků, kde jeden z nich obsahuje vestavěný disk nebo krátkou tyč z elektrodového materiálu. První blok, kde se nachází pracovní elektroda, je konstruován z inertního materiálu polytetrafluorethylenu (PTFE) nebo polychlorotrifluoroethylenu (Kel-F). Druhý blok tvořící pomocnou elektrodu je vyroben z nerezové oceli. Oba bloky jsou odděleny tenkým těsněním z PTFE, které slouží jako vymezovací vložka okolo pracovní elektrody.¹³

Cela thin-layer by měla splňovat pro maximální citlivost následující body:

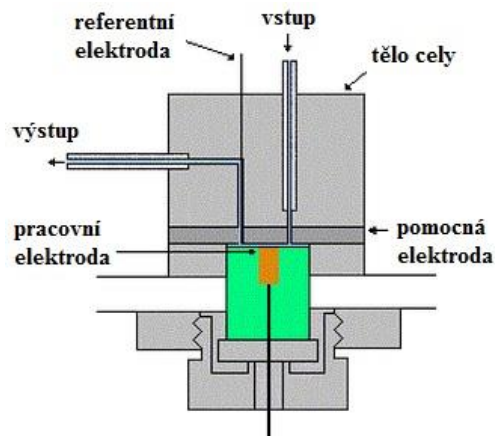
- maximalizace povrchu elektrody,
- použití co nejtenčího těsnění,
- provoz při vysokém průtoku.

V praxi jsou tyto parametry kvůli zvýšení pozadí proudu omezeny. Plocha elektrody má běžně 15-20 mm², těsnění 20-100 μm, které poskytuje objem cely menší než 1 μl. Průtoková rychlost činí cca 1 ml/min.^{13, 16}

Mezi výhody patří nízké náklady na konstrukci cely, snadná demontáž pro údržbu (zejména leštění pracovní elektrody), možnost použití různých materiálů elektrod, rychlá odezva a snadno nastavitelný objem cely. Nevýhodou je malý povrch elektrody, malé procento elektrochemické konverze analytu (do 10%) a neschopnost odolávat zpětnému tlaku při sériovém zapojení s dalšími detektory.^{13, 16}

- **Model 5040** (*Analytical cell*)

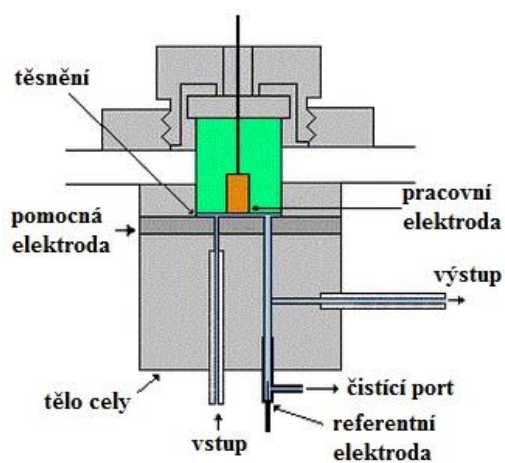
Model 5040 (Obr. 7) je určen k použití různých elektrodových materiálů (Au, Ag, Pt a skelný uhlík). Cela je užitečná především pro aplikace pulzní amperometrické detekce sacharidů, alifatických hydroxylových skupin a acetylcholinu.^{13, 18}



Obr. 7: Amperometrická cela ESA Model 5040 (Analytical cell)¹⁸

- **Model 5041** (Enhanced Microbore analytical cell)

Model 5041 (Obr. 8) je určen pro extrémně nízké objemy. Cella je navržena pro použití v situacích „microbore“, které vyžadují maximální citlivost.¹⁸



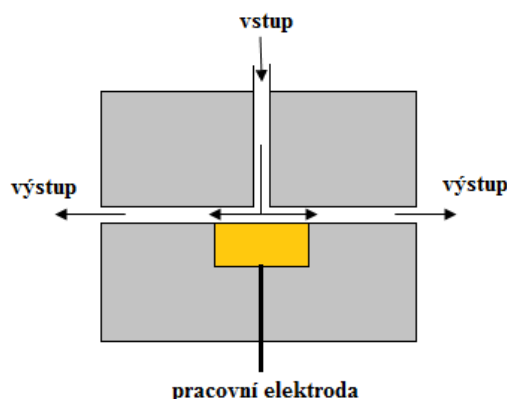
Obr. 8: Amperometrická cela ESA Model 5041 (Enhanced Microbore analytical cell)¹⁸

2) Amperometrické cely typu „wall-jet“

U typu wall-jet (Obr. 9) eluát vstupuje do cely malým otvorem a dopadá jako tryska kolmo na čelní stěnu pracovní elektrody, kde poté proudí radiálně po povrchu. V místě, kde dopadá tryska na povrch elektrody, by nemělo dojít k omezení radiálního toku eluátu.

Musí se zároveň předpokládat, že se tryska před dopadem na elektrodu nerozbije. Průzkumy prokázaly, že tryska zůstane neporušená na vzdálenost až 10 mm. Povrch elektrody je udržován v čistotě díky vysoké rychlosti proudění eluátu.^{13, 14, 15, 16, 19}

Signál je závislý na velikosti elektrody a průměru trysky. Elektroda by měla být alespoň 10x větší než je průměr trysky. Velmi důležitá je také vysoká průtoková rychlost.^{13, 15, 16}



Obr. 9: Amperometrická cela typu „wall-jet“

2.1.3. Elektrochemická oxidace

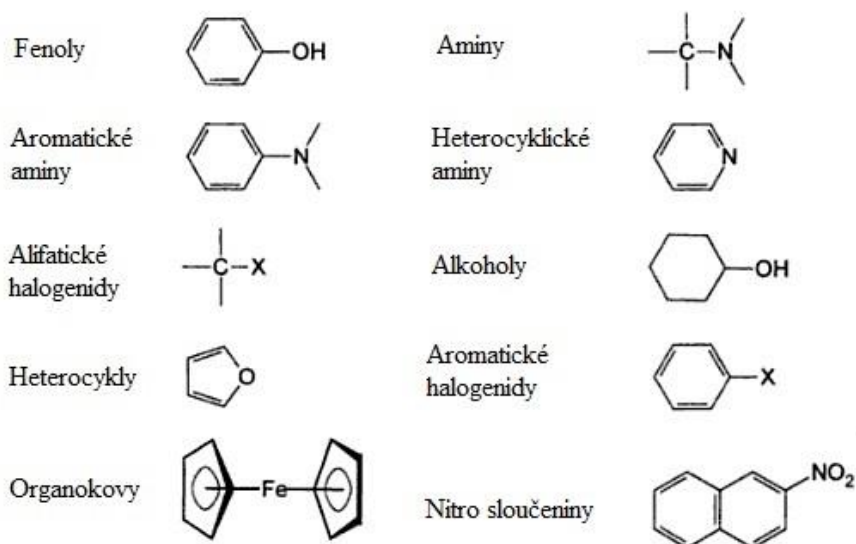
Elektrochemická oxidace musí být pečlivě optimalizována pro každou aplikaci, zejména pokud se jedná o oxidační potenciál látek, pufovací systém, průtokovou rychlost v elektrochemické cele a typ elektrochemické cely. U coulometrických průtokových cel dochází často k adsorpci nepolárních sloučenin na povrchu porézní grafitové elektrody. Z tohoto důvodu jsou vhodnější amperometrické cely, kde je na výběr z mnoha materiálů pracovních elektrod. U tlumivého roztoku sloužícího jako elektrolyt, je obzvlášť důležitá definovaná hodnota pH vztahující se k pH závislosti Pd/H₂ referentní elektrody. Pro většinu aplikací je pufovací systém nastaven na fyziologické pH = 7,4. Jak již bylo dříve zmíněno, průtoková rychlost v elektrochemické cele ovlivňuje míru konverze. Snížení průtokové rychlosti zvyšuje konverzi, nicméně s příliš nízkými průtoky může docházet k adsorpci na povrchu pracovní elektrody.⁸

Nejllepší způsob optimalizace oxidačního potenciálu je záznam z „hmotnostního voltamogramu“, tzn., že výstup z elektrochemické cely je přímo veden do ionizačního zdroje

hmotnostního spektrometru. Analyt je kontinuálně pumpován přes elektrochemickou celu a potenciál pracovní elektrody se nachází v požadovaném rozsahu. Spektra z hmotnostního voltamogramu jsou zaznamenána v závislosti na elektrochemickém potenciálu a poskytují náhled na oxidační chování léčiv.⁸

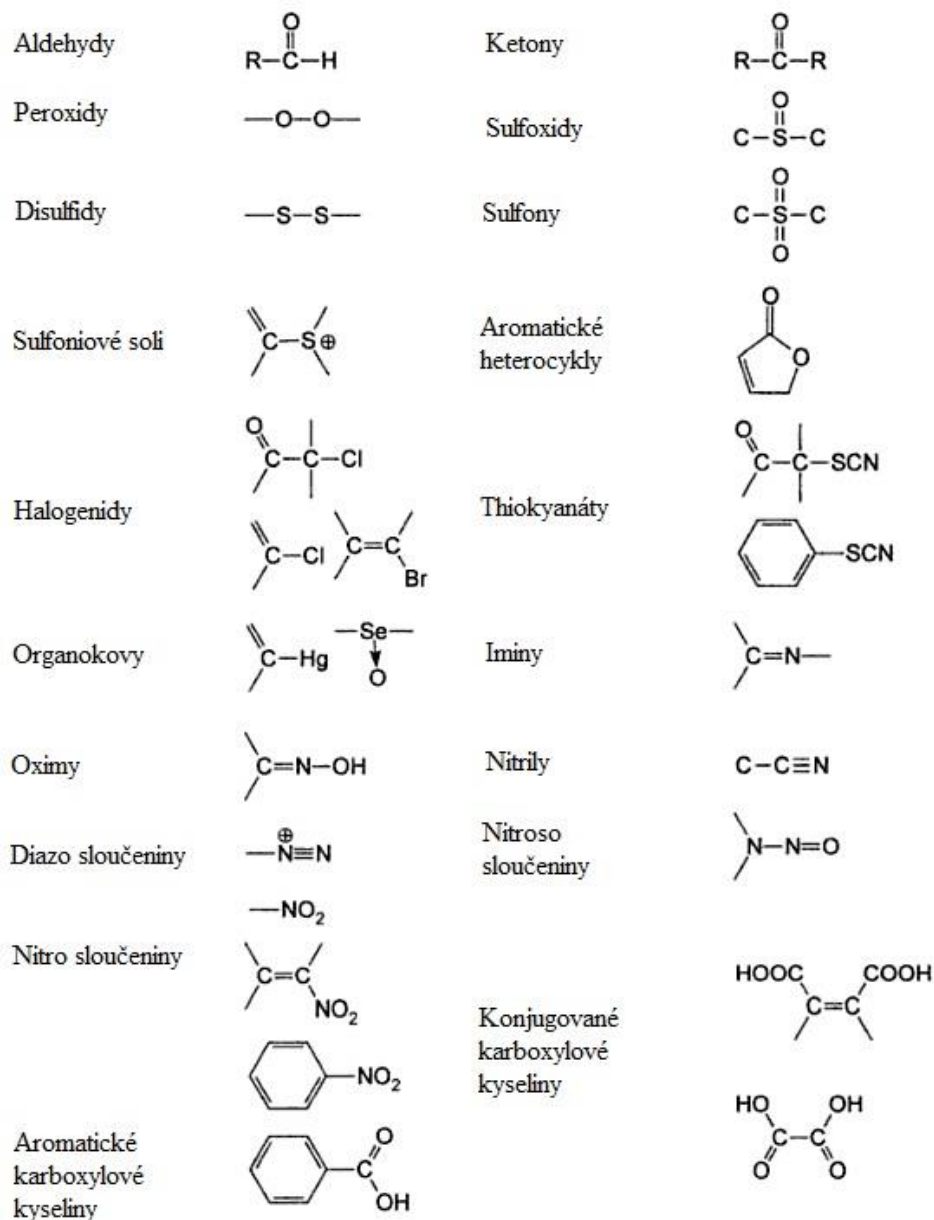
2.1.4. Elektroaktivní funkční skupiny sloučenin

V elektrochemii jsou funkční skupiny spojovány nejčastěji s oxidací nebo jejich redukcí. Při dostatečně vysokých potenciálech bude většina funkčních skupin vykazovat určitý stupeň elektroaktivity. U elektrochemických metod je zapotřebí pro analytické účely užít mírných potenciálů, za kterých probíhá oxidace nebo redukce jen některých skupin, viz Obr. 10 a Obr. 11).¹³



Obr. 10: Elektro-oxidovatelné funkční skupiny¹³

Elektrochemicky aktivní sloučeniny jsou aromáty obsahující hydroxylovou (fenoly), methoxylovou nebo amino skupinu, dále alifatické sloučeniny, zejména thioly a aminy. Pro kvantitativní analýzu je třeba znát počet elektronů potřebný k přeměně funkční skupiny. Redukce aldehydu na alkoholy je například dvouelektronový proces, ale redukce nitro na amino skupinu vyžaduje 6 elektronů. Tyto rozdíly se odráží v rozsahu užitého proudu.¹³



Obr. 11: Elektro-redukovatelné funkční skupiny¹³

2.1.5. Aplikace EC-MS

Elektrochemie nabízí zajímavé perspektivy nejen pro přímou detekci reaktivních metabolitů, ale také pro identifikaci jejich proteinových aduktů. Reaktivní metabolity mohou kovalentně modifikovat proteiny, což má za následek vyvolání vedlejších účinků léčiv. Identifikace těchto kovalentně modifikovaných proteinů v komplexní biologické směsi je poměrně pracná, avšak užitím metody např. EC-LC-MS mohou být tyto adukty snadno

generovány, takže můžeme identifikovat vazebné místo v proteinu. EC je vhodná také pro syntézu metabolitů léčiv, které byly použity jako referenční látka ve screeningových procesech pro kontrolu dopingů. Proto metoda nachází využití především ve farmaceutickém průmyslu.^{8, 20, 21, 22}

2.2. VYBRANÉ DERIVÁTY BROMFENOLŮ

Bromované fenoly představují široce užívanou skupinu látek zpomalující hoření (tzv. retardátory hoření), díky jejich nízké ceně a vysoké účinnosti. Tyto látky se přidávají do polymerních matric za účelem inhibice nebo potlačení spalovacího procesu.^{23, 24, 25, 26, 60}

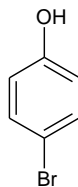
Existuje přibližně 70 druhů bromovaných retardátorů hoření a obvykle obsahují 50-80% bromu. Používají se jak ve vnitřních, tak venkovních produktech včetně televize, počítače, mikrovlnné trouby, kopírovacích strojů, potrubí, konstrukčních materiálech, textilu a nábytku, kde tvoří 5-30% výrobku. Účelem je omezení vzniku požáru, ztrát na životech a škod majetku. Poptávka po bromovaných zpomalovačů hoření neustále roste. Ročně se vyrábí více než 200 000 tun po celém světě.^{23, 24, 25, 26, 27, 28, 60}

Při stanovení se uplatňuje plynová a kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem, nebo UV detekcí v případě kapalinové chromatografie. Dále se uplatňují elektromigrační techniky (např. kapilární zónová elektroforéza) a elektrochemie. Vzhledem k rostoucímu užívání bromfenolů, a s tím souvisejícího znečištění životního prostředí stoupá zájem o vývoj technologií vedoucích k odbourání těchto organických polutantů.^{28, 29, 30, 31, 32, 33, 52}

2.2.1. 4-bromfenol

2.2.1.1. Charakteristika a vlastnosti

4-bromfenol, známý také jako p-bromfenol nebo p-bromhydroxybenzen (Obr. 12), je za normálních teplot a tlaků stabilní, světle béžový až narůžovělý krystalický prášek (20°C) charakteristického zápachu, typického pro fenoly. Sumární vzorec 4-BP je C_6H_5OBr a molekulová hmotnost 173,01. Teplota varu 235-236°C, teplota tání 64-68°C, hustota 1,84 g/cm³. Rozpustnost ve vodě při 25°C je 25 g/l. Dále je rozpustný v alkoholech, chloroformu, etheru a ledové kyselině octové. S oxidačními činidly, chloridy a anhydridy kyselin je velmi reaktivní. Při rozkladu 4-BP dochází ke vzniku nebezpečných produktů (CO, CO₂ a halogenovaných sloučenin, např. HBr).^{34, 35, 36, 58}



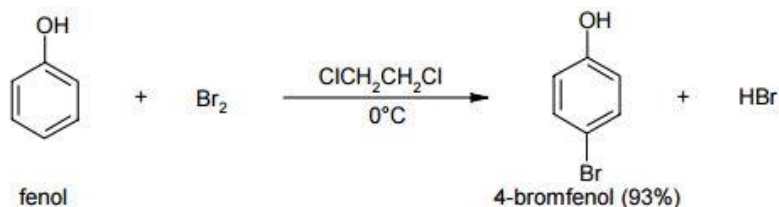
Obr. 12: Strukturní vzorec 4-bromfenolu

2.2.1.2. Toxicita

Toxický 4-BP se řadí mezi možné karcinogeny. Letální dávka LD₅₀ v orálním podání činí 523 mg/kg, v intraperitoneálním podání 411 mg/kg. Toxicita i karcinogenita byla zkoumána na myších. Tato látka je toxická i pro vodní organismy, letální koncentrace EC₅₀ činí 0,41-0,47 mg/l a může způsobit dlouhodobé nepříznivé účinky na vodní prostředí.^{34, 35, 36}

2.2.1.3. Příprava

Aromatickou elektrofilní substitucí, konkrétně bromací fenolu, lze připravit 4-bromfenol (Obr. 13). Reakce probíhá v nepolárním rozpouštědle (1,2-chlorethan) při 0°C, kdy dochází ke vzniku monosubstituovaného produktu. Substituce probíhá přednostně do para polohy.³⁷



Obr. 13: Příprava 4-bromfenolu³⁷

2.2.1.4. Výskyt

4-bromfenol se vyskytuje ve vodě, kde je produkován mořskými řasami jako metabolit. Výskyt ve vodě je spojen s výskytem v mořských plodech (ryby, kraby, krevety), kde má ve vysoké koncentraci nežádoucí vliv na kvalitu masa a chuť mořských plodů. V nízkých koncentracích (ng/g) specifickou chuť masa vylepšuje. Usazuje se v sedimentech a půdě, kde se hromadí. Bromfenoly nejsou snadno biologicky rozložitelné a proto v životním prostředí přetrvávají.^{23, 47, 48, 49, 50, 51}

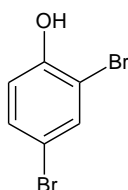
2.2.1.5. *Využití*

Využití 4-BP spočívá především v organické syntéze, farmaceutickém průmyslu, medicíně a uplatňuje se také jako pesticid.³⁸

2.2.2. 2,4-dibromfenol

2.2.2.1. *Charakteristika a vlastnosti*

2,4-dibromfenol (Obr. 14) je za normálních podmínek bílý až béžový krystalický prášek mající silný fenolický zápach. Sumární vzorec se skládá z $C_6H_4OBr_2$ s molekulovou hmotností 251,91, teplotou varu 154 °C a teplotou tání cca 40 °C. Ve vodě je 2,4-DBP jen mírně rozpustný, dobře se rozpouští v methanolu. Se silnými oxidačními činidly a bázemi je neslučitelný, dále je zapotřebí se vyvarovat použití hliníku, mědi a mosazi při skladování. Během rozkladu vznikají toxické výpary CO, CO₂ a HBr.^{39, 40, 41, 42}



Obr. 14: *Strukturní vzorec 2,4-dibromfenolu*

2.2.2.2. *Toxicita*

Toxicita 2,4-DBP byla testována na myších, krysách a králících. Akutní orální toxicita LD₅₀ u myši je 282 mg/kg, u krys 50 mg/kg. Letální dávka LD₅₀ v intraperitoneálním podání u myši činí 160 mg/kg a v dermálním podání u králíků >2000 mg/kg.⁴⁰

2.2.1.3. *Výskyt*

2,4-dibromfenol se vyskytuje ve vodě a říčních sedimentech, díky jeho produkci vodními živočichy. Maximální koncentrace v povrchové vodě je 40 µg/l. Nachází se v mořských plodech, kde ovlivňuje chuť a kvalitu masa v závislosti na koncentraci, izomeru a mořském prostředí. Do ovzduší se dostává spalováním halogenovaného odpadu a rašeliny (290 ng/m³).^{23, 47, 48, 49, 50, 51, 52}

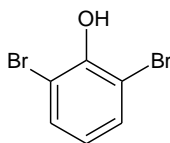
2.2.2.4. *Využití*

Stejně jako ostatní bromované fenoly, také 2,4-bromfenol nachází hlavní využití v organické syntéze. Používá se jako reaktivní meziproduct při výrobě epoxy-fenolického polymeru.⁴⁷

2.2.3. 2,6-dibromfenol

2.2.3.1. *Charakteristika a vlastnosti*

2,6-dibromfenol (Obr. 15) je pevná látka obsahující krystalky jehlicovitého tvaru bílé až béžové barvy s nepříjemným fenolickým zápachem. Sumární vzorec $C_6H_4OBr_2$ s molekulovou hmotností 251,91 má teplotou varu 256 °C a teplotou tání 56 °C. 2,6-DBP je rozpustný v methanolu, ethanolu, etheru, benzenu a vodě. Spalováním vznikají toxické produkty CO, CO₂ a halogenované sloučeniny.^{43, 44, 45}



Obr. 15: *Strukturní vzorec 2,6-dibromfenolu*

2.2.3.2. *Toxicita*

Informace o toxicitě 2,6-dibromfenolu nejsou prokázány.^{47, 50}

2.2.3.3. *Výskyt*

Přirozeně je 2,6-dibromfenol produkován vodními živočichy ve formě metabolitů. Vyskytuje se ve vodě a říčních sedimentech, kde je jeho maximální koncentrace 3 µg/l, avšak chlorace přírodních vod obsahující ionty bromidu může mít za následek tvorbu bromovaných fenolů a koncentrace v pitné vodě může dosahovat hodnot až 60 ng/l. Obecně platí, že koncentrace bromfenolů v pitné vodě jsou menší než 3 ng/l. Je přítomen v mořských plodech a oproti ostatním bromovaným fenolům má výraznější chuť i v nízkých koncentracích (chuťový práh je 0,5 ng/l).^{23, 28, 47, 48, 49, 50, 51, 53, 54}

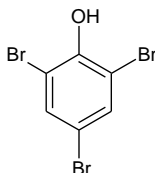
2.2.3.4. *Využití*

2,6-DBP se využívá v organické syntéze a k přípravě 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehydu a 3,5-dimethoxybenzaldehydu.⁴⁵

2.2.4. 2,4,6-tribromfenol

2.2.4.1. *Charakteristika a vlastnosti*

2,4,6-tribromfenol nebo také bromol (Obr. 16) je špinavě bílý až narůžovělý krystalický prášek pronikavého zápachu, charakteristického pro fenoly. Sumární vzorec 2,4,6-TBP je $C_6H_3OBr_3$ s molekulovou hmotností 330,80, teplotou varu 244°C, teplotou tání 94°C, relativní hustotou 2,55 g/cm³, hodnotou pK_a 5,97 a rozdělovacím koeficientem oktanol/voda log K_{OC}= 3,89. Rozpustnost ve vodě při 25°C je 59 mg/l. Dále je rozpustný v alkoholech, chloroformu, etheru, glycerinovém oleji, horkém benzenu, kyselině octové a alkalickém louhu. Bromol je velmi reaktivní s oxidačními činidly, chloridy a anhydridy kyselin a při rozkladu dochází ke vzniku nebezpečných produktů CO, CO₂ a HBr.^{46, 47, 55, 56, 57,}
58



Obr. 16: Strukturální vzorec 2,4,6-tribromfenolu

2.2.4.2. *Toxicita*

Toxický 2,4,6-TBP byl zkoumán u potkanů po jednorázové perorální dávce od 4,04 do 5,34 mg/kg. Tato látka je rychle absorbována z gastrointestinálního traktu. Převážná část radioaktivity se snadno vylučuje močí (77%) a 2-14% se vylučují výkaly. Akutní orální toxicita LD₅₀ u potkanů je menší než 2000 mg/kg. Při otravě potkanů byla pozorována snížená aktivita, slinění, křeče a třes. Letální dávka LD₅₀ v inhalační formě podání je větší než 1630 mg/m³, kdy potkani byly uzavřeni po dobu 4 hodin v dynamické vzduchové komoře. Příznaky toxicity se projevily sníženou motorikou, šilháním, dušností, zarudnutím a průjmem. Letální dávka LD₅₀ v dermálním podání byla testována na potkanech a králících, kdy nebyly zjištěny žádné úmrtí ani známky toxicity, proto se LD₅₀ u potkanů

odhaduje na větší než 2000 mg/kg a u králíků větší než 8000 mg/kg. Látka je toxická i pro vodní organismy, letální koncentrace EC₅₀ je 0,26-1,6 mg/l v závislosti na druhu vodního organismu (řasy, bezobratlí, ryby).^{46, 47, 56, 57}

2.2.4.3. Příprava a výroba

Obdobně jako u 4-bromfenolu můžeme připravit 2,4,6-TBP aromatickou elektrofilní substitucí (bromací fenolu) (Obr. 17). Reakci probíhající v polárním rozpouštědle (voda) je obtížné zastavit. K substituci dochází ve všech polohách, ortho i para.³⁷



Obr. 17: Příprava 2,4,6-tribromfenolu³⁷

Výroba probíhá v uzavřených reaktorech. Jedná se o bezvodý proces, jehož produktem je tavenina. Tavenina je poté ochlazována a pro snazší zacházení granulována. 2,4,6-TBP může vznikat také při rozkladu plastů s obsahem tetrabrombisfenolu-A jako vedlejší produkt.^{47, 56, 57, 59, 60, 61}

2.2.4.4. Výskyt

2,4,6-tribromfenol je přirozeně produkován bentickými živočichy (živočichy žijícími u dna), tzn. mořskými řasami a červy. Vyskytuje se proto ve vodě a říčních sedimentech. Maximální koncentrace v povrchové vodě je 0,3 µg/l a v sedimentech do 3690 µg/kg suché hmotnosti. Chlorací vody se 2,4,6-TBP může vyskytovat v pitné vodě v hodnotě 20 ng/l. Látka se může do životního prostředí také uvolňovat z odpadu při užívání zpomalovačů hoření. Do ovzduší se dostává obzvláště z výfukových emisí při používání olovnatého benzínu (4500 ng/m³) a spalováním halogenovaného odpadu a rašeliny (380 ng/m³).^{47, 54, 56, 57, 62}

Bromované fenoly byly detekovány nejen u člověka v mateřském mléce, krvi a tukové tkáni, ale také v mořských plodech.^{23, 47, 48, 49, 50, 51, 62, 63, 64}

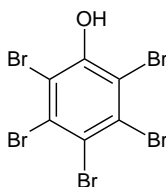
2.2.4.5. *Využití*

2,4,6-TBP je nejrozšířenější produkt z bromovaných fenolů. Používá se výhradně jako chemický meziprodukt při výrobě zpomalovačů hoření, ale sám se využívá také jako zpomalovač hoření epoxidů, polyuretanů, plastů, papíru a textilu. Dále se užívá k impregnaci a ochraně dřeva, je velmi účinný při hubení hmyzu, hub a bakterií, tudíž se uplatňuje jako fungicid, pesticid a germicid.^{47, 56, 57, 65, 66}

2.2.5. Pentabromfenol

2.2.5.1. *Charakteristika a vlastnosti*

Pentabromfenol (Obr. 18), známý také jako 2,3,4,5,6-pentabromfenol, je za normálních teplot a tlaků stabilní, běžově hnědý krystalický prášek štiplavého zápachu typického pro fenoly. Sumární vzorec PBP je C_6HOBBr_5 a molekulová hmotnost 448,58. Teplota tání je 223-226°C, bod varu 352,3°C při 760 mmHg, bod vzplanutí 166,9°C a hustota 2,894 g/cm³. Látka je schopna sublimovat. Dále je špatně rozpustná, ve vodě při 25°C je rozpustnost 0,1 g/l. Se silnými oxidačními činidly a silnými bázemi je velmi reaktivní. Při rozkladu PBP dochází ke vzniku nebezpečných produktů (CO, CO₂, HBr a výpary bromu).^{47, 56, 58, 67, 68, 69}



Obr. 18: *Strukturní vzorec pentabromfenolu*

2.2.5.2. *Toxicita*

Toxicita PBP byla testována na krysách. Letální dávka LD₅₀ v orálním podání je 200 mg/kg. Tato látka je vysoce toxická pro vodní organismy a ryby. Letální koncentrace EC₅₀ činí 93 mg/l a může způsobit dlouhodobé nepříznivé účinky na vodní prostředí.^{56, 67, 68, 69, 70}

2.2.5.3. Výroba

Pentabromfenol se vyrábí reakcí 2,4,6-TBP s bezvodým bromem v přítomnosti bromidu železitého jako katalyzátoru.^{47, 56}

2.2.5.4. Výskyt

Stejně jako ostatní bromfenoly i PBP se přirozeně vyskytuje ve vodě, sedimentech a do ovzduší se dostává především z výfukových plynů. Byl stanoven v mateřském mléce a v lidské plazmě.^{33, 47, 56, 71}

2.2.5.5. Využití

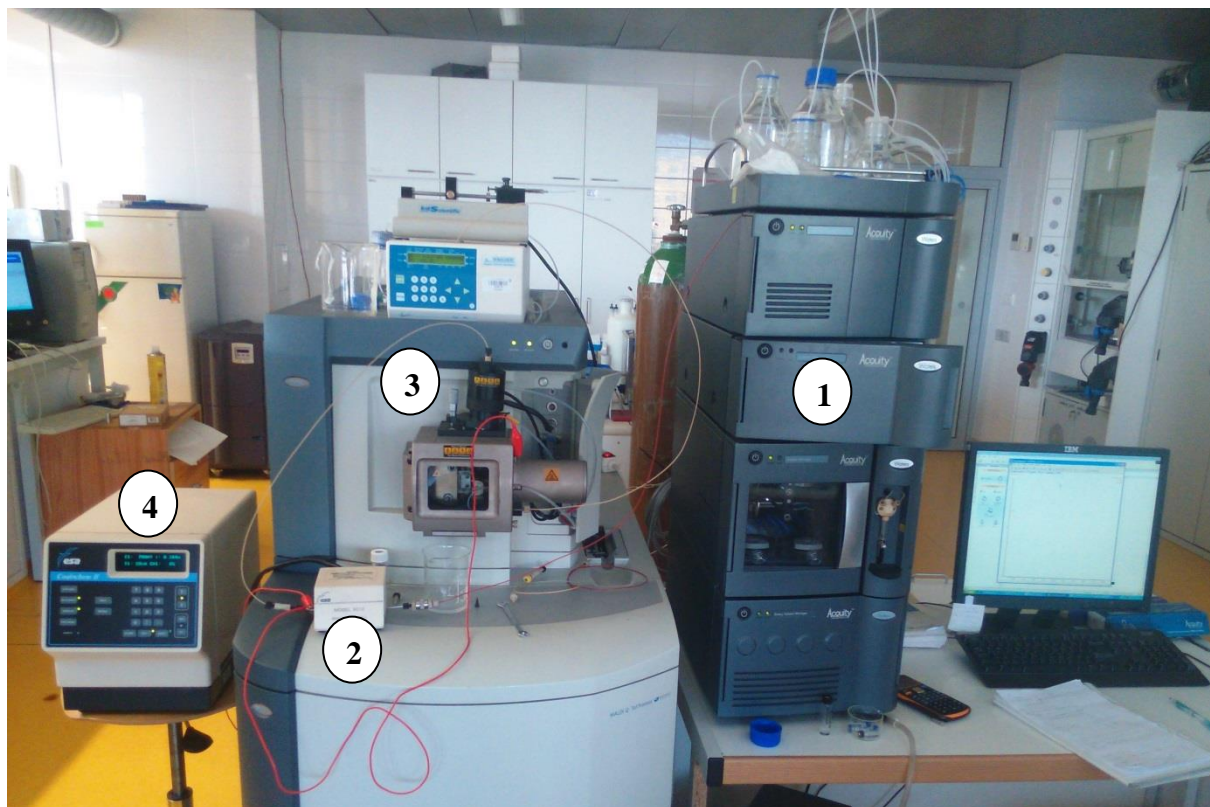
PBP se využívá především v organické syntéze a jako retardátor hoření. Byl použit jako chemický meziprodukt pro pentabromfenoxy sloučeniny. Dále se může uplatňovat jako biocid.^{33, 47, 56}

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1. LABORATORNÍ PŘÍSTROJE

Jako dávkovací zařízení byl použit autosampler kapalinového chromatogramu (UPLC, Acquity, Waters), odkud byly vzorky vedeny přes elektrochemickou coulometrickou celu s porézní grafitovou elektrodou (Model 5010 Standard Analytical Cell, ESA) do iontového zdroje hmotnostního spektrometru (Q-qTof Premier, Waters) s ionizací elektrosprejem a hybridním analyzátozem Q-qTof. Elektrosprejový iontový zdroj pracoval v záporném režimu ionizace. Potenciál na pracovní grafitové elektrodě byl korigován pomocí potenciostatu (Coulchem II Model 5100A, ESA).

Nosná kapalina se skládala z 10 mmol/l $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ v H_2O (A) a methanolu (B) se stálým složením s izokratickou elucí v poměru 50:50. Celkový čas analýzy byl 2,5 minuty s průtokovou rychlostí 0,1 ml/min.



Obr. 19: Instrumentace použitých laboratorních přístrojů; 1- UPLC, 2- elektrochemická cela, 3- MS, 4- potenciostat

3.2. CHEMIKÁLIE

Deionizovaná voda (připravena pomocí přístroje Direct-Q 3 UV, Millipore water purification system, Merck), octan amonný (99,9%, Sigma-Aldrich), octan sodný (99%, Sigma-Aldrich), methanol (VWR Chemicals Prolabo, HiPerSolv CHROMANORM), acetonitril (VWR Chemicals Prolabo, HiPerSolv CHROMANORM), kyselina mravenčí (85%, Penta), amoniak (25-29%, Penta), 4-bromfenol (99%, Sigma-Aldrich), 2,4-dibromfenol (95%, Sigma-Aldrich), 2,6-dibromfenol (99%, Sigma-Aldrich), 2,4,6-tribromfenol (99%, Sigma-Aldrich), pentabromfenol (96%, Sigma-Aldrich).

3.3. PRACOVNÍ POSTUP

3.2.1. Příprava standardů

Roztoky standardů 4-bromfenolu, 2,4-dibromfenolu, 2,6-dibromfenolu, 2,4,6-tribromfenolu a pentabromfenolu byly připraveny rozpuštěním 3 mg standardu v methanolu tak, aby výsledná koncentrace byla 1 mg/ml. Výchozí standardní roztoky byly dále ředěny na koncentraci 10 µg/ml.

3.2.2. Parametry iontového zdroje

Parametry iontového zdroje byly nastaveny následovně:

Tab. I: Parametry iontového zdroje

Parametr iontového zdroje	Hodnota	Parametr iontového zdroje	Hodnota
Capillary	1,58	LM resolution	2,5
Sampling cone	40	HM resolution	15,0
Extraction cone	5,0	Ion energy	0
Ion guide	5,0	Pre-filter	6,0
Source	100	Collision energy	5,0
Desolvation	450	Cell entrance	1,0
		Cell exit	-15,5

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1. IDENTIFIKACE OXIDAČNÍCH PRODUKTŮ

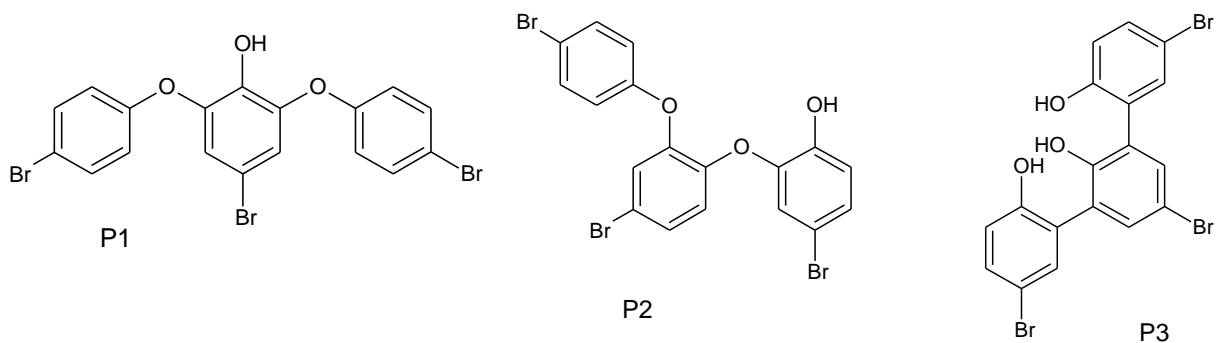
4.1.1. 4-bromfenol

Roztok 4-bromfenolu o koncentraci 10 µg/ml byl oxidován v elektrochemické cele při různých hodnotách potenciálů (0 mV, 200 mV, 400 mV, 550 mV, 600 mV, 650 mV, 700 mV a 800 mV), kdy byly sledovány a identifikovány vznikající oxidační produkty. Značné množství produktů s nejvyšší intenzitou bylo poskytnuto při hodnotě potenciálu 700 mV. Látky byly měřeny s vysokým rozlišením, abychom mohli srovnat hodnotu m/z neznámých produktů s hmotnostmi odpovídajících navržených struktur.

V hmotnostním spektru 4-bromfenolu se při oxidačním potenciálu 0 mV vyskytuje ion prekurzoru s m/z 170,9467, což s chybou 9,4 ppm odpovídá molekulovému složení $C_6H_4OBr^-$ (vypočtená hodnota m/z 170,9451 Da) (Obr. 28, A). Produkty vzniklé elektrochemickou oxidací 4-BP při potenciálu 700 mV (Obr. 28, B) jsou popsány níže. Všechny m/z hodnoty jsou uváděny pro jedenkrát deprotonované molekuly $[M-H]^-$.

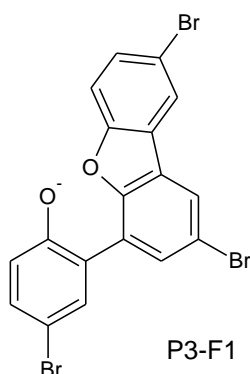
Oxidací 4-BP byl nalezen ve spektru produkt o hmotnosti m/z 510,8224 a je zároveň druhým nejintenzivnějším iontem spektra (Obr. 28, B). Izotopické složení píku iontu odpovídá přítomnosti třech atomů bromu a hodnota m/z napovídá vzniku trimerní molekuly $C_{18}H_{10}O_3Br_3^-$, tj. spojování jednotlivých molekul 4-BP za odštěpování dvou atomů vodíku. Přesná hmotnost látky sumárního vzorce $C_{18}H_{10}O_3Br_3^-$ je m/z 510, 8186. Chyba hmotnosti činí 7,4 ppm. V zásadě lze uvažovat o třech způsobech propojení 4-bromfenolových jednotek a následně usuzovat na konkrétní strukturu produktu na základě MS/MS spekter (Obr. 29).

- 1) Spojení vytvořením peroxidové vazby. Nejeví se jako příliš pravděpodobné, protože není možné tímto způsobem navázat třetí bromfenolový skelet.
- 2) Spojení za vzniku diaryleterových vazeb za vzniku např. produktu **P1** nebo **P2** (Obr. 20).
- 3) Spojení za vzniku C-C vazeb mezi aromatickými cykly 4-bromfenolu, např. za vzniku produktu **P3** (Obr. 20).



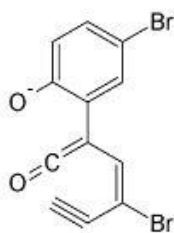
Obr. 20: Strukturní složení produktů P1, P2 a P3 s m/z 510,8224

V MS/MS spektru (Obr. 29) iontu 510,8 je pozorováno odštěpování neutrálního fragmentu 18 Da (H_2O) za vzniku iontu 492,8. Z výše navržených struktur se odštěpení vody při fragmentaci dá nejlépe vysvětlit na produktu **P3** vznikem fragmentu se strukturou **P3-F1** (Obr. 21). U produktu **P1** se odštěpení vody jeví jako daleko méně pravděpodobné, protože jediná hydroxylová skupina ve struktuře je při fragmentaci deprotonovaná.



Obr. 21: Strukturní složení fragmentu P3-F1 s m/z 492,8

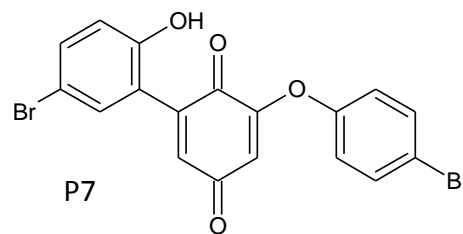
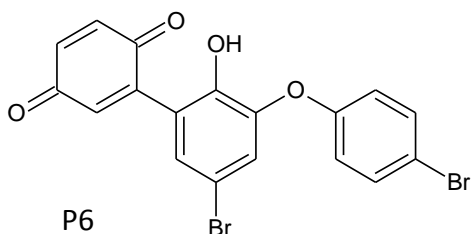
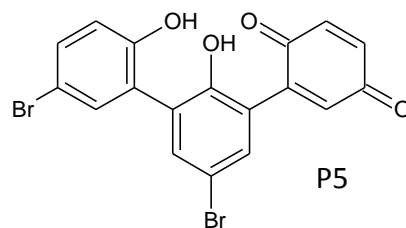
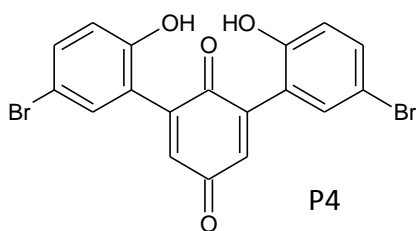
Dalším fragmentem iontu m/z 510,8 je ion m/z 338,9, který formálně odpovídá neutrální ztrátě bromfenolu (Obr. 22). Mechanismus vzniku tohoto fragmentu lze navrhnout jak ze struktur **P1/P2**, tak i ze struktury **P3**. Z hlediska interpretace struktury látky s m/z 510,8 je patrně důležitější méně intenzivní fragment m/z 355,9, jehož izotopické píky ukazují na dva atomy Br ve struktuře. Nominálně sudá hodnota m/z pak znamená, že jde o radikál (má se za to, že prekurzorový ion neobsahuje atomy dusíku a nemůže tedy jít o ion s lichým počtem dusíkových atomů ve struktuře). Tento fragment odpovídá neutrální ztrátě 154,9 Da (tedy bromfenylovému radikálu), což je možné ze struktur **P1** a **P2**, ne ze struktury **P3**.



Obr. 22: Strukturní složení fragmentu po ztrátě bromfenolu, m/z 338,9

Fakt, že byly pozorovány vzájemně se fakticky vylučující neutrální ztráty vody a bromfenylového radikálu, vede k závěru, že ion m/z 510,8 ve skutečnosti odpovídá směsi produktů obsahujících jak diaryleterové vazby tak přímé spojení aromatických cyklů C-C vazbami. Je nicméně třeba poznamenat, že jde pouze o hypotézu, která zatím nebyla potvrzena nezávislou metodou. To platí i v případech všech dále navrhovaných struktur a fragmentací, i když to nebude výslovně uvedeno.

Dalším nalezeným produktem je látka s m/z 446,8868 (Obr. 23). Izotopické složení píku iontu odpovídá přítomnosti dvou atomům bromu a hodnota m/z napovídá, že dochází ke vzniku trimerní molekuly $C_{18}H_9O_4Br_2^-$ jejíž přesná hodnota je m/z 446,8873. Chyba hmotnosti tedy činí 1,1 ppm. Pravděpodobně se jedná o chinon se strukturou **P4**, **P5**, **P6**, nebo **P7**.



Obr. 23: Strukturní složení produktů P4, P5, P6 a P7 s m/z 446,8868

Struktura produktu s m/z 462,9104 pravděpodobně odpovídá některé z možných struktur produktu m/z 446,8868 modifikované zavedením další hydroxyskupiny, odchylka od vypočtené hodnoty m/z 462,8822 (61 ppm) je ovšem pro jednoznačné potvrzení tohoto elementárního složení příliš vysoká.

Izotopické složení píků látky s hmotností m/z 432,9105 vede nejspíše ke vzniku trimerní molekuly $C_{18}H_{11}O_3Br_2^-$ se dvěma atomy bromu (Obr. 24). Přesná hodnota $C_{18}H_{11}O_3Br_2^-$ je m/z 432,9080 a chyba hmotnosti 1,3 ppm. Pravděpodobně dochází ke vzniku produktů **P8**, nebo **P9**.



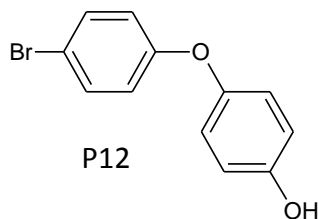
Obr. 24: Strukturální složení produktů P8 a P9 s m/z 432,9104

Další produkt elektrochemické oxidace s hmotností m/z 340,8843 odpovídá vzniku dimerní molekuly $C_{12}H_7O_2Br_2^-$ se dvěma atomy bromu (Obr. 25). Přesná hmotnost látky $C_{12}H_7O_2Br_2^-$ je 340,8818, z čeho vyplývá chyba měření 7,3 ppm. Strukturální složení této dimerní látky napovídá, že se patrně jedná produkty **P10**, nebo **P11**. V MS/MS spektru iontu m/z 340,9 (Obr. 30) dominuje bromidový ion, odštěpování bromfenylového radikálu v tomto případě nebylo pozorováno a lze se tedy klonit spíše ke struktuře **P11**.



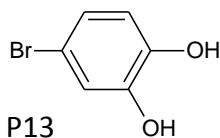
Obr. 25: Strukturální složení produktů P10 a P11 s m/z 340,8844

Nejintenzivnějším iontem spektra (Obr. 28, B) je látka s hmotností m/z 262,9731 obsahující pouze 1 atom bromu. Sumární vzorec $C_{12}H_8O_2Br^-$ odpovídá hmotě m/z 262,9713, kde chyba hmotnosti činí 6,8 ppm. Velmi pravděpodobně se jedná o produkt **P12**.

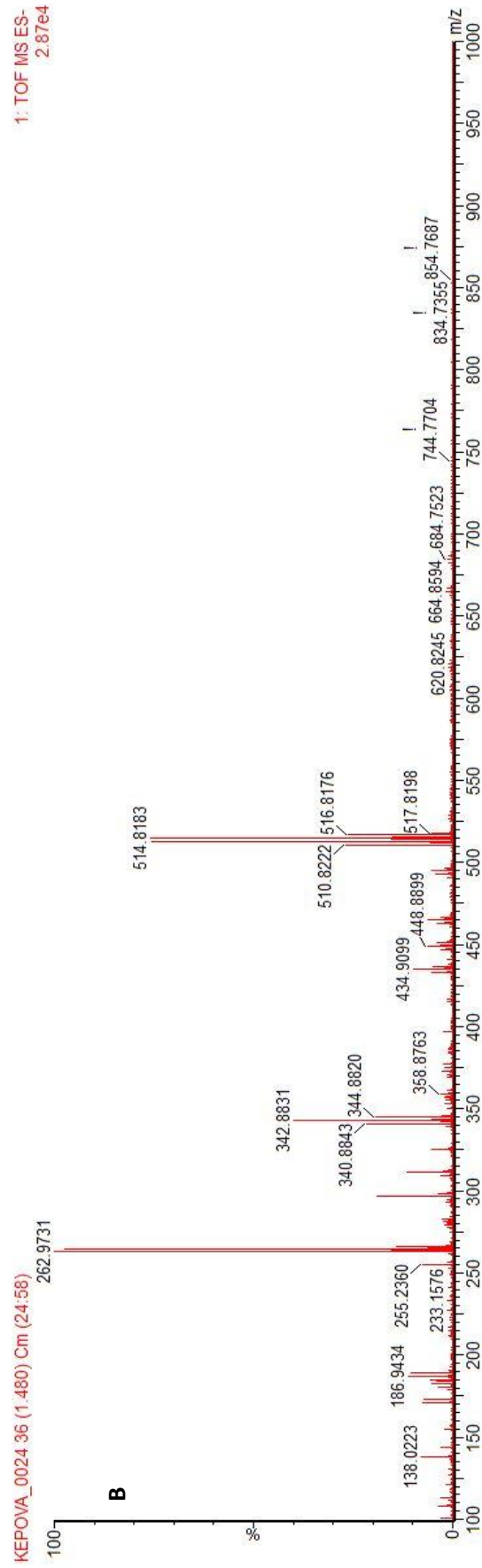
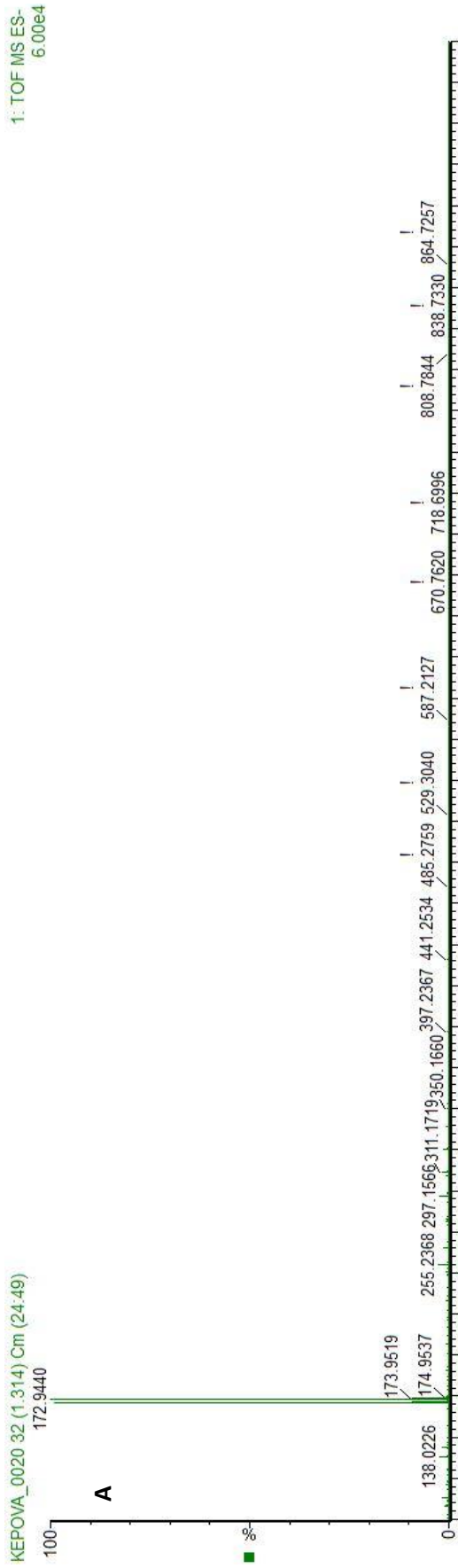


Obr. 26: Strukturní složení produktu P12 s m/z 262,9731

Poslední oxidační produkt s hmotností m/z 186,9434 obsahuje dle izotopického složení píků jeden atom bromu. Podle sumárního složení molekuly produktu $C_6H_4O_2Br^-$ s přesnou hmotností m/z 186,9400 a chybou měření 18 ppm lze usoudit, že dochází ke vzniku produktu **P13**.

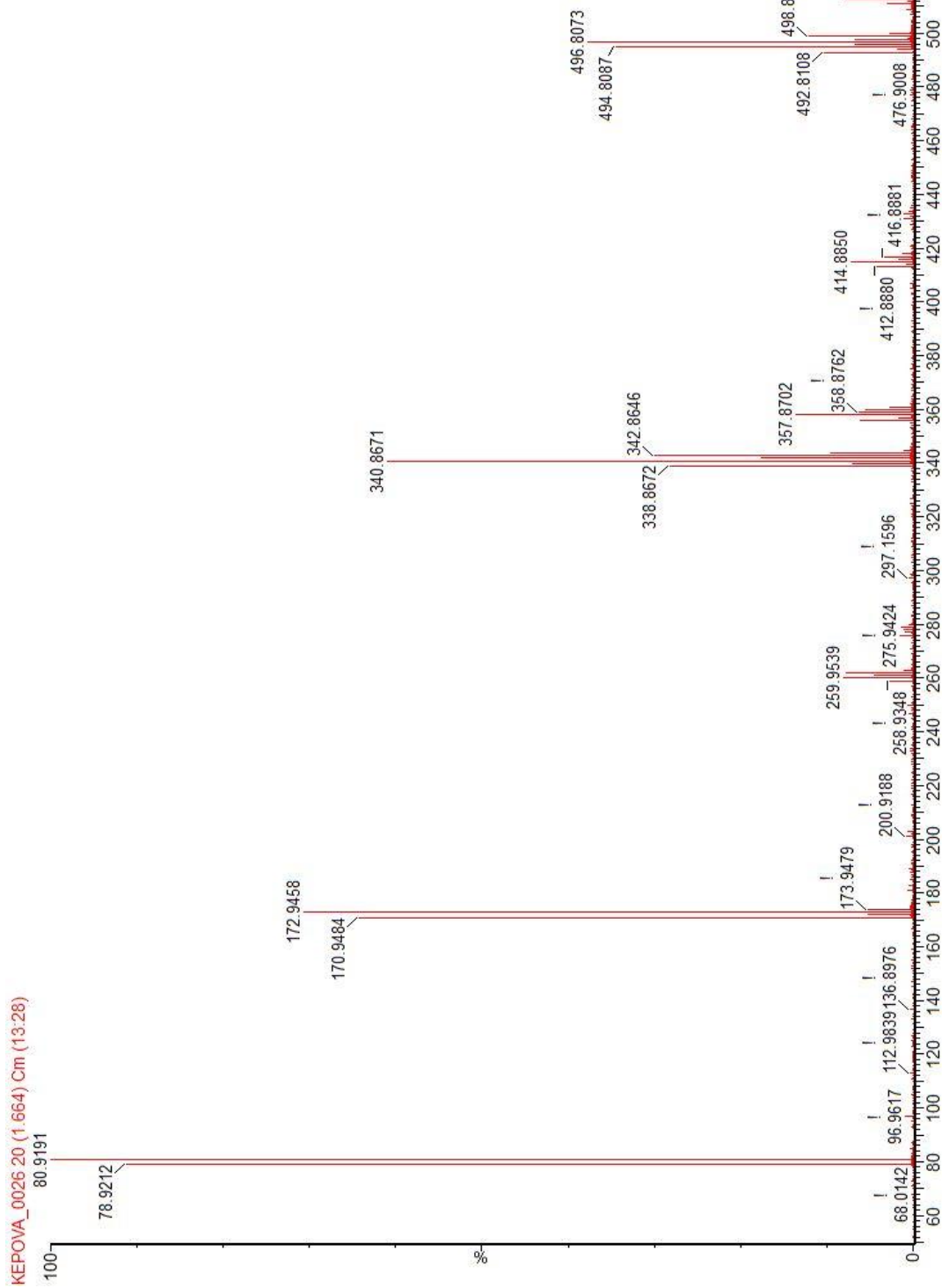


Obr. 27: Strukturní složení produktu P13 s m/z 186,9434

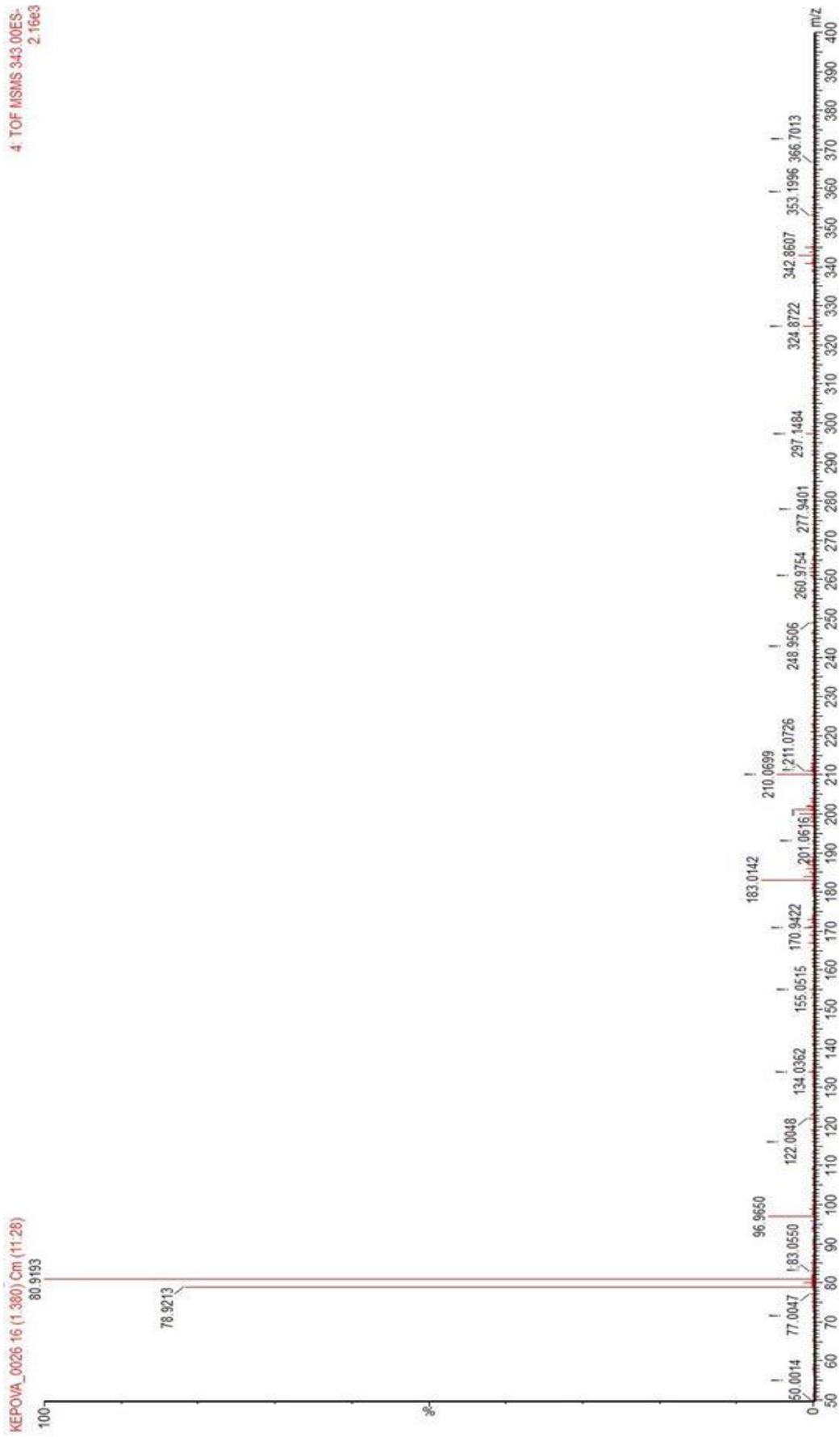


Obr. 28: Hmotnostní spektra 4-BP při 0 mV (A) a jeho oxidačních produktů při 700mV (B)

1: TOF MSMS 514.00ES-
1.42e3



Obr. 29: MSMS spektrum produktu s m/z 510,8 při 700mV



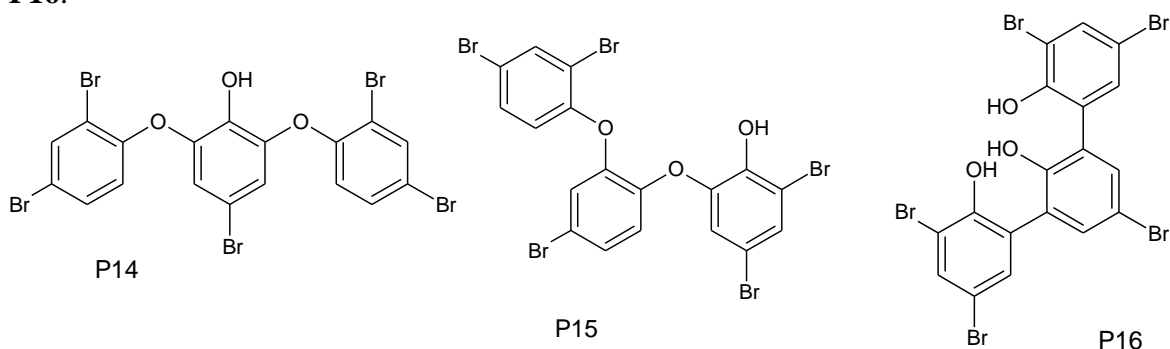
Obr. 30: MSMS spektrum produktu s m/z 340,9 při 700mV

4.1.2. 2,4-dibromfenol

Roztok 2,4-dibromfenolu o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ byl oxidován v elektrochemické cele při různých hodnotách potenciálů. Při daných hodnotách potenciálů (0 mV, 100 mV, 200 mV, 300 mV, 400 mV, 500 mV, 600 mV, 700 mV a 800 mV) byly sledovány a identifikovány vznikající oxidační produkty. Značné množství produktů s nejvyšší intenzitou bylo poskytnuto při hodnotě potenciálu 700 mV. Látky byly měřeny s vysokým rozlišením, abychom mohli srovnat hodnotu m/z neznámých produktů s hmotností odpovídajících navržených struktur.

V hmotnostním spektru 2,4-dibromfenolu se nachází při potenciálu 0 mV ion prekurzoru s m/z 248,8573 a složením $\text{C}_6\text{H}_3\text{OBr}_2^-$ (Obr. 35, A). Vzhledem k vypočítané hmotnosti látky $\text{C}_6\text{H}_3\text{OBr}_2^-$ m/z 248,8556 Da je chyba hmotnosti 6,8 ppm. Oxidační produkty 2,4-DBP vzniklé při potenciálu 600 mV (Obr. 35, B) jsou popsány níže. Všechny m/z hodnoty jsou uváděny pro jedenkrát deprotonované molekuly $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Po elektrochemické oxidaci 2,4-DBP byl nalezen ve spektru produkt o hmotnosti m/z 666,6366. Jeho izotopické složení píku iontu odpovídá přítomnosti pěti atomům bromu a hodnota m/z napovídá vzniku trimerní molekuly $\text{C}_{18}\text{H}_8\text{O}_3\text{Br}_5^-$ (Obr. 31), tj. spojování jednotlivých molekul 2,4-DBP za odštěpování dvou atomů vodíku. Přesná hmotnost molekuly $\text{C}_{18}\text{H}_8\text{O}_3\text{Br}_5^-$ je m/z 666,6396 z čeho vyplývá chyba hmotnosti 4,5 ppm. Lze opět uvažovat o třech způsobech propojení 2,4-dibromfenolových jednotek stejně, jako tomu bylo u 4-bromfenolu. Předpokládané strukturální složení oxidačního produktu je **P14**, **P15**, nebo **P16**.



Obr. 31: Strukturální složení produktů P14, P15 a P16 s m/z 666,6366

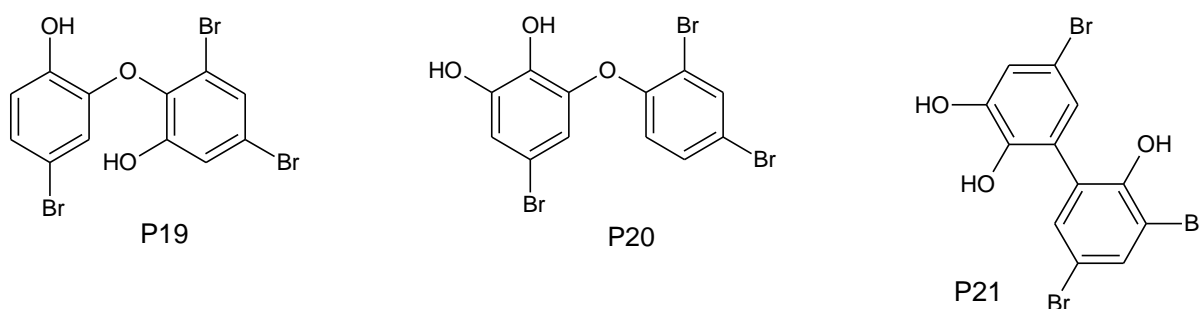
Látka s hmotností m/z 496,7061 patřící mezi jedny z nejintenzivnějších iontů spektra odpovídá přítomnosti čtyř atomům bromu a její m/z odpovídá vzniku dimerní molekuly

$C_{12}H_5O_2Br_4^-$ (Obr. 32) s vypočítanou hodnotou m/z 496,7029 a chybou měření 6,4 ppm. Pravděpodobně se jedná o produkt **P17**, nebo **P18**. V MS/MS spektru iontu m/z 496,7 (Obr. 36) dochází k odštěpení dibromfenylového radikálu za vzniku ionradikálu m/z 263,8 a dále ke ztrátě radikálu bromu za vzniku iontu m/z 417,8. Lze se tedy klonit spíše ke struktuře **P17**.

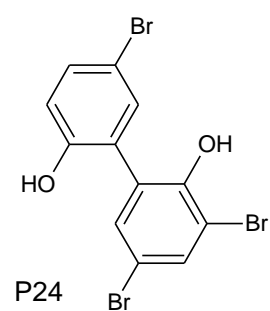
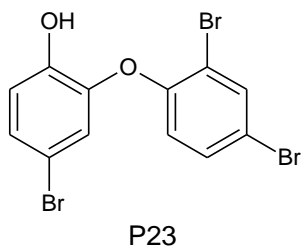
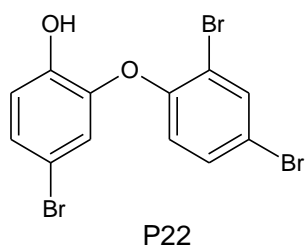


Obr. 32: Strukturální složení produktů P17 a P18 s m/z 496,7061

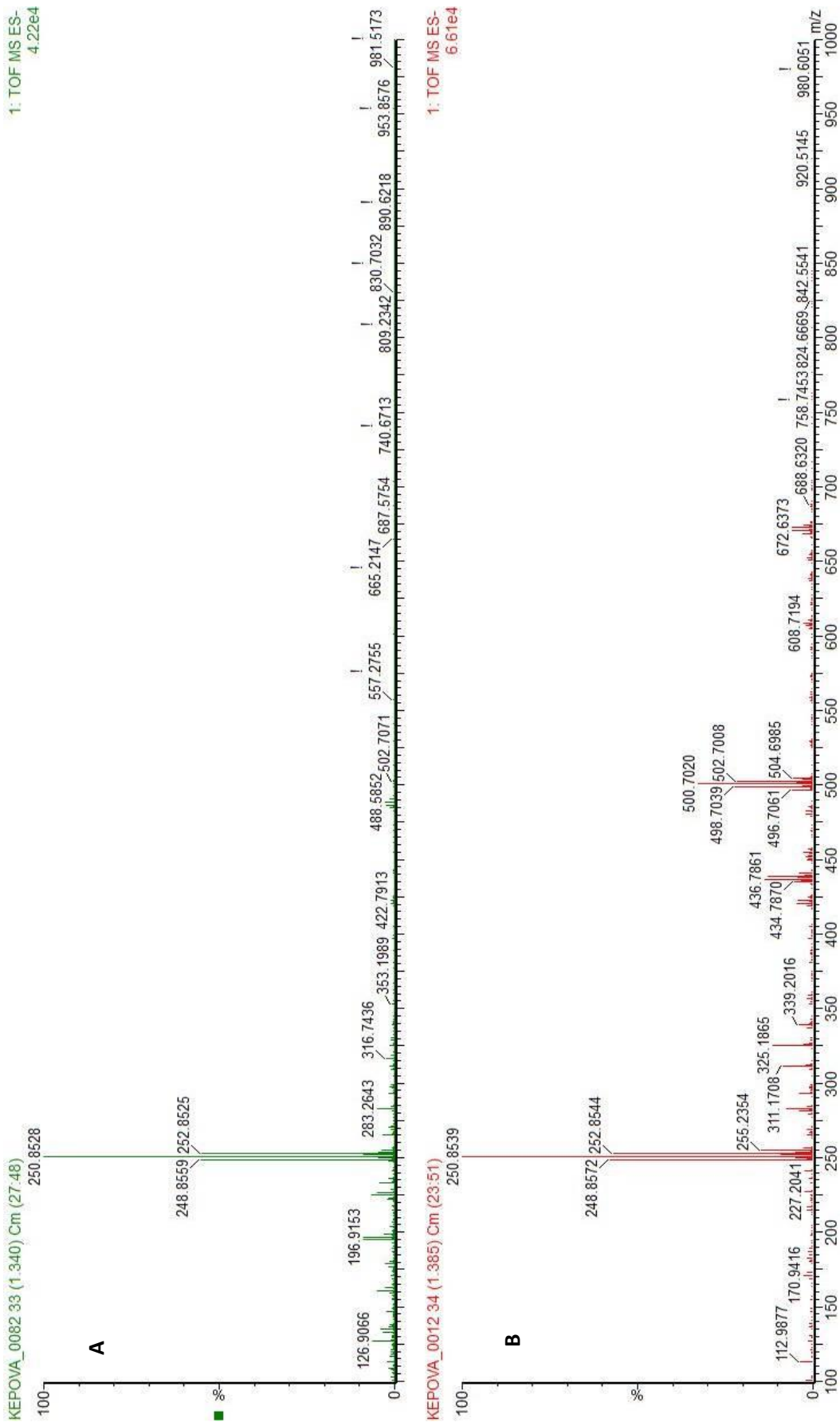
Poslední dvě látky s m/z 434,7870 a m/z 418,7946 odpovídají podle m/z vzniku dimerních molekul $C_{12}H_6O_3Br_3^-$ a $C_{12}H_6O_2Br_3^-$, každá se třemi atomy bromu, lišící se pouze počtem kyslíků. Vypočtená hodnota $C_{12}H_6O_3Br_3^-$ m/z 434,7873 poukazuje na chybu měření 0,69 ppm a molekula $C_{12}H_6O_2Br_3^-$ s m/z 418,7923 chybu 5,5 ppm. U oxidačního produktu s m/z 434,7870 dochází nejspíše ke vzniku např. produktu **P19**, **P20**, nebo **P21** (Obr. 33) a u produktu s m/z 418,7946 ke vzniku **P22**, **P23**, nebo **P24** (Obr. 34).



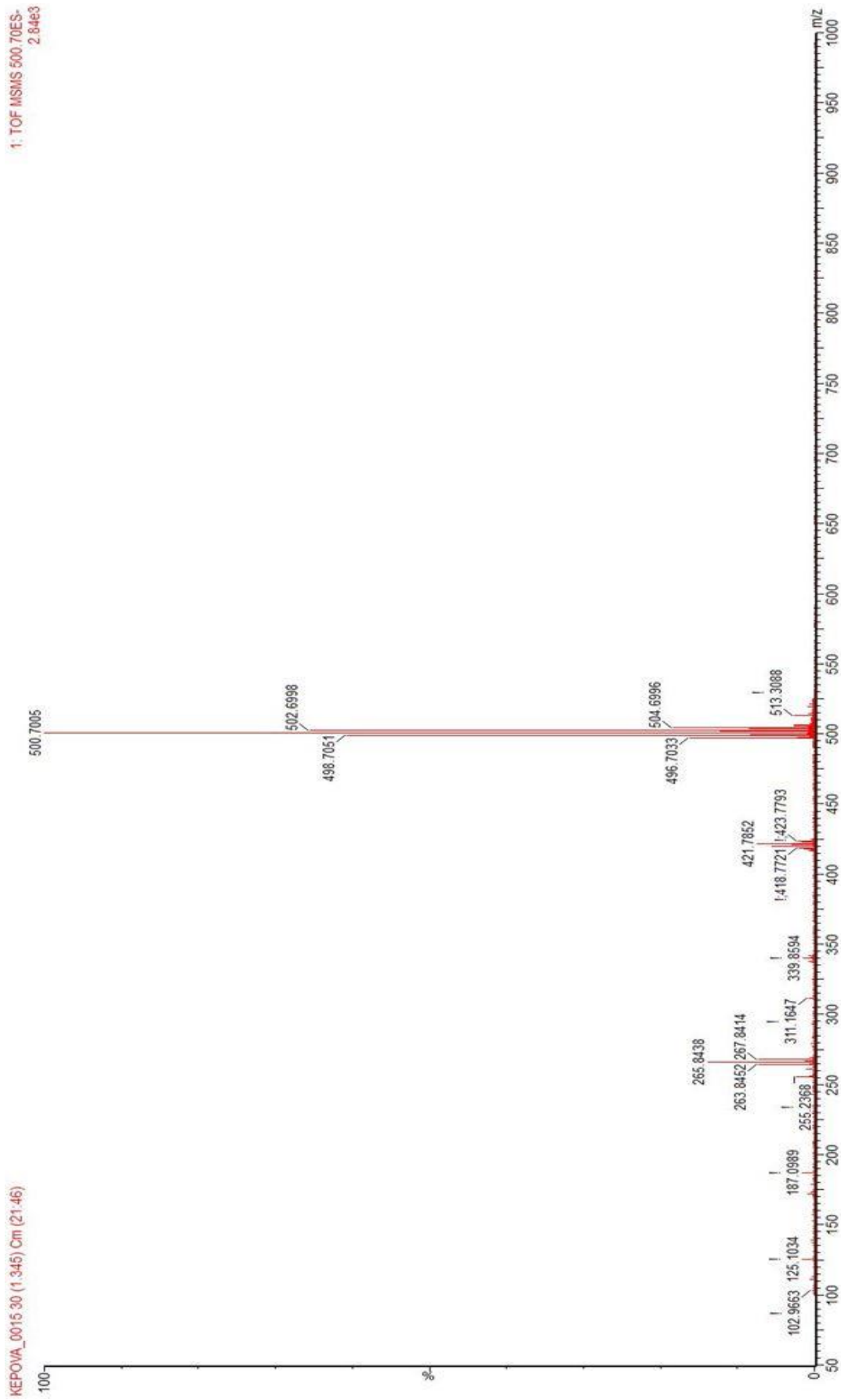
Obr. 33: Strukturální složení produktů P19, P20 a P21 s m/z 434,7870



Obr. 34: Strukturní složení produktů P22, P23 a P24 s hmotností m/z 418,7946



Obr. 35: Hmotnostní spektra 2,4-DBP při 0 mV (A) a jeho oxidačních produktů při 600mV (B)



Obr. 36: MSMS spektrum produktu s m/z 496,7 při 600 0mV

4.1.3. 2,6-dibromfenol

Roztok 2,6-dibromfenolu o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ byl oxidován v elektrochemické cele při různých hodnotách potenciálů (0 mV, 100 mV, 200 mV, 300 mV, 400 mV, 500 mV, 550 mV, 600 mV, 650mV, 700 mV a 800 mV), kdy byly sledovány a identifikovány vznikající oxidační produkty. Značné množství produktů s nejvyšší intenzitou bylo poskytnuto při hodnotě potenciálu 700 mV. Látky byly měřeny s vysokým rozlišením, abychom mohli srovnat hodnotu m/z neznámých produktů s hmotností odpovídajících navržených struktur.

V hmotnostním spektru 2,6-dibromfenolu se při oxidačním potenciálu 0 mV vyskytuje ion prekurzoru s m/z 248,8554, což s chybou 0,81 ppm odpovídá molekulovému složení $\text{C}_6\text{H}_3\text{OBr}_2^-$ (Obr. 43, A). Vypočtená hodnota m/z látky $\text{C}_6\text{H}_3\text{OBr}_2^-$ je m/z 248,8556 Da. Produkty vzniklé elektrochemickou oxidací 2,6-DBP při potenciálu 700 mV (Obr. 43, B) jsou popsány níže. Všechny m/z hodnoty jsou uváděny pro jedenkrát deprotonované molekuly $[\text{M-H}]^-$.

Oxidací 2,6-DBP byl nalezen ve spektru produkt o hmotnosti m/z 682,6638. Izotopické složení píku iontu odpovídá přítomnosti pěti atomům bromu a hodnota m/z napovídá vzniku trimerní molekuly $\text{C}_{18}\text{H}_8\text{O}_4\text{Br}_5^-$ (Obr. 37), tj. spojování jednotlivých molekul 2,6-DBP za odštěpování dvou atomů vodíku. Chyba hmotnosti je 43 ppm vzhledem k vypočtené hodnotě m/z 682,6345 molekuly $\text{C}_{18}\text{H}_8\text{O}_4\text{Br}_5^-$. S největší pravděpodobností se jedná o produkt **P25**, nebo **P26**.



Obr. 37: Strukturální složení produktů P25 a P26 s m/z 682,6638

Dalším nalezeným produktem je látka s m/z 666,6522, obdobně jako u 2,4-DBP, s chybou měření 19 ppm. Dochází patrně ke vzniku produktu **P27**, nebo **P28** (Obr. 38).



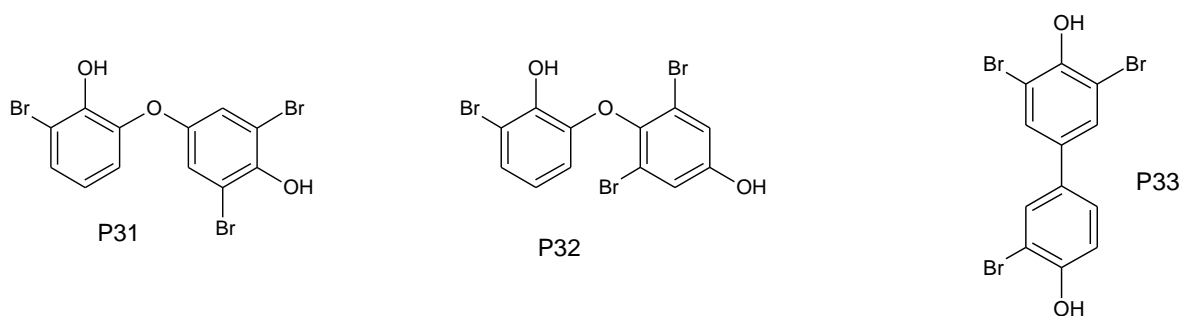
Obr. 38: Strukturální složení produktů P27 a P28 s m/z 666,6522

Stejně jako u 2,4-DBP, i u 2,6-DBP se vyskytuje produkt s m/z 496,7055 s chybou hmotnosti 6,4412 ppm. Tento produkt je zároveň nejintenzivnějším iontem spektra (Obr. 43, B). Pravděpodobně vzniká produkt **P29**, nebo **P30** (Obr. 39).

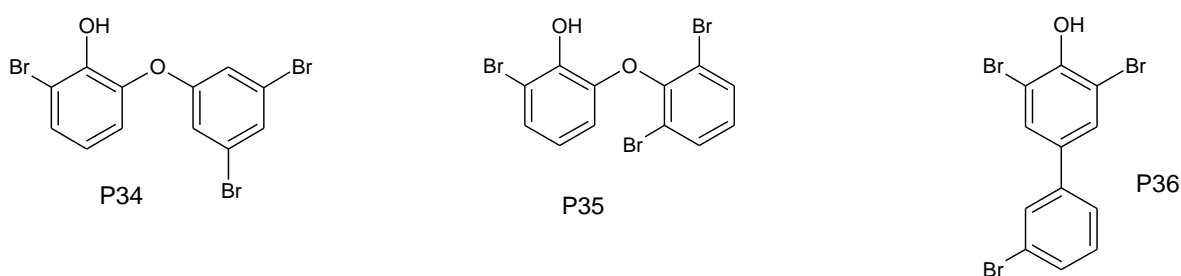


Obr. 39: Strukturální složení produktů P29 a P30 s m/z 496,7055

Další dvě látky s m/z 434,7887 a s m/z 418,7883 se složením $C_{12}H_6O_3Br_3^-$ a $C_{12}H_6O_2Br_3^-$ se opět vyskutují u 2,4-DBP. U první dimerní molekuly s m/z 434,7887 s chybou měření 3,2 ppm dochází nejspíše ke vzniku produktu **P31**, **P32**, nebo **P33** (Obr. 40). U druhé látky s m/z 418,7883 a chybou hmotnosti 9,6 ppm dochází pravděpodobně ke vzniku produktu **P34**, **P35**, nebo **P36** (Obr. 41).

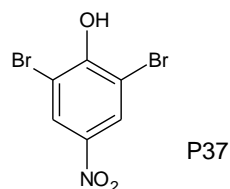


Obr. 40: Strukturní složení produktů P31, P32 a P33 s m/z 434,7887



Obr. 41: Strukturní složení produktů P34, P35 a P36 s m/z 418,7883

Poslední oxidační produkt s m/z 293,8418, který je druhým nejintenzivnějším iontem spektra (Obr. 43, B), obsahuje dle izotopického složení píků dva atomy bromu. Dochází pravděpodobně ke vzniku molekuly $C_6H_2O_3Br_2N^-$ jejíž přesná m/z 293,8407 odpovídá chybě hmotnosti 3,7 ppm. Lichá hodnota m/z je způsobena přítomností dusíku (nitroskupiny), která může vznikat elektrochemickou oxidací díky obsahu amoniaku v nosné kapalině. Amoniak přítomný v nosné kapalině $CH_3COONH_4:MeOH$ se bude pravděpodobně oxidovat a poté vázat jako nukleofil NO_2^- na molekulu oxidovaného, silně elektrofilního bromfenolu. Velmi pravděpodobně dochází ke vzniku produktu **P37** (Obr. 42).

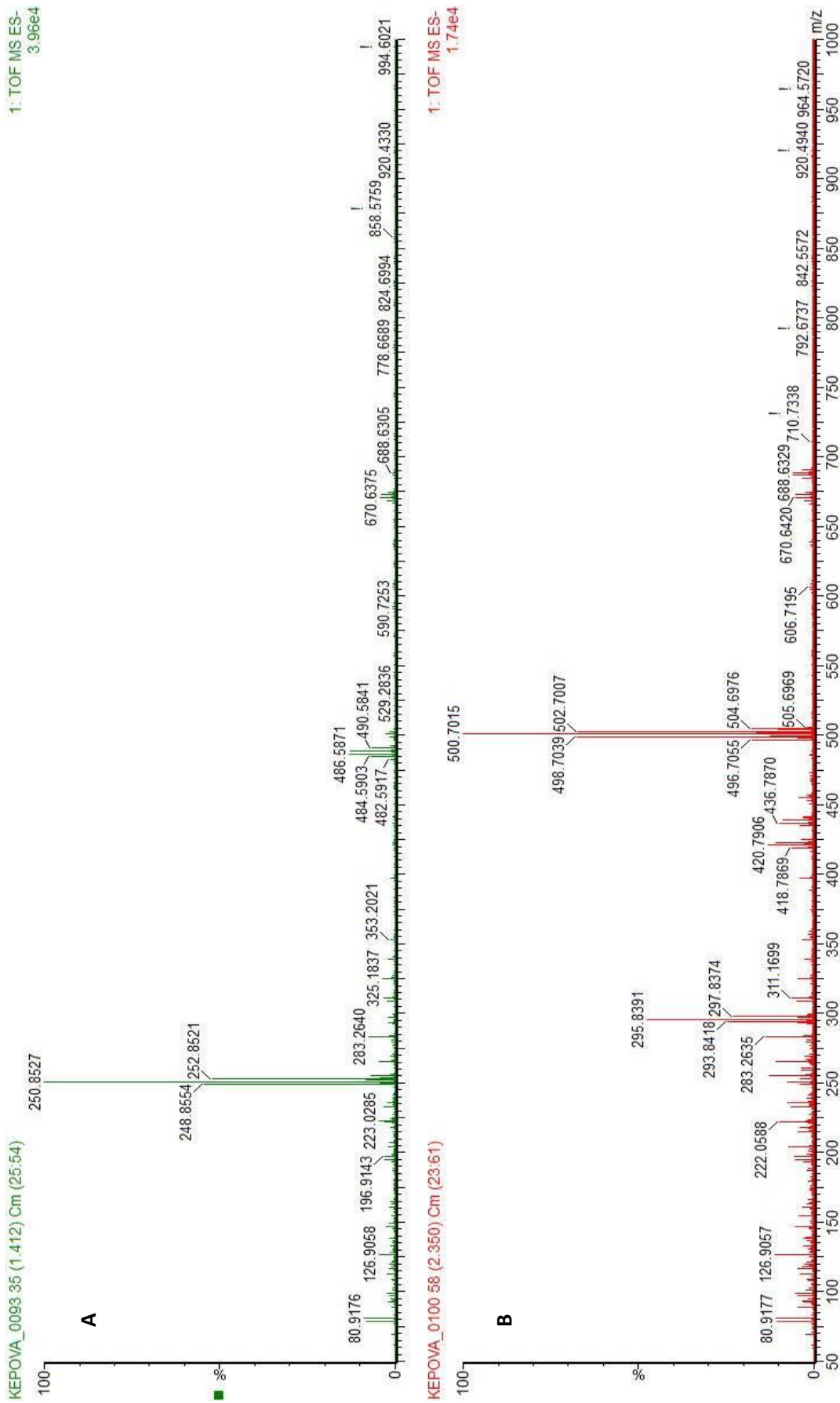


Obr. 42: Strukturní složení produktu P37 s m/z 293,8418

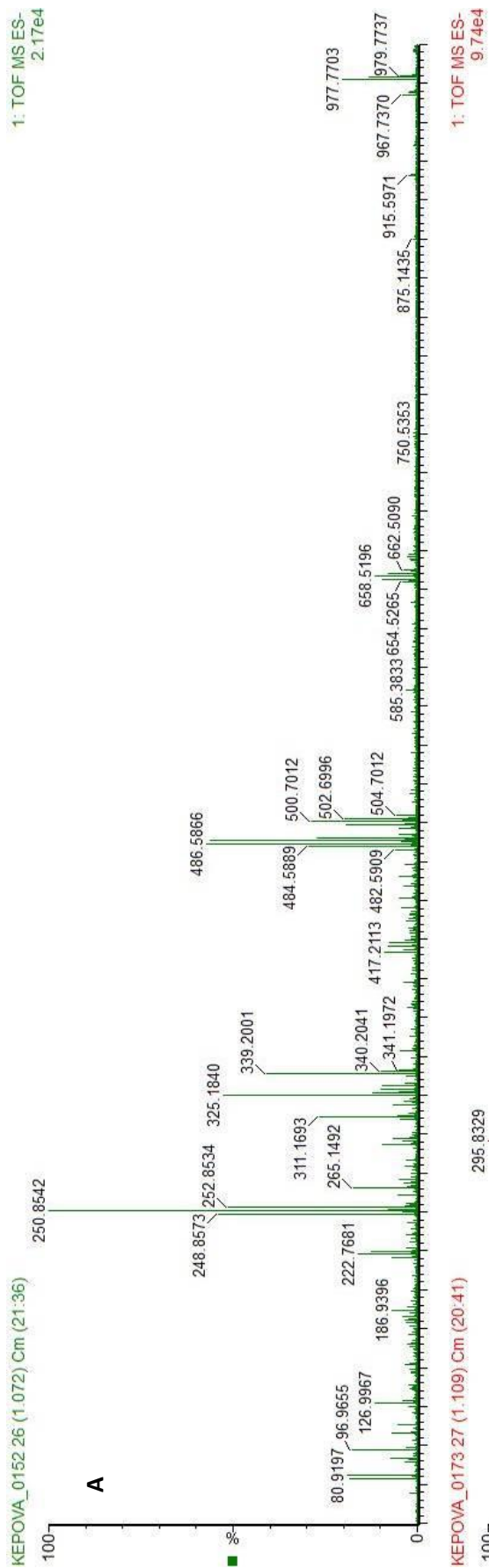
Vznik produktu **P37** byl potvrzen experimentem, kdy byla sledována elektrochemická oxidace této látky v nosné kapalině bez obsahu amonných iontů, tedy v 1% $HCOOH$ v $H_2O:MeOH$ v poměru 50:50 při oxidačním potenciálu 700 mV. Za použití

této kapaliny se produkt s hmotností m/z 293,8418 ve spektru nevyskytoval (Obr. 44, A). V druhé fázi experimentu byla sledována elektrochemická oxidace 2,6-DBP ve stejné nosné kapalině (1% HCOOH v H₂O:MeOH v poměru 50:50) za přídavku 10 μ l 0,1M NaNO₂ při oxidačním potenciálu 700 mV. Produkt s m/z 293,8418 byl ve spektru přítomen v tak velké intenzitě, že zastínil téměř všechny produkty elektrochemické oxidace 2,6-dibromfenolu (Obr 44, B).

Při tomto experimentu byla také zjištěna sorbce dusitanového iontu na porézní grafitové elektrodě. Sorbce se projevovала přítomností hmoty m/z 293,8418 při oxidaci 2,6-DPB v 1% HCOOH v H₂O:MeOH, kdy byl v předešlém kroku oxidován vzorek s přídavkem 10 μ l 0,1M NaNO₂. Elektrochemická oxidace byla proto opakovaně sledována vždy po promývání elektrochemické cely nosnou kapalinou 1% HCOOH v H₂O:MeOH v poměru 90:10 v 10 minutových intervalech. Promýváním elektrody docházelo k postupnému vymývání dusitanového iontu, které bylo sledováno v hmotnostních spektrech úbytkem intenzity hmoty m/z 293,8418.



Obr. 43: Hmotnostní spektra 2,6-DBP při 0 mV (A) a jeho oxidačních produktů při 700mV (B).



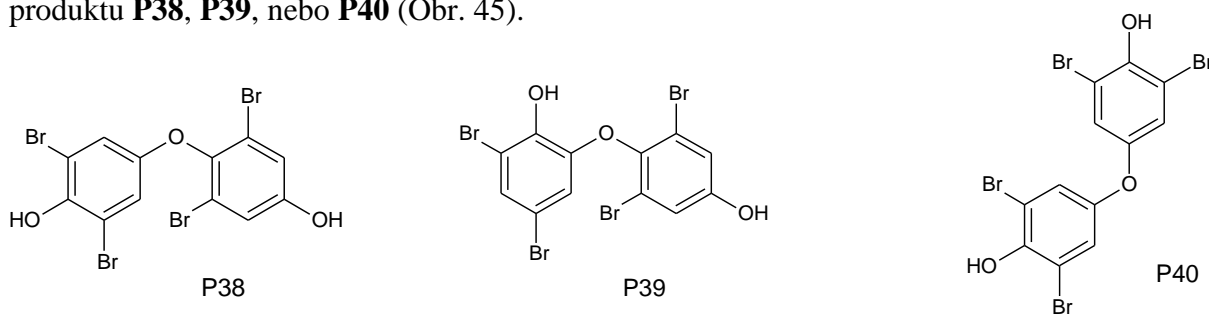
Obr. 44: Hmotnostní spektra 2,6-DBP při 700 mV v 1% HCOOH v H₂O:MeOH (A) a 2,6-DBP při 700 mV v 1% HCOOH v H₂O:MeOH za přítavku 10 µl 0,1M NaNO₂ (B).

4.1.4. 2,4,6-tribromfenol

Roztok 2,4,6-tribromfenolu o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ byl oxidován v elektrochemické cele při různých hodnotách potenciálů. Při daných hodnotách potenciálů (0 mV, 600 mV, 650 mV, 700 mV, 750 mV a 800 mV) byly sledovány a identifikovány vznikající oxidační produkty. Značné množství produktů s nejvyšší intenzitou bylo poskytnuto při hodnotě potenciálu 750 mV. Látky byly měřeny s vysokým rozlišením, abychom mohli srovnat hodnotu m/z neznámých produktů s hmotností odpovídajících navržených struktur.

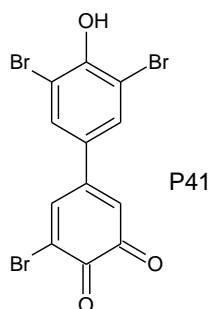
V hmotnostním spektru 2,4,6-tribromfenolu se nachází při potenciálu 0 mV ion prekurzoru s m/z 326,7694 a složením $\text{C}_6\text{H}_2\text{OBr}_3^-$ (Obr. 48, A). Vzhledem k vypočtené hmotnosti látky $\text{C}_6\text{H}_2\text{OBr}_3^-$ m/z 326,7661 Da je chyba hmotnosti 10 ppm. Oxidační produkty 2,4,6-TBP vzniklé při potenciálu 750 mV (Obr. 48, B) jsou popsány níže. Všechny m/z hodnoty jsou uváděny pro jedenkrát deprotonované molekuly $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Po elektrochemické oxidaci 2,4,6-TBP bylo nalezeno ve spektru několik produktů. Prvním produktem je látka s m/z 512,7012 odpovídající vzniku dimerní molekuly $\text{C}_{12}\text{H}_5\text{O}_3\text{Br}_4^-$ se čtyřmi atomy bromu. Přesná hmotnost molekuly $\text{C}_{12}\text{H}_5\text{O}_3\text{Br}_4^-$ m/z 512,6978 odpovídá chybě měření 6,6 ppm. Sumární složení této dimerní látky napovídá vzniku produktu **P38**, **P39**, nebo **P40** (Obr. 45).



Obr. 45: Strukturální složení produktů P38, P39 a P40 s m/z 512,7012

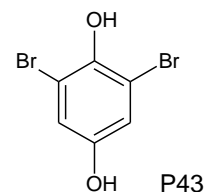
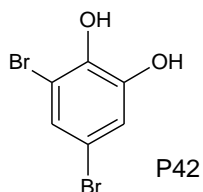
Izotopické složení píku iontu látky s m/z 432,7750 vyskytující se také u 4-bromfenolu odpovídá tentokrát přítomnosti třech atomů bromu. Hodnota m/z vede ke vzniku molekuly $\text{C}_{12}\text{H}_4\text{O}_3\text{Br}_3^-$ s chybou 7,9 ppm (vypočtená hodnota m/z 432,7716 Da). Nejspíše dochází ke vzniku chinonu, produkt **P41** (Obr. 46).



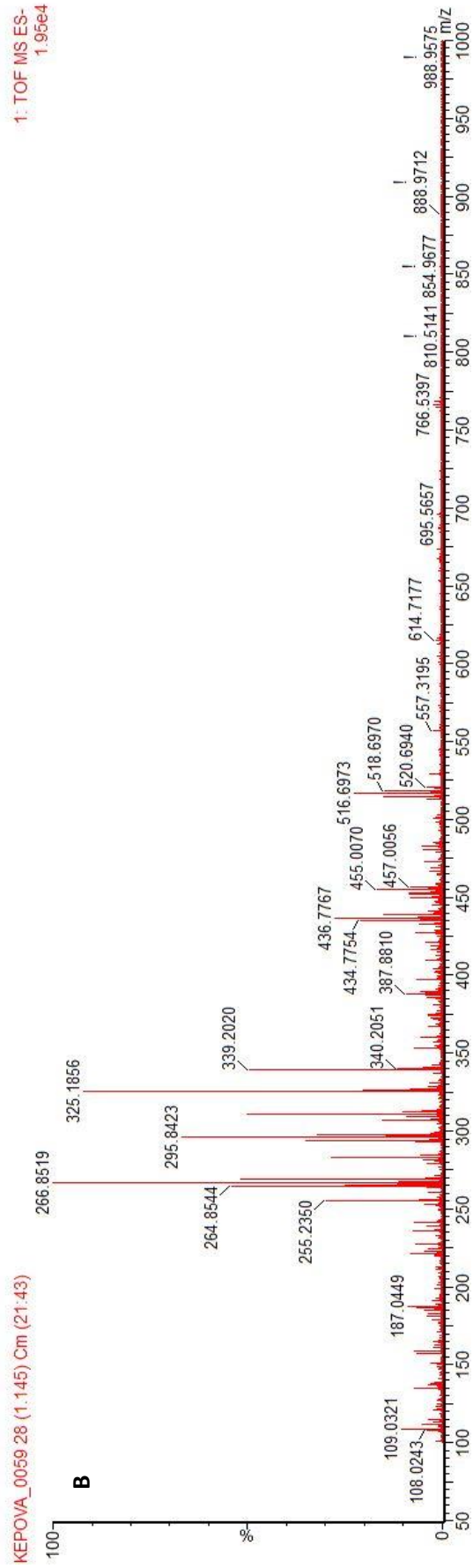
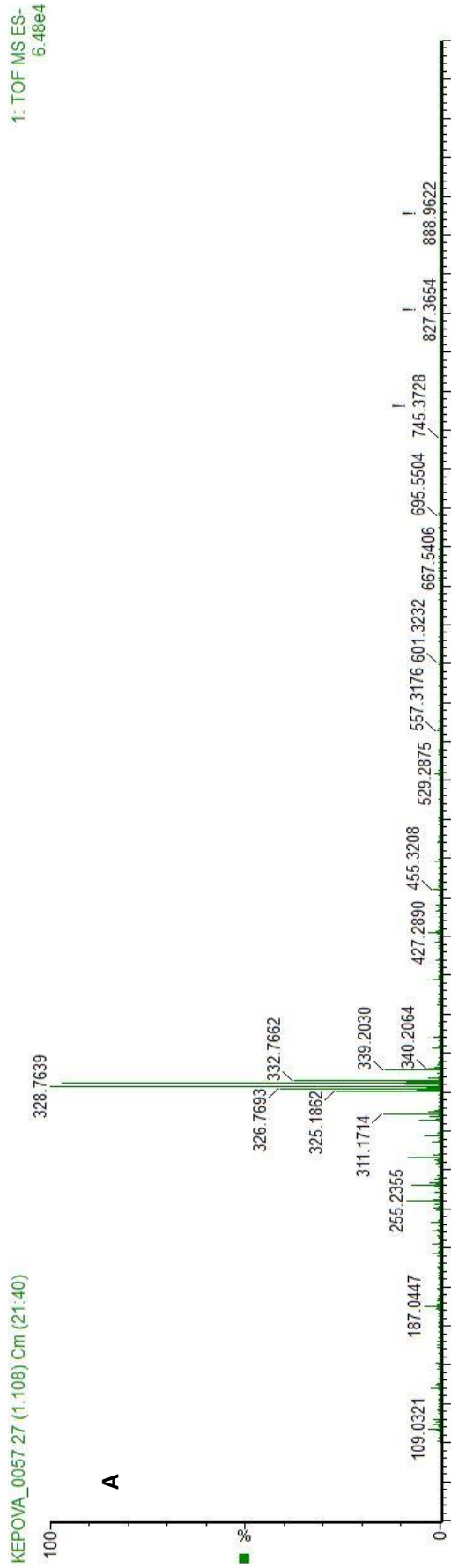
Obr. 46: Strukturální složení produktu P41 s m/z 432,7750

Druhým nejintenzivnějším iontem spektra (Obr. 48, B) je produkt $C_6H_2O_3Br_2N^-$ s hmotností m/z 293,8446 a chybou měření 13 ppm (vypočtená hodnota m/z činí m/z 293,8407 Da). Vznik produktu **P37** je analogický jako u 2,6-DBP (Obr. 42).

Poslední látkou je produkt s nejvyšší intenzitou ve spektru (Obr. 48, B), $C_6H_3O_2Br_2^-$ s hmotností m/z 264,8543 obsahující dle izotopického složení píků dva atomy bromu. Chyba měření odvíjející se od vypočtené hodnoty $C_6H_3O_2Br_2^-$ s m/z 264,8505 je 14 ppm. Lze usoudit, že se jedná o produkt **P42**, nebo **P43** (Obr. 47).



Obr. 47: Strukturální složení produktů P42 a P43 s m/z 264,8543



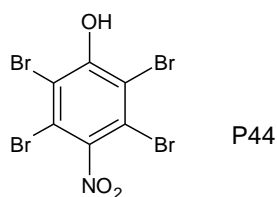
Obr. 48: Hmotnostní spektra 2,4,6-TBP při 0 mV (A) a jeho oxidačních produktů při 750mV (B).

4.1.5. Pentabromfenol

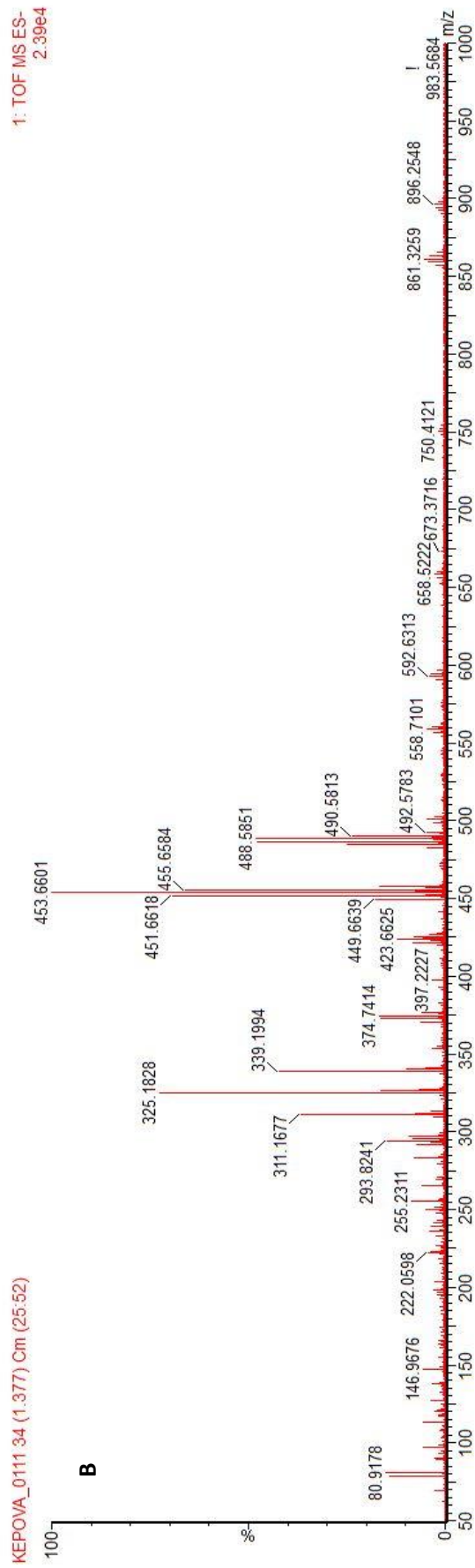
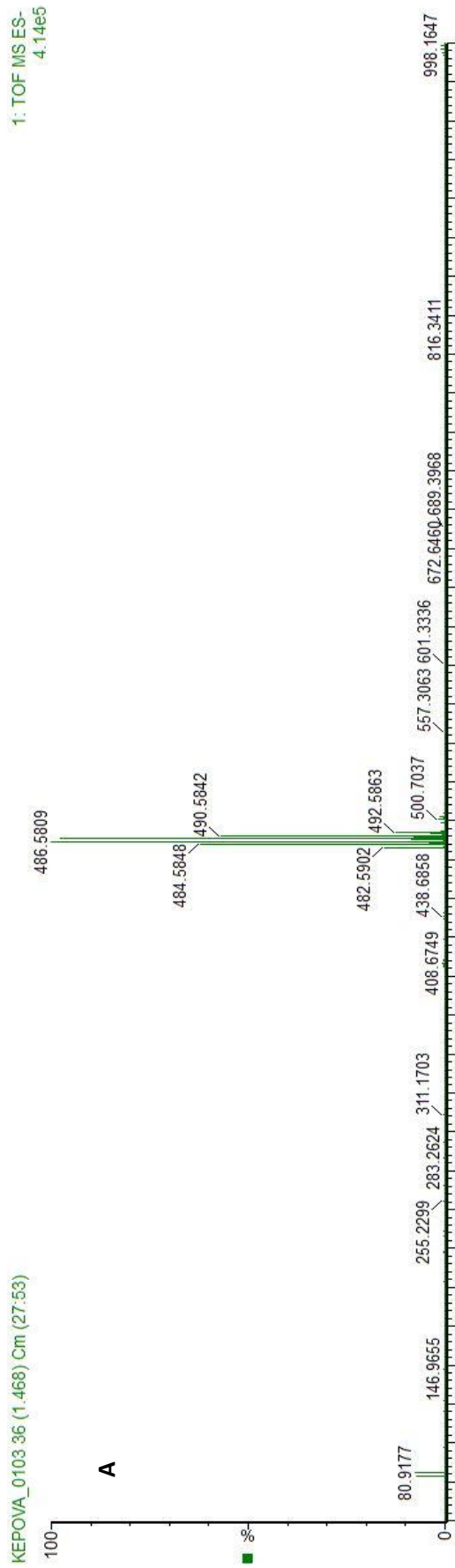
Pentabromfenol o koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$ byl oxidován v elektrochemické cele při různých hodnotách potenciálů (0 mV, 100 mV, 200 mV, 300 mV, 400 mV, 500 mV, 600 mV, 700 mV, 800 mV a 900 mV), kdy byly sledovány a identifikovány vznikající oxidační produkty. Až při potenciálu 800 mV se začala spotřebovávat výchozí látka s m/z 482,5902 za vzniku oxidačních produktů. Látky byly měřeny s vysokým rozlišením, abychom mohli srovnat hodnotu m/z neznámých produktů s hmotností odpovídajících navržených struktur.

V hmotnostním spektru pentabromfenolu se při oxidačním potenciálu 0 mV vyskytuje ion prekurzoru s hmotností m/z 482,5902, která odpovídá molekulovému složení C_6OBr_5 (Obr. 50, A). Přesná hmotnost látky C_6OBr_5 je m/z 482,5866. Z toho vyplývá, že ion prekurzoru byl naměřen s chybou hmotnosti 7,4596 ppm. Produkty vzniklé elektrochemickou oxidací PBP při potenciálu 800 mV (Obr. 50, B) jsou popsány níže. Všechny m/z hodnoty jsou uváděny pro jedenkrát deprotonované molekuly $[\text{M}-\text{H}]^-$.

Oxidací PBP vzniká ve spektru primárně produkt o hmotnosti m/z 449,6639. Izotopické složení nejintenzivnějšího píku spektra (Obr. 50, B) odpovídá přítomnosti čtyř atomů bromu. Dochází pravděpodobně ke vzniku molekuly $\text{C}_6\text{O}_3\text{Br}_4\text{N}^-$ (Obr. 49), jejíž přesná m/z 449,6617 Da odpovídá chybě hmotnosti 4,9 ppm. Produkt **P44** vzniká stejným mechanismem jako u 2,6-DBP a 2,4,6-TBP.



Obr. 49: Strukturální složení produktu P44 s m/z 449,6639



Obr. 50: Hmotnostní spektra PBP při 0 mV (A) a jeho oxidačních produktů při 800 mV (B).

4.2. ELUČNÍ PROFIL

U látek 4-bromfenol, 2,4-dibromfenol, 2,6-dibromfenol, 2,4,6-tribromfenol a pentabromfenol byl studován eluční profil při oxidačním potenciálu 700 mV. Celkový čas analýzy byl prodloužen na 5 minut. Na porézní grafitové elektrodě byla pozorována sorbce vznikajících oxidačních produktů. Většina z nich byla přítomna ještě v 5. minutě analýzy s poměrně velkou intenzitou.

Například u 2,6-DBP se ion produktu s m/z 496,7 začal eluovat v 0,78 min. Intenzita iontu s časem roste až do cca 3,50 minuty, poté začala klesat. Produkt se vymýval velmi pomalu. Časová závislost intenzity iontu produktu je uvedena v Tab. II.

Tab. II: Časová závislost intenzity iontu produktu m/z 496,7083 2,6-dibromfenolu

t [min]	Intenzita iontu m/z 496,7083	t [min]	Intenzita iontu m/z 496,7083
1,00-1,25	82	3,00-3,25	5650
1,25-1,50	408	3,25-3,50	4800
1,50-1,75	1760	3,50-3,75	5310
1,75-2,00	4050	3,75-4,00	4480
2,00-2,25	4280	4,00-4,25	4220
2,25-2,50	4730	4,25-4,50	4010
2,50-2,75	4930	4,50-4,75	3930
2,75-3,00	4960	4,75-5,00	3170

Na Obr. 51, B je pozorována sorbce produktu s m/z 496,7, na rozdíl od iontu 293,8, který sorbci na porézní grafitové elektrodě nevykazuje (Obr. 51, A).



Obr. 51: Chromatogram produktu s m/z 293,8 při 700 mv (A) a chromatogram produktu s m/z 496,7 při 700 mv (B)

4.3. VLIV SLOŽENÍ NOSNÉ KAPALINY NA ELEKTROCHEMICKOU OXIDACI

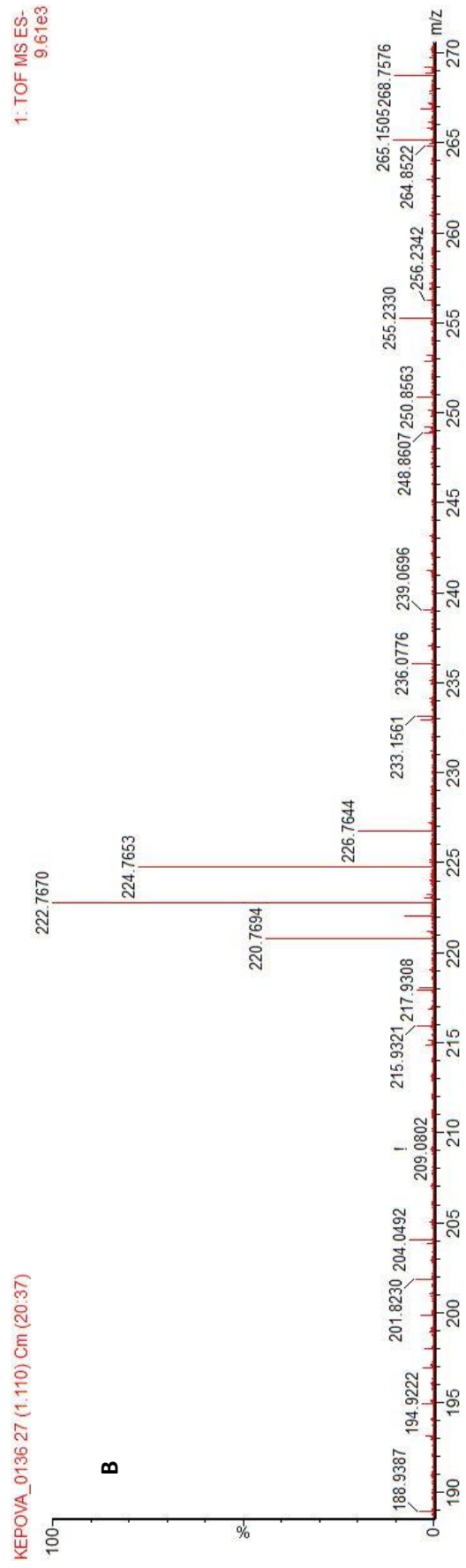
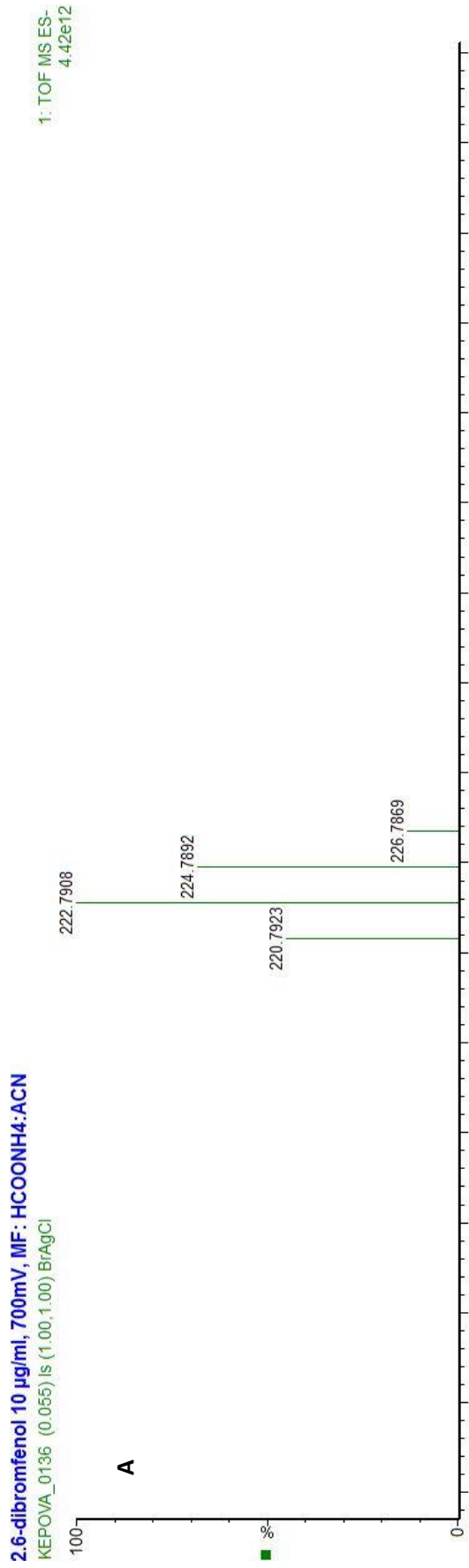
Dalším experimentem byl sledován vliv složení nosné kapaliny na elektrochemickou oxidaci při potenciálu 700 mV. Experiment probíhal za použití čtyř druhů nosných kapalin (HCOONH_4 v MeOH, HCOONH_4 v ACN, CH_3COONa v MeOH a CH_3COONa v ACN) vždy v poměru 50:50. Vzorčky standardů 4-bromfenolu, 2,4-dibromfenolu, 2,6-dibromfenolu, 2,4,6-tribromfenolu a pentabromfenolu byly připraveny rozpuštěním 3 mg standardu v daných kapalinách tak, aby výsledná koncentrace byla 1 mg/ml. Výchozí standardní roztoky byly dále ředěny na koncentraci 10 $\mu\text{g/ml}$.

Při použití kapalin s obsahem sodných iontů, tedy CH_3COONa v MeOH a CH_3COONa v ACN byla sledována tvorba aduktů sodíku, které oxidační produkty zcela zastínily. Oxidační produkty nebyly interpretovatelné a dané nosné kapaliny se jevily jako nevyhovující.

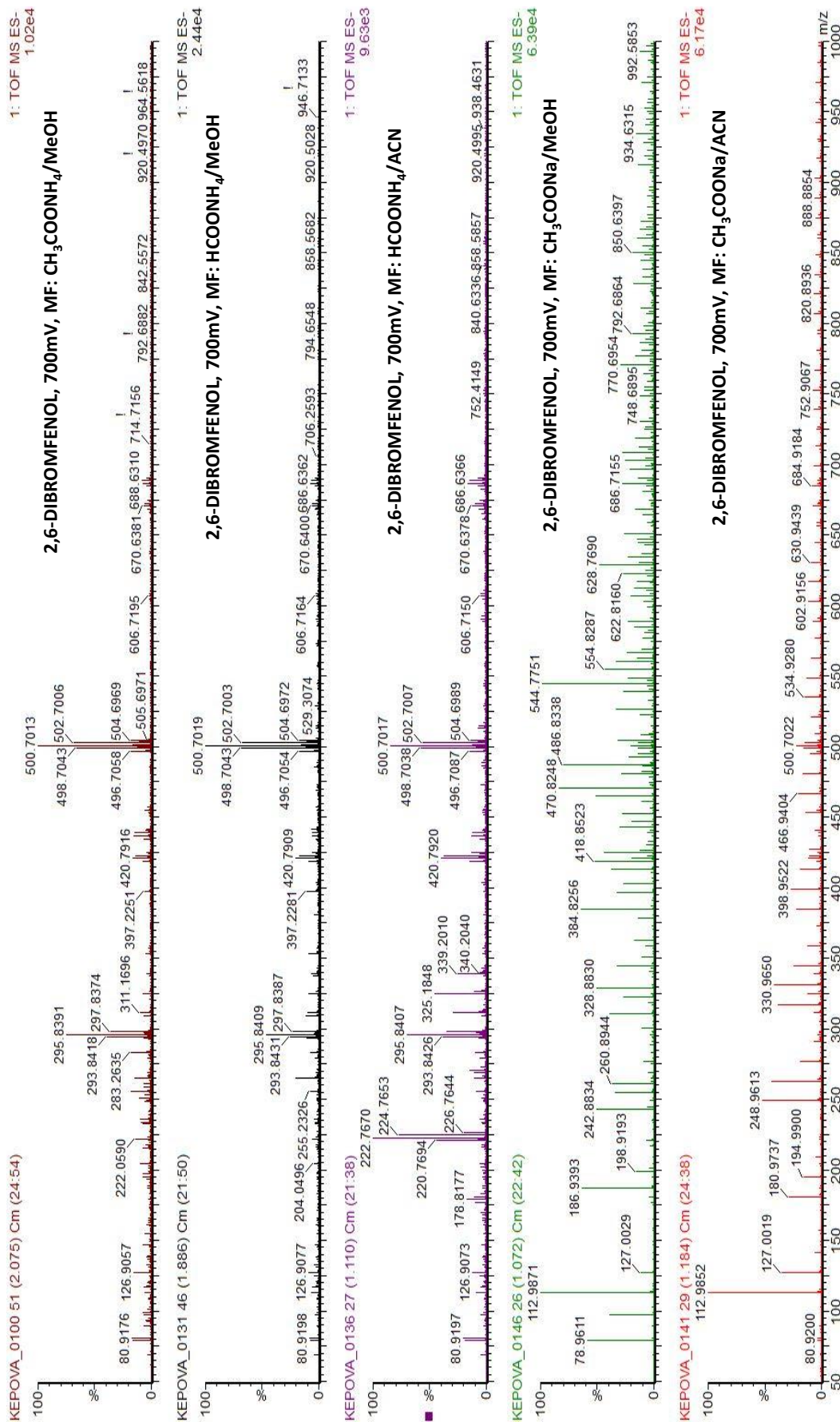
Mezi vhodnou nosnou kapalinou se řadí HCOONH_4 v MeOH, kde nebyly pozorovány žádné výrazné odlišnosti od základního systému $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ v MeOH.

V případě HCOONH_4 v ACN byl u všech vzorků nalezen ve spektru produkt o hmotnosti s m/z 220,7694. Jeho hodnota m/z napovídá vzniku sloučeniny BrAgCl^- , která je totožná s izotopickým modelem BrAgCl^- (Obr. 52). Vznik sloučeniny BrAgCl^- s m/z 220,7694 není znám. Předpoklad kontaminace ACN se při opakování experimentu za použití jiné zásobní láhve ACN nepotvrdil.

Na Obr. 53 je názorný přehled hmotnostních spekter oxidačních produktů 2,6-dibromfenolu za použití daných nosných kapalin ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$ v MeOH, HCOONH_4 v MeOH, HCOONH_4 v ACN, CH_3COONa v MeOH a CH_3COONa v ACN). U prvního, horního MS spektra byl použit pro srovnání základní systém $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ v MeOH.



Obr. 52: Izotopický model sloučeniny BrAgCl (A) a hmotnostní spektrum oxidačního produktu 2,6-DBP s hmotností m/z 220,7694 (B)



Obr. 53: Hmotnostní spektra 2,6-DBP v nosných kapalinách CH₃COONH₄ v MeOH, HCOONH₄ v MeOH, HCOONH₄ v ACN, CH₃COONa v MeOH a CH₃COONa v ACN

5. ZÁVĚR

Tato diplomová práce je zaměřena na identifikaci produktů vznikajících elektrochemickou oxidací vybraných bromovaných fenolů (4-bromfenolu, 2,4-dibromfenolu, 2,6-dibromfenolu, 2,4,6-tribromfenolu a pentabromfenolu). Vzhledem ke stoupající poptávce a výrobě převážně toxických bromovaných fenolů, rozšířené po celém světě, a s tím souvisejícího znečištění životního prostředí je potřeba se těmito látkami zabývat.

První pasáž teoretické části je věnována popisu poměrně nové analytické techniky, on-line spojení elektrochemie s hmotnostní spektrometrií se zaměřením na různé typy elektrochemických cel. Jsou popsány jejich výhody a nevýhody, elektrochemická oxidace a elektroaktivní funkční skupiny sloučenin. Nesmíme opomenout také aplikace EC-MS jejíž využití se nachází především ve farmaceutickém průmyslu a k identifikaci různých látek či metabolitů. Druhá pasáž poukazuje hlavně na vlastnosti, toxicitu, výskyt a využití jednotlivých bromovaných fenolů.

V experimentální části jsou prezentovány pravděpodobné strukturní složení oxidačních produktů 4-bromfenolu, 2,4-dibromfenolu, 2,6-dibromfenolu, 2,4,6-tribromfenolu a pentabromfenolu. Bylo zjištěno, že elektrochemickou oxidací dochází ke vzniku monomerních, dimerních a trimerních molekul. Značná část vzniklých produktů odpovídá etherům, dále docházelo ke vzniku chinonů a nitroderivátů. U všech zkoumaných látek se oxidační produkty sorbovaly na pórzní grafitové elektrodě. Dále byl sledován vliv složení nosné kapaliny na elektrochemickou oxidaci za použití čtyř druhů kapalin (HCOONH_4 v MeOH, HCOONH_4 v ACN, CH_3COONa v MeOH a CH_3COONa v ACN). Bylo zjištěno, že kapaliny s obsahem sodných iontů jsou pro identifikaci produktů nevyhovující a u kapalin s obsahem amonných iontů dochází ke vzniku nitroderivátů.

6. LITERATURA

1. Jirovský D., Bartošová Z., Skopalová J.: Electrochemistry on-line with mass spektrometry: Notes on current state of the technice, AUPO Chemica, **47**, 22–25 (2007).
2. Jirovský D.: *Elektrochemické senzory v analytických průtokových technikách*. Habilitační práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2012.
3. Van Berkel G. J.: J. Am. Soc. Mass Spectrom. **15**, 1691–1692 (2004).
4. Jurva U., Wikstrom H. V., Weidolf L., Bruins A. P.: Rapid Commun. Mass Spectrom. **17**, 800–810 (2003).
5. Faber H., Vogel M., Karst U.: Anal. Chim. Acta **834**, 9–21 (2014).
6. Karst U.: Angew. Chem. Int. Ed. **43**, 2476–2478 (2004).
7. Jahn S., Karst U.: J. Chromatogr. A, **1259**, 16–49 (2012).
8. Lohmann W. Baumann A., Karst U.: LC GC North Am. **28**, 470 (2010).
9. Lohmann W., Karst U.: Anal.Chem. **79**, 6831–6839 (2007).
10. Wang J.: *Analytical Electrochemistry*. Wiley-VCH, 2nd Ed., New York 2000.
11. Jurva U.: *Electrochemistry on-line with mass spectrometry: Instrumental methods for in vitro generation and detection of drug metabolites*. Dissertation thesis, Faculty of Mathematics and Natural Sciences, University of Groningen (2004).
12. Pretty J. R., Deng H., Goeringer D. E., Van Berkel G. J.: Anal. Chem. **72**, 2066–2074 (2000).
13. Flanagan R. J., Perrett D., Whelpton R.: *Electrochemical detection in HPLC: Analysis of Drugs and Poisons*, London 2005.
14. Yamada J., Matsuda H.: J. Electroanal. Chem. **44**, 189–198 (1973).
15. Gunasingham H.: TrAC, Trends Anal. Chem. **7**, 217–221 (1988).

16. Riman D.: *Elektrody z uhlíkového mikrovlákna jako amperometrické detektory pro HPLC s isokratickou i gradientovou elucí*. Diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2013.
17. Hájková J.: *Využití HPLC s elektrochemickou detekcí pro analýzu azithromycinu v biologických vzorcích*. *Bakalářská práce, Univerzita Karlova, Praha 2008*.
18. <http://www.spectrotech.com.tw/esa/cell.htm>, staženo 16. 2. 2015.
19. Fisher A. C., Compton R. G.: *J. Electroanal. Chem.* **318**, 53–59 (1991).
20. Jurva U., Wikstrom H. V., Bruins A. P.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **14**, 529–533 (2000).
21. Lohmann W., Karst U.: *Anal. Bioanal. Chem.* **386**, 1701–1708 (2006).
22. Honeychurch K.C., Hart J. P.: *Insciences J.* **4**, 1–18 (2014).
23. Knob R., Marák J., Staňová A., Maier V., Kaniansky D., Ševčík J.: *J. Chromatogr. A* **1217**, 3446–3451 (2010).
24. Segev O., Kushmaro A., Brenner A.: *Int. J. Environ. Res. Public Health* **6**, 478–491 (2009).
25. Vrkoslavová J., Stiborová H., Zemanová T., Macková M., Demnerová K.: *Chem. Listy* **105**, 654–660 (2011).
26. Alae M., Wenning R. J.: *Chemosphere* **46**, 579–582 (2002).
27. <http://www.phytosanitary.org/projekty/2004/vvf-03-04.pdf>, staženo 7. 4. 2015.
28. Knob R.: *Analýza vybraných bromovaných fenolů pomocí on-line spojení kapilární izotachoforézy s kapilární zónovou elektroforézou*. Rigorózní práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2012.
29. Marková E., Smyslová P., Macíková P., Skopalová J., Barták P.: *Chem. Listy* **106**, 195–199 (2012).

30. Polo M., Llompar M., Garcia-Jares C., Gomez-Noya G., Bollain M. H., Cela R.: *J. Chromatogr. A* **1124**, 11–21 (2006).
31. Sambe H., Hoshina K., Hosoya K., Haginaka J.: *J. Chromatogr. A* **1134**, 16–23 (2006).
32. Frederiksen M., Vorkamp K., Bossi R., Riget F., Dam M., Svensmark B.: *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **87**, 1095–1109 (2007).
33. Blanco E., Casais M. C., Mejuto M. C., Cela R.: *J. Chromatogr. A* **1068**, 189–199 (2005).
34. <https://www.fishersci.ca/viewmsds.do?catNo=AC304411000>, staženo 2. 4. 2015.
35. http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB7181317.htm, staženo 2. 4. 2015.
36. <https://www.spectrumchemical.com/MSDS/TCI-B0787.pdf>, staženo 2. 4. 2015.
37. Svoboda J.: *Organická chemie I*. 1. vyd., Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2005.
38. <http://chemyq.com/En/xz/xz1/3898tfvja.htm>, staženo 3. 4. 2015.
39. <https://www.fishersci.ca/viewmsds.do?catNo=AC406511000>, staženo 3. 4. 2015.
40. <https://www.spectrumchemical.com/MSDS/TCI-D0265.pdf>, staženo 3. 4. 2015.
41. <http://datasheets.scbt.com/sds/WPNA/EN/sc-238315.pdf>, staženo 3. 4. 2015.
42. http://www.apolloscientific.co.uk/downloads/msds/OR13037_msds.pdf, staženo 3. 4. 2015.
43. <http://www.fishersci.com/ecom/servlet/msdsproxy?productName=AC294270100&productDescription=2%2C6-DIBROMOPHENOL+99%2B%25+10GR&catNo=AC294270100&vendorId=VN00032119&storeId=10652>, staženo 3. 4. 2015.
44. <https://www.spectrumchemical.com/MSDS/TCI-D3384.pdf>, staženo 3. 4. 2015.
45. <http://www.chemyq.com/En/xz/xz1/7428crrcr.htm>, staženo 3. 4. 2015.

46. <https://www.spectrumchemical.com/MSDS/TCI-T0349.pdf>, staženo 3. 4. 2015.
47. <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad66.htm#4.3>, staženo 3. 4. 2015.
48. Whitfield F. B., Last J. H., Shaw K. J., Tindale C. R.: *J. Sci. Food Agric.* **46**, 29–42 (1988).
49. Whitfield F. B., Helidoniotis F., Shaw K. J., Svoronos D.: *J. Agric. Food Chem.* **47**, 2367–2373 (1999).
50. Mordáčová T.: *Analýza bromovaných fenolů v plastech*. Diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2012.
51. Vilma Mota da Silva, Marcia Cristina da Cunha Veloso, Aline S. de Oliveira, Gislaine Vieira Santos, Pedro A. de S. Pereira, Jailson B. de Andrade: *Talanta* **68**, 323–328 (2005).
52. Lopez P., Brandsma S. A., Leonards P. E. G., De Boer J.: *J. Chromatogr. A* **1216**, 334–345 (2009).
53. Adams J. B., Lock S. J., Toward M. R., Williams B. M.: *Food Chem.* **64**, 377–381 (1999).
54. Pizarro C., Sáenz-González C., Perez-del-Notario N., González-Sáiz J. M.: *J. Chromatogr. A* **1217**, 7630–7637 (2010).
55. Kučerová P.: *Využití elektrochemických technik pro výzkum biologicky aktivních látek*. Rigorózní práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2015.
56. Marková E.: *Studium elektrochemických přeměn vybraných derivátů bromfenolu*. Diplomová práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2011.
57. <http://www.inchem.org/documents/sids/sids/118796.pdf>, staženo 3. 4. 2015.
58. Budavari S., O'Neil M. J., Smith A. (Eds.): *The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*, 12th edition. Chapman & Hall, New York 1996.
59. Smyslová P.: *Elektrochemická aktivita bromovaných zpomalovačů hoření*. Bakalářská práce, Univerzita Palackého, Olomouc 2010.

60. Jančaříková M.: *Hodnocení vytěkávacích toků bromovaných zpomalovačů hoření z materiálů a spotřebních výrobků*. Diplomová práce, Masarykova univerzita, Brno 2013.
61. Polo, M., Llompart M., Garcia-Jares C., Gomez-Noya G., Bollain M.-H., Cela R.: J. Chromatogr. A, **1124**, 11–21 (2006).
62. Haldén N. A., Nyholm R. J., Andersson L. P., Holbech H., Norrgren L.: Aquat. Toxicol. **100**, 30–37 (2010).
63. Thomsen C., Lundanes E., Becher G.: J. Environ. Monit. **3**, 366–370 (2001).
64. Thomsen C., Leknes H., Lundanes E., Becher G.: J. Anal. Toxicol. **26**, 129–137 (2002).
65. <http://www.chemicaland21.com/specialtychem/perchem/2,4,6-TRIBROMOPHENOL.htm>, staženo 3. 4. 2015.
66. Nichkova M., Germani M., Marco M. P.: J. Agric. Food Chem. **56**, 29–34 (2008).
67. http://www.chemdb-portal.cn/fisher_msds_pdf/608-71-9_EN.pdf, staženo 18. 4. 2015.
68. <https://fscimage.fishersci.com/msds/12307.htm>, staženo 18. 4. 2015.
69. <http://www.chemnet.com/dict/dict--608-71-9--cz.html>, staženo 18. 4. 2015.
70. <http://www.guidechem.com/msds/608-71-9.html>, staženo 18. 4. 2015.
71. Thomsen C., Janák K., Lundanes E., Becher G.: J. Chromatogr. B **750**, 1–11 (2001).

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

MS	mass spectrometry	hmotnostní spektrometrie
EC	electrochemistry	elektrochemie
HPLC	high-performance liquid chromatography	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UPLC	ultra performance liquid chromatography	ultra účinná kapalinová chromatografie
ESI	electrospray ionization	ionizace elektrosprejem
EI	electron impact	ionizace elektronem
LC	liquid chromatography	kapalinová chromatografie
PTFE	polytetrafluoroethylene	polytetrafluorethylen
Kel-F	polychlorotrifluoroethylene	polychlorotrifluoroethylen
4-BP	4-bromophenol	4-bromfenol
2,4-DBP	2,4-dibromophenol	2,4-dibromfenol
2,6-DBP	2,6-dibromophenol	2,6-dibromfenol
2,4,6-TBP	2,4,6-tribromophenol	2,4,6-tribromfenol
PBP	pentabromophenol	pentabromfenol
CH ₃ COONH ₄	ammonium acetate	octan amonný
CH ₃ COONa	sodium acetate	octan sodný
HCOONH ₄	ammonium formate	mravenčan amonný
HCOOH	formic acid	kyselina mravenčí
MeOH	methanol	methanol
ACN	acetonitrile	acetonitril
CO	carbon monoxide	oxid uhelnatý
CO ₂	carbon dioxide	oxid uhličitý
HBr	hydrogen bromide	bromovodík
Au	aurum (latinsky)	zlato
Ag	argentum (latinsky)	stříbro
Pt	platinum (latinsky)	platina
MF	mobile phase	mobilní fáze

LD ₅₀	medium lethal dose	letální (smrtná) dávka látky způsobující 50% úhyn testovaných živočichů
ppm	parts per million	jedna miliontina
min.	minuta	
tzn.	to znamená	
tzv.	takzvaný	
např.	například	
cca	přibližně	

8. SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1: On-line zapojení EC-MS.
- Obr. 2: Coulometrická cela ESA Model 5010A (*Standard Analytical Cell*)
- Obr. 3: Coulometrická cela ESA Model 5011A (*High Sensitivity Analytical Cell*)
- Obr. 4: Coulometrická cela ESA Model 5020 (*Guard Cell*)
- Obr. 5: Coulometrická cela ESA Model 5021 (*Conditioning Cell*)
- Obr. 6: Coulometrická cela ESA Model 5030 (*Cell*)
- Obr. 7: Amperometrická cela ESA Model 5040 (*Analytical cell*)
- Obr. 8: Amperometrická cela ESA Model 5041 (*Enhanced Microbore analytical cell*)
- Obr. 9: Amperometrická cela typu „wall-jet“
- Obr. 10: Elektro-oxidovatelné funkční skupiny
- Obr. 11: Elektro-redukovatelné funkční skupiny
- Obr. 12: Strukturní vzorec 4-bromfenolu
- Obr. 13: Příprava 4-bromfenolu
- Obr. 14: Strukturní vzorec 2,4-dibromfenolu
- Obr. 15: Strukturní vzorec 2,6-dibromfenolu
- Obr. 16: Strukturní vzorec 2,4,6-tribromfenolu
- Obr. 17: Příprava 2,4,6-tribromfenolu
- Obr. 18: Strukturní vzorec pentabromfenolu
- Obr. 19: Instrumentace použitých laboratorních přístrojů; 1- UPLC, 2- elektrochemická cela, 3- MS, 4- potenciostat
- Obr. 20: Strukturní složení produktů P1, P2 a P3 s m/z 510,8224
- Obr. 21: Strukturní složení fragmentu P3-F1 s m/z 492,8
- Obr. 22: Strukturní složení fragmentu po ztrátě bromfenolu, m/z 338,9
- Obr. 23: Strukturní složení produktů P4, P5, P6 a P7 s m/z 446,8868
- Obr. 24: Strukturní složení produktů P8 a P9 s m/z 432,9104
- Obr. 25: Strukturní složení produktů P10 a P11 s m/z 340,8844
- Obr. 26: Strukturní složení produktu P12 s m/z 262,9731
- Obr. 27: Strukturní složení produktu P13 s m/z 186,9434
- Obr. 28: Hmotnostní spektra 4-BP při 0 mV (A) a jeho oxidačních produktů při 700mV (B)
- Obr. 29: MSMS spektrum produktu s m/z 510,8 při 700mV
- Obr. 30: MSMS spektrum produktu s m/z 340,9 při 700mV

- Obr. 31: Strukturní složení produktů P14, P15 a P16 s m/z 666,6366
- Obr. 32: Strukturní složení produktů P17 a P18 s m/z 496,7061
- Obr. 33: Strukturní složení produktů P19, P20 a P21 s m/z 434,7870
- Obr. 34: Strukturní složení produktů P22, P23 a P24 s hmotností m/z 418,7946
- Obr. 35: Hmotnostní spektra 2,4-DBP při 0 mV (A) a jeho oxidačních produktů při 600mV (B)
- Obr. 36: MSMS spektrum produktu s m/z 496,7 při 600 0mV
- Obr. 37: Strukturní složení produktů P25 a P26 s m/z 682,6638
- Obr. 38: Strukturní složení produktů P27 a P28 s m/z 666,6522
- Obr. 39: Strukturní složení produktů P29 a P30 s m/z 496,7055
- Obr. 40: Strukturní složení produktů P31, P32 a P33 s m/z 434,7887
- Obr. 41: Strukturní složení produktů P34, P35 a P36 s m/z 418,7883
- Obr. 42: Strukturní složení produktu P37 s m/z 293,8418
- Obr. 43: Hmotnostní spektra 2,6-DBP při 0 mV (A) a jeho oxidačních produktů při 700mV (B).
- Obr. 44: Hmotnostní spektra 2,6-DBP při 700 mV v 1% HCOOH v H₂O:MeOH (A) a 2,6-DBP při 700 mV v 1% HCOOH v H₂O:MeOH za přídavku 10 μ l 0,1M NaNO₂ (B).
- Obr. 45: Strukturní složení produktů P38, P39 a P40 s m/z 512,7012
- Obr. 46: Strukturní složení produktu P41 s m/z 432,7750
- Obr. 47: Strukturní složení produktů P42 a P43 s m/z 264,8543
- Obr. 48: Hmotnostní spektra 2,4,6-TBP při 0 mV (A) a jeho oxidačních produktů při 750mV (B).
- Obr. 49: Strukturní složení produktu P44 s m/z 449,6639
- Obr. 50: Hmotnostní spektra PBP při 0 mV (A) a jeho oxidačních produktů při 800 mV (B).
- Obr. 51: Chromatogram produktu s m/z 293,8 při 700 mv (A) a chromatogram produktu s m/z 496,7 při 700 mV (B)
- Obr. 52: Izotopický model sloučeniny BrAgCl⁻ (A) a hmotnostní spektrum oxidačního produktu 2,6-DBP s hmotností m/z 220,7694 (B)
- Obr. 53: Hmotnostní spektra 2,6-DBP v nosných kapalinách CH₃COONH₄ v MeOH, HCOONH₄ v MeOH, HCOONH₄ v ACN, CH₃COONa v MeOH a CH₃COONa v ACN

9. SEZNAM TABULEK

Tab. I: Parametry iontového zdroje

Tab. II: Časová závislost intenzity iontu produktu m/z 496,7083 2,6-dibromfenolu.