

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Bc. Lucie Hostačná

STANOVENÍ CHLORBENZOOVÝCH KYSELIN
V ENVIRONMENTÁLNÍCH VZORCÍCH POMOCÍ
SEPARAČNÍCH TECHNIK S HMOTNOSTNÍ DETEKČÍ

Determination of chlorobenzoic acids in environmental
samples using a separation techniques with mass detection

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. RNDr. Zuzana Bosáková, CSc.

Praha 2011

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857.

Prohlášení

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

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 22. 8. 2011

Lucie Hostačná

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému konzultantovi Doc. RNDr. Tomášovi Cajthamlovi, Ph.D. za čas a cenné rady, které mi věnoval, za odborné vedení a všestrannou pomoc při vypracování této diplomové práce. Dále děkuji RNDr. Zdeně Křesinové, která mi ochotně pomohla a poradila vždy, kdy jsem potřebovala. Rovněž děkuji své školitelce Doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, CSc., že mi tuto práci zprostředkovala.

V neposlední řadě děkuji svému přítelovi a zbytku své rodiny, která mi během studia pomáhala a vždy mě podporovala.

Obsah

Abstrakt.....	6
Abstract.....	7
Seznam zkratk.....	8
1 Úvod.....	9
2 Cíl práce.....	10
3 Literární úvod.....	11
3.1 Chlorbenzoové kyseliny.....	11
3.2 Fyzikální a chemické vlastnosti CBA.....	12
3.3 Zdroje znečištění životního prostředí.....	13
3.4 Toxicita CBA a vliv na živé organismy.....	16
3.5 Biodegradace CBA.....	18
3.6 Metody extrakce CBA.....	19
3.7 Metody stanovení CBA.....	21
3.8 Plynová chromatografie.....	22
4 Experimentální část.....	25
4.1 Používaný materiál a chemikálie.....	25
4.2 Chromatografické podmínky – HPLC/UV.....	27
4.3 Chromatografické podmínky – GC/MS.....	28
4.4 Příprava zásobních roztoků.....	30
4.5 Příprava půdy před stanovením.....	30
4.6 Umělá kontaminace půdy.....	30
4.7 Příprava extrakčních patron pro extrakci vzorků pomocí ASE.....	31
4.8 Vysokotlaká extrakce rozpouštědlem.....	32
4.9 Přečištění extraktu půdy gelovou permeační chromatografií.....	33
4.9.1 Příprava gelu a kolony.....	33
4.9.2 Retenční chování analytů při použití gelové permeační chromatografie a stanovení vlivu půdní matrice.....	34
4.10 Derivatizace vzorků pro měření GC/MS.....	35
4.10.1 Použití derivatizačního činidla methylester kyseliny chlormravenčí.....	35

4.10.2	Použití derivatizačního činidla diazomethan	37
4.11	Validace metody	39
5.	Výsledky a diskuze.....	41
5.1	Optimalizace derivatizace činidlem methylester kyseliny chlormravenčí	41
5.2	Optimalizace derivatizace činidlem diazomethan.....	44
5.2.1	GC/MS podmínky pro 6 standardů MeCBA	44
5.2.2	Stanovení účinnosti derivatizace pomocí DM	45
5.2.3	Ověření účinnosti derivatizace DM	47
5.2.4	Optimalizace GC/MS podmínek pro 15 CBA	49
5.4	Přečištění extraktu gelovou permeační chromatografií	52
5.4.1	Retenční chování analytů.....	52
5.4.2	Určení vlivu matrice půdy na retenční chování analytů	52
5.5	Analýza 15 CBA v uměle kontaminované půdě	52
5.6	Validace metody	54
5.6.1	Kalibrační křivky.....	54
5.6.2	Limit stanovitelnosti LOQ zvolené analytické metody	56
5.6.3	Správnost a přesnost metody.....	57
5.7	Analýza reálného vzorku půdy	59
6.	Závěr	61
	Seznam použité literatury.....	63
	Přílohy A - I.....	71

Abstrakt

Kyseliny chlorbenzoové jsou významným kontaminantem životního prostředí, jejichž hlavním zdrojem je bakteriální degradace polychlorovaných bifenyly. Kyseliny chlorbenzoové se kumulují v životním prostředí a inhibují další bakteriální degradaci polychlorovaných bifenyly.

V této práci byla optimalizována metoda pro stanovení 15 derivátů chlorbenzoových kyselin (2-CBA; 3-CBA; 4-CBA; 2,3-CBA; 2,4-CBA; 2,5-CBA; 2,6-CBA; 3,4-CBA; 3,5-CBA; 2,3,5-CBA; 2,3,6-CBA; 2,4,6-CBA; 2,3,4,5-CBA; 2,3,5,6-CBA a 2,3,4,5,6-CBA) v půdní matrici zahrnující vysokotlakou extrakci rozpouštědlem, přečištění pomocí gelové permeační chromatografie, derivatizaci diazomethanem a následnou kvantifikaci vzorků pomocí GC/MS. Jako extrakční podmínky byly použity: extrakční směs 1% kyselina octová v hexan/acetonu (1:1 v/v), teplota 150 °C, tlak 10,34 MPa. Pro přečištění pomocí gelové permeační chromatografie bylo použito rozpouštědlo dichlormethan. Derivatizace pomocí diazomethanu měla účinnost v rozsahu 83,7 – 110,6 % s relativní směrodatnou odchylkou 2,1 – 14,2 %.

Aplikace optimalizované metody na uměle kontaminované vzorky půdy při analýze pomocí GC/MS poskytla výtěžnost všech analytů v rozsahu 91,7 – 132,5 % s relativní směrodatnou odchylkou 2,1 – 12,1 %.

Validace zvolené analytické metody po aplikaci na GC/MS poskytla u analytů 2-CBA; 3-CBA; 4-CBA a 2,3,4,5-CBA limit stanovitelnosti 0,003 µg/ml, u ostatních analytů 0,001 µg/ml. Hodnoty správnosti metody se pohybovaly od 87 % do 130 % s přesností od 2 - 12 % vyjádřena % relativní směrodatné odchylky.

Aplikací metody na analýzu reálného vzorku půdy kontaminované polychlorovanými bifenyly bylo detekováno všech 15 derivátů kyseliny chlorbenzoové.

Klíčová slova: Chlorbenzoové kyseliny, vysokotlaká extrakce rozpouštědlem, gelová permeační chromatografie, derivatizace, půdní matrice, GC/MS

Abstract

Chlorobenzoic acids are a major environmental contaminant. The main source of contamination of environmental matrix is a bacterial degradation of polychlorinated biphenyls.

In this work, it has been optimized a method for the determination of 15 chlorobenzoic acid derivatives (2-CBA; 3-CBA; 4-CBA; 2,3-CBA; 2,4-CBA; 2,5-CBA; 2,6-CBA; 3,4-CBA; 3,5-CBA; 2,3,5-CBA; 2,3,6-CBA; 2,4,6-CBA; 2,3,4,5-CBA; 2,3,5,6-CBA and 2,3,4,5,6-CBA) in the soil matrix, including accelerated solvent extraction, purification by gel permeation chromatography, derivatization and subsequent quantification of samples by GC/MS. As the extraction conditions were used: an extraction mixture of 1% acetic in hexane/acetone (1:1 V/v), temperature by 150 °C, pressure by 10,34 MPa. For purification by gel permeation chromatography solvent was used dichloromethane. Derivatization with diazomethane was determined in the range of 83,7 to 110,6 % with relative standard deviation from 2,1 to 14,2 %.

Application of the optimized method of the artificially contaminated soil samples in the analysis of GC/MS provided the yield of all analytes in the range of 91,7 to 132,5 % with relative standard deviation from 2,1 to 12,1 %.

Validation of methods after application to GC/MS gave the analytes 2-CBA; 3-CBA; 4-CBA and 2,3,4,5-CBA the limit of quantification of 0,003 µg/ml, for other analytes of 0,001 µg/ml. The values of method accuracy ranged from 87 % to 130 % with precision of 2 to 12 % expressed as relative standard deviation %.

All 15 derivatives of chlorobenzoic acids have been detected by applying the method to analyze real sample of soil contaminated with polychlorinated biphenyls.

Keywords: Chlorobenzoic acids, accelerated solvent extraction, gel permeation chromatography, derivatization, soil matrix, GC/MS

Seznam zkratek

2,3-CIPh	2,3-dichlorfenol
ACN	acetonitril
ASE	vysokotlaká extrakce rozpouštědlem
BSTFA	bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
CBA	kyselina chlorbenzoová
DCM	dichlormethan
DM	diazomethan
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EtAc	ethylester kyseliny octové
GC	plynová chromatografie
GPC	gelová permeační chromatografie
HCB	hexachlorbenzen
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
LOD	limit detekce
LOQ	limit stanovitelnosti
m/z	poměr hmotnosti náboje a iontu
MAE	extrakce mikrovlnnou energií
MCF	methylester kyseliny chlormravenčí
MeCBA	methylester kyseliny chlorbenzoové
MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní detekce
NADH	redukovaný nikotinamid adenin dinukleotid
PCB	polychlorovaný byfenyl
PTFE	polytetrafluorethylen
Pyr	pyridin
r ²	regresní koeficient
RSD	relativní směrodatná odchylka
SF	stacionární fáze
TFA	kyselina trifluoroctová
TMSI	tetramethylsilylimidazol
UV	ultrafialová detekce

1 Úvod

V posledních letech se problematika zabývající se výskytem polychlorovaných bifenyly (PCB) v přírodě stala velmi aktuálním tématem. Díky medializované problematice PCB existuje mnoho prací zabývajících se problematikou jejich vlivu na životní prostředí, škodlivostí vůči organismům, ale také selektivním stanovením PCB v environmentálních matricích a v neposlední řadě také biodegradními metodami.

Jedním z konečných produktů bakteriální biodegradace PCB jsou různé deriváty kyseliny chlorbenzoové (CBA). CBA mohou být toxické pro řadu vodních organismů, toxicita byla také prokázána vůči některým druhům rostlin. V hlavní řadě má ale přítomnost zástupců CBA v životním prostředí negativní účinky na následnou bakteriální degradaci PCB. CBA se v životním prostředí kumulují a jejich přítomnost následně inhibuje další bakteriální degradaci PCB.

Do současné doby nebyla vypracována selektivní analytická metoda umožňující stanovení více derivátů CBA v environmentálních vzorcích, s konečnou analýzou pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC/MS). Stanovení koncentrace CBA v environmentálních vzorcích je důležité z hlediska ochrany životního prostředí. Přítomnost CBA v půdě může mít za následek zpomalení či úplné zastavení procesu degradace PCB zprostředkované bakteriemi.

Tato diplomová práce se v experimentální části zaměřuje na vypracování analytické metody umožňující stanovení 15 derivátů kyseliny chlorbenzoové (15 CBA) v půdních matricích.

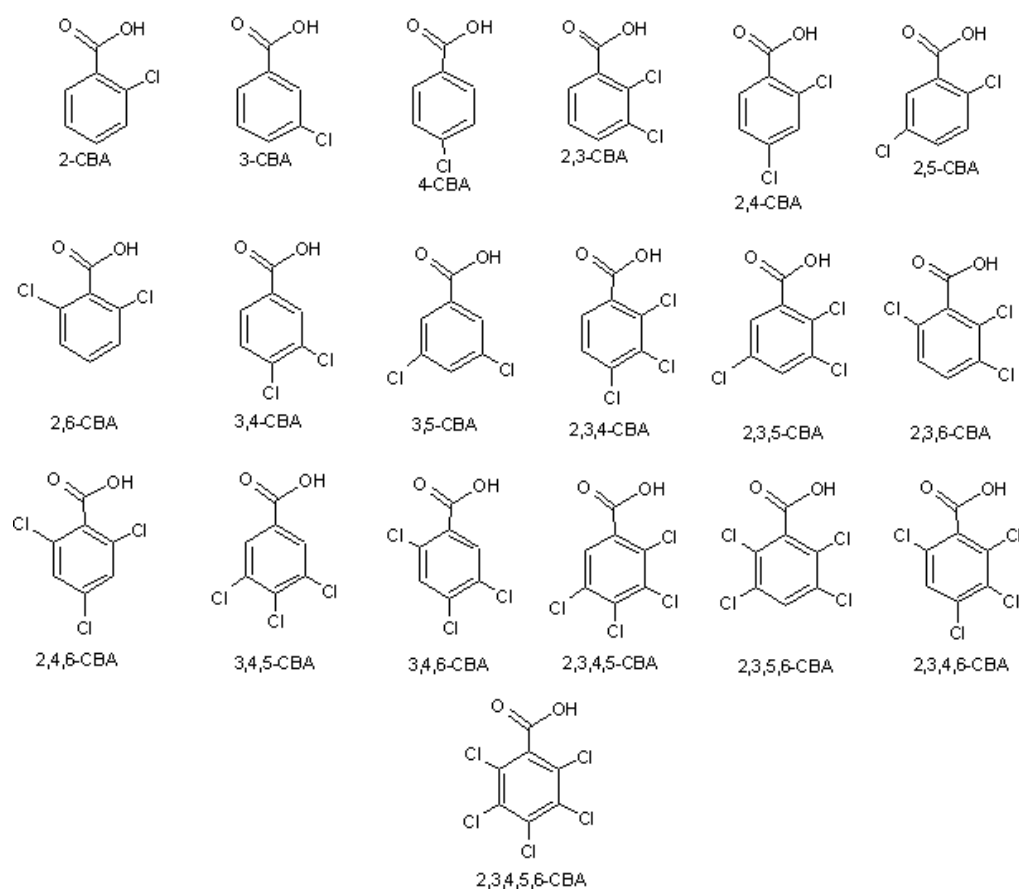
2 Cíl práce

Cílem diplomové práce je vypracovat vhodnou metodu pro selektivní stanovení 15 CBA v půdní matrici pomocí GC/MS zahrnující vypracování literární rešerše zabývající se problematikou analýzy chlorbenzoových kyselin, vypracování derivatizačního postupu umožňujícího měření pomocí GC/MS, optimalizaci extrakčního kroku a vypracování selektivního čistícího mezikroku. Závěrem diplomové práce je aplikace optimalizované metodiky na reálně kontaminovanou půdu.

3 Literární úvod

3.1 Chlorbenzoové kyseliny

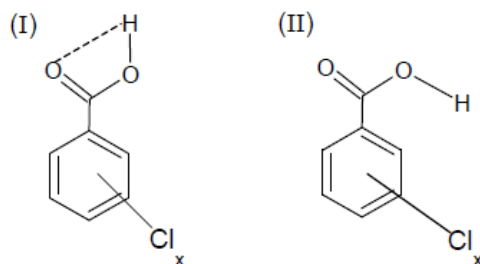
CBA jsou deriváty benzoové kyseliny, které ve své molekule obsahují 1 – 5 atomů chloru. Rozdílný počet a polohy atomů chloru v molekulách CBA umožňují existenci 19 derivátů CBA (Obr. 1).



Obr. 1 Struktury derivátů chlorbenzoových kyselin

3.2 Fyzikální a chemické vlastnosti CBA

Neionizovaná forma CBA existuje ve dvou různých konformacích karboxylové skupiny (Obr. 2). V plynné fázi jsou všechny konformery s intramolekulární vazbou vodíkového atomu (I) stabilnější než odpovídající konformery bez intramolekulární vazby (II) (1).



Obr. 2 Dva různé konformery karboxylové skupiny CBA. (I) karboxylová skupina s intramolekulární vazbou vodíkového atomu, (II) karboxylová skupina bez intramolekulární vazby (1)

Všechny CBA jsou silnější kyseliny než kyselina benzoová. Při pH 7 budou všechny existovat výlučně ve formě aniontu (1).

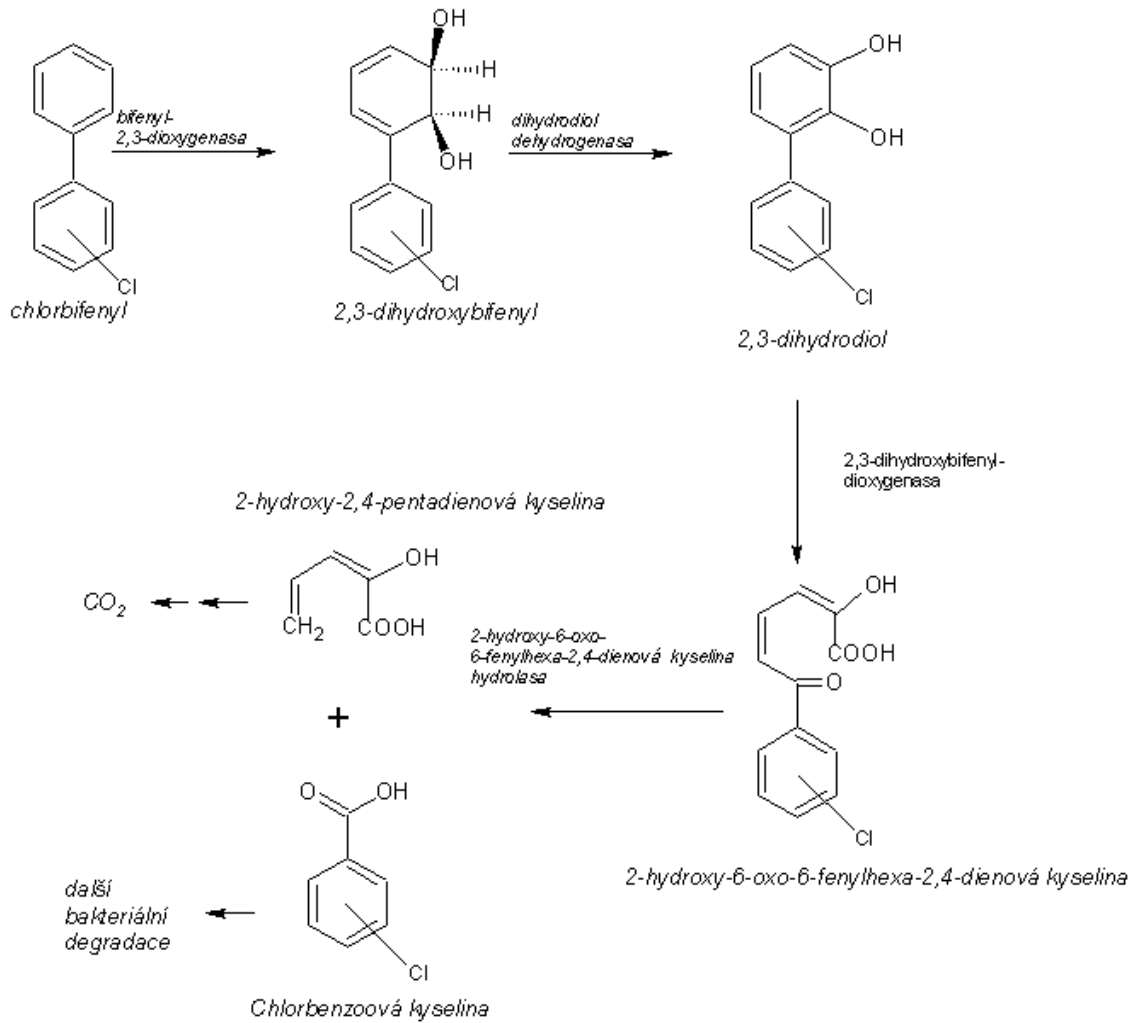
3.3 Zdroje znečištění životního prostředí

Chlorované organické sloučeniny vážně znečišťují životní prostředí v důsledku jejich ekotoxicity a vysoké perzistence (2).

Přírodní zdroj CBA je téměř neznámý. Existuje pouze jedna zmínka o pyrolytické formě CBA nalezena ve vulkanickém popelu (3).

Kyseliny chlorbenzoové jsou známé jako meziprodukty vznikající aerobní biologickou nebo chemickou degradací pesticidů a herbicidů (4). CBA byly přítomny v oblastech ošetřených herbicidy jako dikamba (2,5-dichlor-6)-methoxybenzoová kyselina a 2,3,6-trichlorbenzen (5). CBA jsou známé také jako kontaminanty vypouštěné ze závodů papírenského průmyslu (6).

V neposlední řadě je důležité zmínit mikrobiální aerobní degradaci PCB, jejímž meziproduktem jsou právě CBA (Obr. 3). Jedná se o největší zdroj znečištění životního prostředí CBA. PCB jsou perzistentní organické znečišťující látky. Polychlorované bifenyly byly použity jako chladicí kapaliny a maziva v transformátorech, kondenzátorech a jiných elektrických zařízeních, díky jejich odolnosti vůči vysokým teplotám a dobrým izolačním vlastnostem (7). Odhaduje se, že po celém světě bylo vyrobeno více než 1,5 milionu tun PCB (8).



Obr. 3 Cesty aerobní bakteriální degradace PCB vedoucí k chlorbenzoové kyselině (2,9,10,11)

PCB směsi byly vyráběny pod různými obchodními názvy, např. Aroclor (USA), Clophen (Německo), Kanechlor (Japonsko), Sovol (bývalý SSSR), Ceredor (UK), a Delor 103 (Slovensko) (7). Obchodní výroba PCB v USA skončila v roce 1977. V ostatních zemích se výroba zastavila o několik let později (12). Jejich masivní ukončení a zakazování výroby bylo způsobeno prokázáním karcinogenity (13) a taky dalších závažných dopadů na imunitní, reprodukční, nervový a endokrinní systém (8, 14, 15).

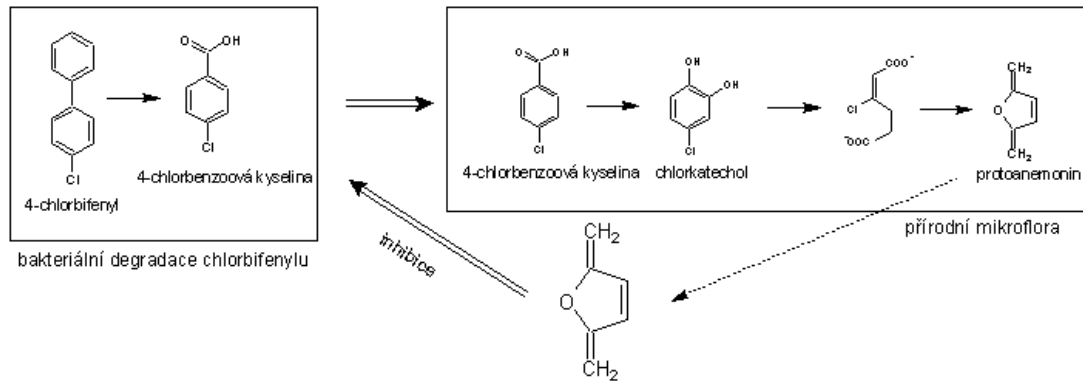
Navzdory zákazu používání PCB ve většině zemí stále přetrvávají v životním prostředí, zejména v půdě a sedimentech, a to díky jejich výjimečné chemické stabilitě.

V České republice, podobně jako v jiných průmyslových zemích, docházelo v důsledku dlouhodobého používání PCB k jejich kontaminaci a hromadění. Kontaminace byla způsobena neznalostí ekologických rizik při ukládání odpadů obsahujících PCB na běžné skládky a také únikem kapaliny do okolí způsobeným často nevyhovujícím technickým stavem příslušných zařízení (16). Minimálně 70 % vyrobených PCB se stalo polutantem ekosystémů ČR a SR (17). Z hlediska původu jsou hlavním zdrojem PCB v ČR a SR směsi vyrobené v letech 1959 až 1984 v n. p. Chemko Strážské a použité jako dielektrické (Delor 103), teplonosné (Delotherm) a hydraulické kapaliny (Hydelor), maziva a plastifikátory (Delor 106) (18).

Obecně zvýšený obsah PCB ve všech složkách životního prostředí byl prokázán hlavně v oblastech velkých průmyslových aglomerací silně industrializovaných zemí. U nás je z tohoto pohledu nutné zaměřit se na oblasti Prahy, Ostravy, Ústí nad Labem a Lhenice.

I když toxicita CBA vůči bakteriím degradující PCB není příliš velká (18, 19), může ovlivňovat následnou bakteriální degradaci PCB (7, 20, 21). Bakterie degradující PCB nemají schopnost degradovat CBA. Dochází ke kumulaci CBA, které následně mají inhibiční vliv na další bakteriální degradaci PCB. Pravděpodobně dochází přímo k inhibici genové exprese (7).

Navíc další transformace chlorbenzoátů přes chlorkatechol má za následek vznik toxického protoanemoninu z chlorkatecholu (Obr. 4) (22, 23). Protoanemonin je antibiotikum působící na široké spektrum mikroorganismů tvořící aktivní složku rostlin z čeledi pryskyřníkovité (*Ranunculaceae*) (22, 24).



Obr. 4 Bakteriální degradace chlorbifenylu vedoucího k toxickému produktu protoanemoninu, který následně inhibuje další degradaci PCB (22, 23)

Vzhledem k tomu, že CBA jsou rozpustné ve vodě, mohou ve znečištěné lokalitě přejít do vodné fáze a následně se akumulovat například v podzemních vodách (25). CBA se v říční vodě mohou vázat na huminové látky esterovou vazbou (26).

3.4 Toxicita CBA a vliv na živé organismy

Disociace je důležitým faktorem toxicity CBA. Neionizované analogy CBA jsou obvykle méně toxické než ionizované formy. CBA jsou toxické pro organismy, jako jsou obrvení (27), Dafnie (28), řasy (29) a ryby (28). Toxicita CBA byla také prokázána vůči některým rostlinám, například tabáku (*Nicotiana tabacum*) (30).

Sazenice tabáku byly vystaveny po dobu 24 hodin s mono-CBA (2- a 3-CBA); di-CBA (2,5- a 3,4-CBA) a tri-CBA (2,4,6- a 2,3,5-CBA) a došlo k poškození DNA. Koncentrace CBA potřebná k indukci toxických a DNA škodlivých účinků na sazenice tabáku závisí na počtu chlorů.

Nejtoxičtější byly při stejné koncentraci tri-CBA, následně di-CBA a nakonec mono-CBA. Zhruba šestkrát vyšší koncentrace mono-CBA vyvolá stejnou toxicitu jako tri-CBA (30).

CBA vykazují mírnou estrogenní aktivitu. Jejich estrogenicita je různě silná díky rozdílné chemické struktuře. Nejvyšší aktivitu vykazují 2,3-CBA, 2,3,6-CBA, 2,4,6-CBA a všechny mono-CBA. Na druhou stranu PCB (směs PCB kongenerů Delor 103) vykazuje aktivitu androgenní. Výsledky naznačují možné přechody z hormonální aktivity PCB během bakteriální degradace (31).

Oxidační degradace chlorbenzoátů může být uskutečněna jedním ze dvou řetězců reakcí: eliminací nebo substitucí chloru před rozštěpením aromatického kruhu (32).

Některé bakterie (hlavně rodu *Pseudomonas*, *Burkholderia* a *Alcaligenes*) jsou schopny využít CBA jako jediný zdroj uhlíku a energie (33, 34). Pokud je k dispozici molekulární kyslík a exogenní NADH, vede tato reakce k degradaci 2-CBA a 2,5-CBA na katechol a 4-chlorkatechol (35). Také bakterie *Pseudoxanthomonas sp. PNK-04* vykázala schopnost degradovat 2-CBA a 3-CBA. Dále bylo zjištěno, že začlenění povrchově aktivní látky syntetizované z živých buněk do kultivačního média stimuluje degradaci (36).

Metabolismus CBA u rostlin zatím není dostatečně znám. Rostlinné buňky jsou schopny metabolizovat CBA v různém stupni. Ze tří testovaných druhů rostlin *in vitro* pěstovaných (křen, lilek a tabák) pouze křen a lilek ukázaly významnou schopnost transformace CBA. Obě rostliny metabolizovaly během dvou týdnů více než 90 % 2-CBA a 20 - 40 % z 2,3-; 2,4-; 2,5- a 2,6-CBA (37).

3.6 Metody extrakce CBA

Za účelem stanovení koncentrace CBA přítomné v environmentálních matricích je nutné zahrnout extrakci. Pro vodné vzorky obsahující CBA byla popsána metoda extrakce kapalina-kapalina pomocí extrakčního rozpouštědla *n*-butyl alkoholu (38), methyl *t*-butyl etheru (39) a ethylesteru kyseliny octové (EtAc) (38, 40). Bylo prokázáno, že nižší extrakční teplota má pozitivní vliv na výtěžnost extrakce (38).

V literatuře existuje mnoho prací zabývajících se extrakcí půdy obsahující organické polutanty, například jednoduchá extrakce půdy obsahující CBA za použití detergentu Zwittergent a roztoku hexametafosforečnanu sodného (41, 42), která byla aplikována na CBA.

Další známé způsoby extrakcí organických polutantů jsou Soxhletova extrakce, mikrovlnná extrakce (MAE, z anglického Microwave-Assisted Extraction) a vysokotlaká extrakce rozpouštědlem (ASE, z anglického Accelerated Solvent Extraction) (43, 44). Tyto články se zabývají porovnáváním podmínek jednotlivých způsobů extrakce půdy. ASE má obvykle největší extrakční účinnost ve srovnání s MAE a Soxhletovou extrakcí. Efektivita extrakce v případě MAE a Soxhletovy extrakce byla v tomto případě oproti ASE více ovlivněna vlastnostmi zkoumaných sloučenin a půdy. ASE a MAE nejsou tolik časově náročné v porovnání se Soxhletovou extrakcí. Soxhletova extrakce také většinou vyžaduje větší spotřebu rozpouštědel (43). ASE a Soxhletova extrakce jsou oproti MAE více automatizované a extrahované vzorky většinou nevyžadují další filtrace (44).

Výhody extrakce půdy ASE byly použity v publikaci Křesinová a kol. (45). Křesinová a kol. extrahovali půdu obsahující 15 CBA. Porovnávali použití čtyř různých extrakčních rozpouštědel, tlaků a teplot. Použito bylo rozpouštědlo: chlormethan, hexan/aceton, 1% kyselina mravenčí v hexan/acetonu a 1% kyselina octová v hexan/acetonu. Jako nejlepší rozpouštědlo bylo stanoveno 1% kyselina octová v hexan/acetonu (1:1 v/v) za tlaku 10,34 MPa a teploty 150 °C. Výtěžnost extrakce za těchto podmínek byla pro všechny 15 CBA vyšší než 82 % (45).

3.7 Metody stanovení CBA

Mezi vhodné metody pro stanovení CBA patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) spojená s ultrafialovou detekcí (UV) nebo hmotnostní detekcí (MS) a plynová chromatografie s hmotnostní detekcí (GC/MS). V literatuře byly popsány i jiné metody, jako je například stanovení spektrofotometrické, ovšem spolehlivost této metody je nízká (38).

Pro rutinní analýzu stanovení koncentrace CBA ve vzorcích z životního prostředí byly vyvinuty mikrobiální biosenzory s detekcí založenou na spotřebě kyslíku ve vztahu k oxidaci analytu (46), neumožňující však selektivní detekci a vyžadující náročnější podmínky (senzory jsou stabilní po dobu 20 dní při teplotě 4 °C) (38).

Dietz popsal ve své studii separaci CBA pomocí HPLC na C18 reverzní fázi za použití eluce mobilní fáze (MF) voda/acetonitril/kyselina octová a UV detekce 222 nm (39). Jiná práce popisuje separaci na C18 koloně za použití MF methanol/voda/kyselina fosforečná a UV detekce 205 nm (37). Byla popsána separace CBA na koloně ODS-AQ reverzní fáze s použitím izokratické eluce s MF skládající se ze směsi 25% fosfátového pufru (50 mM, pH 2,5), 25 - 50% methanolu (MeOH) a 50% acetonitrilu (ACN) při průtoku 0,7 ml/min a UV detekce 238 nm (47). Okyselení MF při použití HPLC vyžaduje nízká hodnota pKa chlorbenzoových kyselin (37, 39, 47).

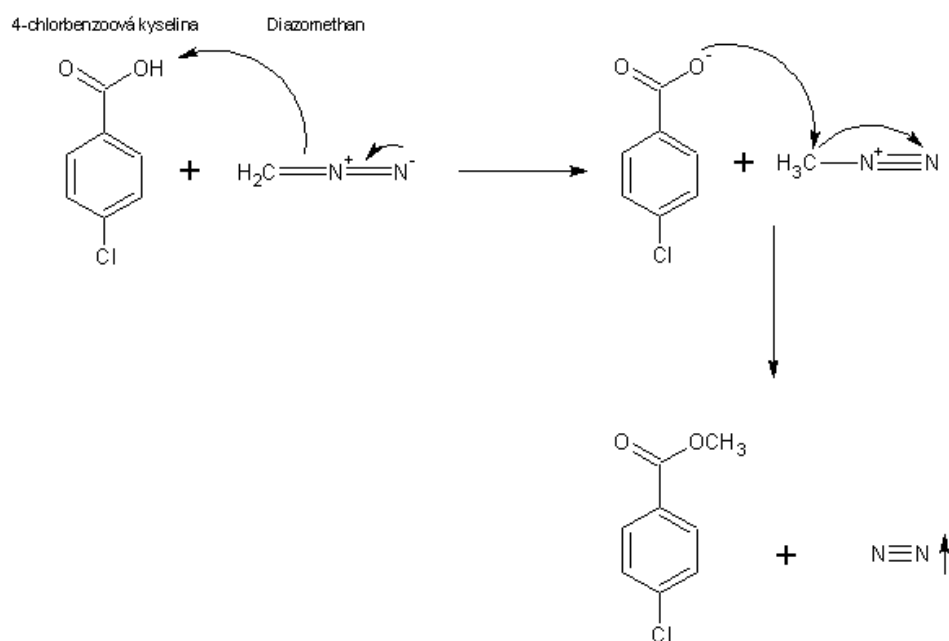
V literatuře bylo popsáno několik chromatografických metod pro stanovení koncentrace CBA ve vzorku. Většina publikací se ale prvotně zajímá o degradační experimenty a využívá tak chromatografické metody pro stanovení pouze některých isomerů CBA (39, 47). Existuje jen málo publikací popisujících stanovení a separaci mono-, di-, tri-, tetra- a penta- chlorbenzoových kyselin (45). Křesinová a kol. popsal ve své studii z roku 2011 použití několika MF a separace pomocí 4 různých stacionárních fází (SF).

Jako nejlepší se ukázala fáze C18 na hybridním základě, umožňující úplnou separaci všech 15 isomerů CBA za použití mobilní fáze ACN (B) a 0,1% kyselina trifluoroctová (TFA) v 10% ACN (A) s průtokem 0,8 ml/min (45).

3.8 Plynová chromatografie

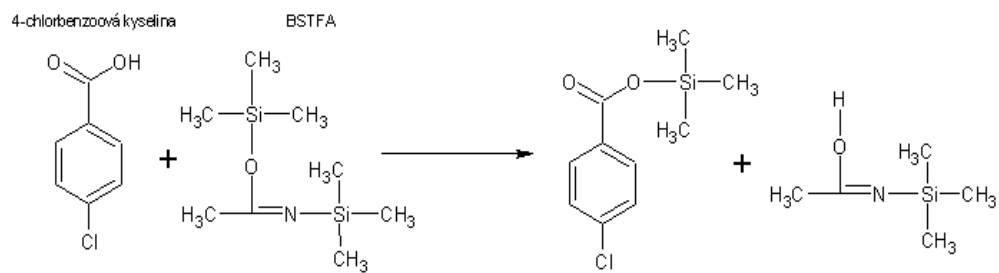
V případě stanovení CBA pomocí plynové chromatografie (GC) je nutná derivatizace jejich karboxylové skupiny. Nalezení vhodného derivatizačního postupu pro CBA a následné stanovení pomocí GC je důležité vzhledem k vysoké selektivitě GC. Použití GC/MS umožňuje navíc vysokou citlivost stanovení. Stanovení CBA pomocí GC/MS derivatizací karboxylové skupiny kyseliny benzoové se zabývá několik publikací.

Nejčastěji byla použita derivatizace pomocí diazomethanu (DM). Například derivatizace kyseliny benzoové 500 ml DM po dobu 2 h při 4 °C (48), kyseliny fluorbenzoové 100 ml DM (49) a také přímo kyseliny chlorbenzoové 200 µl DM po dobu 2 h při teplotě 25 °C. Výťažnost této derivatizace v případě izomerů mono- a di- CBA byla stanovena mezi 67 % a 81 % (50). Jedná se o esterifikaci (methylaci). Produktem derivatizace je methylester kyseliny chlorbenzoové (MeCBA), který je snadno analyzován pomocí GC/MS. Na Obr. 6 je znázorněn mechanismus reakce vzniku derivatizačního produktu MeCBA.



Obr. 6 Mechanismus derivatizace CBA diazomethanem

Další možná derivatizace CBA je pomocí činidla bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) (51). Derivatizace s BSTFA je trimethylsilylace a je znázorněna na Obr. 7.

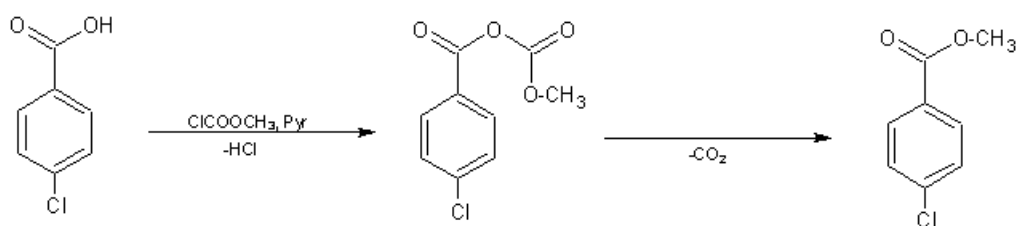


Obr. 7 Derivatizace kyseliny chlorbenzoové pomocí BSTFA

Pro derivatizaci karboxylové skupiny použili Citová I. a kol., Petit-Dominguez M. a kol., Dufková, V. a kol. činidlo ester kyseliny chlormravenčí. Isobutylester kyseliny chlormravenčí byl použit pro derivatizaci perfluorovaných organických kyselin za katalýzy pyridinu (Pyr) (52, 53, 54). Postup byl dále optimalizován ve vodném prostředí, kdy bylo získáno nejlepších výsledků ve fosfátovém pufru (pH 2,5).

Citová I. a kol., Petit-Dominguez M. a kol. použili methylester kyseliny chlormravenčí (MCF) pro derivatizaci karboxylové skupiny aromatických kyselin (52) a přírodních olejů obsažených v pryskyřičkových silicích (53). Derivatizace byla provedena ve vodném prostředí. Reakční médium bylo složeno z ACN:H₂O:MeOH:Pyr, přičemž poměr byl upravován a optimalizován. Nejlepší výsledky byly dosaženy použitím ACN:H₂O:MeOH:Pyr v poměru 14:10:2:3. Po derivatizaci karboxylové skupiny aromatických kyselin pomocí MCF a po aplikaci na GC/MS byl naměřený limit stanovitelnosti pro 6 analytů v rozsahu 2,2 – 11,9 µg/ml. Účinnost derivatizace nebyla uvedena (52).

Produktem derivatizace CBA pomocí MCF jsou také MeCBA. Reakce je znázorněna na Obr. 8.



Obr. 8 Derivatizace kyseliny chlorbenzoové pomocí MCF

4 Experimentální část

4.1 Používaný materiál a chemikálie

Standardy 2-MeCBA ($\geq 98\%$); 3-MeCBA (98%); 4-MeCBA (99%); 2,4-MeCBA (97%); 2,5-MeCBA (99%); 3,5-MeCBA; 2,3-CBA (97%); 3,4-CBA (99%); 2,3,5-CBA (97%); 2,4,6-CBA; 2,3,5,6-CBA; 2,3,4,5,6-CBA byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (USA). 2-CBA ($\geq 98\%$); 3-CBA ($\geq 98\%$); 4-CBA ($\geq 98\%$); 2,4-CBA ($\geq 98\%$); 2,5-CBA ($\geq 98\%$); 2,6-CBA ($\geq 98\%$) byly zakoupeny od firmy Merck (Německo). 3,5-CBA ($\geq 98\%$) byl zakoupen od firmy Fluka (USA). 2,3,6-CBA (98%) byl zakoupen od firmy Supelco (Německo), 2,3,4,5-CBA ($\geq 97\%$) byl zakoupen od firmy TCI Europe (Belgie) a 2,3-dichlorfenol (2,3-CIPh) (99%) od firmy Riedel-de Haën (Německo).

MCF (99%); TFA ($\geq 99\%$); pyridin ($\geq 99,9\%$); hexachlorbenzen (HCB) (99%); BSTFA:TMCS (99:1); nitrosomethyl močovina (stab.; 98%) byly zakoupeny od firmy Sigma Aldrich (USA). Diethylether (nestab.; 99,5%); EtAc ($\geq 99,7\%$; HPLC); dichlormethan (DCM) ($\geq 99,9\%$; HPLC), aceton ($\geq 99,5\%$; PESTAPUR); hexan ($\geq 95\%$; PESTAPUR); gel Bio-Beads®S-X12; chloroform (stab. 99,8%; HPLC) byly zakoupeny od firmy Chromservis (ČR). ACN ($\geq 99,95\%$; LC/MS); MeOH ($\geq 99,95\%$; LC/MS) byly zakoupeny od firmy Biosolve (Nizozemsko). Kyselina chlorovodíková (35%) a Na₂SO₄ bezvodý byl zakoupen od firmy Lach-Ner (ČR). Hydroxid draselný (85 – 100,5%) byly zakoupeny od firmy Riedel-de Haën (Německo). Uhličitan sodný (NaHCO₃) (85%; p.a.) byl zakoupen od firmy Lachema (ČR). MF pro HPLC byla připravena v deionizované vodě Millipore-Q.

Půda byla získána na pozemku Mikrobiologického ústavu Akademie věd ČR s následujícími vlastnostmi: celkový obsah organického uhlíku 0,8 %; celkový obsah organické hmoty 1,4 %; pH 5,3; vodní jímavost 31 % a granulometrické složení: 50,9 % písek; 31,2 jemný písek; 10,8 % prach; 7,1 % jílu (55).

Reálně kontaminovaná půda pochází z oblasti Lhenice. Čvančarová M. ve své diplomové práci z roku 2009 analyzovala hodnotu koncentrace PCB ve stejném vzorku reálné půdy. Stanovila koncentraci PCB 302,7 µg/g (kongenery 16, 17, 18, 22, 28, 31, 32, 33, 37, 42, 44, 45, 48, 47, 49, 52, 56, 60, 66, 70, 71, 74, 76, 95, 99, 101, 105, 110, 113, 118, 149) (56).

4.2 Chromatografické podmínky – HPLC/UV

Vzorky byly analyzovány kapalinovým chromatogramem firmy Alliance Waters složeného ze separačního modulu Waters 2695, PDA detektoru Waters 2996 a vyhodnocovacího programu Empower² Waters (Waters, USA). Analyty byly separovány na koloně XBridge C18 250 mm x 4,6 mm i.d., velikost částic 3,5 µm (Waters), za chromatografických podmínek uvedených v Tab. 1.

Tab. 1 Podmínky při měření vzorků HPLC/UV

Mobilní fáze	A 0,1% TFA v 10% ACN B 100% ACN
Gradient MF: min/%B	0/17; 30/17; 60/34; 70/50
Délka analýzy	80 minut
Dávkovaný objem vzorku	20 µl
Teplota kolony	35 °C
Teplota vzorků	25 °C
Průtok mobilní fáze	0,8 ml/min
Detekce	210 – 240 nm

Metoda analýzy HPLC/UV pro 15 CBA byla převzata z práce Křesinová a kol. (45) včetně podmínek měření, vyhodnocování a charakteristik kalibračních křivek.

Metoda byla použita pro kvantifikaci 15 derivátů CBA v ASE extraktech (Kap. 4.8), ve frakcích gelové permeační chromatografie (GPC) (Kap. 4.9.2) a zároveň k nepřímé kvantifikaci účinnosti derivatizace (Kap. 4.10.1). Chromatografické podmínky uvedené v Tab. 2 byly použity pro určení úbytku nezderivatizovaných CBA a příbytku MeCBA (Kap. 4.10.2.3).

Tab. 2 Podmínky při měření derivatizovaných vzorků HPLC/UV

Mobilní fáze	A 0,1% TFA v 10% ACN B 100% ACN
Gradient MF: min/%B	0/17; 30/17; 60/34; 70/50
Délka analýzy	110 minut
Dávkovaný objem vzorku	20 μ l
Teplota kolony	35 °C
Teplota vzorků	25 °C
Průtok mobilní fáze	0,8 ml/min
Detekce	210 – 240 nm

4.3 Chromatografické podmínky – GC/MS

Plynovým chromatogramem firmy Varian 450-GC (USA) s hmotnostním detektorem 250-MS IT mass spectrometer (Varian), autosamplerem Combi Pal (CTC Analytics, Švédsko) a vyhodnocovacím programem Varian workstation (Varian) byly analyzovány methyl estery CBA.

Pro separace byla použita kolona DB-5MS o délce 30 m, průměru 0,25 μ m a tloušťkou SF 0,25 μ m (Agilent Technologies, USA).

Teplotní program začal izotermálně při 60 °C při zavřeném děliči po dobu 1 minuty. Následně byl dělič otevřen v poměru 1:50 a teplotním programem uvedeným v Tab. 3.

Tab. 3 Podmínky při měření vzorků pomocí GC/MS

Nosný plyn	helium
Průtok nosného plynu	1 ml/min
Split ratio (1 min)	1:50
Dávkovaný objem vzorku	1 μ l
Teplota injektoru	240 °C
Teplotní gradient: °C v čase analýzy (min)	60(0); 60(1); 100(2,6); 135(37,6); 185(52,6); 240(74,8)
Délka analýzy	75 min

Pro ionizaci látek byla použita metoda dopadu elektronu (70 eV) a pro detekci byl použit detektor na principu iontové pasti. Byl měřen celkový iontový proud v rozsahu hmot 50 - 400 m/z od 6. do 55. minuty analýzy.

Jednotlivé derivatizované látky a vnitřní standard HCB byly identifikovány na základě hmotnostních spekter a retenčních časů.

4.4 Příprava zásobních roztoků

Pro analýzu pomocí GC/MS byly všechny zásobní a pracovní roztoky připravovány v EtAc, pro analýzu pomocí HPLC/UV v ACN.

Odvážením pevných standardů jednotlivých isomerů CBA do 12 ml skleněných vial a rozpuštěním v příslušném množství ACN/EtAc byly připraveny zásobní roztoky o koncentraci 2000 µg/ml. Z těchto zásobních roztoků byl ředěním v ACN/EtAc připraven směsný roztok 15 CBA o koncentraci 100 µg/ml.

Stejným postupem byly připraveny zásobní roztoky MeCBA a směsný roztok 6 MeCBA a zásobní roztoky vnitřních standardů 2,3-CIPh a HCB.

Ze zásobních roztoků byly ředěním v ACN/EtAc připravovány pracovní roztoky o různých koncentracích.

4.5 Příprava půdy před stanovením

Půda byla dodána již vysušená. Před vlastním stanovením byla půda přesáta přes síto o velikosti ok 1 mm.

4.6 Umělá kontaminace půdy

Ze zásobních roztoků standardů 15 CBA byl ředěním v acetonu připraven směsný roztok 15 CBA o koncentraci 100 µg/ml. Postup kontaminace a příprava extrakčních patron byly převzaty ze zavedené praxe v laboratoři (55). 20 g půdy bylo odváženo do kádinky. K půdě byly pipetou opatrně přidány 4 ml pracovního roztoku 15 CBA v acetonu o koncentraci 100 µg/ml tak, aby nepřišel do kontaktu se stěnami a dnem kádinky.

Takto připravená půda byla ponechána v digestoři, dokud se aceton neodpařil a suchá půda byla promíchána.

4.7 Příprava extrakčních patron pro extrakci vzorků pomocí ASE

Uměle kontaminovaná a suchá půda byla odvážena do kádinek vždy po 3 g. Ke 3 g půdy bylo přidáno 300 μ l destilované vody tak, aby nedošlo ke kontaktu se stěnami a dnem kádinky. Půda byla promíchána, do kádinek bylo odváženo 3 g Na_2SO_4 a obsah byl promíchán. Připravené vzorky půdy byly přesypány do připravených ASE patron.

Nerezové ASE patrony o velikosti 11 ml byly sestaveny tak, že na dno byly umístěny dva papírové filtry, mořský písek a vzorek půdy. Patrony byly dosypány mořským pískem, na vrch byl přidán papírový filtr a patrony byly uzavřeny. Celkem bylo připraveno 6 patron se vzorky půdy.

4.8 Vysokotlaká extrakce rozpouštědlem

Půda byla extrahována pomocí extraktoru ASE200 Accelerated solvent extraktor od firmy Dionex (Francie).

Tab. 4 Extrakční podmínky při extrakci půdy pomocí ASE

Rozpouštědlo	1% kyselina octová v hexan:aceton (1:1, v/v)
Teplota	150 °C
Tlak	1600 Pa
Počet extrakčních kroků	3
Předehřívání	0 min
Zahřívání	5 min
Extrakční krok	7 min
Promývací objem patrony	60 %
Promytí	60 s

V Tab. 4 jsou uvedeny extrakční podmínky pro extrakci půdy pomocí ASE, které byly převzaty z publikace Křesinová a kol. (45).

Tři extrakty byly zakoncentrovány odpařením ve vyhřívaném bloku při teplotě 40 °C a tlaku 60 kPa na zhruba 1 ml. K zakoncentrovaným extraktům bylo přidáno 250 µl pracovního roztoku 2,3-CIPh o koncentraci 80 µg/ml v acetonitrilu jako vnitřní standard a vzorky byly analyzovány pomocí HPLC/UV. Některé takto připravené vzorky obsahovaly nerozpuštěnou pevnou fázi, která byla před HPLC analýzou odstraněna filtrací přes PTFE filtry.

Další tři extrakty byly použity pro aplikaci na GPC. Protože extrakční rozpouštědlo obsahuje kyselinu octovou, která by mohla mít negativní účinek na gel v koloně GPC, bylo potřeba množství této kyseliny minimalizovat. Extrakty byly zakoncentrovány odpařením ve vyhřívaném bloku při teplotě 40 °C a tlaku 60 kPa na zhruba 1 ml. Následně byl k extraktům přidán 1 ml DCM, když došlo opět k odpaření rozpouštědla na zhruba 1 ml, byl přidán 1 ml DCM a vzorek odpařen na zhruba 200 µl. Ke vzorku bylo přidáno 600 µl DCM a vzorek byl aplikován na GPC.

Dále byly připraveny tři vzorky standardů v extrakčním rozpouštědle o koncentraci 60 µg/ml. Tyto vzorky pro kontrolu ztráty analytů během odpařování byly zakoncentrovávány odpařením ve vyhřívaném bloku ze stejného množství extrakčního rozpouštědla a za stejných podmínek.

4.9 Přechištění extraktu půdy gelovou permeační chromatografií

4.9.1 Příprava gelu a kolony

Gel BioBeads SX12 byl připraven navážením 20 g gelu do Erlenmayerovy baňky se zábrusem. Ke gelu bylo přidáno šestinásobné množství DCM, než byla navážka gelu. Erlenmayerova baňka byla uzavřena a ponechána na 24 h ve 4 °C pro dostatečné nabobtnání gelu. Následně byla Erlenmayerova baňka s nabobtnaným gelem ponechána 20 min v ultrazvuku K12 Kraintek (Slovensko) pro odstranění přítomného vzduchu. Kolona Omnifit Glass Column, 10 x 500 mm (Chromservis, ČR) byla naplněna gelem, neprodyšně uzavřena a spojena s dávkovací smyčkou, průtokem mobilní fáze Modifier pump (Suprex, USA) a automatickým sběračem frakcí Fraction collector frac-100 (Pharmacia, Švédsko).

4.9.2 Retenční chování analytů při použití gelové permeační chromatografie a stanovení vlivu půdní matrice

Pro přípravu gelu a jako MF bylo použito rozpouštědlo DCM. MF byla před každým použitím kolony pro GPC umístěna na 15 min do ultrazvuku pro odvzdušnění.

Retenční chování analytů při použití GPC bylo stanoveno použitím pracovního roztoku 15 CBA o koncentraci 20 µg/ml připraveného v DCM. 800 µl pracovního roztoku bylo aplikováno na GPC kolonu. Průtok mobilní fáze byl 0,75 ml/min.

Pro určení retenčního chování analytů byly sbírány frakce po 2 min v celkové délce 45 min. Frakce byly zakoncentrovány pod proudem dusíku.

Poté bylo přidáno 250 µl pracovního roztoku 2,3-CIPh o koncentraci 80 µg/ml v ACN jako vnitřní standard a frakce byly analyzovány HPLC/UV. Dále byly připraveny tři vzorky standardů v DCM o koncentraci 20 µg/ml. Tyto vzorky pro kontrolu ztráty analytů během odpařování byly zakoncentrovávány odpařením pod proudem dusíku ze stejného množství DCM.

Výtěžnost GPC s DCM jako mobilní fází byla stanovena aplikací 800 µl pracovního roztoku 15 CBA o koncentraci 20 µg/ml v DCM a byly sbírány dvě frakce 1 – 14 min a 15 – 30 min. Vzorky byly odpařeny a analyzovány dle postupu uvedeného výše.

Stanovení vlivu půdní matrice bylo provedeno užitím ASE extraktu nekontaminované půdy (Kap. 4.8) K extraktu zkoncentrovanému odpařením ve vyhřívaném bloku při teplotě 40 °C a tlaku 60 kPa na přibližně 200 µl bylo přidáno 600 µl pracovního roztoku standardů 15 CBA o koncentraci 20 µg/ml v DCM a roztok byl aplikován na GPC. Byly sbírány dvě frakce 1 – 14 min a 15 – 30 min. Vzorky byly odpařeny a analyzovány shodným postupem uvedeném výše.

4.10 Derivatizace vzorků pro měření GC/MS

Účinnost derivatizačního kroku byla stanovena derivatizací jednotlivých standardů 15 CBA o koncentraci 20 µg/ml v ACN dle postupu uvedeného níže. Vzorky byly poté odpařeny pod proudem dusíku do sucha a bylo k nim pipetováno 1000 µl ACN. Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí HPLC/UV. Byl sledován úbytek nezderivatizovaných CBA a příbytek MeCBA.

4.10.1 Použití derivatizačního činidla methylester kyseliny chlormravenčí

Do 12 ml vialy bylo odpipetováno 240 µl pracovního roztoku 15 CBA o koncentraci 200 µg/ml v ACN. Ke vzorku byly přidány 3 ml reakčního média. Reakční médium bylo připraveno smícháním ACN, H₂O, MeOH a Pyr v poměru 14:10:2:3. Uzavřené vzorky byly na 1 min ponechány pro smíchání v ultrazvuku (1. derivatizační krok). Následně byl ke vzorku odpipetován MCF v množství 450 µl. MCF byl pipetován opatrně po kapkách, jelikož docházelo k bouřlivé reakci za současného uvolňování CO₂. Vzorek byl uzavřen a 1 min třepán (2. derivatizační krok). Ke vzorku byly přidány 3 ml chloroformu a vzorek byl 2 min třepán, až došlo k vytvoření 2 vrstev (3. derivatizační krok). Ke vzorku byly přidány 3 ml 1M NaHCO₃ a 2 min byl třepán (4. derivatizační krok). Ze vzorku byla opatrně odebrána spodní organická vrstva.

Pro odstranění stop vody z organické vrstvy byl použit bezvodý síran sodný. 2 g síranu sodného byly přidány do skleněných kolonek o objemu 10 ml, síran sodný byl nejprve promyt 5 ml ACN, poté byl k němu přidán vzorek a nakonec bylo vše promyto 1 ml ACN. Ke vzorku bylo přidáno 200 µl pracovního roztoku 2,3-ClPh o koncentraci 200 µg/ml v ACN. Takto připravený vzorek byl analyzován pomocí HPLC/UV, kde byl sledován úbytek CBA.

Vzhledem k vysokým interferencím v HPLC vlivem použitých derivatizačních rozpouštědel bylo nutné rozpouštědlo před analýzou odpařit pod proudem dusíku a vzorek rozpustit v 1 ml ACN.

Derivatizační postup byl různě modifikován. Podmínky jsou uvedeny v Tab. 5.

Tab. 5 Pět různých podmínek použitých při derivatizaci CBA pomocí MCF

	1	2	3	4	5
Vzorek 200 µg/ml	240 µl	240 µl	240 µl	240 µl	240 µl
HCl 1M	0 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Reakční médium	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
1. Derivatizační krok	1 min 25 °C	10 min 25 °C	10 min 25 °C	10 min 25 °C	10 min 25 °C
MCF	450 µl	450 µl	450 µl	450 µl	450 µl
2. Derivatizační krok	2 min 25 °C	20 min 25 °C	10 min 25 °C	20 min 55 °C	10 min 55 °C
Chloroform	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
3. Derivatizační krok	2 min 25 °C	20 min 25 °C	10 min 25 °C	10 min 25 °C	20 min 25 °C
NaHCO ₃ 1M	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml	3 ml
4. Derivatizační krok	2 min 25 °C	20 min 25 °C	10 min 25 °C	10 min 25 °C	20 min 25 °C

4.10.2 Použití derivatizačního činidla diazomethan

4.10.2.1 Příprava diazomethanu

Do 250 ml Erlenmayerovy baňky bylo odměřeno 100 ml chladného diethyletheru, ke kterému bylo přidáno 35 ml chladného 40% KOH. Erlenmayerova baňka byla umístěna do ledové lázně a teplota byla udržována okolo 5 °C. Za stálého míchání bylo po malých dávkách přidáváno předem navážené množství nitrosomethylmočoviny na celkovou koncentraci 0,1 M a následně byl roztok ponechán 10 min odstát. Roztok byl přenesen do předchlazené uzavíratelné skleněné nádoby obsahující pecky KOH v množství cca 5 g. Po půl hodině byl roztok opět odpipetován do nádoby obsahující KOH. DM byl skladován v mrazáku při -20 °C (57).

4.10.2.2 Derivatizační postup

Do 1,5 ml vialy bylo odpipetováno 100 µl pracovního roztoku 15 CBA o koncentraci 200 µg/ml. Ke vzorku byl přidán DM a MeOH, vzorek byl promíchán a ponechán v digestoři. Množství DM a MeOH, čas a teplota derivatizace byly různě modifikovány a jsou uvedeny v Tab. 6. Následně bylo rozpouštědlo odpařeno pod proudem dusíku, přidán 1 ml ACN a analyzován pomocí HPLC/UV, kde byl sledován úbytek nezderivatizovaných CBA.

Tab. 6 Osm různých podmínek derivatizace 15 CBA pomocí DM

	1	2	3	4	5	6	7	8
Vzorek 200 µg/ml	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Diazomethan	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	1 ml	0,5 ml	1 ml	0,5 ml	0,5 ml
MeOH	0 µl	5 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
Čas	1 h	1 h	1 h	1 h	2 h	2 h	1 h	1 h
Teplota	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C	55 °C	5 °C

4.10.2.3 Ověření účinnosti derivatizace DM

Komerčně bylo k dispozici pouze 6 standardů MeCBA (2-MeCBA; 3-MeCBA; 4-MeCBA; 2,4-MeCBA; 2,5-MeCBA a 3,5-MeCBA). Ostatních 9 CBA byly jednotlivě derivatizovány postupem uvedeným v Kap. 4.10.2.2 při různých podmínkách (Tab. 7). Tyto podmínky byly zvoleny tak, aby došlo k takové derivatizaci analytů, kdy se úbytky CBA pohybují v rozmezí 100 – 0 %. Vzorky byly analyzovány pomocí HPLC/UV. Byl sledován procentní poměr píku nezderivatizovaných CBA a zderivatizovaných CBA (MeCBA).

Tab. 7 Šest různých podmínek derivatizace 9 CBA pomocí DM pro dosažení stechiometrie derivatizace

	1	2	3	4	5	6
Vzorek 200 µg/ml	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Diazomethan	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,250 ml	0,250ml	0,250 ml
MeOH	10 µl	10 µl	5 µl	10 µl	5 µl	10 µl
Čas	1 h	0,5 h	1 h	1 h	1 h	0,5 h
Teplota	5 °C	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C	25 °C

4.11 Validace metody

Kvantitativní analýza byla provedena na základě výšky jednotlivých píků, kvalitativní analýza na základě shody retenčních časů a hmotnostních spekter.

Kalibrační křivka – Kalibrační křivky (6 – 9 kalibračních bodů) pro jednotlivé MeCBA byly připraveny a měřeny v lineárním rozsahu od 0,003 µg/ml (2-MeCBA; 2,6-MeCBA; 2,3,5,6-MeCBA), 0,005 µg/ml (3-MeCBA+4-MeCBA; 2,3-MeCBA; 2,5-MeCBA; 3,4-MeCBA; 2,3,4,5-MeCBA) a 0,01 µg/ml (2,4-MeCBA; 3,5-MeCBA; 2,3,6-MeCBA; 2,4,6-MeCBA) do 10 µg/ml. Každý bod kalibrační křivky byl měřen třikrát.

Limit kvantifikace – LOQ byl stanoven jako nejnižší bod kalibrace, který byl kvantifikován s přesností RSD nižší než 20 % pro n = 3. Limit detekce LOD byl stanovena jako 1/3 hodnoty LOQ.

Přesnost a správnost metody – 6 vzorků půdy bylo kontaminováno postupem uvedeným v Kap 4.6 na koncentrační hladinu 0,001 µg/ml; 0,003 µg/ml; 0,005 µg/ml; 0,01 µg/ml; 0,05 µg/ml a 0,1 µg/ml. Každá koncentrační hladina byla připravena ve čtyřech paralelách vzorků půdy.

ASE patrony byly připraveny dle postupu v Kap. 4.7. Půda byla extrahována metodou uvedenou v Kap. 4.8. Extrakty byly dále upraveny dle Kap. 4.9.2 a 4.10.2.2 a analyzovány GC/MS. Vzorke, ve kterých nebyly některé analyty detekovány, byly desetinásobně zakoncentrovány odpařením pod proudem dusíku a opětovně analyzovány GC/MS. Správnost byla určena jako hodnota relativních směrodatných odchylek a přesnost jako hodnota procentuálního rozdílu mezi hodnotami naměřenými a vypočtenými.

5. Výsledky a diskuze

5.1 Optimalizace derivatizace činidlem methylester kyseliny chlormravenčí

Vzorky byly derivatizovány MCF za podmínek podobných v článku Citová, I. a kol (52). Podmínky byly různě optimalizovány pro dosažení nejlepších výsledků. Všechny podmínky jsou uvedeny v Kap. 4.10.1 v Tab. 5. Účinnost derivatizace byla stanovena derivatizací jednotlivých standardů o koncentraci 20 µg/ml v ACN dle postupu viz Kap. 4.10.1. Účinnost byla kvantifikována nepřímo pomocí HPLC/UV sledováním úbytku nezderivatizovaných analytů. Nejlepší účinnost byla dosažena za podmínek uvedených v Tab. 8. Účinnost derivatizace za těchto podmínek je uvedena v Tab. 9.

Tab. 8 Podmínky derivatizace MCF, při kterých bylo dosaženo nejlepší účinnosti

	Vzorek 200 µg/ml	HCl 1M	Reakční médium	1. derivatizační krok	MCF	2. derivatizační krok	Chloroform	3. derivatizační krok	NaHCO ₃ 1M	4. derivatizační krok
Podmínky 5	240 µl	10 µl	3 ml	10 min 25 °C	450 µl	10 min 55 °C	3 ml	20 min 25 °C	3 ml	20 min 25 °C

Derivatizace CBA za podmínek 1 uvedených v Tab. 5 byla neúčinná. Po přidání HCl došlo k nárůstu účinnosti derivatizace (podmínky 2 – 5; viz Tab. 5) (data neprezentována). Stejného zvýšeného účinku se docílilo při zvýšeném času jednotlivých derivatizačních kroků. Zvýšená teplota 2. derivatizačního kroku vedla k dalšímu zvýšení účinnosti derivatizace.

Současně se zvýšenou teplotou ale bylo nutné snížit čas druhého derivatizačního kroku na 10 min. Došlo ke sníženému celkovému času derivatizace. Nejlepší účinnosti tedy bylo dosaženo při dodržení podmínek 5.

Tab. 9 Průměrná účinnost derivatizace MCF standardů 15 CBA o koncentraci 20 µg/ml postupem uvedeným v Kap. 4.10.1 za podmínek uvedených v Tab. 8 a analyzované pomocí HPLC/UV; RSD (%): Relativní směrodatná odchylka

Analyt	Průměrná účinnost (n = 3)	RSD (%) (n = 3)
2-CBA	94,0 %	5,2
3-CBA	83,2 %	6,4
4-CBA	87,8 %	3,2
2,3-CBA	100,1 %	3,5
2,4-CBA	92,4 %	11,5
2,5-CBA	99,8 %	5,6
2,6-CBA	47,5 %	9,8
3,4-CBA	92,2 %	7,1
3,5-CBA	96,7 %	3,2
2,3,5-CBA	83,8 %	6,5
2,3,6-CBA	31,2 %	8,2
2,4,6-CBA	55,0 %	13,2
2,3,4,5-CBA	97,0 %	5,2
2,3,5,6-CBA	78,2 %	12,3
2,3,4,5,6-CBA	69,7 %	9,2

Z Tab. 9 je patrné, že účinnost derivatizace se u analytů 2-CBA; 3-CBA; 4-CBA; 2,3-CBA; 2,4-CBA; 2,5-CBA; 3,4-CBA; 3,5-CBA; 2,3,5-CBA; 2,3,4,5-CBA blíží ku 100 %. U analytů 2,3,6-CBA; 2,6-CBA; 2,4,6-CBA; 2,3,4,5,6-CBA a 2,3,5,6-CBA je účinnost derivatizace pouze 31,2 – 78,2 %.

Nízká účinnost pro těchto pět analytů je pravděpodobně způsobena strukturou těchto derivátů, resp. polohou chlorů. Chlory vytváří sterickou zábranu okolo karboxylové skupiny a nedochází tak k úplné methyloaci karboxylové skupiny. Citová, I. a kol. používali MCF pro derivatizaci karboxylové skupiny aromatických kyselin (52). Derivatizace byla účinná, což bylo nejspíš způsobeno nižší sterickou zábranou kolem karboxylové skupiny. Alkylestery kyseliny mravenčí jsou pro svou vysokou reaktivitu často využívány jako derivatizační činidla. Tyto kyseliny methylují amino skupinu (55, 58), hydroxy skupinu (52, 59) a karboxylovou skupinu (54, 52, 60). Alkylestery kyseliny mravenčí jsou univerzálním činidlem použitelným pro několik funkčních skupin. Podmínky derivatizace musí být ale pro jednotlivé skupiny modifikovány. Vliv na derivatizaci nemá pouze funkční skupina analytu ale i struktura.

Kvalitativním měřením GC/MS bylo zjištěno, že u 2,3,4,5,6-CBA nevzniká předpokládaný derivatizační produkt MeCBA, ale dochází k dekarboxylaci a vzniká pentachlorbenzen. Charakteristické ionty pro pentachlorbenzen jsou 215 + 248 + 250 m/z.

Problém v případě selektivní kvantifikace je i vznik dvou derivatizačních produktů v případě dvou derivátů CBA. V případě analytů 2,4,6-CBA a 2,3,5,6-CBA dochází k neúplné dekarboxylaci. Derivatizace dává vznik dvěma produktům 2,4,6-MeCBA i 2,4,6-trichlorbenzen s charakteristickými ionty 180 + 182 + 207 + 209 m/z a 2,3,5,6-MeCBA i 2,3,5,6-tetrachlorbenzen s charakteristickými ionty 179 + 216 + 218 m/z.

Složitost, množství použitých chemikálií a časová náročnost derivatizace pomocí MCF není vhodná pro praktické aplikace stanovení CBA.

5.2 Optimalizace derivatizace činidlem diazomethan

5.2.1 GC/MS podmínky pro 6 standardů MeCBA

Standardy pro všechny 15 MeCBA nebyly komerčně k dispozici. Účinnost derivatizace byla ověřena také pomocí zakoupených MeCBA standardů u 2-CBA; 3-CBA; 4-CBA; 2,4-CBA; 2,5-CBA a 3,5-CBA.

Kalibrační křivky 6 MeCBA byly připraveny ředěním zásobního roztoku standardů v EtAc do pěti koncentračních úrovní v rozmezí 0,1 – 10 µg/ml, ve kterém se pohybovaly i hodnoty derivatizovaných standardů. Charakteristika kalibračních křivek je uvedena v Tab. 10. Hodnoty LOD a LOQ nejsou příliš nízké vzhledem k tomu, že kalibrace byla použita pouze pro účely stanovení účinnosti derivatizace.

Tab. 10 Kalibrační křivky 6 MeCBA v EtAc v rozsahu 0,1 – 10 µg/ml o 5 bodech měřených pomocí GC/MS; hodnota LOD pro všechny analyty je 0,03 µg/ml, hodnota LOQ je pro všechny analyty 0,1 µg/ml

Analyt	Rovnice	Počet bodů přímky	Rozsah (µg/ml)	r^2
2-MeCBA	$y = 14771x - 2732$	5	0,1 - 10	0,9917
3-MeCBA+4-MeCBA	$y = 63036x + 39566$	5	0,1 - 10	0,9939
2,4-MeCBA	$y = 9318,9x - 1696,5$	5	0,1 - 10	0,9976
2,5-MeCBA	$y = 9203x + 1684,8$	5	0,1 - 10	0,9974
3,5-MeCBA	$y = 8750,5x + 1379,5$	5	0,1 - 10	0,9980

5.2.2 Stanovení účinnosti derivatizace pomocí DM

6 CBA byly derivatizovány postupem uvedeným v Kap. 4.10.2.2. Podmínky derivatizace byly různé a jsou uvedeny v Kap. 4.10.2.2 v Tab. 6. Účinnost byla sledována měřením GC/MS.

Tab 11. Podmínky derivatizace, při kterých byla dosažena nejvyšší účinnost

	Vzorek 200 µg/ml	Diazomethan	MeOH	Čas	Teplota
Podmínky 8	100 µl	0,5 ml	10 µl	1 h	5 °C

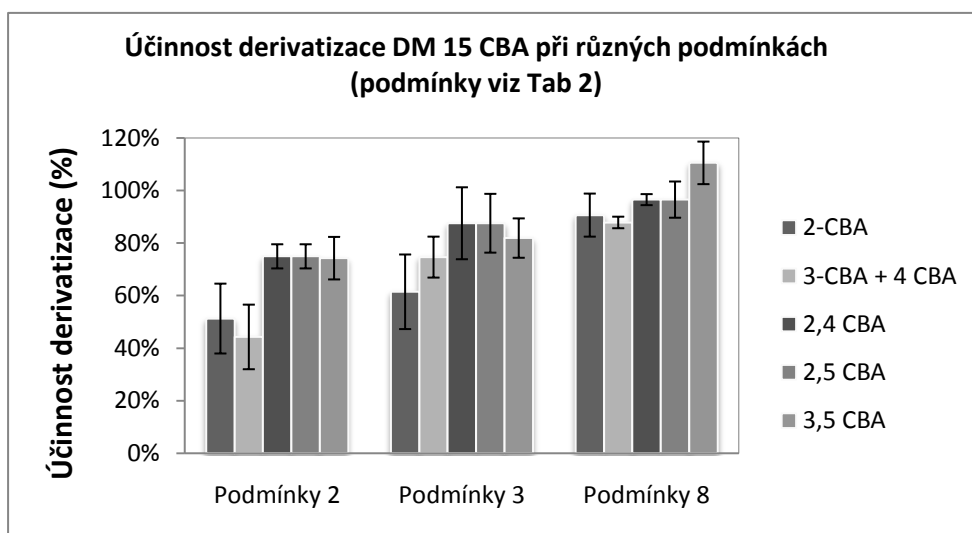
Pro derivatizaci 6 CBA byly modifikovány podmínky (Tab. 6). Derivatizace za podmínek 1 nebyla účinná (data neprezentována). Při derivatizaci za podmínek 1 nebyl vzorek okyselen 1M MeOH. Derivatizace za podmínek 5 – 7 nebyla účinná (data neprezentována). Za podmínek 5 – 7 byl použit MeOH, ale zároveň došlo v případě podmínek 5 a 6 k prodloužení času derivatizace na 2 h a v případě podmínek 7 zůstal čas derivatizace 1 h, ale došlo ke zvýšení teploty derivatizace na 55 °C. Prodloužení času i zvýšení teploty má tedy negativní vliv na účinnost derivatizace. Účinnost derivatizace za podmínek 4 byla pouze do 50 – 60 %. Nižší účinnost byla nejspíše způsobena zvýšením množství DM na 1 ml. Na Obr. 9 je vidět účinnost derivatizace za podmínek 2, 3 a 8. Při těchto podmínkách byl přidán MeOH, derivatizace za podmínek 2 a 3 probíhala za teploty 25 °C, za podmínek 8 při teplotě 5 °C.

Z Obr. 9 a z výsledků předchozích podmínek je patrné, že účinnost se zvyšuje přidáním MeOH, tedy vytvořením kyselého prostředí derivatizace.

V kyselém prostředí dochází k lepší disociaci karboxylové kyseliny a tím k lepšímu vzniku derivatizačního produktu methyl esteru kyseliny chlorbenzoové. Množství přidaného MeOH nemá vliv na účinnost.

Účinnost se zvyšuje se snižující se teplotou. K stejnému výsledku dochází i v případě prodloužení času derivatizace.

Niedan, V. a kol. derivatizovali kyselinu chlorbenzoovou po dobu 2 h za pokojové teploty a účinnost stanovili v rozsahu 67 – 81 % (50). Za těchto podmínek (podmínky 5; viz Tab. 6) derivatizace účinná nebyla a to i přes přídavek MeOH.



Obr. 9 Účinnost derivatizace DM 15 CBA postupem uvedeným v kap. 4.10.2.2 za různých podmínek uvedených v Tab. 6

5.2.3 Ověření účinnosti derivatizace DM

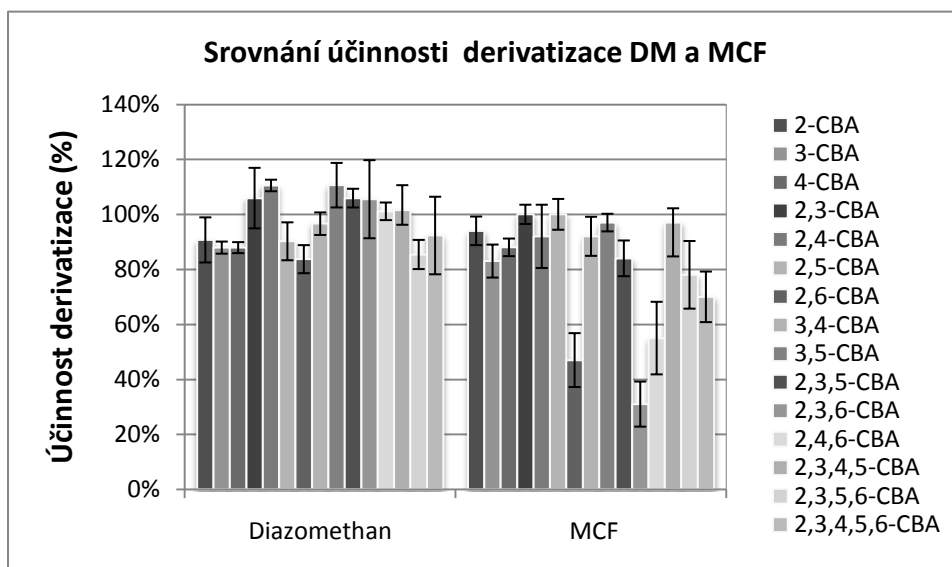
Předchozí postup ověřil, že derivatizace dle postupu uvedeným v Kap. 4.10.2.2 a za podmínek 8, které jsou uvedeny v Tab. 11 je účinná u 6 CBA ($\geq 88\%$). Postupem uvedeným v Kap. 4.10.2.3 byla ověřena účinnost derivatizace u zbylých 9 CBA a byly připraveny vlastní standardy MeCBA. V Tab. 7 je uvedeno 6 různých i méně účinných (mírných) podmínek, aby došlo k takové derivatizaci analytů, kdy se úbytky CBA pohybují v rozmezí 100 – 0 %. Vzorky byly analyzovány pomocí HPLC/UV. Byl sledován procentní poměr píku nezderivatizovaných CBA a zderivatizovaných CBA (MeCBA). Podmínky byly zvoleny takové, aby bylo umožněno sledování stechiometrického nárůstu, resp. poklesu píku MeCBA, resp. CBA.

Grafy zobrazující stechiometrický nárůst účinnosti derivatizace pro 9 CBA jsou přiloženy v příloze A – I. Z hodnoty regresního koeficientu r^2 , který je u všech rovnic přímky roven 1 vyplývá, že nárůst účinnosti derivatizace je rovnoměrný a stechiometrický. Ze stechiometrie je také patrné, že nedochází k žádným vedlejším reakcím. Tímto postupem byla ověřena účinnost derivatizačního postupu a mohlo dojít k přípravě vlastních standardů.

V Tab. 12 je uvedena průměrná účinnost derivatizace DM pro všech 15 CBA připravených postupem viz Kap. 4.10.2.2 za podmínek 8 uvedených v Tab. 11. Na Obr. 10 je srovnání účinnosti derivatizace DM a MCF za nejlepších dosažených podmínek. Z Obr. 10 je patrné, že derivatizace DM je účinnější. Velký rozdíl účinnosti sledujeme zejména u analytů 2,6-CBA; 2,3,6-CBA; 2,4,6-CBA; 2,3,5,6-CBA a 2,3,4,5,6-CBA. Derivatizace DM je pro směs vybraných 15 CBA vhodnější.

Tab 12. Průměrná účinnost derivatizace standardů 15 CBA o koncentraci 10 µg/ml postupem uvedeným v Kap. 4.10.2.2 za podmínek: 100 µl, DM 0,5 ml, MeOH 10 µl, čas derivatizace 1 hodina za teploty 5 °C; vzorky byly analyzovány GC/MS

Analyt	Průměrná účinnost (n = 3)	RSD (%)
2-CBA	90,7 %	8,2
3-CBA+4-CBA	87,9 %	2,2
2,3-CBA	105,9 %	11,0
2,4-CBA	110,5 %	2,1
2,5-CBA	90,2 %	6,9
2,6-CBA	83,7 %	5,1
3,4-CBA	96,6 %	4,1
3,5-CBA	110,6 %	8,1
2,3,5-CBA	105,9 %	3,4
2,3,6-CBA	105,5 %	14,2
2,4,6-CBA	101,1 %	3,2
2,3,4,5-CBA	101,5 %	9,1
2,3,5,6-CBA	85,4 %	5,3
2,3,4,5,6-CBA	92,3 %	14,1



Obr 10. Srovnání účinnosti derivatizace DM (postup Kap. 4.10.2.2, podmínky v Tab. 11) a MCF (postup 4.10.1, podmínky v Tab. 8)

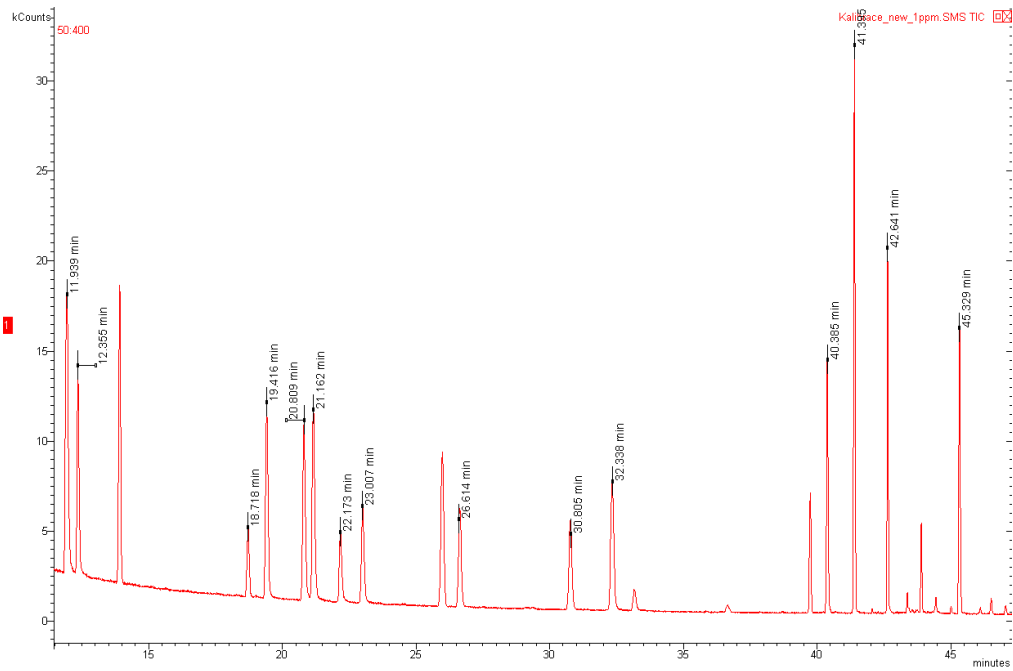
5.2.4 Optimalizace GC/MS podmínek pro 15 CBA

V rámci této práce byly použity dva typy GC/MS kolon lišící se stacionární fází. Ani na jedné z kolon se nepodařilo dosáhnout úplné separace všech 15 zástupců methylovaných chlorbenzoových kyselin. Kolona DB-5, která je univerzální a převážně nepolární, byla srovnávána s kolonou o střední polaritě DB-200 (o délce 30 m, průměru 0,25 μm a tloušťkou SF 0,25 μm (Agilent Technologies, USA)), která je od výrobce doporučovaná pro chlorované látky. Kolony měly stejné parametry. Kolonou DB-200 nebylo možné dosáhnout rozlišení analytů 3,5-MeCBA a 2,6-MeCBA. Na koloně DB-5, byly tyto dva analyty separovány, ale nepodařilo se rozdělit analyty 3-MeCBA a 4-MeCBA, ani po optimalizaci teplotního gradientu metody. Proto byly tyto dvě látky kvantifikovány jako směsný pík s retenčním časem 11,939 min.

Charakteristické ionty a retenční časy analytů, které byly použity při identifikaci látek a při vyhodnocování jejich koncentrace ve vzorcích jsou uvedeny v Tab. 13. Na Obr. 11 je uveden příklad GC/MS chromatogramu standardů 15 MeCBA s hexachlorbenzenem jako vnitřním standardem.

Tab. 13 Retenční časy a charakteristické ionty analytů při měření vzorků GC/MS

Analyt	Retenční čas (min)	m/z
3-MeCBA+4-MeCBA	11,939	111,2+139,2+141,2+170,1
2-MeCBA	12,355	111,2+139,2+141,2+169,1
3,5-MeCBA	18,718	145,2+147,2+173,2+175,1+204,1+207,1
2,6-MeCBA	19,416	145,3+173,2+175,1+204
3,4-MeCBA	20,809	145,3 + 147,2 + 175,1 + 204
2,5-MeCBA	21,162	145,2+173,2+175,1+204,1
2,4-MeCBA	22,173	145,2+173,2+175,1+204
2,3-MeCBA	23,007	145,2+173,2+175,1+204
2,3,5-MeCBA	26,614	179,3+209,1+211+238,1+240
2,3,6-MeCBA	30,805	179,3+209,1+211+238,1+240,2
2,4,6-MeCBA	32,338	179,3+209,1+207+211+240+241,9
2,3,5,6-MeCBA	40,385	213,3+241,4+243,1+245+274+276
HCB	41,395	284+286
2,3,4,5-MeCBA	42,641	215,3+241,3+243,1+245+274+276
2,3,4,5,6-MeCBA	45,329	249,3+275,5+277,2+279+308



Obr. 11 CG/MS chromatogram 15 MeCBA a vnitřního standardu HCB; pořadí analytů: 3-MeCBA+4-MeCBA; 2-MeCBA; 3,5-MeCBA; 2,6-MeCBA; 3,4-MeCBA; 2,5-MeCBA; 2,4-MeCBA; 2,3-MeCBA; 2,3,5-MeCBA; 2,3,6-MeCBA; 2,4,6-MeCBA; 2,3,5,6-MeCBA; HCB; 2,3,4,5-MeCBA; 2,3,4,5,6-MeCBA

5.4 Přečištění extraktu gelovou permeační chromatografií

Pro aplikaci vzorků extrahovaných postupem uvedeným v Kap. 8 na GC/MS musel být zahrnut čistící mezikrok. Z důvodu značné rozdílnosti polarit jednotlivých analytů byla pro přečištění vzorků zvolena GPC.

5.4.1 Retenční chování analytů

Pro přípravu gelu a jako mobilní fáze bylo použito rozpouštědlo DCM. Pro hodnocení retenčního chování analytů a výtěžnosti GPC s DCM jako MF byly frakce sbírány po 2 min v celkové délce 45 min a následně kvantifikovány HPLC/UV. Takto bylo zjištěno, že analyty eluují mezi 15 – 20 min.

Pro zjištění celkové výtěžnosti GPC byl v rámci optimalizace metody proveden experiment zahrnující sběr frakce mezi 15 – 30 min. Výtěžnost se blížila ku 100 % (data neprezentována).

5.4.2 Určení vlivu matrice půdy na retenční chování analytů

Určení vlivu matrice půdy na retenční chování analytů v GPC bylo provedeno užitím ASE extraktu nekontaminované půdy (Kap. 4.9.2). Po aplikaci na GPC bylo zjištěno, že půdní matrice nemá na retenční chování analytů vliv a analyty eluují mezi 15 – 30 min.

5.5 Analýza 15 CBA v uměle kontaminované půdě

Výtěžnost analytické metody zahrnující extrakci ASE uměle kontaminované půdy 15 CBA, přečištění pomocí GPC a derivatizace pomocí DM byla měřena užitím GC/MS. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 14. Podmínky extrakce ASE byly převzaty z práce Křesinová a kol. (45). Výtěžnost extrakce ASE měřená pomocí HPLC/UV v této práci byla 82,0 – 114,0 % s RSD 0,7 – 9,4 % (45).

Tab. 14 Průměrné výtěžnosti 15 CBA po extrakci půdy ASE s koncentrací 3 µg/g půdy při přečištění přes GPC, derivatizací pomocí DM a s následnou kvantifikací pomocí GC/MS

Analyt	Průměrná výtěžnost (n = 5)	RSD (%)
2-CBA	104,3 %	11,3
3-CBA+4-CBA	92,0 %	3,7
2,3-CBA	132,5 %	3,7
2,4-CBA	104,3 %	4,6
2,5-CBA	97,0 %	7,0
2,6-CBA	94,0 %	12,1
3,4-CBA	100,1 %	9,2
3,5-CBA	99,6 %	5,8
2,3,5-CBA	101,8 %	4,5
2,3,6-CBA	96,5 %	3,8 (n = 4)
2,4,6-CBA	92,4 %	2,5
2,3,4,5-CBA	99,6 %	3,2
2,3,5,6-CBA	91,7 %	2,1
2,3,4,5,6-CBA	96,2 %	2,1

5.6 Validace metody

Celá metoda umožňující kvantifikaci MeCBA v půdě zahrnuje extrakci půdy ASE, přečištění extraktů půdy pomocí GPC a derivatizaci diazomethanem s konečnou kvantifikací GC/MS. Metoda byla validována postupem uvedeným v Kap. 4.11.

5.6.1 Kalibrační křivky

Kalibrační křivky 15 CBA byly připraveny ředěním zásobního roztoku standardů 15 MeCBA v EtAc. Charakteristika kalibračních křivek je uvedena v Tab. 15. Kalibrační křivka v případě analytů 2,3,4,5,6-MeCBA a 2,3,5-CBA je devítibodová s lineárním rozsahem koncentrací 0,003 – 10 µg/ml, v případě analytů 2-MeCBA; 2,6-MeCBA; 2,3,5,6-MeCBA je osmibodová s lineárním rozsahem koncentrací 0,005 – 10 µg/ml, u analytů 3-MeCBA+4-MeCBA; 2,3-MeCBA; 2,5-MeCBA; 3,4-MeCBA a 2,3,4,5-MeCBA je sedmibodová s lineárním rozsahem koncentrací 0,01 – 10 µg/ml a u analytů 2,4-MeCBA; 3,5-MeCBA; 2,3,6-MeCBA a 2,4,6-MeCBA je šestibodová s lineárním rozsahem koncentrace 0,05 – 10 µg/ml. Každý bod kalibrační křivky představuje aritmetický průměr čtyř hodnot

Tab 15. Kalibrační křivky 15 MeCBA v EtAC měřené pomocí GC/MS

Analyt	Rovnice	Počet bodů přímky	Rozsah (µg/ml)	r ²	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
2-MeCBA	$y = 21878x - 1814$	8	0,005 - 10	0,9897	1,7	0,5
3-MeCBA+4-MeCBA	$y = 44649x + 5071$	7	0,01 - 10	0,9939	3,3	10,0
2,3-MeCBA	$y = 16033x + 667,53$	7	0,01 - 10	0,9979	3,3	10,0
2,4- MeCBA	$y = 12745x - 87,972$	6	0,05 - 10	0,9925	16,7	50,0
2,5-MeCBA	$y = 43527x + 427,08$	7	0,01 - 10	0,9991	3,3	10,0
2,6-MeCBA	$y = 38677x - 1377,5$	8	0,005 - 10	0,9991	1,7	0,5
3,4- MeCBA	$y = 23619x - 0,8202$	7	0,01 - 10	0,9914	3,3	10,0
3,5-MeCBA	$y = 13115x + 3663,2$	6	0,05 - 10	0,9818	16,7	50,0
2,3,5-MeCBA	$y = 31418x - 3599$	9	0,003 - 10	0,9955	1,0	0,3
2,3,6-MeCBA	$y = 32759x - 11145$	6	0,05 - 10	0,9916	16,7	50,0
2,4,6-MeCBA	$y = 38576x - 2398,6$	6	0,05 - 10	0,9934	16,7	50,0
2,3,4,5-MeCBA	$y = 28279x + 2870,7$	7	0,01 - 10	0,9984	3,3	10,0
2,3,5,6-MeCBA	$y = 38619x - 1263,9$	8	0,005 - 10	0,9987	1,7	0,5
2,3,4,5,6-MeCBA	$y = 30594x - 641,08$	9	0,003 - 10	0,9990	1,0	0,3

5.6.2 Limit stanovitelnosti LOQ zvolené analytické metody

Nejnižší hodnota koncentrace, která byla kvantifikována po aplikaci zvolené analytické metody na uměle kontaminovanou půdu pro všech 15 CBA, byla 0,003 µg/g. V případě 11 CBA (2-CBA; 3-CBA; 4-CBA; 2,3-CBA; 2,4-CBA; 2,5-CBA; 2,6-CBA; 3,4-CBA; 3,5-CBA; 2,3,5-CBA a 2,3,4,5,6-CBA) byla tato hodnota stanovena bez nutnosti začlenění dalšího analytického kroku. Aby mohly být ostatní analyty (2,3,6-CBA; 2,4,6-CBA; 2,3,4,5-CBA a 2,3,5,6-CBA) detekovány na koncentrační hladině 0,003 µg/g, byly vzorky desetinásobně zakoncentrovány a opětovně analyzovány pomocí GC/MS.

Tímto postupem došlo k začlenění dalšího analytického kroku zahrnujícího zakoncentrování odpařením rozpouštědla pod proudem dusíku do sucha a rozpuštění vzorku v 100 µl EtAc. Výtěžnost 15 CBA analytické metody se snížila a je uvedena v Tab. 16. Z Tab. 16 je patrné, že výtěžnost analytické metody (ASE extrakce, GPC přečištění, DM derivatizace, GC/MS analýza) se v případě zahrnutí zakoncentrování vzorku snížila pro 15 CBA o 0,0 – 10,5 %.

Koncentrační hladina 0,001 µg/g nebyla bez zakoncentrování detekována u žádných z analytů. Vzorek byl tedy desetinásobně zakoncentrován a opětovně analyzován pomocí GC/MS. Detekovat se podařilo 11 CBA (2,3-CBA; 2,4-CBA; 2,5-CBA; 2,6-CBA; 3,4-CBA; 3,5-CBA; 2,3,5-CBA; 2,3,6-CBA; 2,4,6-CBA; 2,3,5,6-CBA a 2,3,4,5,6-CBA). Analyty 2-CBA; 3-CBA; 4-CBA a 2,3,4,5-CBA detekovány na koncentrační hladině 0,001 µg/g nebyly ani po zakoncentrování vzorku. Výtěžnost 11 CBA se v tomto případě také snížila.

Snížení výtěžnosti poukazuje na možné ztráty derivatizačních produktů MeCBA, které jsou těkavé. Výsledky průměrných výtěžností pro všechny koncentrační hladiny jsou uvedeny v Tab. 16.

5.6.3 Správnost a přesnost metody

Přesnost a správnost celého postupu byly určeny analýzou uměle kontaminovaných půdních vzorků (viz Tab. 16) ve čtyřech paralelách na koncentračních hladinách 0,001; 0,003; 0,005; 0,01; 0,05; a 0,1 µg/g. Hodnoty správnosti metody se pohybovaly od 87 % do 130 % s přesností od 2 - 12 % vyjádřena % RSD.

Tab. 16 Průměrné výtěžnosti (%) a RSD (%) pro n = 4 analytické metody zahrnující extrakci půdy pomocí ASE, přečištění pomocí GPC, derivatizace pomocí DM a analýza pomocí GC/MS; v případě koncentračních hladin 0,001 µg/g a 0,003 µg/g byl vzorek navíc 10× zakoncentrován odpařením rozpouštědla pod proudem dusíku a rozpuštěním v 100 µl EtAc

Analyt	0,001 µg/g	0,003 µg/g	0,005 µg/g	0,01 µg/g	0,05 µg/g	0,1 µg/g
2-CBA	n.d.	99,2 (3,5)	102,0 (8,7)	104,0 (2,3)	101,2 (6,1)	110,3 (11,2)
3-CBA+4-CBA	n.d.	87,4 (5,0)	95,3 (5,6)	96,0 (5,9)	90,5 (7,0)	98,0 (3,7)
2,3-CBA	124,5 (5,6)	122,0 (10,3)	128,2 (3,2)	122,4 (5,6)	130,2 (2,3)	129,6 (5,7)
2,4-CBA	98,0 (2,1)	101,0 (3,5)	99,5 (12,3)	102,5 (6,7)	107,0 (5,1)	109,2 (3,0)
2,5-CBA	95,0 (3,4)	95,3 (3,6)	97,5 (5,3)	96,2 (2,8)	95,2 (8,1)	98,6 (2,0)
2,6-CBA	90,2 (4,0)	92,3 (2,1)	91 (3,4)	96,7 (5,2)	92,1 (2,0)	97,2 (8,1)
3,4-CBA	98,4 (10,1)	100,2 (12,5)	102,2 (8,7)	105,2 (6,2)	98,0 (3,2)	105,4 (6,0)
3,5-CBA	94,5 (6,2)	90,2 (5,5)	99,2 (3,1)	101,2 (5,0)	105,3 (5,6)	102,0 (3,4)
2,3,5-CBA	99,2 (3,7)	95,3 (2,3)	102,2 (4,0)	103,0 (2,1)	99,6 (4,1)	99,6 (3,0)
2,3,6-CBA	96,0 (5,2)	91,2 (3,2)	98,0 (3,1)	92,1 (4,0)	100,6 (5,1)	93,2 (6,7)
2,4,6-CBA	87,9 (4,5)	88,2 (2,9)	97,2 (2,5)	94,2 (2,5)	90,5 (7,0)	98,7 (3,0)
2,3,4,5-CBA	n.d.	98,7 (9,5)	101,2 (3,4)	97,0 (5,1)	97,0 (4,1)	102,3 (6,2)
2,3,5,6-CBA	87,7 (2,3)	87,7 (5,6)	95,0 (2,1)	96,0 (3,1)	92,6 (7,0)	96,2 (4,1)
2,3,4,5,6-CBA	88,2 (7,6)	95,3 (3,1)	96,0 (3,2)	96,8 (5,1)	101,2 (11,3)	98,2 (6,2)

n.d.: analyt nedetekován

5.7 Analýza reálného vzorku půdy

Reálný vzorek půdy pocházel z oblasti Lhenice. Celý analytický postup stanovení 15 CBA včetně extrakčního kroku, přečištění a derivatizace byl aplikován na stanovení 15 CBA v reálném vzorku půdy. Získané výsledky jsou shrnuty v Tab. 17.

Křesinová a kol. stanovovali koncentraci 15 CBA v reálné půdě pocházející ze stejné oblasti. Pro stanovení byla použita metoda zahrnující extrakci ASE za stejných podmínek jako v této práci a vzorky byly kvantifikovány HPLC/UV. Detekovány byly 3-CBA; 4-CBA; 2,3-CBA; 2,4-CBA; 2,5-CBA; 2,6-CBA; 2,3,5-CBA; 2,3,6-CBA; 2,4,6-CBA a 2,3,5,6-CBA s nejnižší hodnotou koncentrace 0,02 $\mu\text{g/g}$ pro 2,3-CBA a s nejvyšší hodnotou koncentrace 0,62 $\mu\text{g/g}$ pro 2,4,6-CBA (45).

V této diplomové práci byla reálná půda ze stejné oblasti analyzována metodou zahrnující extrakční krok pomocí ASE, přečištění pomocí GPC, derivatizace pomocí DM a vzorky byly kvantifikovány GC/MS. Detekováno bylo všech 15 derivátů CBA s nejnižší hodnotou koncentrace 0,04 $\mu\text{g/g}$ pro 2,6-CBA a s nejvyšší hodnotou koncentrace 0,85 $\mu\text{g/g}$ pro 2,4-CBA.

Z výsledků je patrné, že metoda stanovení pomocí GC/MS s derivatizací vzorků pomocí DM dosahuje výrazně nižších detekčních limitů.

Čvančarová, M. ve své diplomové práci stanovila ve stejném vzorku půdy celkovou koncentraci PCB 302,7 $\mu\text{g/g}$ (koncentrace kongengrů jsou uvedeny v Kap. 4.1). Kyseliny chlorbenzoové jsou produktem bakteriální degradace PCB. CBA se kumulují v životním prostředí a ovlivňují další bakteriální degradaci PCB. Přítomnost CBA v environmentálním vzorku má za následek inhibici bakteriální degradace PCB. Stanovená koncentrace CBA v reálném vzorku půdy může mít za následek, že koncentrace PCB 302,7 $\mu\text{g/ml}$ se v půdě nebude dále degradovat a nedojde tak její dekontaminaci.

Tab 17. Průměrná koncentrace 15 CBA v reálném vzorku půdy extrahovaném ASE, přečištěném přes GPC, derivatizované pomocí DM s konečnou kvantifikací GC/MS

Analyt	Průměrná koncentrace μg/g půdy (n = 4)	RSD (%) (n = 4)
2-CBA	0,102	12,1 %
3-CBA+4-CBA	0,124	10,0 %
2,3-CBA	0,778	10,2 %
2,4-CBA	0,852	8,1 %
2,5-CBA	0,058	10,1 %
2,6-CBA	0,041	11,9 %
3,4-CBA	0,222	8,2 %
3,5-CBA	0,203	5,7 %
2,3,5-CBA	0,139	12,5 %
2,3,6-CBA	0,308	10,2 %
2,4,6-CBA	0,071	9,0 %
2,3,4,5-CBA	0,066	12,4 %
2,3,5,6-CBA	0,061	7,1 %
2,3,4,5,6-CBA	0,080	6,5 %

6. Závěr

Byla vypracována a validována metoda stanovení dostupných 15 CBA v půdě zahrnující ASE extrakci půdy, přečištění extraktů půdy přes GPC a derivatizaci analytů pomocí DM a konečnou kvantifikaci vzorků pomocí GC/MS.

Při samotné analýze GC/MS se hodnota LOQ pohybovala v rozsahu 0,003 – 0,01 µg/ml.

Účinnost derivatizace diazomethanem byla pro všechny analyty v rozsahu 83,7 – 110,6 % s RSD 2,2 – 14,2 %. Derivatizace DM je jednoduchá, časově a cenově nenáročná. Výtěžnost 15 CBA v půdě se při zahrnutí všech kroků stanovení (extrakce, přečištění a derivatizace) při analýze GC/MS pohybovala v rozsahu 91,7 – 132,5 % s RSD 2,1 – 12,1 %.

Validací zvolené metody byla stanovena nejnižší hodnota koncentrační hladiny CBA v půdě, kterou můžeme pomocí této optimalizované metody (extrakce, přečištění a derivatizace) detekovat. Pro analyty 2,3-CBA; 2,4-CBA; 2,5-CBA; 2,6-CBA; 3,4-CBA; 3,5-CBA; 2,3,5-CBA; 2,3,6-CBA; 2,4,6-CBA; 2,3,5,6-CBA a 2,3,4,5,6-CBA byla nejnižší detekovaná koncentrační hladina 0,001 µg/g. Pro analyty 2-CBA; 3-CBA; 4-CBA a 2,3,4,5-CBA byla nejnižší detekovaná koncentrační hladina 0,003 µg/g. Některé analyty byly na těchto koncentračních hladinách detekovány pouze v případě zahrnutí dalšího analytického kroku a to desetinásobným zakoncentrováním. S tímto krokem došlo zároveň ke snížení účinnosti celého analytického postupu o 0,0 – 10,8 %.

Hodnoty správnosti metody se pohybovaly od 87 % do 130 % s přesností od 2 - 12 % vyjádřena % RSD.

Aplikací zvolené metody na analýzu reálného vzorku půdy bylo detekováno všech 15 derivátů kyseliny chlorbenzoové. Nejvyšší koncentrace byla zjištěna pro 2,4-CBA 0,852 µg/g. Nejnižší koncentrace byla zjištěna pro 2,6-CBA 0,041 µg/g.

Detekováním kyselin chlorbenzoových ve stejném vzorku poukazuje na důležitost vypracování vhodné metody pro analýzu CBA v environmentálních vzorcích.

Vypracování vhodné metody pro selektivní stanovení kyselin chlorbenzoových v půdní matrici pomocí GC/MS zahrnující extrakční krok, čistící mezikrok a derivatizace umožňující měření pomocí GC/MS je důležité pro životní prostředí, přesto taková metoda vypracována doposud nebyla.

Výsledkem této diplomové práce je selektivní metoda umožňující stanovení koncentrace vybraných 15 ti derivátů CBA v půdě, která může být kontaminována PCB. Metoda může být použita pro stanovení vlivu přítomnosti CBA na další degradaci PCB. Tato metoda také může najít uplatnění při studiu biodegradace PCB.

Seznam použité literatury

- (1) Tang, A.; Wang, L.; Zhou, r.: Gibbs energies of formation of chlorinated benzoic acids and benzoates application to their reductive dechlorination. *Journal of Molecular Structure* 960/1-3: 31–39 (2010).
- (2) Field, J.A.; Sierra-Alvarez, R.: Microbial transformation and degradation of polychlorinated biphenyls. *Environmental Pollution* 155/1: 1–12 (2008).
- (3) Pereira, W. E.; Rostad, C. E.; Taylor, H. E.; Volcanic Eruption: Characterization of Organic Compounds in Ash Samples. *Geophysical Research Letters* 7/11: 953–954 (1980).
- (4) Magara Y.; Aizawa T.; Matumote N.; Souna F.: Degradation of pesticides by chlorination during water purification. *Water Science and Technology* 30/7: 119–128 (1994).
- (5) Sandman E.; Loos, M.: Enumeration of 2,4-D degrading microorganisms in soil and crop plant rhizospheres using indicator media: high population associated with sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Chemosphere* 13/9: 1073–1084 (1984).
- (6) Dionysiou D.D.; Suidan M.T.; Bekou E.; Baudin I.; Laine J.: Effect of ionic strength and hydrogen peroxide on photocatalic degradation of 4-chlorobenzoic acid in water. *Applied Catalysis B: Environmental* 26/3: 153–171 (2000).
- (7) Pieper, D.H.; Seeger, M.: Bacterial Metabolism of Polychlorinated Biphenyls. *Journal od Molecular Microbiology and Biotechnology* 15/2-3: 121–138 (2008).
- (8) Faroon, O.; Jones, D.; de Rosa, C.: Effects of polychlorinated biphenyls on the nervous system. *Toxicology and Industrial Health* 16/7-8: 305–333 (2001).

- (9) Furukawa, K.: Biochemical and genetic bases of microbial degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs). *Journal of General and Applied Microbiology* 46/6: 283-296 (2000)
- (10) Bedard, D.L.: Polychlorinated biphenyls in aquatic sediments: environmental fate and outlook for biological treatment. *Earth and environmental science* 4: 443–465 (2003).
- (11) Pieper, D.H.: Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls. *Applied Microbiology and Biotechnology* 67/2: 170 (2005).
- (12) Ross, G.: The public health implications of polychlorinated biphenyls (PCBs) in the environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 59/3: 275–291 (2004).
- (13) Mayes, B.A.; McConnell, E.E.; Neal, B.H.; Brunner, M.J.; Hamilton, S.B.; Sullivan, T.M.; Peters, A.C.; Ryan, M.J.; Toft, J.D.; Singer, A.W.; Brown, J. F. Jr.; Menton, R.G.; Moore, J.A.: Comparative Carcinogenicity in Sprague–Dawley Rats of the Polychlorinated Biphenyl Mixtures Aroclors 1016, 1242, 1254, and 1260 *Toxicological science* 41/1: 62-76 (1998).
- (14) Aoki, Y.: Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disrupters - What we have learned from Yusho disease. *Environmental Research Section A* 86/1: 2-11 (2001).
- (15) Toxicological Profile for Polychlorinated Biphenyls (PCBs). Agency for Toxic Substances and Disease Registry, US Department of Health and Human Services, Atlanta 2000.
Staženo z: <http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp17.pdf>
- (16) Hetflejš, J.: Detoxification of solid wastes containing PCBs. *Chemické Listy* 88/9: 545-556 (1994).
- (17) Hetflejš, J.: Chemical destruction od PCBs. *Chemické listy* 87/6: 407–417 (1993)

- (18) Agulló, L.; Cámara, B.; Martínez, P.; Latorre, V.; Seeger, M.: Response to (chloro)biphenyls of the polychlorobiphenyl-degrader *Burkholderia xenovorans* LB400 involves stress proteins also induced by heat shock and oxidative stress. *FEMS Microbiology Letters*. 267/1: 167-175 (2007).
- (19) Martínez, P.; Agulló, L.; Hernández, M.: Chlorobenzoate inhibits growth and induces stress proteins in the PCB-degrading bacterium *Burkholderia xenovorans* LB40. *Archives of Microbiology* 188/3: 289-297 (2007).
- (20) Havel, J.; Reineke, W.: Degradation of Acrolor 1221 and survival of strains in soil microcosms. *Applied Microbiology and Biotechnology* 38/1: 129-134 (1992).
- (21) Sondossi, M.; Sylvestre, M.; Ahmad, D.: Effects of chlorobenzoate transformation on the *Pseudomonas testosteroni* biphenyl and chlorobiphenyl degradation pathway. *Applied and Environmental Microbiology* 58/2: 485-495 (1992).
- (22) Blasco, R.; Wittich, R.-M.; Mallavarapu, M.; Timmis, K. N.; Pieper, D. H.: From xenobiotic to antibiotic, formation of protoanemonin from 4-chlorocatechol by enzymes of the 3-oxoadipate pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 270/49: 29229-29235 (1995).
- (23) Blasco, R.; Mallavarapu, M.; Wittich, R.-M.; Timmis, K.N.; Pieper, D.H.: Evidence that Formation of Protoanemonin from Metabolites of 4-Chlorobiphenyl Degradation Negatively Affects the Survival of 4-Chlorobiphenyl-Cometabolizing Microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 63/2: 427-434 (1997).
- (24) Seegal, B. C.; Holden, M.: The antibiotic activity of extracts of *Ranunculaceae*. *Science* 101/2625: 413-414 (1945).

- (25) Adebusoje, S.A.; Miletto, M.: Characterization of multiple chlorobenzoic acid-degrading organisms from pristine and contaminated systems: Mineralization of 2,4-dichlorobenzoic acid. *Bioresource Technology* 102/3: 3041- 3048 (2011).
- (26) Michaelis, W.; Richnow, H.H.; Seifert, R.: Chemically bound chlorinated aromatics in humic substances. *Naturwissenschaften* 82/3: 139-142 (1995).
- (27) Muccini, M.; Layton, A.C.; Sayler, G.S.; Schultz, T.W.: Aquatic toxicities of halogenated benzoic acids to *Tetrahymena pyriformis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 62/5: 616-622 (1999).
- (28) Zhao, Y.H.; Cronin, G.D. Ji, M.T.D.; Dearden, J.C.: QSAR study of the toxicity of benzoic acids to *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* and carp. *Science of the Total Environment* 216/3: 205–215 (1998).
- (29) Lee, P.Y.; Chen, C.Y.: Toxicity and quantitative structure–activity relationships of benzoic acids to *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Journal of Hazardous Materials* 165/1-3: 156-161 (2009).
- (30) Gichner, T.; Lovecka, P.; Vrchotova, B.: Genomic damage induced in tobacco plants by chlorobenzoic acids-Metabolic products of polychlorinated biphenyls. *Mutation Research* 657/2: 140-145 (2008).
- (31) Svobodová K.; Plačková M.; Novotná V.; Cajthaml T.: Estrogenic and androgenic activity of PCBs, their chlorinated metabolites and other endocrine disruptors estimated with two *in vitro* yeast assays. *Science of the Total Environment* 407/22: 5921-5925 (2009).
- (32) Vrana, B.; Dercová, K.; Baláž, Š.: Monitoring evaporation polychlorinated biphenyls (PCB) in long-term degradation experiments. *Biotechnolpgy Techniques* 9/5: 333-338 (1995).
- (33) Haggblom, M.M: Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. *FEMS Microbiology Letters* 103/1: 29–71 (1992).

- (34) Ramirez-Saad, H. C.; Sessitsch, A.; Akkermans, A.D.L.: Molecular diversity in the bacterial community and the fluorescent pseudomonads group in natural and chlorobenzoate-stressed peat-forest soil. *Microbiological Research* 158/1: 47–54 (2003).
- (35) Fava, F.; Baldoni, F.; Marchetti, L.: 2-Chlorobenzoic acid and 2,5-dichlorobenzoic acid metabolism by crude extracts of *Pseudomonas* sp. CPE2 strain. *Letters in Applied Microbiology* 22/4: 75–279 (1996).
- (36) Nayak, S.A.; Vijaykumar, M.H; Karegoudar, T.B.: Characterization of biosurfactant produced by *Pseudoxanthomonas* sp. PNK-04 and its application in bioremediation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 63/1: 73–79 (2009).
- (37) Macková. M.; Vrchotová, B.; Francová, K.; Sylvestre, M.; Tomaniová, M.; Lovecká, P.; Demnerová, K.; Macek, T.: Biotransformation of PCBs by plants and bacteria—consequences of plant-microbe interactions. *European Journal of Soil Biology* 43/4: 233–241 (2007).
- (38) Niftaliev, S. I.; Korenman, Ya. I.; Konstantinova, N. A.; Sysoev, V.V.: Selective Determination of Chlorobenzoic Acids Using Extraction with Hydrophylic Solvents. *Journal of Analytical Chemistry* 59/4: 319-322 (2004).
- (39) Dietz, E.A; Cortellucci, N.J; Singley, K.F.: Determination of benzoic-acid, chlorobenzoic acids and chloroendic acid in water. *Journal of Liquid Chromatography* 16/15: 3331-3347 (1993).
- (40) Lambo, A.J; Patel, T.R.: Cometabolic Degradation of Polychlorinated Biphenyls at Low Temperature by Psychrotolerant Bacterium *Hydrogenophaga* sp. IA3-A. *Current Microbiology* 53/1: 48–52 (2006).

- (41) Bott, T.L.; Kaplan, L.A.: Autecological properties of 3-chlorobenzoate-degrading bacteria and their population dynamics when introduced into sediments. *Microbial Ecology* 43/2: 199-216 (2002).
- (42) Gentry, T.J.; Wang, G.; Rensing, C.; Pepper, I.L.: Chlorobenzoate-degrading bacteria in similar pristine soils exhibit different community structures and population dynamics in response to anthropogenic 2-, 3- and 4-chlorobenzoate levels. *Microbial Ecology* 48/1: 90-102 (2004).
- (43) Wang, W.; Meng, B.; Lu, X.; Liu, Y.; Tao, S.: Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides from soils: A comparison between Soxhlet extraction, microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction techniques. *Analytica Chimica Acta* 602/2: 211-222 (2007).
- (44) Zuloaga, O.; Etxebarria, N.; Fernández, L.A.; Madariaga, J.M.: Optimization and comparison of MAE, ASE and Soxhlet extraction for the determination of HCH isomers in soil samples. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 367/8: 733-737 (2000).
- (45) Křesinová, Z.; Muzikář, M.; Olšovská, J.; Cajthaml, T.: Determination of 15 isomers of chlorobenzoic acid in soil samples using accelerated sample extraction followed by liquid chromatography. *Talanta* 84/4: 1141-1147 (2011).
- (46) Bachmann, T.T.; Bilitewski, U.; Schmid, R.D.A.: Microbial sensor based on *Pseudomonas putida* for phenol, benzoic acid and their monochlorinated derivatives which can be used in water and n-hexane. *Analytical Letters* 31/14: 2361-2373 (1998).

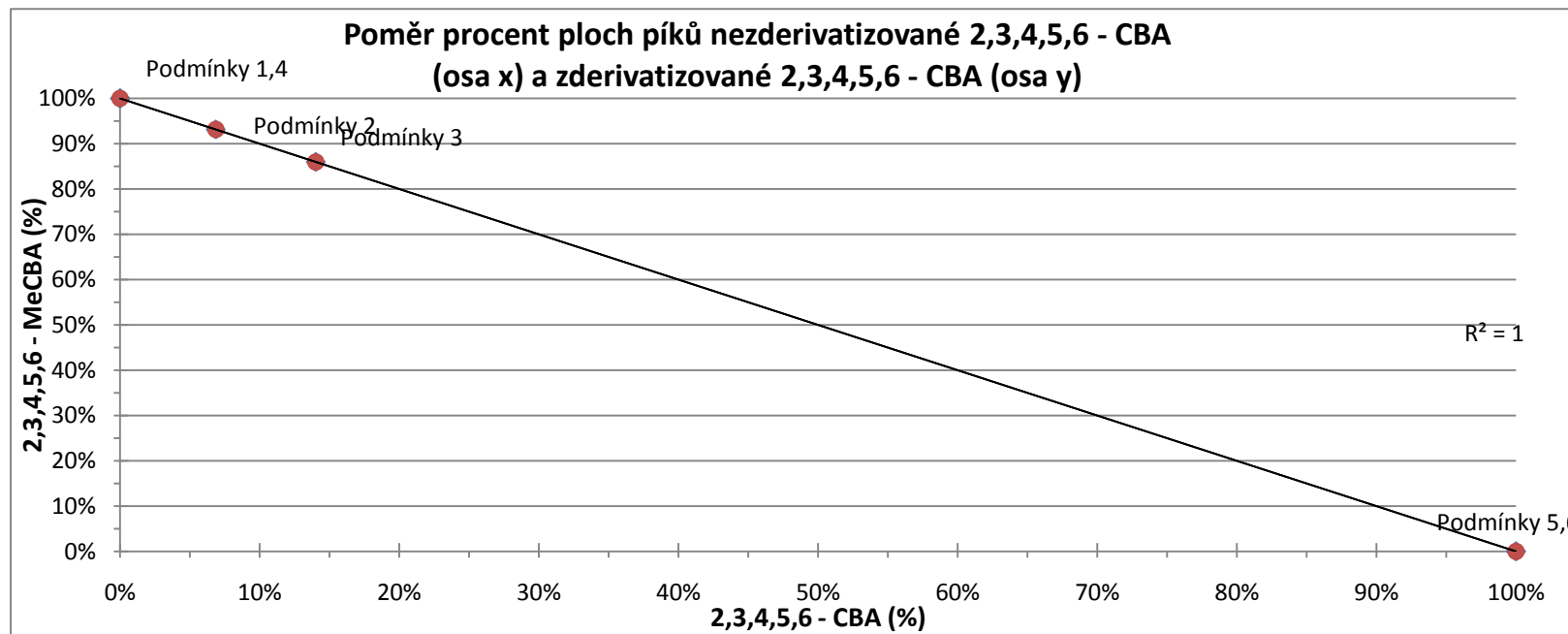
- (47) Adebusoje, S.A.; Picardal, F.W.; Ilori, M.O.; Amund, O.O.; Fuqua, C.: Characterization of multiple novel aerobic polychlorinated biphenyl (PCB)-utilizing bacterial strains indigenous to contaminated tropical African soils. *Biodegradation* 19/1: 145–159 (2008).
- (48) Hirschlag, H.; Köster, R.: Development of a solid-phase extraction and derivatization method for polar carboxylic acids from aqueous extracts of inorganic multi-component incineration residues. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 362/3: 274-280 (1998).
- (49) Galdigaa, C.U.; Greibrokk, T.: Ultra-trace determination of fluorinated aromatic carboxylic acids in aqueous reservoir fluids using solid-phase extraction in combination with gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 793/2: 297-306 (1998).
- (50) Niedan, V.; Scholer, H.F.: Natural formation of chlorobenzoic acids (CBA) and distinction between PCB-degraded CBA. *Chemosphere* 35/6: 1233-1241 (1997).
- (51) Kamei, I.; Kogura, R.; Kondo, R.: Metabolism of 4,4'-dichlorobiphenyl by white-rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* and *Phanerochaete* sp. MZ142. *Applied Microbiol and Biotechnology* 72/3: 566–575 (2006).
- (52) Citová, I.; Sladkovský, R.; Solich, P.: Analysis of phenolic acids as chloroformate derivatives using solid phase microextraction-gas chromatography. *Analytica Chimica Acta* 573-574: 231-241 (2006).
- (53) Petit-Dominguez M.D.; Martinez-Maganto, J.: MCF fast derivatization procedur for identification of resinous deposit components from the inner walls of roman age amphorae by GC-MS. *Talanta* 51/4: 727-734 (2000).

- (54) Dufková, V.; Čabala, R.; Maradová, D.; Štícha, M.: A fast derivatization procedure for gas chromatographic analysis of perfluorinated organic acids. *Journal of Chromatography A* 1216/49: 8659-8664 (2009).
- (55) Článek v tisku: DOI: 10.1016/j.talanta.2011.03.013
- (56) Čvančarová, M.: Studium ekotoxicky biodostupné frakce organopolutantů, Praha 2009.
- (57) Cajthaml, T.; Möder, M.; Kačer P.; Šašek, V.; Popp, P.: Study of fungal degradation products of polycyclic aromatic hydrocarbons using gas chromatography with ion trap mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A* 974 213-222 (2002).
- (58) Nishida, M.; Namera, A.; Yashiki, M.; Kojima, T.: Routine analysis of amphetamine and methamphetamine in biological materials by gas chromatography–mass spectrometry and on-column derivatization. *Journal of Chromatography B* 789/1 65–71 (2003).
- (59) Namera, A.; Yashiki, M.; Nishida, M.; Kojima, T.: Direct extract derivatization for determination of amino acids in human urine by gas chromatography and mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 776/1 49–55 (2002).
- (60) Henriksen, T.; Svensmark, B.; Lindhardt, B.; Juhler, R.K.: Analysis of acidic pesticides using in situ derivatization with alkylchloroformate and solid-phase microextraction (SPME) for GC-MS. *Chemosphere* 44/7: 1531-1539 (2001).

Přílohy A - I

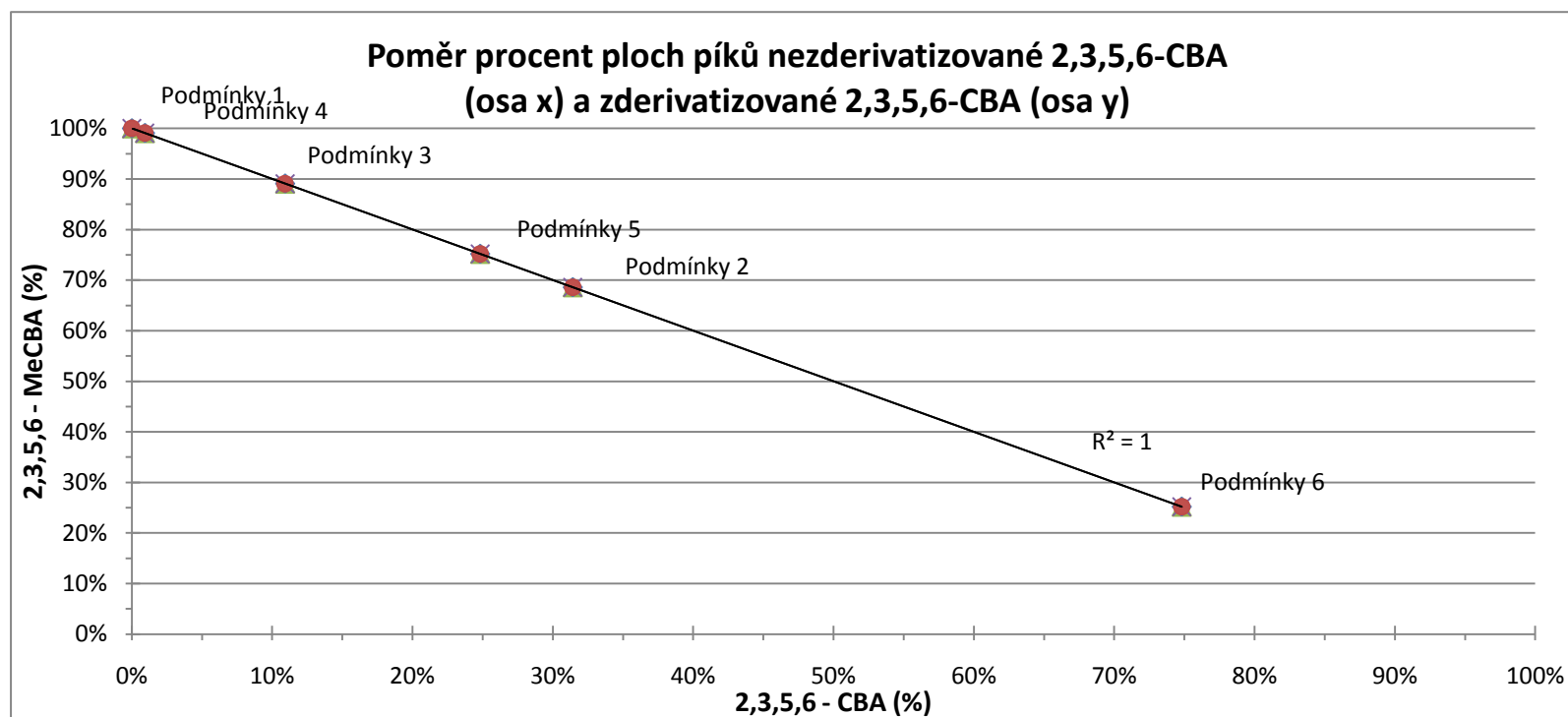
Příloha A: Podmínky derivatizace DM 2,3,4,5,6-CBA pro dosažení stechiometrie derivatizační reakce. Graf: poměr procent ploch píků nezderivatizované 2,3,4,5,6-CBA a zderivatizované 2,3,4,5,6-CBA

	Podmínky 1	Podmínky 2	Podmínky 3	Podmínky 4	Podmínky 5	Podmínky 6
Vzorek	100 μ l 200 ppm	100 μ l 200 ppm	100 μ l 200 ppm	100 μ l 200 ppm	100 μ l 200 ppm	100 μ l 200 ppm
Diazomethan	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,250 ml	0,250 ml	0,250 ml
MeOH	10 μ l	10 μ l	5 μ l	10 μ l	5 μ l	5 μ l
Čas	1 hodina	0,5 hodina	1 hodina	1 hodina	1 hodina	0,5 hodina



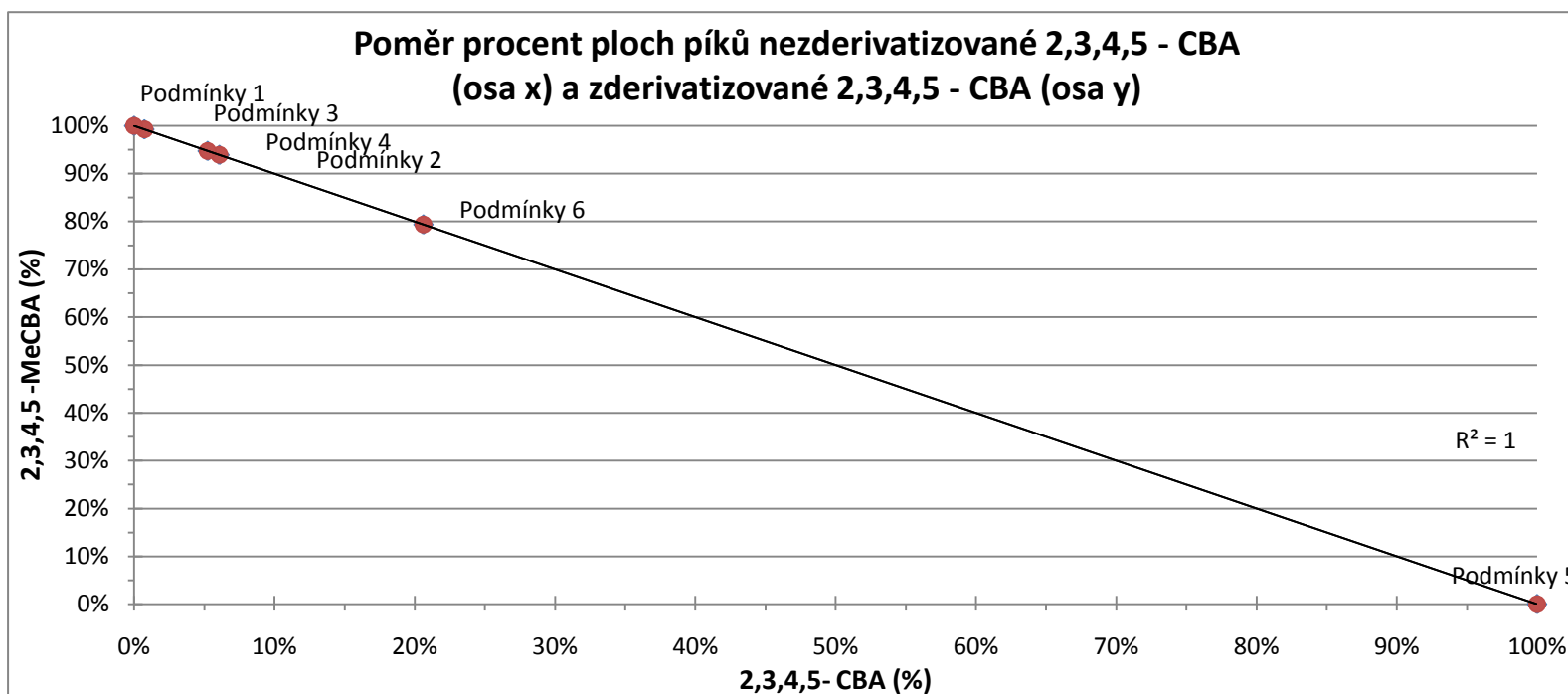
Příloha B: Podmínky derivatizace DM 2,3,5,6-CBA pro dosažení stechiometrie derivatizační reakce. Graf: poměr procent ploch píků nezderivatizované 2,3,5,6-CBA a zderivatizované 2,3,5,6-CBA

	Podmínky 1	Podmínky 2	Podmínky 3	Podmínky 4	Podmínky 5	Podmínky 6
Vzorek	100 μ l 200 ppm	100 μ l 200 ppm	100 μ l 200 ppm	100 μ l 200 ppm	100 μ l 200 ppm	100 μ l 200 ppm
Diazomethan	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,250 ml	0,250 ml	0,250 ml
MeOH	10 μ l	10 μ l	5 μ l	10 μ l	5 μ l	5 μ l
Čas	1 hodina	0,5 hodina	1 hodina	1 hodina	1 hodina	0,5 hodina



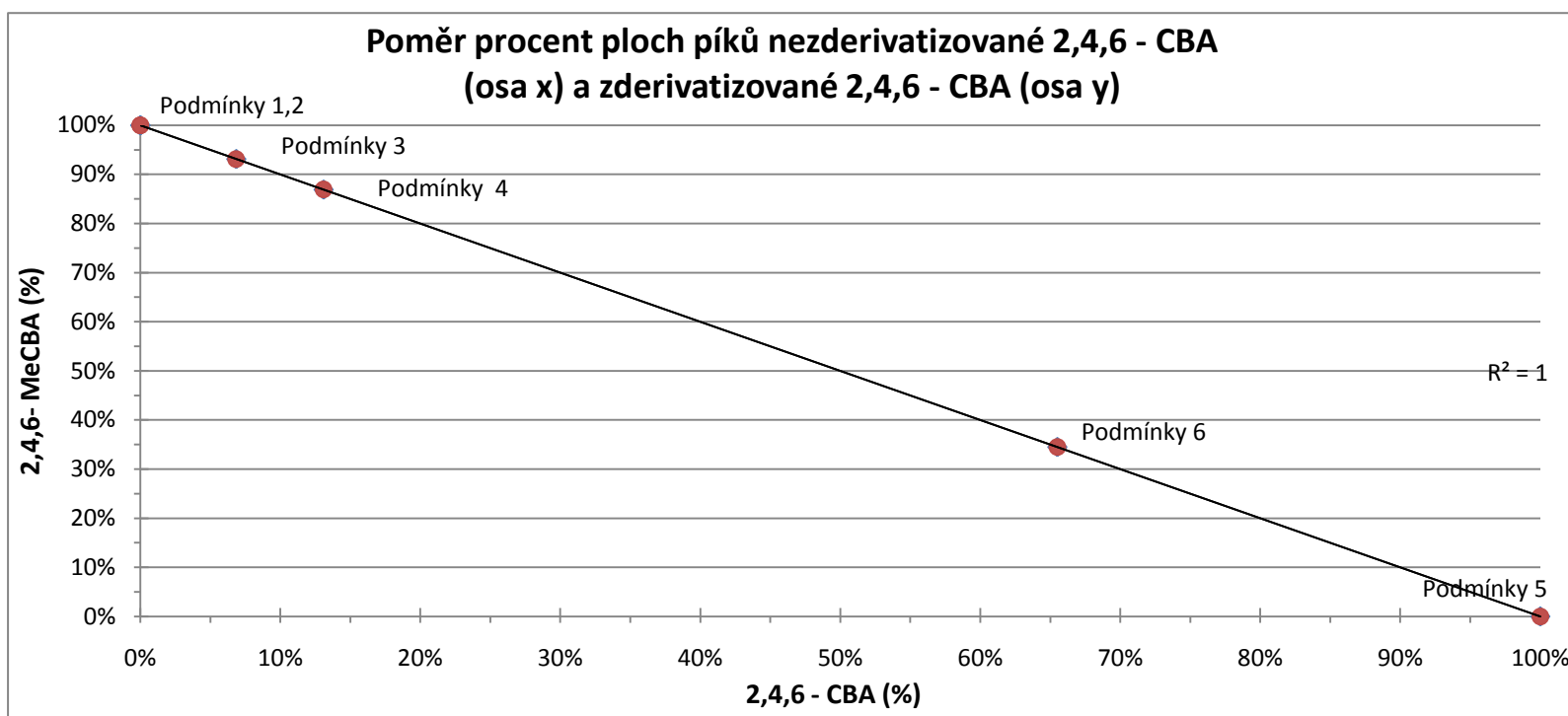
Příloha C: Podmínky derivatizace DM 2,3,4,5-CBA pro dosažení stechiometrie derivatizační reakce. Graf: poměr procent ploch píků nezderivatizované 2,3,4,5-CBA a zderivatizované 2,3,4,5-CBA

	Podmínky 1	Podmínky 2	Podmínky 3	Podmínky 4	Podmínky 5	Podmínky 6
Vzorek	100 µl 200 ppm	100 µl 200 ppm	100 µl 200 ppm	100 µl 200 ppm	100 µl 200 ppm	100 µl 200 ppm
Diazomethan	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,250 ml	0,250 ml	0,250 ml
MeOH	10 µl	10 µl	5 µl	10 µl	5 µl	5 µl
Čas	1 hodina	0,5 hodina	1 hodina	1 hodina	1 hodina	0,5 hodina



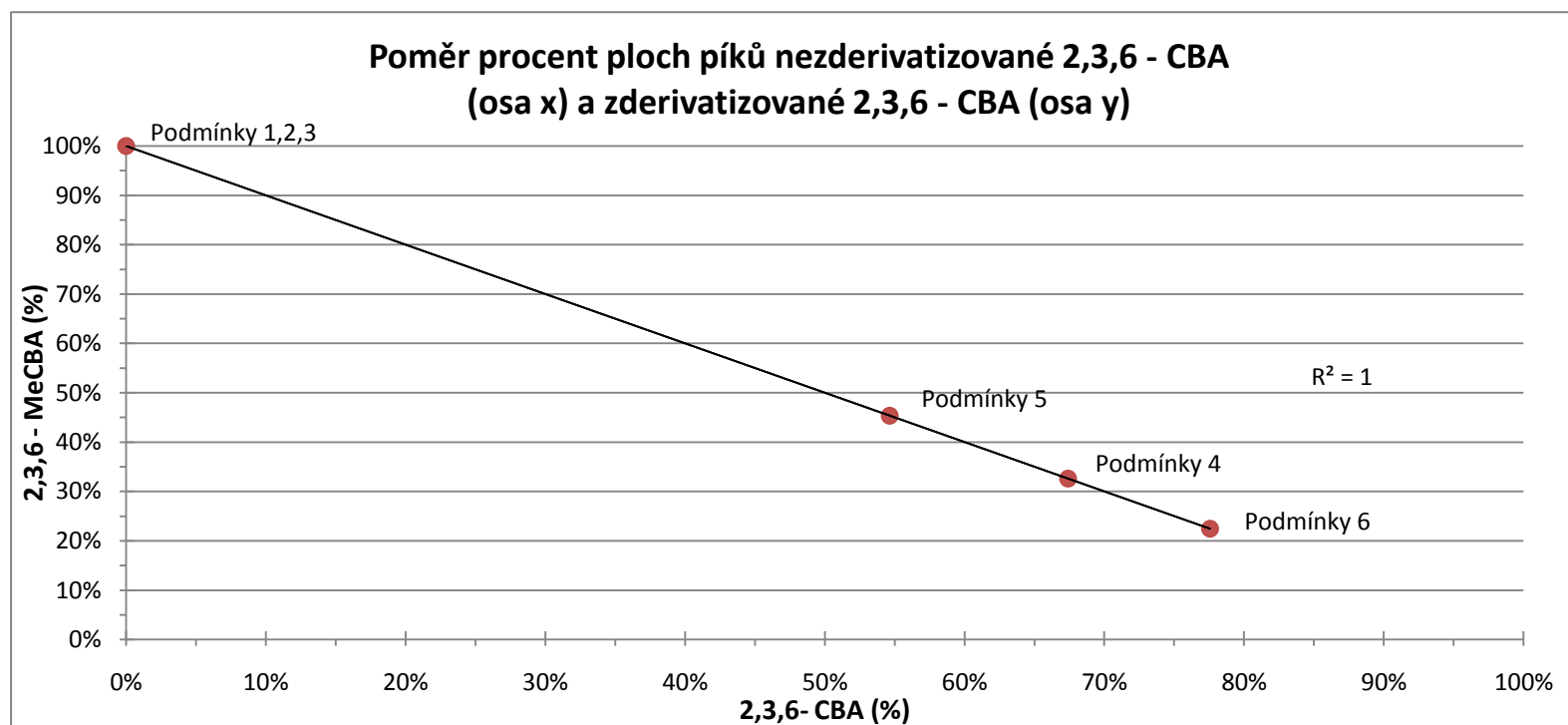
Příloha D: Podmínky derivatizace DM 2,4,6-CBA pro dosažení stechiometrie derivatizační reakce. Graf: poměr procent ploch píků nezderivatizované 2,4,6-CBA a zderivatizované 2,4,6-CBA

	Podmínky 1	Podmínky 2	Podmínky 3	Podmínky 4	Podmínky 5	Podmínky 6
Vzorek	100 µl 200 ppm	100 µl 200 ppm	100 µl 200 ppm	100 µl 200 ppm	100 µl 200 ppm	100 µl 200 ppm
Diazomethan	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,250 ml	0,250 ml	0,250 ml
MeOH	10 µl	10 µl	5 µl	10 µl	5 µl	5 µl
Čas	1 hodina	0,5 hodina	1 hodina	1 hodina	1 hodina	0,5 hodina



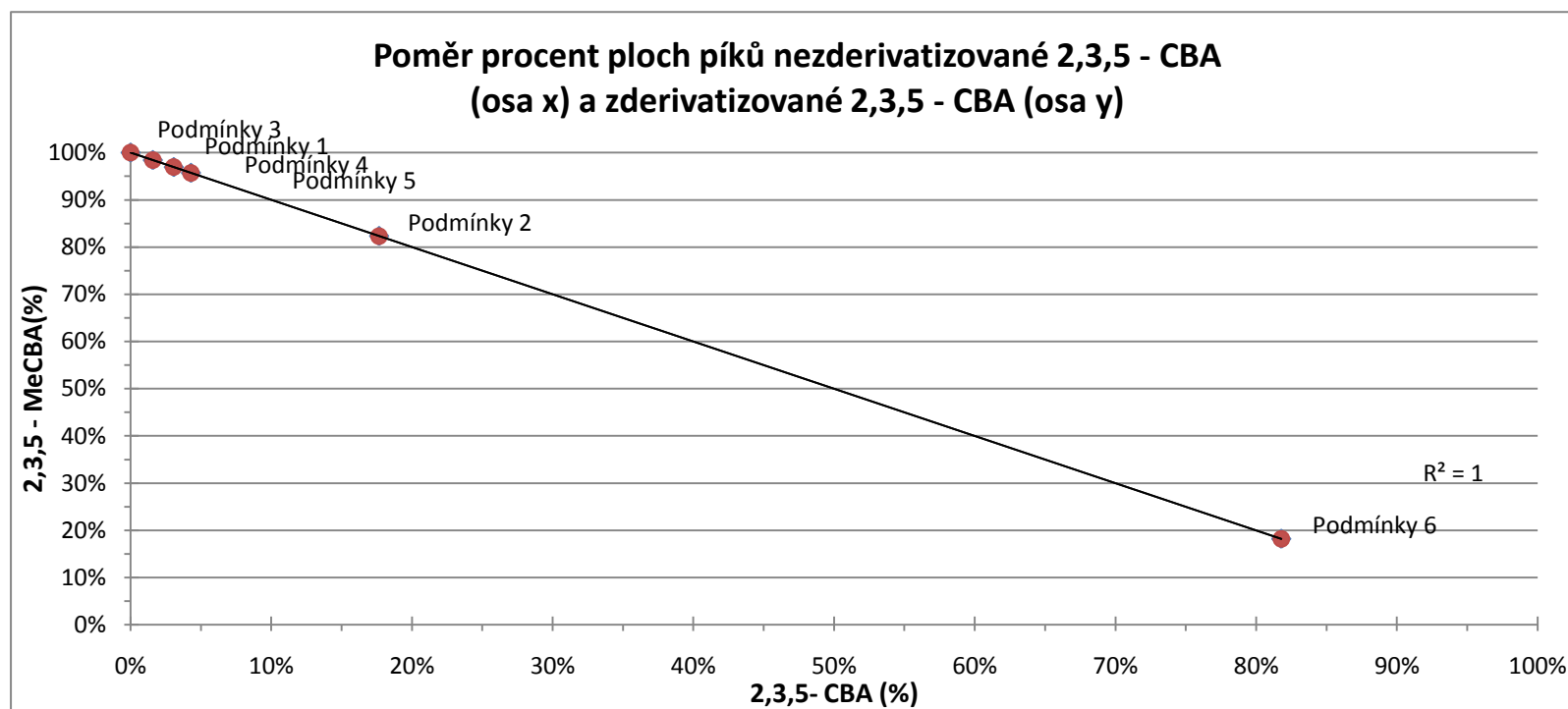
Příloha E: Podmínky derivatizace DM 2,3,6-CBA pro dosažení stechiometrie derivatizační reakce. Graf: poměr procent ploch píků nezderivatizované 2,3,6-CBA a zderivatizované 2,3,6-CBA

	Podmínky 1	Podmínky 2	Podmínky 3	Podmínky 4	Podmínky 5	Podmínky 6
Vzorek	100 µl 200 ppm	100 µl 200 ppm	100 µl 200 ppm	100 µl 200 ppm	100 µl 200 ppm	100 µl 200 ppm
Diazomethan	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,250 ml	0,250 ml	0,250 ml
MeOH	10 µl	10 µl	5 µl	10 µl	5 µl	5 µl
Čas	1 hodina	0,5 hodina	1 hodina	1 hodina	1 hodina	0,5 hodina



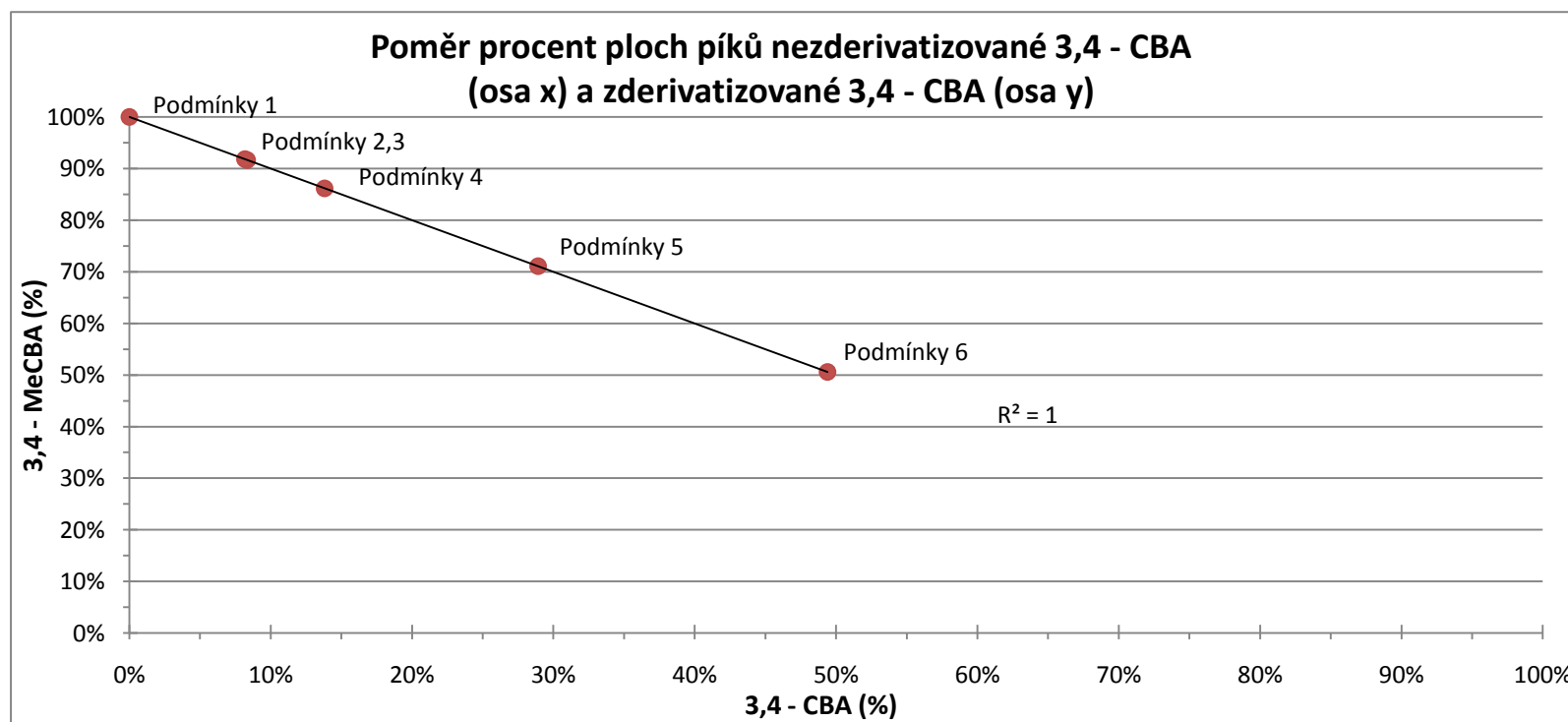
Příloha F: Podmínky derivatizace DM 2,3,5-CBA pro dosažení stechiometrie derivatizační reakce. Graf: poměr procent ploch píků nezderivatizované 2,3,5-CBA a zderivatizované 2,3,5-CBA

	Podmínky 1	Podmínky 2	Podmínky 3	Podmínky 4	Podmínky 5	Podmínky 6
Vzorek	100 µl 200 ppm	100 µl 200 ppm	100 µl 200 ppm	100 µl 200 ppm	100 µl 200 ppm	100 µl 200 ppm
Diazomethan	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,250 ml	0,250 ml	0,250 ml
MeOH	10 µl	10 µl	5 µl	10 µl	5 µl	5 µl
Čas	1 hodina	0,5 hodina	1 hodina	1 hodina	1 hodina	0,5 hodina



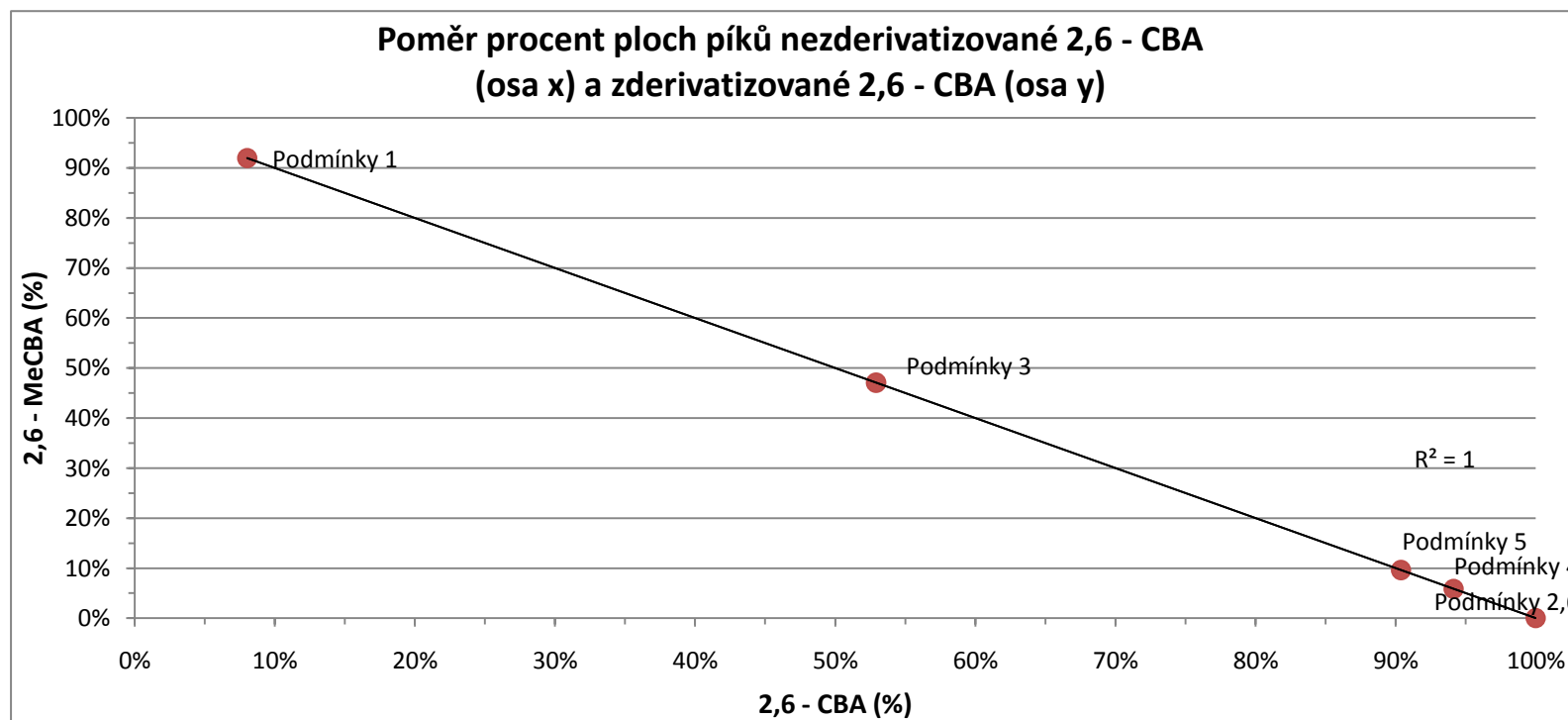
Příloha G: Podmínky derivatizace DM 3,4-CBA pro dosažení stechiometrie derivatizační reakce. Graf: poměr procent ploch píků nezderivatizované 3,4-CBA a zderivatizované 3,4-CBA

	Podmínky 1	Podmínky 2	Podmínky 3	Podmínky 4	Podmínky 5	Podmínky 6
Vzorek	100 µl 200 ppm	100 µl 200 ppm	100 µl 200 ppm	100 µl 200 ppm	100 µl 200 ppm	100 µl 200 ppm
Diazomethan	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,250 ml	0,250 ml	0,250 ml
MeOH	10 µl	10 µl	5 µl	10 µl	5 µl	5 µl
Čas	1 hodina	0,5 hodina	1 hodina	1 hodina	1 hodina	0,5 hodina



Příloha H: Podmínky derivatizace DM 2,6-CBA pro dosažení stechiometrie derivatizační reakce. Graf: poměr procent ploch píků nezderivatizované 2,6- CBA a zderivatizované 2,6-CBA

	Podmínky 1	Podmínky 2	Podmínky 3	Podmínky 4	Podmínky 5	Podmínky 6
Vzorek	100 µl 200 ppm	100 µl 200 ppm	100 µl 200 ppm	100 µl 200 ppm	100 µl 200 ppm	100 µl 200 ppm
Diazomethan	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,250 ml	0,250 ml	0,250 ml
MeOH	10 µl	10 µl	5 µl	10 µl	5 µl	5 µl
Čas	1 hodina	0,5 hodina	1 hodina	1 hodina	1 hodina	0,5 hodina



Příloha I: Podmínky derivatizace DM 2,3-CBA pro dosažení stechiometrie derivatizační reakce. Graf: poměr procent ploch píků nezderivatizované 2,3-CBA a zderivatizované 2,3-CBA

	Podmínky 1	Podmínky 2	Podmínky 3	Podmínky 4	Podmínky 5	Podmínky 6
Vzorek	100 μ l 200 ppm	100 μ l 200 ppm	100 μ l 200 ppm	100 μ l 200 ppm	100 μ l 200 ppm	100 μ l 200 ppm
Diazomethan	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,250 ml	0,250 ml	0,250 ml
MeOH	10 μ l	10 μ l	5 μ l	10 μ l	5 μ l	5 μ l
Čas	1 hodina	0,5 hodina	1 hodina	1 hodina	1 hodina	0,5 hodina

