

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Zavedení metody na stanovení vybraných kongenerů
polychlorovaných bifenylyů ve vodě metodou GC-ECD**

Bakalářská práce

Eliška Talaváňová

Školitel: Ing. David Kahoun, Ph.D.

České Budějovice 2015

Talaváňová, E., (2015): Zavedení metody na stanovení vybraných kongenerů polychlorovaných bifenyly ve vodě metodou GC-ECD. [Establishment of the method for determination of selected congeners of polychlorinated biphenyls in water using GC-ECD. Bc. Thesis, in Czech.] – 39 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

This bachelor thesis deals with the determination of selected congeners of polychlorinated biphenyls in water using GC-ECD. Firstly, the development and optimisation of the analytical method was performed. The following parameters of the analytical method were chosen for optimization: carrier gas flow rate, sample volume, injector temperature, splitless time, initial column temperature, temperature gradient and detector temperature. Then, extraction time of the liquid-liquid extraction was optimised. Finally, the method was successfully validated and applied to the analysis of a real tap water sample.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 26. 11. 2015

.....

Eliška Talaváňová

Poděkování

Ráda bych tímto poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Ing. Davidu Kahounovi, Ph.D. za odborné vedení, poskytnuté rady a informace, které mi umožnily vypracování této práce.

Poděkování patří také mé rodině a příteli za podporu a pomoc.

Cíle bakalářské práce

- vypracovat literární rešerši na dané téma
- vypracovat postup extrakce vybraných kongenerů polychlorovaných bifenyľů z vody do kapaliny (LLE) a provést základní optimalizaci tohoto postupu
- vypracovat analytickou metodu na stanovení vybraných kongenerů polychlorovaných bifenyľů pomocí plynového chromatografu s detektorem elektronového záchyty (GC-ECD) a provést základní optimalizaci této metody
- provést základní validaci celé analytické procedury
- provést testování vypracované analytické procedury na reálných vzorcích vod a její následné hodnocení

Obsah

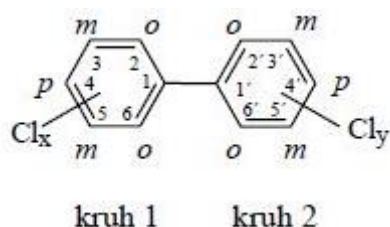
1	Teoretická část.....	1
1.1	Polychlorované bifenyly.....	1
1.1.1	Fyzikálně-chemické vlastnosti	1
1.1.2	Výroba a použití	2
1.1.3	Výskyt v životním prostředí.....	3
1.1.4	Toxicita.....	4
1.1.5	Dopady na lidské zdraví	4
1.1.6	Likvidace	5
1.2	Plynová chromatografie.....	6
1.2.1	Nosný plyn	7
1.2.2	Regulační systém.....	7
1.2.3	Dávkovací zařízení	7
1.2.4	Kolona	8
1.2.5	Detektor	8
1.2.6	Termostat.....	9
1.3	Extrakce kapalina-kapalina (LLE).....	10
1.4	Porovnání analytických metod	11
2	Materiál a metody.....	13
2.1	Použité chemikálie a činidla	13
2.2	Instrumentální vybavení a spotřební materiál	13
2.3	Příprava roztoků a standardů	14
2.3.1	Příprava zásobních roztoků	14
2.3.2	Příprava pracovních roztoků	14
2.3.3	Příprava kalibračních roztoků	15
2.3.4	Příprava vzorků vod	15
3	Výsledky a diskuse.....	17
3.1	Optimalizace chromatografické separace	17

3.1.1	Testovací analýza	17
3.1.2	Optimalizace teploty injektoru	18
3.1.3	Optimalizace počáteční teploty kolony	19
3.1.4	Optimalizace průtoku plynu	20
3.1.5	Optimalizace splitless periody	21
3.1.6	Optimalizace teplotního gradientu	22
3.1.7	Optimalizace objemu nástřiku.....	23
3.1.8	Optimalizace teploty detektoru	24
3.1.9	Optimalizace chromatografické separace a detekce - souhrn	25
3.2	Optimalizace extrakce	26
3.2.1	Optimalizace doby extrakce	26
3.2.2	Volba vhodného vnitřního standardu	27
3.3	Validace metody	28
3.3.1	Linearita	28
3.3.2	Správnost a přesnost.....	30
3.3.3	Rozsah	31
3.3.4	Mez detekce a mez stanovitelnosti.....	32
3.4	Testování metody na reálném vzorku vody.....	33
4	Závěr.....	35
5	Seznam použité literatury	36
6	Seznam zkratk a symbolů.....	39

1 Teoretická část

1.1 Polychlorované bifenyly

Polychlorované bifenyly jsou průmyslově vyráběné toxické, organické sloučeniny, které jsou směsí bifenylových molekul, na kterých může být vázáno 1 až 10 atomů chloru. Podle počtu atomů chloru v molekule a jejich vzájemné polohy, je možné rozlišit až 209 sloučenin (tzv. kongenerů) (1). Dle IUPAC jsou jednotlivým kongenerům podle rostoucích číselných indexů přiřazena čísla od 1 do 209. Sumární vzorec těchto látek lze zapsat $C_{12}H_{10-(x+y)}Cl_{(x+y)}$, kde $(x+y) = 1$ až 10, x = počet atomů Cl v kruhu 1, y = počet atomů Cl v kruhu 2. Strukturální vzorec PCB je znázorněn na Obr. 1 (2).



Obr. 1: Obecná struktura polychlorovaných bifenyly (2).

1.1.1 Fyzikálně-chemické vlastnosti

Vlastnosti jednotlivých kongenerů se liší podle stupně chlorace. PCB jsou bez zápachu, průzračné nebo žlutě zbarvené, olejovité až amorfní, netěkavé kapaliny o teplotě varu 340 až 385 °C (3). Tato teplota vzrůstá se stoupajícím počtem atomů chloru v molekule. PCB jsou chemicky, teplotně a biologicky velmi stabilní, nehořlavé a prakticky nerozpustné ve vodě, ale naopak dobře rozpustné v organických rozpouštědlech a tucích. Jejich rozpustnost naopak klesá se stoupajícím počtem atomů chloru v molekule (4). Tyto látky mají vysoký elektrický odpor a jsou velmi odolné vůči vzplanutí, k hoření dochází až při teplotách nad 1000 °C. Díky těmto rozmanitým vlastnostem byly PCB široce využívány (1).

Vzhledem k vysoké perzistenci PCB však dochází k jejich akumulaci v životním prostředí, což činí tyto toxické látky velice nebezpečnými, zejména pro vodní ekosystémy (5). V potravních řetězcích přecházejí z jednoho organismu do druhého téměř beze změny. Proto, v důsledku akumulace, se nejvyšší koncentrace PCB vyskytují u vrcholových predátorů. Nejvyšší akumulace vykazují PCB s 5-7 atomy chloru, neboť

deriváty s počtem atomů chloru nižším než 4 podléhají mikrobiálnímu rozkladu (1). Výše chlorované jsou naopak vůči odbourávání rezistentní a v organismech se nemetabolizují. Nejohroženější skupinou organismů jsou mořští savci, u kterých dochází k narušení reprodukční schopnosti, ale PCB jsou toxické i pro ostatní raná vývojová stadia vodních organismů (6).

1.1.2 Výroba a použití

Polychlorované bifenyly se vyráběly přímou chlorací bifenyly, který je možno získat zahříváním benzenu při 800 °C. Chlorace se provádí při 110 °C za katalýzy železnými hoblinami nebo chloridem železitým. Po skončení chlorace se přítomný chlorovodík vypudí větráním. Adiční sloučeniny se odstraňují zahříváním s jednoprocenním hydroxidem sodným při teplotě 140 °C. V závěru probíhá destilace za vakua. Při výrobě vzniká směs chlorovaných sloučenin, proto se produkt ještě čistí rafinací (1; 4).

Průmyslová výroba PCB začala v roce 1929 v USA, odkud se rozšířila do celého světa pod obchodními názvy např. AROCLOR (Monsanto, USA a VB), KANECLOR (Kanegafuchi, Japonsko), CLOPHEN (Bayer, SRN) nebo DELOR (Chemko Strážské, ČSSR). Hlavní producenti, začátek a konec výroby a vyrobené množství PCB jsou zaznamenány v Tab. 1 (3; 7).

Tab. 1: Světoví producenti polychlorovaných bifenyly (8).

Producenti	Stát	Začátek výroby	Konec výroby	Vyrobené množství [t]
Monsanto	USA	1930	1977	640 000
Bayer AG	Německo	1930	1983	160 000
Orgsteklo	Rusko	1939	1990	142 000
Prodelec	Francie	1930	1984	130 000
Monsanto	Velká Británie	1954	1977	66 000
Kanegafuchi	Japonsko	1954	1972	56 000
Chemko Strážské	Československo	1959	1984	21 400

Do roku 1968, než nastala průmyslová nehoda v Japonsku, byly polychlorované bifenyly považovány za relativně neškodné látky. Při této nehodě se PCB dostaly do potravinářského oleje během jeho zpracování, což bylo způsobeno netěsností teplosměnného systému, v němž byly PCB používány jako přenašeč tepla. Po této nehodě byla výroba

a použití PCB zakázána v Japonsku a postupně i v dalších zemích (9). Zvýšené koncentrace v místech zamoření, nebo v místech špatného uskladnění, mohou mít závažný, nepříznivý účinek na životní prostředí a lidské zdraví (5).

Polychlorované bifenyly jsou v současné době zakázané a nevyrábějí se. V minulosti byly PCB hojně využívány ve strojírenském a chemickém průmyslu jako teplotně odolná média v průmyslových zařízeních, která vyžadovala ohřev na vysoké teploty. Dále pak byly využívány jako chladicí oleje v transformátorech napětí, kondenzátorech a dalších elektrických zařízeních, kde se uplatňují jejich výborné izolační vlastnosti a stabilita (2; 6). Kromě použití v uzavřených systémech však byly PCB používány i jako spotřební materiály, jako plastifikátory polymerů, přísady do barev, nátěrových hmot a tiskařských barev, jako součást prostředků na ochranu rostlin a mnoho dalších (5).

1.1.3 Výskyt v životním prostředí

Polychlorované bifenyly patří mezi syntetické antropogenní polutanty. Mono-, di- a trichlorované bifenyly degradují poměrně rychle, zatímco výšechlorované jsou vůči biodegradaci rezistentní a mohou být rozkládány pouze anaerobně. Rychlost degradace je ovlivňována nejen stupněm chlorace, ale i polohou chloru. Proto molekuly s atomy chloru v *para* pozici jsou biodegradovány snáze (6; 7).

Za dobu co se PCB používaly, pronikly tisíce tun těchto látek do životního prostředí. Emise pocházejí z používání výrobků a z odpadů s obsahem PCB. Malé množství těchto látek se může nacházet v mnoha halogenovaných sloučeninách. Dalším zdrojem emisí jsou kaly z odpadních vod, nelegální nakládání s odpady z výrobků obsahujících PCB, spalování průmyslových i komunálních odpadů a úniky ze zařízení, která používají PCB. Nejdůležitějším zdrojem je však redistribuce již dříve uvolněných PCB. Velké množství se také uvolňuje při přehřátí nebo explozi transformátorů a kondenzátorů, při průmyslových procesech v elektrárnách a při zpracování železa a oceli. Bylo zavedeno sledování tzv. indikátorových kongenerů (PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180), nacházejících se v technických směsích ve vysokých koncentracích, které se vyznačují střední až vysokou perzistencí. Používání PCB je regulováno, proto jsou nové úniky do prostředí ve srovnání s minulostí minimální (6).

Ve vodě a v půdě může docházet k velmi pomalé biodegradaci. Ve vodě se PCB sorbují na sedimenty a organickou hmotu. Důkazem toho je jejich podstatně vyšší koncentrace v sedimentech než v okolní vodě (2; 6). Jelikož mohou sedimenty sloužit jako zásobníky PCB, jsou vodní ekosystémy těmito látkami ohroženy nejvíce. Ve vodním

prostředí je jediným abiotickým degradačním procesem fotolýza (6). Transport PCB z půdy do vyšších rostlin je nízký, neboť množství PCB v biomase hospodářsky důležitých i planě rostoucích druhů je nepatrné (1).

Stopy PCB byly zjištěny na všech místech světa v půdě, povrchové a spodní vodě, rybách i mateřském mléce (5). Dokonce byly nalezeny i v polárních oblastech ve sněhu a v tuku ledních medvědů, což svědčí o skutečně globálním znečištění (1; 5).

1.1.4 Toxicita

Stejně jako DDT a jeho analogy patří PCB k lipofilním látkám. Ukládají se v tukových tkáních nebo v částech tkání bohatých na tuk. U vyšších organismů v játrech, nervové tkáni, mozku a tukových složkách svalů, u planktonu v jeho lipidické části (1). Z tělesných tuků se PCB vylučují jen velmi pomalu, proto k otravě může dojít po dlouhodobé expozici nízkým dávkám. Vykazují vysokou schopnost kumulace v sedimentech dna a ve vodních organismech, u nichž je akumulací koeficient 10^3 - 10^5 (10).

Studie prokázaly, že PCB se řadí mezi látky s nízkou akutní toxicitou. Při chronické otravě, která se projevuje již po dlouhodobém vdechování koncentrací menších než 1 mg/m^3 , způsobují ekzém, dermatitidy, jsou neurotoxické, hepatotoxické a patří mezi podezřelé karcinogeny (5). PCB s nízkým počtem atomů chloru mají nižší karcinogenní účinky, než kongenery s vysokým počtem navázaných atomů chloru. Při interakci s prokázaným karcinogenem mohou zvyšovat jeho negativní působení, např. u mykotoxinů (1; 10).

Substituce v poloze *ortho* zvyšuje toxicitu, proto kongenery, které neobsahují chlor v této poloze a mohou tedy vytvořit planární uspořádání, jsou lépe redukovány než *ortho*-substituované izomery (3; 11).

1.1.5 Dopady na lidské zdraví

Do těla mohou polychlorované bifenily vstupovat inhalačně, ale zejména orálně, tedy kontaminovanou potravou (6). Největší nárůst ve zvyšování koncentrace těchto látek nastává hned v prvním článku potravního řetězce, ve stupni voda – plankton, kde jsou 10^3 až 10^4 násobné koncentrace PCB v biomase řas ve srovnání s okolní vodou (1).

Při koncentraci 1 mg/m^3 vzduchu a vyšších, se PCB vstřebávají i neporušenou pokožkou a dostávají se lymfatickým a krevním oběhem do mízních uzlin a sleziny.

Mění metabolismus jiných cizorodých látek i steroidů v organismu, dochází ke zvětšení sleziny a způsobují imunopresi – všeobecné snížení obranyschopnosti organismu (1).

Koncentrace těchto látek v jednotlivých orgánech závisí na obsahu tuku. Výjimkou je mozek, který obsahuje méně PCB než by odpovídalo obsahu tuku v něm (6). Perzistence jednotlivých kongenerů se v orgánech opět liší, ovšem vyšší stálost nemusí vždy znamenat vyšší toxicitu. Ke zvýšení toxicity PCB mohou přispět stopy dibenzofuranů a dioxinů. Rozdíly v jejich toxicitě mohou být také způsobeny vznikem specifických meziproduktů a metabolitů (1; 6).

U savců při koncentraci PCB větší než 50 mg/kg tuku došlo ke změnám na kůži, imunopresi, poruchám reprodukce, zvětšení štítné žlázy a ojediněle k nádorům hladké svaloviny. Chronická subletální toxicita polychlorovaných bifenylnů ovlivňuje také růst a reprodukci zvířat ve všech stupních potravního řetězce. Tyto látky lze, díky průchodu PCB bariérou krev-mozek, detekovat v mozku jak dospělých jedinců, tak i právě narozených mláďat. U zvířat bylo opakovaně dokázáno, že vysoké dávky PCB v potravě mají souvislost s rakovinou tlustého střeva (1; 2).

V České republice platí pro koncentrace PCB v ovzduší pracovišť tyto limity: PEL – 0,5 mg/m³ a NPK-P – 1 mg/m³ (6).

1.1.6 Likvidace

Problémem při likvidaci polychlorovaných bifenylnů je jejich spalování, kdy při teplotách pod 1200 °C z nich vznikají polychlorované dibenzodioxiny, polychlorované dibenzofurany a jejich deriváty, které jsou ještě mnohem toxičtější než původní látky (4; 6). Tyto látky vznikají také například při spalování netříděného odpadu, kdy chlor ze spalovaných plastů (PVC) reaguje s fenoly pocházejícími z papíru a ze dřeva (1). Likvidace PCB je proto spojena s nutností využívání zcela speciálních technologických postupů, kterými jsou spalování v martinských nebo cementárenských pecích, v nichž se jedy váží na alkálie a nepronikají tak do ovzduší (1; 6).

1.2 Plynová chromatografie

Chromatografie je separační technika, která využívá dělení složek mezi dvěma fázemi, z nichž jedna je mobilní a druhá stacionární. Plynová chromatografie má své označení dle skupenství mobilní fáze, kterou je plyn (12).

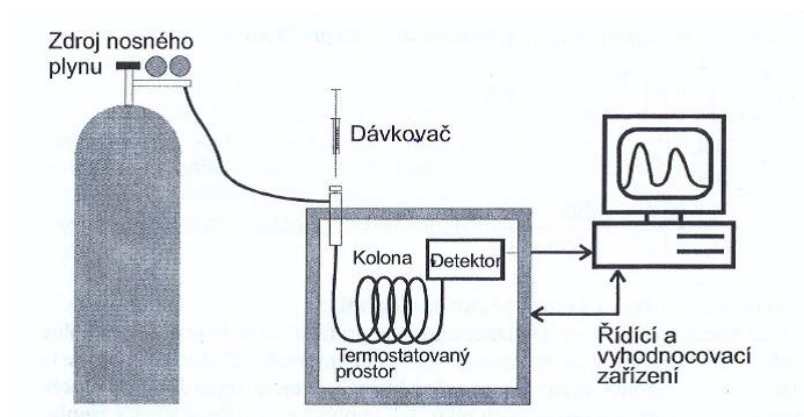
Vzorek, kterým může být plyn nebo kapalina, je vstřikován do proudu inertní, plynné mobilní fáze, která je často nazývána jako nosný plyn (13). Při chromatografii kapalných vzorků se volí taková teplota, aby molekuly dělených složek byly v podobě par (14).

Mobilní fáze unáší vzorek prostorem, ve kterém dochází k separaci. Stacionární fáze představuje nepohybující se náplň separačního prostoru. Při průchodu vzorku separačním prostorem dochází k jeho opakované interakci se stacionární fází a ustavování rozdělovacích rovnováh mezi stacionární a mobilní fází. Přitom se chromatografický systém natolik přiblíží rovnováze, že distribuci složky mezi dvě fáze lze popsat distribuční konstantou. Distribuční (rozdělovací) konstanta složky A je poměr rovnovážných koncentrací složky v obou fázích, přičemž v čitateli se uvádí koncentrace složky ve fázi stacionární:

$$K_D = \frac{[A]_s}{[A]_m}$$

S rostoucí hodnotou K_D bude látka více zadržována stacionární fází, bude se pomaleji pohybovat separačním prostorem a později tento prostor opustí. Interakce složky a chromatografických fází jsou určujícím faktorem pro rychlost migrace složky v chromatografickém systému. Rozdíly v rychlostech migrace potom umožňují rozdělení složek. Pomocí chromatografických technik je možno získat kvalitativní i kvantitativní informace o jednotlivých složkách směsi (15).

Množství rozdělených složek je zaznamenáno detektorem jako funkce času nebo objemu proteklého nosného plynu (14). Jednotlivé části plynového chromatografu jsou znázorněny na Obr. 2.



Obr. 2: Schéma plynového chromatografu (16).

Tlaková nádoba slouží jako zásobník nosného plynu, který je přes redukční ventil veden do dávkovače, chromatografické kolony a detektoru. Dávkovač, kolona a detektor jsou umístěny v termostatovaném prostoru, umožňujícím individuální nastavení teplot jednotlivých částí. Celé zařízení je doplněno regulačními prvky pro zajištění konstantního průtoku a tlaku nosného plynu kolonou a počítačem pro zpracování signálu z detektoru a řízení průběhu analýzy (16).

1.2.1 Nosný plyn

Zdrojem nosného plynu jsou tlakové lahve s vodíkem, dusíkem, heliem nebo argonem, které mají tu výhodu, že jsou inertní vůči vzorku i stacionární fázi. Volba nosného plynu je většinou určena druhem kolony a detektoru (13). Kromě nosného plynu vyžadují některé detektory další zdroje plynu (17).

1.2.2 Regulační systém

Regulační systém zajišťuje stálý nebo programově se měnící průtok nosného plynu, který se reguluje jemnými jehlovými ventily (18; 19).

1.2.3 Dávkovací zařízení

Nástřik vzorku se provádí mikrostríkačkou přes těsnění ze silikonové gumy (septum), uzavírající vnitřní prostor dávkovače (16). Dávkované objemy se pohybují řádově v jednotkách mikrolitrů. Kapalně vzorky je nutné okamžitě zplynit, aby byly do kolony transportovány již v podobě par, a bylo dosaženo co nejvyšší reprodukovatelnosti. U kapilárních kolon se používá tzv. dělič (splitter), který odvede nadbytečné množství vzorku mimo kolonu (14). Aby se kapalně vzorky rychle odpařily, je ideální, když je dávkovač vyhříván na teplotu alespoň o 50 °C vyšší, než je teplota varu nejméně těkavé složky vzorku. Nakonec jsou páry vzorku unášeny nosným plynem do kolony umístěné v termostatu (16).

Moderní přístroje jsou již vybaveny zařízením pro automatické dávkování (autosampler) vzorku, které je vhodné pro sériové analýzy a navíc zvyšuje produktivitu práce (14).

1.2.4 Kolona

V plynové chromatografii se používají náplňové nebo kapilární kolony. Typ kolony ovlivňuje objem dávkovaného vzorku, počet analytů, které mohou být snadno odděleny, dobu potřebnou pro separaci a účinnost separace (13).

Náplňové kolony jsou spirálovité trubice ze skla, nerezové oceli, mědi nebo hliníku o vnitřním průměru 2 až 5 mm a délce 2 až 6 m (13). Trubice obsahují částice stacionární fáze ve formě adsorbentu (GSC) nebo nosiče se zakotvenou kapalnou fází (GLC) (17).

Kapilární kolony jsou nejčastěji vyrobeny z křemenného skla o vnitřním průměru 50 – 350 μm a délkou až 100 m, potažené vrstvou polymeru (polyimidu) pro zvýšení mechanické odolnosti. Vnitřní stěnu mají pokrytou tenkým filmem zakotvené netěkavé kapaliny, sloužící jako stacionární fáze (16). Obecně platí, že rostle-li vnitřní průměr a tloušťka stacionární fáze, účinnost separace se snižuje (18). Výhodou kapilárních kolon, oproti náplňovým, je jejich podstatně vyšší separační účinnost (20).

Kapilární kolony lze rozdělit do tří skupin podle způsobu umístění stacionární fáze. Kolony s kapalinou (tenká vrstva stacionární fáze) zakotvenou na vnitřních stěnách kapilární trubice nesou označení WCOT. Kolony s kapalinou zakotvenou na nosiči, který je zachycený na stěnách kapiláry, se nazývají SCOT. A posledním druhem kolon je typ PLOT s pórovitým adsorbentem zachyceným na stěnách kapiláry (15).

Selektivita v plynové chromatografii je ovlivněna volbou stacionární fáze. Stacionární fázi volíme podle charakteru vzorku a podle rozsahu teplot varu. Obecně platí, že zvolená stacionární fáze má mít podobnou polaritu jako analyzovaný vzorek (13). Existují stovky stacionárních fází, ale pouze pět až deset fází se řadí mezi nejpoužívanější. Mezi nejběžnější stacionární fáze patří polysiloxany, skvalan s nejmenší polaritou a polyethylenglykol, který je silně polární stacionární fází (19).

1.2.5 Detektor

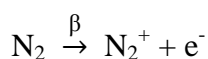
Látky, které opouštějí kolonu, vstupují společně s nosným plynem do detektoru, jehož úkolem je poskytovat rozdílné signály při průchodu samotného nosného plynu (nulový) a při průchodu nosného plynu obsahujícího analyt. Fyzikálně chemická vlastnost analytu je převáděna na měřitelný, zpravidla elektrický signál, který je zaznamenáván v závislosti na čase. Detektor musí mít vysokou citlivost, dobrou stabilitu signálu a jeho odezva by měla být lineární funkcí obsahu analytu (12; 19).

Tepelně vodivostní detektor (TCD) je univerzální, ale málo citlivý detektor. Nosný plyn proudí přes vlákno, které je zahříváno na určitou teplotu průchodem konstantního

elektrického proudu a ochlazuje ho na určitou teplotu (18). Eluovaná látka mění tepelnou vodivost nosného plynu, tím dojde ke změně teploty vlákna i jeho elektrické vodivosti (20).

Plamenově ionizační detektor (FID) patří mezi nejčastěji používané detektory. Princip spočívá v měření změny ionizačního proudu vodíkovo-vzduchového plamene, která je způsobena přítomností eluovaného analytu (12). Podstatnou část detektoru tvoří hořáček, v němž je spalována směs nosného plynu z kolony a vodíku, který je k nosnému plynu přimíchán před vstupem do hořáčku. Ionty a elektrony, vzniklé spálením eluovaných složek ze vzorku, zvýší elektrický tok mezi hořáčkem a sběrnou elektrodou, která je umístěna nad ústím hořáčku. Jako pomocný plyn se do spodní části detektoru přivádí vzduch (12; 17). FID však není univerzálním detektorem, odezvu nedává většina anorganických plynů a par a některé organické látky, např. HCOOH nebo CCl₄ (20).

Detektor elektronového záchytu (ECD) je selektivní ionizační detektor, citlivý na elektronegativní atomy, zejména halogeny (17). Z nosného plynu, ionizovaného β zářičem ⁶³Ni, vznikají kationty a pomalé elektrony:



Pokud detektorem protéká pouze nosný plyn, přenáší se migrací nabitých částic mezi elektrodami elektrický náboj úměrný proudu. Jestliže nosný plyn obsahuje látky s elektronegativními vlastnostmi, pomalé elektrony se zachytí za vzniku aniontů a dojde k poklesu elektrického proudu (15). Ačkoli je detekční limit ECD výborný (1-2 ng/l) (21), jeho lineární rozsah je maximálně jen dva řády (13).

Hmotnostní spektrometr (MS) je nejčastěji používán v kombinaci s plynovou chromatografií (GC-MS) při analýze komplexních matric (12). Ionty jsou zpravidla analyzovány kvadrupólovým analyzátozem nebo iontovou pastí. Analyt lze identifikovat porovnáním jeho hmotnostního spektra s knihovnou spekter sloučenin (18).

1.2.6 Termostat

Termostat udržuje dostatečně vysokou teplotu v dávkovacím zařízení, koloně a detektoru, aby byl vzorek stále v plynném stavu (18). Jelikož teplota těchto tří částí různě ovlivňuje chromatografickou analýzu, termostatování těchto prostorů probíhá odděleně a většinou na rozdílnou teplotu, která odpovídá jejich optimální funkci (17). Teplota kolony, která může být buď konstantní, nebo se programově měnit, je zásadní pro dosažení dobré separace (13).

1.3 Extrakce kapalina-kapalina (LLE)

Extrakce je dělicí metoda, při níž se využívá rozdílné rozpustnosti jednotlivých složek vzorku v různých rozpouštědlech. Podle způsobu provedení je rozeznávána *extrakce tuhou fází* a *extrakce kapalinou* (14).

Při extrakci PCB ze vzorků vod se téměř výhradně využívá jedné z technik extrakce kapalinou, a to extrakce z kapaliny do kapaliny. Tato technika umožňuje mnoho jednoduchých, rychlých a selektivních dělení různých druhů látek v širokém rozmezí koncentrací. Daná složka se rozděluje mezi dvě prakticky nemísitelné kapalně fáze. Jednou z nich je vodný roztok, druhou organické rozpouštědlo nemísitelné (nebo omezeně mísitelné) s vodou, či roztok určité sloučeniny v tomto rozpouštědle. Extrakce se řídí Nernstovým rozdělovacím zákonem, který říká, že poměr aktivit (koncentrací) extrahované složky v obou fázích je v rovnováze konstantní. Tento poměr, který charakterizuje danou látku při určité teplotě a tlaku, se nazývá rozdělovací konstanta K_D (12; 14).

Do organické fáze (tedy přes fázové rozhraní) mohou přejít pouze elektroneutrální složky. Většina organických sloučenin (kromě protolytů) je ve vodném roztoku přítomna v neionizované formě. Vodný roztok organické látky stačí protřepat s organickým rozpouštědlem, v němž se lépe rozpouští než ve vodě a většina organické látky se tak převede do organické fáze. Výběr vhodného organického rozpouštědla se řídí povahou složky, která má být izolována. Orientačně lze použít *Liebigova pravidla*: Podobné se rozpouští v podobném (14).

Anorganické sloučeniny (pokud nemají kovalentní charakter), jsou ve vodě disociovány na ionty, které do organické fáze nepřecházejí. Je tedy nutné příslušný iont nejprve přeměnit na elektroneutrální částici buď tvorbou chelátu, nebo iontového asociátu, které jsou dobře extrahovatelné (20).

1.4 Porovnání analytických metod

Stanovením polychlorovaných bifenyľů ve vodě se zabývalo již mnoho studií, v rámci nichž bylo zkoumáno mnoho různých způsobů příprav vzorků k analýze i analytických metod. Následující tabulka shrnuje různé techniky s detekčními limity, kterých bylo dosaženo ve vybraných pracích. V experimentální části budou tyto hodnoty porovnány s výsledky mé práce.

Tab. 2: Přehled detekčních limitů u stanovovaných kongenerů PCB pro různé analytické techniky.

Analyt	Extrakční technika	Detekční technika	Mez detekce [ng/l]	Citace
PCB 28	DLLME-SFO	GC-ECD	4,32	(22)
PCB 52			5,44	
PCB 101			4,08	
PCB 138			3,75	
PCB 153			4,18	
PCB 180			3,33	
PCB 28	SPME	GC-MS	100	(23)
PCB 138			110	
PCB 153			110	
PCB 180			80	
PCB 28	MSPE	GC-MS/MS	0,11	(24)
PCB 52			0,15	
PCB 101			0,12	
PCB 138			0,13	
PCB 153			0,13	
PCB 180			0,32	
PCB 28	dSPE	GC-MS/MS	0,04	(25)
PCB 52			0,04	
PCB 101			0,06	
PCB 153			0,09	
PCB 28	SBSE-TD	GC-MS	6,0	(26)
PCB 52			5,0	
PCB 138			5,0	
PCB 153			5,0	
PCB 180			15,0	

Nejnižších detekčních limitů pro všechny analyty bylo dosaženo v práci (25), kde bylo využito techniky dSPE a plynové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí. V práci (26) bylo dosaženo až 22x nižších LOD v porovnání s prací (23), kde bylo využito standardní techniky GC-MS. V práci (23), kde bylo využito techniky SPME

v kombinaci s GC-MS, bylo docíleno až 2500x vyšších LOD v porovnání s ostatními pracemi. V práci (22), kde bylo využito techniky DLLME-SFO a GC-ECD bylo s výjimkou PCB 180 dosaženo srovnatelných hodnot jako v práci (26).

Tab. 3: Přehled výtěžností a RSD v jednotlivých pracích.

Citace	Objem vzorku	Koncentrační úroveň	Výtěžnost	RSD
	[ml]	[ng/l]	[%]	[%]
(22)	5	100	79,4 - 112,2	8,5 - 8,08
		1000		
(23)	30	400	neuvedeno	8 - 14
(24)	100	10	94 - 108	3 - 6
		20		
		50		
(25)	200	5	84,9 - 101,0	3,0 - 5,7
		50		
(26)	10	100	47,6 - 83,4	2,7 - 4,2
	100			

Nejvyšší výtěžnosti (112,2 %) bylo dosaženo v práci (22), kde bylo využito techniky DLLME-SFO a GC-ECD.

V práci (26), kde bylo využito techniky SBSE-TD a GC-MS, bylo dosaženo nejnižší hodnoty výtěžnosti i nejnižší hodnoty RSD v porovnání s ostatními pracemi.

V práci (24) bylo při polovičním objemu vzorku dosaženo srovnatelných hodnot RSD jako v práci (25).

2 Materiál a metody

2.1 Použité chemikálie a činidla

- Standardy PCB: PCB-Mix 1 - Lot: 30618IO, 10 ng/μl in iso-Octane (Dr. Ehrensrorfer)

Tab. 4: Přehled studovaných kongenerů PCB.

Zkratka	Název analytu	Číslo CAS
PCB 28	2,4,4'-trichlorbifenyl	7012-37-5
PCB 52	2,2',5,5'-tetrachlorbifenyl	35693-99-3
PCB 101	2,2',4,5,5'-pentachlorbifenyl	37680-73-2
PCB 138	2,2',3,4,5,5'-hexachlorbifenyl	35065-28-2
PCB 153	2,2',4,4',5,5'-hexachlorbifenyl	35065-27-1
PCB 180	2,2',3,4,4',5,5'-heptachlorbifenyl	35065-29-3

- Vnitřní standardy:
 - 2,4,5,6-tetrachloro-m-xylene - čist. 99,0 %, Lot: 21107 (Dr. Ehrensrorfer)
 - PCB No.209 - Lot: 40512IO, 10 ng/μl in iso-Octane (Dr. Ehrensrorfer)
- Aceton - čist. p.a. (Penta)
- n-hexan - čist. SupraSolv (Merck)
- n-heptan - čist. SupraSolv (Merck)
- Dusík - čist. 99,99 % obj. (Linde)

2.2 Instrumentální vybavení a spotřební materiál

- Plynový chromatograf: Trace 1310 (Thermo)
- Chromatografická kolona: TR-5MS; fáze: phenylpolysilphenylene-siloxane, délka: 30 m; vnitřní průměr: 0,25 mm, tloušťka filmu 0,25 μm (Thermo)
- Detektor elektronového záchytu: ECD Trace 1300 Series GC (Thermo)
- Analytické váhy: PI 2002 (Denver Instrument)
- Třepačka: Orbit 1000 (Labnet)
- Odměrné sklo třídy přesnosti A (Fisherbrand)
- Skleněné dávkovací mikrostríkačky o objemu 25, 50, 100, 250 a 500 μl (Hamilton)

- Automatická nastavitelná pipeta 100-1000 µl: M1000 (Biohit)
- Ovládání GC-ECD systému a vyhodnocování naměřených dat bylo provedeno pomocí programu Chromeleon 7.2.1.5537. Zpracování výsledků bylo prováděno v programu MS Office Excel 2015 a v programu EffiValidation 3.0.

2.3 Příprava roztoků a standardů

2.3.1 Příprava zásobních roztoků

Zásobní roztok vnitřního standardu TCMX (PCB-IS-TCMX-A) byl připraven navážením 14,13 mg látky do 10 ml odměrné baňky, rozpuštěním a doplněním heptanem po rysku. Zásobní roztok byl uchováván v chladničce při 5 °C po dobu nejdéle 6 měsíců.

Zásobní roztok vnitřního standardu PCB 209 byl dodán komerčně ve formě standardního roztoku PCB No. 209 o koncentraci 10 ng/µl (PCB-IS-PCB209-A). Objem zásobního roztoku činil 10 ml a jako rozpouštědlo byl použit isooktan. Zásobní roztok byl uchováván v chladničce při 5 °C do data expirace (květen 2017).

Zásobní roztok 6 studovaných kongenerů byl dodán komerčně ve formě směsného standardního roztoku PCB-Mix 1 o koncentraci jednotlivých kongenerů 10 ng/µl (PCB-ST-A). Objem zásobního roztoku činil 10 ml a jako rozpouštědlo byl použit isooktan. Zásobní roztok byl uchováván v chladničce při 5 °C do data expirace (červen 2018).

2.3.2 Příprava pracovních roztoků

Pracovní roztok vnitřního standardu TCMX (PCB-IS-TCMX-B) o koncentraci 10 mg/l byl připraven pipetováním 71,48 µl PCB-IS-TCMX-A do 10 ml odměrné baňky a doplněním heptanem po rysku. Další pracovní roztok (PCB-IS-TCMX-C) o koncentraci 250 µg/l byl připraven pipetováním 625 µl PCB-IS-TCMX-B do 25 ml odměrné baňky a doplněním acetonem po rysku.

Pracovní roztok směsného vnitřního standardu (PCB-IS-C) o koncentraci 100 µg/l byl připraven pipetováním 500 µl PCB-IS-TCMX-B a 500 µl PCB-IS-PCB209-A do 50 ml odměrné baňky a doplněním acetonem po rysku.

Pracovní roztok standardu PCB MIX1 (PCB-ST-B) o koncentraci 20 µg/l byl připraven pipetováním 50 µl zásobního roztoku PCB-ST-A do 25 ml odměrné baňky a doplněním acetonem po rysku.

Všechny pracovní roztoky byly uchovávány v chladničce při 5 °C po dobu nejdéle 6 měsíců.

2.3.3 Příprava kalibračních roztoků

Kalibrační roztoky byly připraveny dle Tab. 5. do vialek o objemu 1,8 ml. Hexan byl dávkován automatickou pipetou (100 – 1000 µl) s plastovou špičkou, roztok vnitřního standardu PCB-IS-C byl dávkován stříkačkou Hamilton (100 µl) a roztok standardu PCB-ST-C byl dávkován sadou stříkaček Hamilton (5, 10, 25, 50, 100, 250 a 500 µl). Každá koncentrační úroveň byla připravena vždy ve třech nezávislých opakováních a analýza kalibračního roztoku byla provedena vždy v den přípravy.

Za účelem kontroly čistoty hexanu, vnitřního standardu PCB-IS-C, vialek, použitých špiček pipety, stříkaček Hamilton i GC-ECD systému byl připraven roztok 900 µl hexanu a 100 µl PCB-IS-C.

Tab. 5: Přehled kalibračních roztoků.

Označení roztoku	Koncentrace analytu	Objem PCB-ST-B	Objem PCB-IS-C	Objem hexanu
	[µg/l]	[µl]	[µl]	[µl]
K1	0,5	25	100	875
K2	0,75	37,5	100	862,5
K3	1	50	100	850
K4	2	100	100	800
K5	5	250	100	650

2.3.4 Příprava vzorků vod

Do skleněné láhve (1 l) se závitem a těsněním bylo naváženo přesně asi 900 g vzorku vody, 2 ml hexanu a 100 µl PCB-IS-C. V případě analýzy spikovaných vzorků byl do lahve přidán ještě roztok PCB-ST-B v množství, které odpovídalo dané koncentrační úrovni. Poté byla lahev uzavřena, vložena na třepačku, na níž byla provedena vlastní extrakce při frekvenci třepání 200 ot/min po dobu 60 minut. Lahev byla při extrakci vždy položena a zajištěna proti pohybu, aby byla při extrakci zajištěna dostatečná disperze kapiček hexanu ve vzorku vody, a aby nedošlo k rozbití lahve jejím nárazem o jinou lahev či třepačku. Po uplynutí doby extrakce byla lahev vyjmuta, postavena na laboratorní stůl a ponechána přibližně 15 minut bez pohybu. Po dostatečném oddělení organické fáze (horní vrstva) byla tato fáze převedena pomocí automatické pipety do vialky o objemu 1,8 ml a vialka byla uzavřena krimpovacím uzávěrem. Každý vzorek byl připraven vždy ve třech nezávislých opakováních a analýza vzorku byla provedena vždy v den přípravy.

Za účelem kontroly čistoty hexanu, vnitřního standardu PCB-IS-C, vialek, použitých špiček pipety, stříkaček Hamilton, skleněné láhve (1 l), GC-ECD systému i čistoty práce při přípravě vzorku, byl pro každou sérii měření (1 série = vzorky měřené v daný den) připraven slepý vzorek, který byl připraven navážením přesně asi 900 g vzorku minerální vody (Dobrá voda), 2 ml hexanu a 100 µl PCB-IS-C.

3 Výsledky a diskuse

3.1 Optimalizace chromatografické separace

3.1.1 Testovací analýza

Za účelem identifikace sloučenin byla provedena testovací analýza směsného roztoku standardů a vnitřních standardů. Byl použit směsný pracovní roztok v hexanu s koncentrací analytů 250 ng/ml. Píky byly identifikovány a byly jim přiřazeny hodnoty retenčních časů. Výchozí podmínky chromatografické separace, které byly zvoleny na základě kompromisu certifikátů standardů, jsou shrnuty níže.

Podmínky separace:

- Objem nástřiku: 1 μ l
- Teplota injektoru: 275 °C
- Průtok plynu: 1,5 ml/min (konstantní)
- Počáteční teplota: 60 °C (doba trvání 0,5 min)
- Teplotní gradient: 20 °C/min
- Konečná teplota: 300 °C (doba trvání 7,5 min)
- Teplota detektoru: 350 °C

3.1.2 Optimalizace teploty injektoru

Teplota injektoru byla testována při teplotách 200, 225, 250, 275 a 300 °C. Pro účely optimalizace byl použit směsný pracovní roztok v hexanu s koncentrací analytů 250 ng/ml. Cílem bylo dosáhnout takové teploty injektoru (minimálně o 50 °C vyšší, než je počáteční teplota kolony), při které dojde k okamžitému vypaření vzorku bez následné kondenzace a při které přejde co největší množství analytu z nástřikového prostoru na chromatografickou kolonu. Jako hodnotící kritéria byla využita plocha píku, faktor symetrie, rozlišení a počet teoretických pater.

Bylo zjištěno, že teplota injektoru nemá téměř vliv na separaci. Pro hodnocení parametrů byl vybrán ten analyt, který v tomto parametru dosahoval nejhorších hodnot. Další hodnocení vlivu teploty pro tento studovaný parametr byl proveden pro ten daný analyt. Výsledky měření jsou uvedeny v Tab. 6.

Faktor symetrie byl vypočten pomocí vztahu: $A_s = \frac{w_{1/20}}{2f}$

kde A_s je faktor symetrie, $w_{1/20}$ je šířka píku v jedné dvacetině jeho výšky a f je vzdálenost mezi kolmicí spuštěnou z vrcholu píku a vzestupnou částí píku v 1/20 jeho výšky.

Rozlišení bylo vypočteno pomocí vztahu: $R_{1,2} = 2 \cdot \frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{w_2 + w_1}$

kde R je rozlišení, t_R je retenční čas a w je šířka píku na úrovni základní linie.

Počet teoretických pater byl vypočten pomocí vztahu: $n = 5,54 \cdot \left(\frac{t_R}{w_{1/2}}\right)^2 = 16 \cdot \left(\frac{t_R}{w}\right)^2$

kde n je počet teoretických pater, t_R je retenční čas, $w_{1/2}$ je šířka píku v polovině jeho výšky a w je šířka píku na úrovni základní linie.

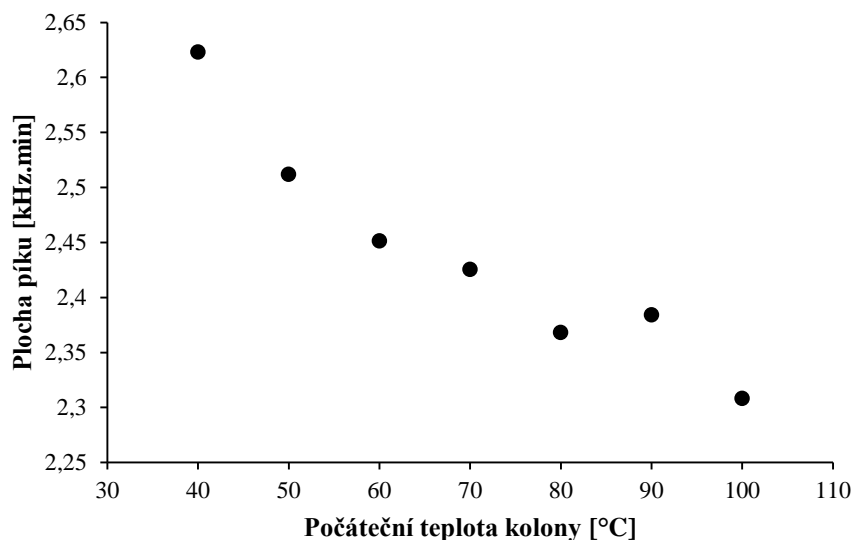
Tab. 6: Optimální teplota injektoru pro jednotlivá hodnotící kritéria.

Parametr		Kritický analyt	Nejhorší hodnota	Nejlepší hodnota	Optimální teplota
Název	Jednotky				[°C]
Plocha píku	[kHz.min]	PCB 52	2,37	2,38	250
Faktor symetrie	[1]	PCB 28	1,12	1,08	275
Rozlišení	[1]	PCB 138/153	8,38	8,46	275
Počet teor. pater	[1]	PCB 180	1486894	1547536	225

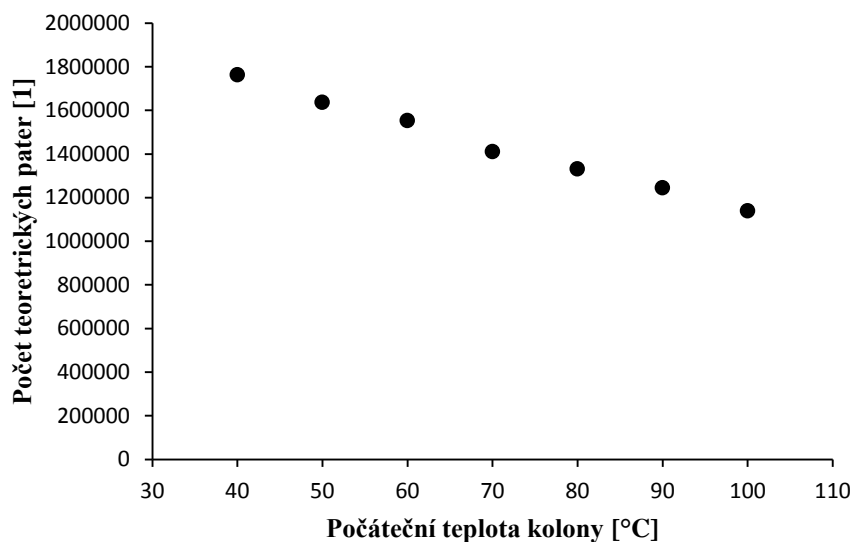
Rozdíly mezi nejhorší a nejlepší hodnotou hodnocených parametrů byly minimální. U dvou z těchto parametrů bylo nejlepších hodnot dosaženo při teplotě 275 °C. Pro další analýzy byla tedy zvolena teplota injektoru 275 °C.

3.1.3 Optimalizace počáteční teploty kolony

Počáteční teplota kolony byla zkoumána v rozmezí 40 - 100 °C. Pro účely optimalizace byl použit směsný pracovní roztok v hexanu s koncentrací analytů 250 ng/ml. Cílem bylo dosáhnout takové počáteční teploty kolony (obvykle o 25 – 30 °C nižší, než je teplota varu rozpouštědla), při které dojde k nejlepšímu zaostření zóny dávkovaného vzorku na začátku chromatografické kolony. Jako hodnotící kritéria byla použita plocha píku a počet teoretických pater. Výsledky měření jsou zaznamenány na Obr. 3 a Obr. 4.



Obr. 3: Graf závislosti plochy píku na počáteční teplotě kolony pro PCB 52.



Obr. 4: Počet teoretických pater v závislosti na počáteční teplotě kolony pro PCB 180.

Bylo zjištěno, že nejvyšších hodnot u hodnocených parametrů bylo dosaženo při teplotě kolony 40 °C. Tato teplota byla vybrána i pro další analýzy.

3.1.4 Optimalizace průtoku plynu

Průtok plynu byl zkoumán při průtoku 0,5; 1; 1,5; 2 a 2,5 ml/min. Při optimalizaci byl použit směsný pracovní roztok v hexanu s koncentrací analytů 250 ng/ml. Cílem bylo dosáhnout co nejkratší doby separace při dostatečné účinnosti separace. Jako hodnotící kritérium bylo využito rozlišení a počet teoretických pater. Výsledky měření jsou uvedeny v Tab. 7.

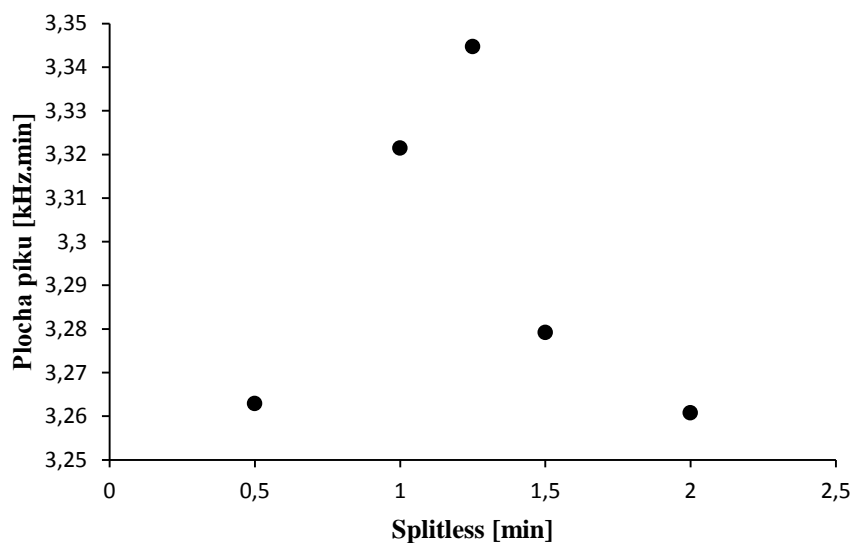
Tab. 7: Průtok plynu při nejvyšších hodnotách rozlišení a počtu teoretických pater.

	Průtok plynu [ml/min]					
	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 138	PCB 153	PCB 180
Nejvyšší rozlišení	1,5	1,5	1	1	1	1
Nejvyšší počet teor. pater	1	1	1	1,5	2	2

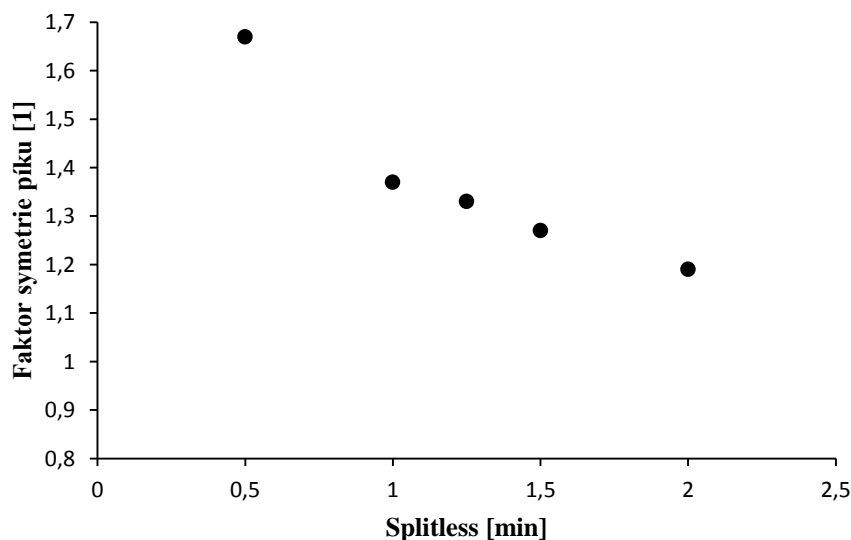
Bylo zjištěno, že optimálních hodnot průtoku nosného plynu bylo dosaženo v rozmezí 1 - 2 ml/min, a tak byla jako kompromisní hodnota zvolena hodnota 1,5 ml/min.

3.1.5 Optimalizace splitless periody

Splitless perioda (doba uzavření splitless ventilu) byla testována při periodě 0,5; 1; 1,25; 1,5 a 2 min. Pro účely optimalizace byl použit směsný pracovní roztok v hexanu s koncentrací analytů 250 ng/ml. Cílem bylo dosáhnout takové doby splitless periody (obvykle 0,5 – 2 min), při které přejde co největší množství analytu z nástřikového prostoru na chromatografickou kolonu při dostatečné symetrii píku. Jako hodnotící kritérium byla zvolena plocha píku a faktor symetrie píku. Hodnoty jsou uvedeny v grafech na Obr. 5 a Obr. 6.



Obr. 5: Graf závislosti plochy píku na splitless periodě pro PCB 52.

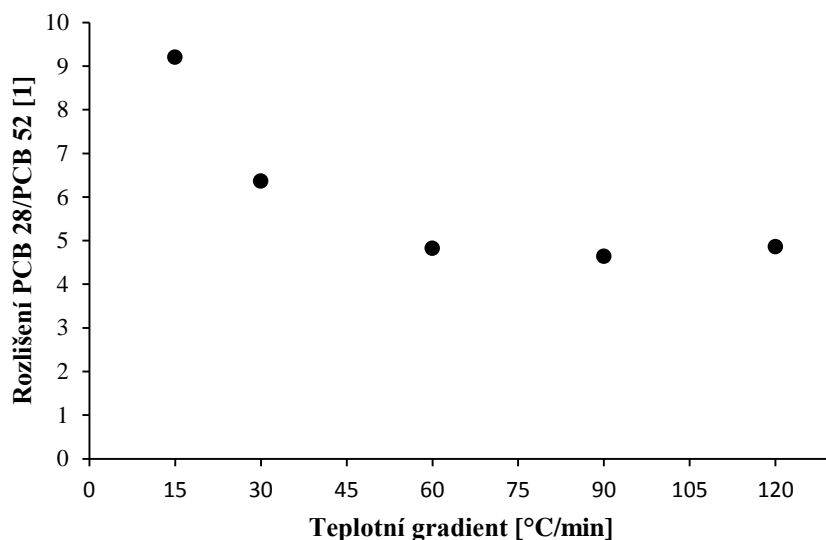


Obr. 6: Graf závislosti faktoru symetrie na splitless periodě pro PCB 153.

Nejlepších hodnot bylo dosaženo při splitless periodě 1,25 min a 2 min. Dle (27) byla pro další analýzy vybrána hodnota splitless periody 2 min.

3.1.6 Optimalizace teplotního gradientu

Teplotní gradient byl zkoumán při hodnotách 15, 30, 60, 90 a 120 °C/min. Pro účely optimalizace byl použit směsný pracovní roztok v hexanu s koncentrací analytů 250 ng/ml. Cílem bylo získat co nejkratší doby separace při dostatečné účinnosti a robustnosti separace. Jako hodnotící kritérium bylo využito rozlišení. Hodnoty pro kritický pár PCB 28/PCB 52 jsou zaznamenány na Obr. 7.



Obr. 7: Graf závislosti rozlišení PCB 28/PCB 52 na teplotním gradientu.

V celém rozsahu byly hodnoty naprosto vyhovující, ale z důvodu obav o reprodukovatelný přenos tepla a dlouhodobou životnost plynového chromatografu, byla zvolena hodnota teplotního gradientu 60 °C/min.

3.1.7 Optimalizace objemu nástřiku

Objem nástřiku byl testován v rozmezí 1 - 3 μl . Pro účely optimalizace byl použit směsný pracovní roztok v hexanu s koncentrací analytů 250 ng/ml. Cílem bylo dosáhnout co nejvyššího objemu nástřiku (pro získání co nejnižších mezí detekce) při dostatečné symetrii píků. Jako hodnotící kritérium byl použit faktor symetrie píku. Výsledky měření jsou uvedeny v Tab. 8.

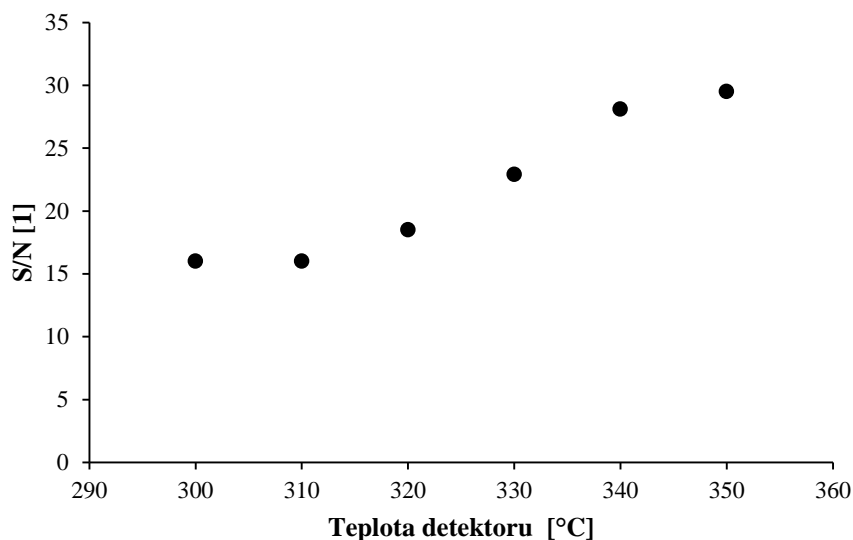
Tab. 8: Faktor symetrie v závislosti na objemu nástřiku.

Objem nástřiku [μl]	Faktor symetrie [1]					
	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 138	PCB 153	PCB 180
1	1,11	1,12	1,11	1,02	1,06	1,02
1,5	1,1	1,13	1,08	1,04	1,07	1,01
2	0,92	1,01	1,05	1,02	1,05	1,05
2,5	0,8	0,86	1,03	1,04	1,03	1
3	0,74	0,73	0,94	1,08	1,02	1,04

Bylo zjištěno, že při objemu nástřiku 2,5 - 3 μl vykazoval faktor symetrie píku hraniční až nepřijatelné hodnoty. Optimálních hodnot faktoru symetrie píku bylo dosaženo v rozmezí 1 - 2 μl . Aby byly splněny požadavky na test způsobilosti systému dle Evropského lékopisu (faktor symetrie v rozmezí 0,8 - 1,5) a byla zajištěna přiměřená robustnost metody, byl pro další analýzy zvolen objem nástřiku 1,5 μl .

3.1.8 Optimalizace teploty detektoru

Různá teplota detektoru byla testována v rozmezí 300 - 350 °C. Pro účely optimalizace byl použit směsný pracovní roztok v hexanu s koncentrací analytů 250 ng/ml. Cílem bylo dosáhnout co nejvyšší odezvy detektoru na analyt při co nejnižší odezvě detektoru na pozadí. Jako hodnotící kritérium byl zvolen poměr signálu k šumu (S/N). Naměřené hodnoty pro PCB 52 jsou zaznamenány na Obr. 8.



Obr. 8: Graf závislosti S/N na teplotě detektoru pro PCB 52.

Nejvyšších hodnot poměru S/N bylo dosaženo při teplotě detektoru 350 °C. Tato teplota byla tedy využita pro další analýzy.

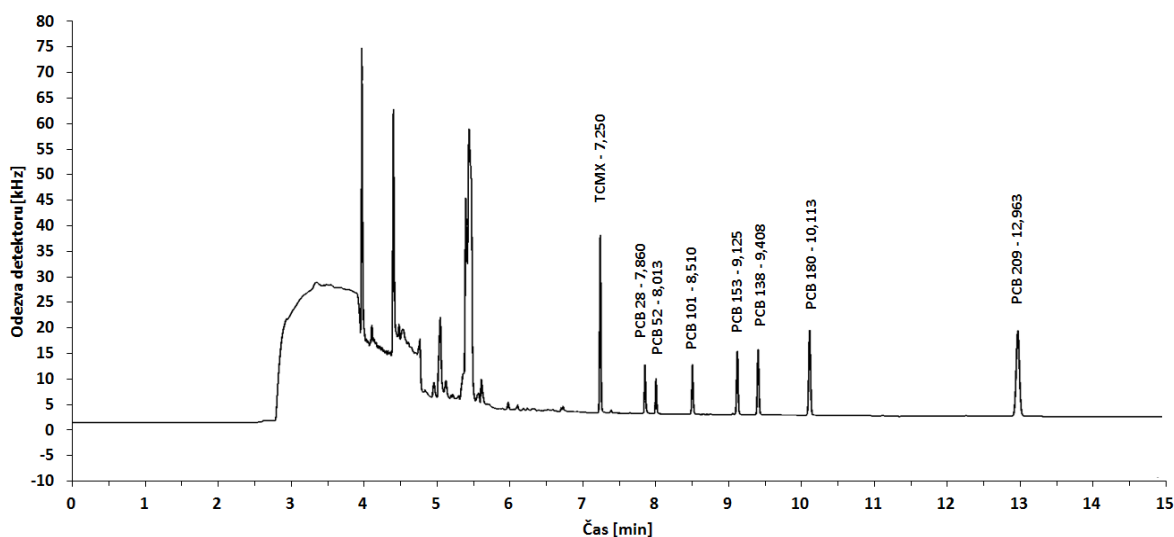
3.1.9 Optimalizace chromatografické separace a detekce - souhrn

Na základě výsledků optimalizace chromatografické separace a detekce sledovaných kongenerů byly získány takové podmínky nastavení přístroje, které umožňují za použití dané instrumentace i spotřebního materiálu jejich co nejefektivnější separaci a co nejlepší detekci.

Souhrn finálních podmínek chromatografické separace a detekce:

- Chromatografická kolona: TR-5MS (délka 30 m; vnitřní průměr: 0,25 mm, tloušťka filmu 0,25 μm)
- Průtok nosného plynu: 1,5 ml/min
- Objem nástřiku: 1,5 μl
- Teplota injektoru: 275 °C
- Splitless perioda: 2 min
- Teplotní gradient: 0. – 2. min 40 °C
2. – 6,3. min 40 °C \rightarrow 300 °C (60 °C/min)
6,3. – 15. min 300 °C
- Teplota detektoru: 350 °C

Na Obr. 9 je uveden chromatogram směsného roztoku standardů a vnitřních standardů po zoptimalizování chromatografické separace.



Obr. 9: Chromatogram směsného roztoku standardů a vnitřních standardů.

3.2 Optimalizace extrakce

V této části práce byla zkoumána doba extrakce, která má významný vliv na výtěžnost extrakce analytů ze vzorku a volba vhodného vnitřního standardu, který má zásadní vliv na spolehlivost stanovení. Extrakce probíhala dle postupu uvedeného v Kap. 2.3.4.

3.2.1 Optimalizace doby extrakce

Doba extrakce byla testována v rozmezí 5 - 180 min. Pro účely optimalizace byl použit kalibrační roztok na nejvyšší koncentrační úrovni (K5). Cílem bylo dosáhnout co nejkratší doby extrakce při dostatečné výtěžnosti extrakce. Jako hodnotící kritérium byla zvolena výtěžnost extrakce. Vliv doby extrakce na výtěžnost extrakce je shrnut v Tab. 9.

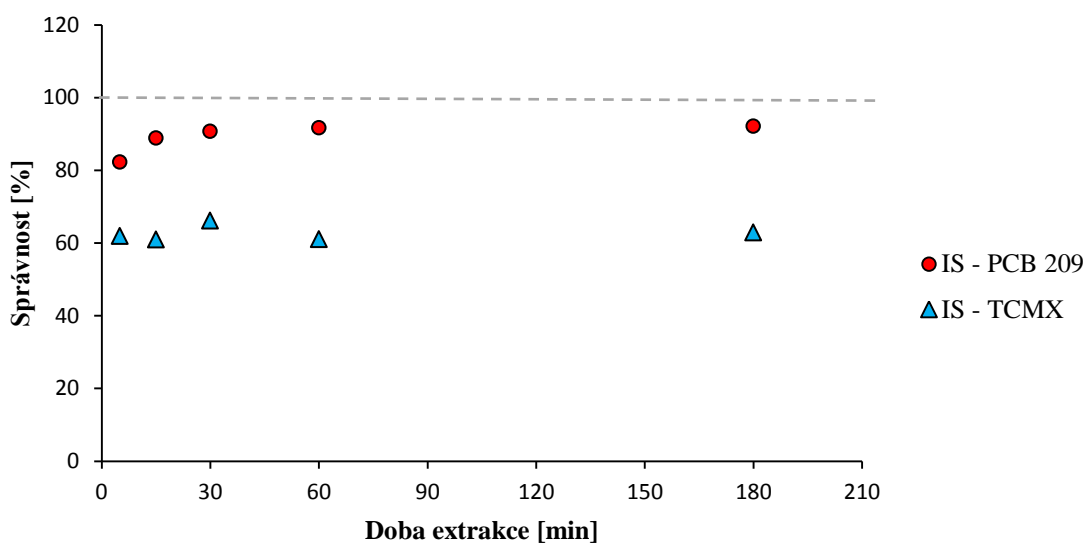
Tab. 9: Závislost doby extrakce na výtěžnost.

Doba extrakce [min]	Výtěžnost extrakce [%]					
	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 138	PCB 153	PCB 180
5	82	81	92	79	82	77
15	89	86	86	83	88	84
30	91	89	93	86	92	88
60	92	93	94	90	96	92
180	92	97	103	97	104	100

Bylo zjištěno, že nejvyšších výtěžností bylo dosaženo při době extrakce 60 a 180 min. Pro další analýzy byla zvolena doba 60 min, neboť navýšení času o dalších 120 min má na výtěžnost extrakce již minimální vliv a významně prodlužuje dobu přípravu vzorku.

3.2.2 Volba vhodného vnitřního standardu

Posledním optimalizovaným parametrem byla volba vhodného vnitřního standardu, který zásadně ovlivňuje přesnost a správnost každé analytické metody. Bylo zjištěno, že při použití dvou různých vnitřních standardů se velmi liší správnost stanovení, jak je vidět na Obr. 10. Při použití IS - PCB 209 se hodnoty správnosti stanovení všech analytů pohybovaly v průměru okolo 89 %, ale v případě použití IS - TCMX to bylo už pouze okolo 63 %. Jako vhodnější vnitřní standard tedy byl zvolen kongener PCB 209, který byl využit pro následující validaci a testování metody na reálném vzorku pitné vody.



Obr. 10: Graf závislosti správnosti stanovení na době extrakce pro PCB 28 při použití dvou různých vnitřních standardů.

3.3 Validace metody

Po optimalizaci podmínek chromatografické separace a extrakce byla provedena základní validace celé analytické procedury. Validace prokazuje vhodnost analytické metody pro kvantitativní analýzu vybraných kongenerů PCB. Mezi základní validační parametry se řadí linearita, správnost, přesnost, rozsah, mez detekce a mez stanovitelnosti.

3.3.1 Linearita

Orientační rozsah byl zvolen na koncentrační úrovni 0,1 - 10 µg/l. Každá koncentrační úroveň byla připravena vždy ve třech nezávislých opakováních. Dávkované objemy jsou shrnuty v následující tabulce.

Tab. 10: Orientační kalibrační roztoky.

Označení roztoku	Koncentrace analytu	Objem PCB-ST-B	Objem PCB-IS-C	Objem hexanu
	[µg/l]	[µl]	[µl]	[µl]
O1	0,1	5	100	895
O2	0,2	10	100	890
O3	0,5	25	100	875
O4	1	50	100	850
O5	2	100	100	800
O6	5	250	100	650
O7	10	500	100	400

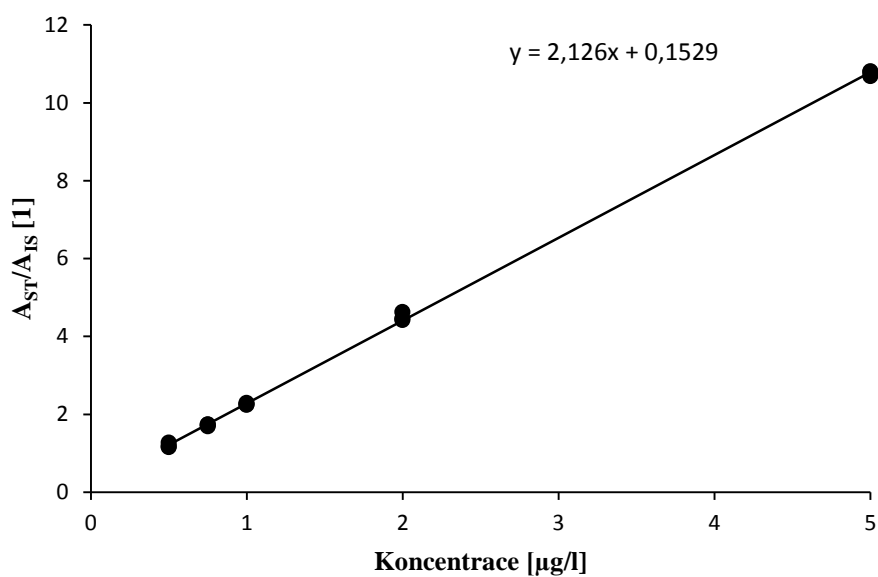
Pracovní rozsah byl u všech analytů zvolen na koncentrační úrovni 0,2 - 5 µg/l, neboť nižší a vyšší koncentrační úrovně nebylo možné zahrnout do kalibrace z důvodu nepřijatelné přesnosti a správnosti. Bylo zjištěno, že detektor dosahuje linearitu pouze v rozsahu jednoho řádu (0,5 - 5 µg/l). Aby byla splněna podmínka minimálního počtu koncentračních úrovní pro sestavení kalibrační křivky dle požadavků uvedených v doporučení Q2 (R1) organizace ICH, byl do kalibrace zařazen roztok o koncentraci 0,75 µg/l (28). Dávkované objemy jsou uvedeny v Tab. 5.

Základní validační parametry týkající se linearitu jsou uvedeny v Tab. 11. Rovnice kalibrační křivky (viz. Obr. 11) je uvedena ve tvaru $y = k \cdot x + q$, kde y je poměr plochy píku standardu ku ploše píku vnitřního standardu, k je směrnice kalibrační křivky, x představuje koncentraci standardu v µg/l a q je intercept.

Tab. 11: Validační parametry linearity jednotlivých analytů.

Parametr		Kritérium přijatelnosti	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 138	PCB 153	PCB 180
Směrnice	[l/μg]	-	2,126	1,513	2,123	2,854	2,770	3,762
Intercept	[1]	-	0,153	0,187	0,268	0,111	0,166	-0,159
Korelační koeficient	[1]	≥ 0,9900	0,9998	0,9999	0,9999	1,000	1,000	0,9999
QC koeficient	[%]	≤ 5,00	1,78	1,23	1,04	0,630	0,760	1,45

Dle publikace Handbook of Chemometrics and Qualimetrics (29) byla u všech analytů splněna kritéria přijatelnosti, vyhodnocená v programu EffiValidation 3.0.



Obr. 11: Graf kalibrační křivky PCB 28.

3.3.2 Správnost a přesnost

Dalším validačním parametrem byla správnost, vyjádřená jako výtěžnost dle požadavků uvedených v doporučení Q2 (R1) organizace ICH (28). Roztoky byly připraveny na třech koncentračních úrovních (K1, K3, K5) dle Tab. 5. Každá koncentrační úroveň byla proměřena ve dvou dnech, vždy ve třech nezávislých opakováních. Hodnoty správnosti naměřené první den jsou zaznamenány v Tab. 12 a data z druhého dne jsou uvedeny v Tab. 13.

Tab. 12: Správnost vyjádřená jako výtěžnost - den 1.

Koncentrační úroveň [µg/l]	Kritérium přijatelnosti: výtěžnost [%]	Správnost (den 1) [%]					
		PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 138	PCB 153	PCB 180
0,5	40 - 120	101	92	94	99	97	103
1		100	102	101	101	101	100
5		100	100	100	100	100	100

Tab. 13: Správnost vyjádřená jako výtěžnost - den 2.

Koncentrační úroveň [µg/l]	Kritérium přijatelnosti: výtěžnost [%]	Správnost (den 2) [%]					
		PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 138	PCB 153	PCB 180
0,5	40 - 120	101	91	96	100	98	106
1		101	101	104	102	102	102
5		103	101	102	101	101	101

Bylo zjištěno, že správnost měření se v průběhu dvou dnů pohybovala v rozmezí 91 - 106 %. První den byla u všech analytů na koncentrační úrovni 5 µg/l výtěžnost 100 %. Nejnižší výtěžnosti bylo v obou případech dosaženo u PCB 52 na nejnižší koncentrační úrovni. Naopak nejvyšší výtěžnost byla vyhodnocena u PCB 180 na téže úrovni.

Dalším hodnoceným parametrem byla přesnost vyjádřená jako opakovatelnost prostřednictvím relativní směrodatné odchylky (RSD) dle požadavků uvedených v doporučení Q2 (R1) organizace ICH (28). Roztoky byly připraveny na třech koncentračních úrovních (K1, K3, K5) dle Tab. 5. Každá koncentrační úroveň byla proměřena ve dvou dnech, vždy ve třech nezávislých opakováních. Hodnoty přesnosti naměřené první den jsou zaznamenány v Tab. 14 a data z druhého dne jsou uvedeny v Tab. 15.

Tab. 14: Přesnost vyjádřená jako opakovatelnost - den 1.

Koncentrační úroveň [µg/l]	Kritérium přijatelnosti: RSD [%]	Přesnost (den 1) [%]					
		PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 138	PCB 153	PCB 180
0,5	≤ 30	4,1	2,2	1,7	1,2	1,3	0,86
1		1,5	3,0	0,82	0,67	0,35	0,34
5		0,43	0,04	0,22	0,23	0,17	0,21

Tab. 15: Přesnost vyjádřená jako opakovatelnost - den 2.

Koncentrační úroveň [µg/l]	Kritérium přijatelnosti: RSD [%]	Přesnost (den 2) [%]					
		PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 138	PCB 153	PCB 180
0,5	≤ 30	3,0	1,6	2,0	0,20	0,32	0,11
1		0,31	1,2	0,89	0,69	0,54	0,34
5		1,9	1,4	1,4	1,1	1,3	0,83

Z naměřených dat bylo zjištěno, že přesnost metody se v průběhu dvou dnů pohybovala v rozmezí 0,04 - 4,1 %. Nejvyšší přesnost byla první den u PCB 52 na nejvyšší koncentrační úrovni. Nejnižší přesnost byla v obou dnech dosažena u PCB 28 na nejnižší koncentrační úrovni.

Dalším sledovaným parametrem byla mezioperační přesnost vyjádřená jako opakovatelnost pomocí relativní směrodatné odchylky (RSD) ze všech 18 měření v obou dnech. Hodnoty pro jednotlivé analyty jsou uvedeny v Tab. 16.

Tab. 16: Mezioperační přesnost vyjádřená jako opakovatelnost.

Kritérium přijatelnosti: RSD [%]	Mezioperační přesnost [%]					
	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 138	PCB 153	PCB 180
≤ 30	2,3	5,0	3,6	1,2	1,8	2,2

Na základě naměřených dat bylo zjištěno, že mezioperační přesnost se pohybovala v intervalu 1,2 - 5,0 %. Srovnatelných hodnot bylo dosaženo u PCB 28 a PCB 180.

3.3.3 Rozsah

Dle výsledků linearity, správnosti a přesnosti bylo zjištěno, že metoda poskytuje výsledky s dostatečnou přesností a správností v rozsahu koncentrací 0,5 – 5 µg/l.

3.3.4 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Poslední validačními parametry - mez detekce a mez stanovitelnosti, byly vyhodnoceny pomocí následujících vztahů:

Mez detekce byla vypočtena pomocí vztahu: $LOD = \frac{3 \cdot c}{S/N}$

kde LOD je mez detekce, c je koncentrace a S/N je poměr signálu k šumu.

Mez stanovitelnosti byla vypočtena dle vztahu: $LOQ = \frac{10 \cdot c}{S/N}$

kde LOQ je mez stanovitelnosti, c je koncentrace a S/N je poměr signálu k šumu.

Tab. 17: LOD a LOQ pro kalibrační roztoky.

Parametr	Koncentrace [ng/l]					
	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 138	PCB 153	PCB 180
LOD	24	30	21	17	17	16
LOQ	73	91	63	53	52	48

Pro kalibrační roztoky byla zjištěna mez detekce v rozmezí 16 - 30 ng/l. Mez stanovitelnosti se pohybovala mezi 48 - 91 ng/l.

3.4 Testování metody na reálném vzorku vody

Vzhledem k nedostupnosti reálného vzorku vody se známým obsahem sledovaných kongenerů PCB bylo testování provedeno na vzorku pitné vody z vodovodního řádu budovy C Přírodovědecké fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích.

Nejprve bylo nutné zhodnotit správnost a přesnost celé analytické procedury. Byly tedy připraveny tzv. spikované vzorky pitné vody o objemu 900 ml s přidavkem 100 μ l PCB-IS-C, 2 ml hexanu a známého objemu roztoku PCB-ST-B o známé koncentraci dle Tab. 18. Spikované vzorky byly extrahovány a analyzovány dle zoptimalizované metody. Každá koncentrační úroveň byla provedena ve 3 nezávislých opakováních.

V Tab. 19 jsou zaznamenány hodnoty výtěžností spikovaných vzorků vod na jednotlivých koncentračních úrovních a v Tab. 20 jsou uvedeny hodnoty RSD.

Tab. 18: Dávkované objemy PCB-ST-B pro přípravu spikovaných vzorků vod.

Koncentrační úroveň [ng/l]	Objem PCB-ST-B [μ l]
0,5	22,5
0,75	33,75
1,0	45
2,0	90
5,0	225

Tab. 19: Správnost vyjádřená jako výtěžnost - spikované vzorky vody.

Koncentrační úroveň [ng/l]	Kritérium přijatelnosti: výtěžnost [%]	Správnost [%]					
		PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 138	PCB 153	PCB 180
0,50	40 - 120	72	73	203	94	107	87
0,75		68	67	65	97	112	86
1,0		89	95	115	95	105	87
2,0		94	94	100	89	96	85
5,0		90	87	95	89	92	87

Tab. 20: Přesnost vyjádřená jako opakovatelnost - spikované vzorky vody.

Koncentrační úroveň [ng/l]	Kritérium přijatelnosti: RSD [%]	Přesnost [%]					
		PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 138	PCB 153	PCB 180
0,50	≤ 30	40	26	78	9,0	23	7,7
0,75		32	15	11	9,9	15	8,2
1,0		20	9,1	3,1	2,8	5,6	3,7
2,0		9,0	3,1	5,2	3,2	6,0	2,2
5,0		8,5	3,0	2,5	3,9	3,6	4,0

Vliv extrakce analytů z vody na parametr správnost byl podle předpokladů již patrný. Z naměřených hodnot bylo zjištěno, že se hodnoty tohoto parametru pohybovaly v rozmezí 65 – 203 %. Nejlepších hodnot výtěžností (89 – 97 %) v celém testovaném rozsahu bylo dosaženo v případě kongeneru PCB 138. Nejnižších hodnot bylo dosaženo u PCB 101, PCB 28 a PCB 52, jejichž výsledky se navíc pohybovaly přibližně na srovnatelné úrovni. Nejvyšší hodnota (203 %), zjištěná u PCB 101, byla z důvodu přítomnosti neznámé interference v jednom ze třech opakování na koncentrační úrovni 0,50 ng/l. V tomto případě bylo překročeno kritérium přijatelnosti.

Rovněž při testování přesnosti nebylo již dosaženo tak výborných hodnot jako v případě postupu bez extrakce (0,04 - 4,1 %), které se nyní pohybovaly v intervalu 2,2 - 78 %. Nejlepší přesnosti bylo dosaženo u PCB 180, jehož průměrná hodnota činila 5,2 % a u PCB 138 s průměrnou hodnotou 5,8 %. U PCB 138 bylo ovšem větší rozmezí hodnot (2,8 - 9,9 %), než v případě PCB 180 (2,2 - 8,2 %). V případě PCB 28 však bylo na dvou nejnižších a u PCB 101 na nejnižší koncentrační úrovni překročeno kritérium přijatelnosti.

Mez detekce a mez stanovitelnosti byla vypočtena podle vztahů uvedených v Kap. 3.3.4 a výsledky jsou uvedeny v Tab. 21.

Tab. 21: LOD a LOQ spikovaných vzorků vod.

Parametr	Koncentrace [ng/l]					
	PCB 28	PCB 52	PCB 101	PCB 138	PCB 153	PCB 180
LOD	0,5			0,2		
LOQ	1			0,5		

V této práci bylo dosaženo srovnatelných hodnot meze detekce jako v práci (24), která využívala techniku GC-MS/MS v kombinaci s MSPE. Odpovídající metoda GC-ECD v práci (22) poskytovala o 1 řád vyšší hodnoty LOD. Metoda GC-MS v kombinaci s SPME (23) dosahovala u PCB 138 a PCB 153 dokonce 550x vyšších hodnot meze detekce. Dle Tab. 2 bylo nižších hodnot meze detekce dosaženo pouze v práci (25).

4 Závěr

V teoretické části byly shrnuty základní poznatky o polychlorovaných bifenylech, plynové chromatografii a extrakci kapalina-kapalina. Závěr této části byl věnován porovnání analytických metod s ostatními pracemi.

V praktické části byla nejprve provedena optimalizace chromatografické separace, která zahrnovala několik parametrů. Nejlepších podmínek bylo dosaženo při teplotě injektoru 275 °C, počáteční teplotě kolony 40 °C, průtoku plynu 1,5 ml/min, splitless periodě 2 min, teplotním gradientu 60 °C/min, objemu nástřiku 1,5 µl a teplotě detektoru 350 °C. Následovala optimalizace extrakce. Nejlepší hodnoty byly získány při době extrakce 60 min.

Dalším krokem byla validace metody, do které se řadí linearita, správnost, přesnost, rozsah, mez detekce a mez stanovitelnosti. Správnost vyjádřená jako výtěžnost se pohybovala v rozmezí 91 - 106 %. Přesnost vyjádřená prostřednictvím RSD dosahovala hodnot 0,04 - 4,1 % a mezioperační přesnost se pohybovala v intervalu 1,2 - 5,0 %. Výsledky s dostatečnou přesností a správností poskytuje metoda v rozsahu koncentrací 0,5 - 5 µg/l. Mez detekce byla zjištěna v rozmezí 16 - 30 ng/l. Mez stanovitelnosti se pohybovala mezi 48 - 91 ng/l.

Na závěr byla metoda testována na reálných vzorcích pitné vody, které byly obohaceny přídatkem sledovaných analytů na koncentrační úroveň 0,50 - 5,0 ng/l. Vliv procesu extrakce analytů z vody i vliv přítomnosti matrice na parametry správnost a přesnost byl již patrný. Výsledky správnosti vyjádřené jako výtěžnost se pohybovaly v rozmezí 65 - 203 % a výsledky přesnosti vyjádřené jako opakovatelnost dosahovaly hodnot 2,2 - 78 %. V obou případech byly nejvyšší hodnoty způsobené přítomností neznámé interference v jednom ze třech opakování na nejnižší koncentrační úrovni (0,50 ng/l). Meze detekce vyjádřené na základě poměru signálu k šumu se pohybovaly v rozmezí 0,2 - 0,5 ng/l a meze stanovitelnosti v rozmezí 0,5 - 1 ng/l. S ohledem na všechny dosažené výsledky správnosti, přesnosti i meze stanovitelnosti uvedené v Kap. 3.3 bylo zjištěno, že tuto metodu lze použít pro kvantitativní analýzu sledovaných kongenerů PCB v reálných vzorcích pitných vod od koncentrací 0,50 ng/l (PCB 138, PCB 153 PCB 180) až 1,0 ng/l (PCB 28, PCB 52, PCB 101).

S ohledem na dosažené meze stanovitelnosti by bylo možné tuto metodu použít pro analýzu reálných vzorků pitných vod. Pro účely hodnocení podle vyhlášky (Vyhláška č. 61/2003 Sb.) by však bylo zapotřebí kolonu s vyšší separační účinností, aby se rozdělily i ty kongenery, které při separaci na této koloně koelují.

5 Seznam použité literatury

- [1]. **Véber, Karel a Kredl, František.** *Polychlorované bifenyly v biosféře, zejména ve vodách a některých vodních organismech*. Praha: Academia, 1991. ISBN 80-200-0361-4.
- [2]. **Velíšek, Jan.** *Chemie potravin 3*. Tábor: OSSIS, 2002. ISBN 80-86659-02-X.
- [3]. **Erickson, Mitchell D.** *Analytical Chemistry of PCBs, Second Edition*. Boca Raton: CRC Press LLC, 1997. ISBN 0-87371-923-9.
- [4]. **Rábl, Vratislav.** Polychlorované bifenyly - výroba, složení, vlastnosti. *Polychlorované bifenyly*. Praha: BIJO, 1992.
- [5]. **Horák, Josef, Linhart, Igor a Klusoň, Petr.** *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2004. ISBN 80-7080-548-X.
- [6]. Integrovaný registr znečišťování. [Online] [Citace: 21. listopad 2014.] <http://www.irz.cz/node/87>.
- [7]. **Totevová, Sonja, et al.** Bakteriální degradace PCB. *Chemické Listy*. 1997.
- [8]. **Víden, Ivan.** *Chemie ovzduší*. Praha: VŠCHT, 2005. ISBN 80-7080-571-4.
- [9]. **Horák, Josef.** Dioxiny jako zdroj ohrožení životního prostředí a zdraví. *Chemické Listy*. 2002.
- [10]. **Hajšlová, Jana a Vávrová, Milada.** *Problematika PCB a dalších organických kontaminantů v zemědělství*. Praha: Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství, 1991. ISSN 0862-3562.
- [11]. **Wiegel, J a Wu, Q.** Microbial reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls. *FEMS Microbiol Ecol*. 2000.
- [12]. **Štulík, Karel, et al.** *Analytické separační metody*. Praha: Karolinum, 2005. 80-246-0852-9.
- [13]. **Harvey, David.** *Modern analytical chemistry*. Boston: McGraw-Hill, 2000. 0-07-237547-7.
- [14]. **Holzbecher, Závíš, Churáček, Jaroslav, et al.** *Analytická chemie*. Praha: SNTL, 1987.
- [15]. **Churáček, Jaroslav, et al.** *Analytická separace látek*. Praha: SNTL, 1990. 80-03-00569-8.
- [16]. **Opekar, František, et al.** *Základní analytická chemie*. Praha: Karolinum, 2002. 978-80-246-0553-1.
- [17]. **Zýka, Jaroslav, et al.** *Analytická příručka I*. Praha: SNTL, 1988.

- [18]. **Klouda, Pavel.** *Moderní analytické metody.* Ostrava : Klouda Pavel, 2003. ISBN 978-80-86369-07-5.
- [19]. **Volka, Karel, et al.** *Analytická chemie II.* Praha : VŠCHT, 1997. 80-7080-227-8.
- [20]. **Drbal, Karel a Křížek, Martin.** *Analytická chemie.* České Budějovice : ZF JU, 1999. 80-7040-352-7.
- [21]. **Fatemeh, Rezaei, a další, a další.** Development of a dispersive liquid–liquid microextraction method for the determination of polychlorinated biphenyls in water. *Journal of Hazardous Materials.* Elsevier, 2008, Sv. 158, 2-3.
- [22]. **Liping, Dai, a další, a další.** Dispersive liquid–liquid microextraction based on the solidification of floating organic droplet for the determination of polychlorinated biphenyls in aqueous samples. *Analytica Chimica Acta.* Elsevier, 2010, Sv. 674, 2.
- [23]. **Cortazar, E., a další, a další.** MultiSimplex optimisation of the solid-phase microextraction–gas chromatographic–mass spectrometric determination of polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls and phthalates from water samples. *Journal of Chromatography A.* Elsevier, 2002, Sv. 978, 1-2.
- [24]. **Liao, QG, Wang, DG a LG, Luo.** Chitosan-poly(m-phenylenediamine)@Fe₃O₄ nanocomposite for magnetic solid-phase extraction of polychlorinated biphenyls from water samples. *ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY.* Springer, 2014, Sv. 406, 29.
- [25]. **Fu, Meizhen, a další, a další.** Ultrathin-shell boron nitride hollow spheres as sorbent for dispersive solid-phase extraction of polychlorinated biphenyls from environmental water samples. *Journal of Chromatography A.* Elsevier, 2014, Sv. 1369.
- [26]. **Pérez-Carrera, Erkuden, a další, a další.** Simultaneous determination of pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in seawater and interstitial marine water samples, using stir bar sorptive extraction–thermal desorption–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A.* Elsevier, 2007, Sv. 1170, 1-2.
- [27]. **Grob, Konrad.** *Split and splitless injection for quantitative gas chromatography.* Weinheim : Die Deutsche Bibliothek, 2003. ISBN 3-527-29879-7.
- [28]. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1). *ICH.* [Online] [Citace: 14. Říjen 2015.] <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html>.
- [29]. **Massart, Désiré Luc.,** *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics, Part A.* Amsterdam : Elsevier, 1997. ISBN 0-444-89724-0.

- [30]. **Svobodová, Zdeňka.** *Toxikologie vodních živočichů.* Praha : MZVŽ ČSR, 1987.
- [31]. **Králová, Blanka, et al.** *Bioanalytické metody.* Praha : VŠCHT, 2008. 978-807080-449-0.
- [32]. United States Environmental Protection Agency. [Online] [Citace: 27. Duben 2015.] <http://www.epa.gov/epawaste/hazard/tsd/pcbs/pubs/congenertable.pdf>.
- [33]. **Lu Liu, Jing Cheng, Guzalnur Matsadiq, Jun-Kai Li.** Novel polymer monolith microextraction using a poly-(methylmethacrylate-co-ethylene dimethacrylate) monolith and its application to the determination of polychlorinated biphenyls in water samples. *Chemosphere.* Elsevier, 2011, Sv. 83, 10.
- [34]. Guidelines for Standard Method, Appendix F. *Association of analytical communities.* [Online] [Citace: 7. Zář 2015.] http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf.

6 Seznam zkratek a symbolů

CAS	registrační číslo chemických látek
DLLME-SFO	disperzní mikroextrakce kapaliny kapalinou založená na tuhnutí plovoucí kapky
dSPE	disperzní extrakce na tuhou fázi
GC-ECD	plynová chromatografie s detektorem elektronového záchytu
GC-MS/MS	plynová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí
ICH	The International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
IS	vnitřní standard
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LLE	extrakce kapalina-kapalina
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
MS	hmotnostní spektrometr
MSPE	extrakce magnetickou tuhou fází
N.A.	daný údaj není dostupný
NPK-P	nejvyšší přípustná koncentrace chemické látky v pracovním ovzduší
PCB	polychlorované bifenoly
PEL	přípustný expoziční limit chemické látky
PLOT	kolona s tenkou vrstvou sorbentu na vnitřní straně kapilár
PR	pracovní roztok
PVC	polyvinylchlorid
RSD	relativní směrodatná odchylka
S/N	poměr signálu k šumu
SBSE-TD	sorpční extrakce na míchadélku - termální desorpce
SCOT	kolona s kapalinou zakotvenou na nosiči na vnitřní straně kapiláry
SPME	mikroextrakce na tuhou fázi
ST	standard
TCD	tepelně vodivostní detektor
TCMX	2,4,5,6-tetrachloro-m-xylen
WCOT	kolona s tenkou vrstvou organické kapaliny na vnitřním povrchu kapiláry
ZR	zásobní roztok