

Environmentální analytická chemie
Analytická chemie životního prostředí

Laboratorní cvičení 2013

4.úloha: Extrakce microcystinů ze vzorků vody metodou SPE

Určení a cíl

Zakonzentrování microcystinů ve vzorcích s nízkou koncentrací pro jejich následné analytické stanovení pomocí HPLC-DAD (kapalinová chromatografie s UV-VIS detekcí)

Princip

Microcystiny ze vzorku se zachytávají na povrchu pevného sorbentu. Následně jsou převedeny do malého množství organického rozpouštědla a tento roztok je připraven pro analýzu microcystinů na HPLC.

Bezpečnost při práci a toxikologické údaje

Vzorky vod, extrakty biomasy sinic = rizikový materiál potenciálně obsahující cyanotoxiny!

Methanol – jedovatý!

Kyselina trifluoroctová – silná žíravina!

Kyselina chlorovodíková – silná žíravina!

Při práci s evakuovanou aparaturou používat ochranné pomůcky (brýle) a dodržovat veškeré zásady bezpečnosti.

Chemikálie a spotřební materiál

- 100% methanol – potřebné roztoky o koncentraci 20% a 50% (v/v) připravit smícháním čistého methanolu a destilované vody
- kyselina trifluoroctová (TFA) – potřebný roztok o koncentraci 0,1%TFA v methanolu připravit smícháním čistého methanolu s TFA (v/v)
- 1% kyselina chlorovodíková
- roztok thiosíranu sodného (c=10g/L)
- GF (glass fiber) filtry (0,45μm)
- SPE kolonky se sorbentem **C18**
- čisté 1.5 mL skleněné vialky, víčka, septa
- stříčka s destilovanou vodou

Přístroje

- filtrační aparatura Nalgene DS0320
- aparatura pro SPE
- elektrická membránová vývěva
- rotační vakuová odparka
- pH metr

4. A Postup práce

příprava vzorků

- vzorky přefiltrovat přes GF filtr (0,45 μ m)
- přidat methanol v množství do 10% celkového objemu (v/v) vzorku. V případě vyššího obsahu organického rozpouštědla zředit vzorek destilovanou vodou tak, aby koncentrace organického rozpouštědla nepřesahovala 10% (v/v)
- filtrát okyselit přidáním HCl na pH~6, pH zkontrolovat pomocí pH metru
- přidat 1mL roztoku thiosíranu sodného (c=10g/L)

aktivace a ekvilibrace SPE kolony

- pokyny ke konkrétním typům kolon jsou uvedeny na příbalových letácích od výrobce
- v případě použití kolon Supelclean LC-18 3ml Tubes postupovat takto:
aktivace 5ml 100% methanolu (bez použití podtlaku)
ekvilibrace 5ml vody (možno použít podtlak)
- v průběhu aktivace, ekvilibrace a přetahování vzorku **kolona nesmí vyschnout !** (nad horní fritou musí být stále alespoň 5mm kapaliny)

přetažení vzorku

- vzorek přetáhnout za použití podtlaku (15mm Hg), průtok 5ml/min
- po přetažení vzorku sušit kolonu proudem vzduchu (10min)
- vysušenou kolonu promýt 5ml 20% methanolu

eluce analytu

- eluci provést 5ml roztoku 0,1%TFA v methanolu, za použití podtlaku (5mm Hg)
- eluát v případě potřeby skladovat v mrazáku (-18°C)

zakoncentrování eluátu

- eluát odpařit do sucha na rotační vakuové odparce (teplota lázně = 45°C)
- odparek rozpustit v 500 μ l 50% methanolu a převést do vialky
- vzorky ve vialkách před analýzou skladovat v mrazáku (-18°C)

4. B Stanovení microcystinů v lyofilizované biomase sinic

Princip

Navážka lyofilizované biomasy sinic je extrahována solventem za působení ultrazvuku. Buněčný debris je oddělen centrifugací, supernatant je zfiltrován a připraven pro analýzu microcystinů.

Bezpečnost při práci a toxikologické údaje

Vzorky vod, extrakty biomasy sinic = rizikový materiál potenciálně obsahující cyanotoxiny!

Methanol – jedovatý!

Při práci s ultrazvukovým homogenizátorem používat tlumítka zvuku a dodržovat veškeré zásady bezpečnosti.

chemikálie a spotřební materiál

- 50% aq. methanol
- 1.5 mL Eppendorfovy mikrozkušavky
- plastová stříkačka 1 mL + jehla
- stříkačkové nylonové filtry (0.45 μ m)
- čisté 1.5 mL skleněné vialky, víčka, septa
- denaturovaný ethanol, stříčka s destilovanou vodou

přístroje

- analytické váhy
- pipeta 100-1000 μ L
- vortex
- ultrazvukový homogenizátor nebo lázeň
- centrifuga

Postup práce

příprava vzorků

- do Eppendorfovy zkumavky navážit cca 20 mg lyofilizované biomasy (zaznamenat přesnou navážku)
- přidat pipetou 1 mL 50% aq. methanolu a důkladně vortexovat
- extrahovat pomocí ultrazvukového homogenizátoru (2 x 20 s, cycle 0.8 x 10%, power 90%), mezi oběma extrakcemi nechat vzorek vychladnout
- centrifugací oddělit buněčný debris (maximální otáčky, 10 min)
- supernatant přefiltrovat pomocí stříkačky a filtru do skleněné vialky
- vzorky před analýzou skladovat při -18°C