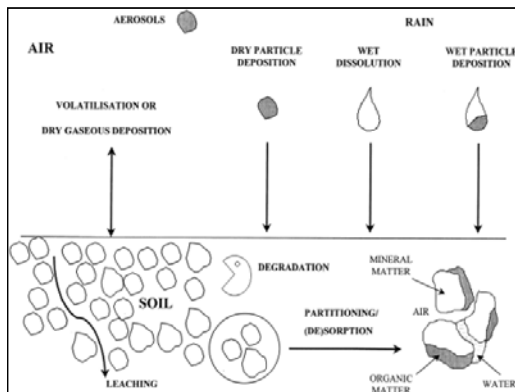


# Laboratorní praktikum

## Základy studia environmentálních procesů - cvičení



RNDr. Petra Růžičková, Ph.D.

Mgr. Pavla Fialová

Mgr. Simona Jílková

Mgr. Barbora Nežiková

Mgr. Jiří Palát

Mgr. Jaromír Sobotka

Mgr. Lenka Sedláčková

# MUNI | RECETOX

## RECETOX

Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta

Brno, Česká Republika

2019

## Obsah

|  |           |
|--|-----------|
| <b>OBECNÉ INFORMACE A CÍLE PŘEDMĚTU .....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>BEZPEČNOST PRÁCE V LABORATOŘI .....</b>   | <b>5</b>  |
| <b>ORGANIZACE CVIČENÍ.....</b>   | <b>7</b>  |
| <b>ÚLOHA Č.1 – ROZDĚLOVACÍ KOEFICIENT N-OKTANOL/VODA.....</b>  | <b>8</b>  |
| <b>ÚLOHA Č.2 - JEHLIČÍ JAKO PASÍVNÍ VZORKOVAČ OVZDUŠÍ.....</b>   | <b>12</b> |
| <b>ÚLOHA Č.3 - ADSORPCE NA PŮDU .....</b>  | <b>15</b> |
| <b>ÚLOHA Č. 4 - VYTĚKÁVÁNÍ Z PŮDY: STANOVTE <math>K_{SA}</math> FENOLU S VYUŽITÍM HPLC .....</b>   | <b>19</b> |
| <b>ÚLOHA Č.5 – ANALYTICKÁ EXTRAKCE PESTICIDŮ Z PŮDY A JEJICH STANOVENÍ METODOU LC-MS/MS .....</b>  | <b>23</b> |
| <b>ÚLOHA Č.6 - STANOVENÍ LIPIDŮ, POLYCHLOROVANÝCH BIFENYLŮ A ORGANOCHLOROVANÝCH PESTICIDŮ V MÁSLÉ .....</b>  | <b>27</b> |
| <b>ÚLOHA Č.7 – STANOVENÍ PESTICIDŮ V KÁVĚ.....</b>   | <b>29</b> |
| <b>ÚLOHA Č.8 – STANOVENÍ PERSISTENTNÍCH ORGANICKÝCH POLUTANTŮ VE VODĚ POMOCÍ PASIVNÍHO VZORKOVÁNÍ.....</b>   | <b>31</b> |
| <b>ÚLOHA Č.9 – STANOVENÍ BROMOVANÝCH ZPOMALOVAČŮ HOŘENÍ (BFR), POLYAROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ (PAH), POLYCHLOROVANÝCH BIFENYLŮ (PCB) A ORGANOCHLOROVANÝCH PESTICIDŮ (OCP) VE FILTRU Z KLIMATIZAČNÍ JEDNOTKY .....</b> | <b>35</b> |

## Obecné informace a cíle předmětu

Výuka: jarní semestr, Přírodovědecká fakulta, MU

Rozsah 0/0/3

Ukončení: z, 4 kr.

Předpoklady: Znalost analytické chemie na úrovni základní přednášky

Chemie životního prostředí

Určeno pro studenty:

Přírodovědecké fakulty, obor biologie, chemie

Cíle předmětu:

Na konci tohoto kurzu bude student schopen:

- přenést teoretické poznatky o chování chemických látek v prostředí a procesech na fázových rozhraních získané v přednáškách z Environmentální chemie do úrovně praktických dovedností
- aplikovat analytické dovednosti získané v praktickém kursu Analytické chemie životního prostředí na pokročilé laboratorní experimenty
- interpretovat laboratorní výsledky z pohledu jejich osudu v prostředí
- předpovídat environmentální chování chemických látek na základě simulace v laboratorních podmínkách
- rozvinout laboratorní dovednosti a principy správné laboratorní praxe

Literatura:

SCHWARZENBACH, René P., Philip M. GSCHWEND a Dieter M. IMBODEN. *Environmental organic chemistry*. 2nd ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2003. xiii, 1313. ISBN 0-471-35750-2.

Výukové metody: Týdenní blokové laboratorní cvičení

Metody hodnocení: docházka, písemný test, práce v laboratoři, protokoly

Podmínky k získání zápočtu:

docházka – **100%** účast na všech laboratorních cvičeních

vstupní test - získání **minima 9 bodů (max. 15 bodů)**

práce v laboratoři – hodnotí se každá z úloh jednotlivě - hodnotí se zájem o danou problematiku, příprava, správná laboratorní praxe, pečlivost (**max. 4 body** za každou úlohu)

protokoly – každý protokol se hodnotí jednotlivě - za každý protokol **minimum 3 body (max. 5 bodů)**, Každý z vás vypracuje samostatně protokol za každou úlohu ze cvičení.

Podmínkou pro udělení zápočtu je získání **minima 36 bodů\*** za úspěšně řešená laboratorní cvičení (**max 60 bodů**). Body bude přidělovat cvičící jednotlivých cvičení na základě úspěšného dokončení příslušné úlohy.

\*u každé jednotlivé položky hodnocení je nutné získat alespoň minimální počet uvedených bodů. Nesplnění jakékoliv jedné z položek hodnocení vede k neudělení zápočtu.

#### Organizace cvičení:

Na začátku praktika budete podepisovat, že jste byli pro účely cvičení proškoleni o bezpečnosti práce v laboratoři a pro práci s chemickými látkami. Před zahájením praktika si tedy důkladně prostudujte kapitolu 2. Bez tohoto podpisu nemůžete praktikum absolvovat.

Prostudujte si, prosím, pečlivě všechny návody k úlohám. Veškerý materiál a pomůcky budou pro vás v laboratořích nachystány.

Během praktika si dělejte poznámky a zapisujte zejména všechny detaily k prováděným postupům a výsledkům. Kdykoliv něco nevíte, zeptejte se vyučujících. Některé části se provádí společně, ale většinu jednotlivých metod budete provádět samostatně nebo ve dvojicích.

Každý z vás vypracuje samostatně protokol za každou úlohu ze cvičení. Pozornost věnujte hlavně výsledkům a následné diskuzi.

Kontaktní osoba: RNDr. Petra Růžičková, Ph.D., ruzickova@recetox.muni.cz

## Bezpečnost práce v laboratoři

- Provoz na všech pracovištích, kde se pracuje s látkami nebo přípravky škodlivými zdraví, musí být upraven tak, aby tyto látky nemohly ohrozit pracovníky na těchto pracovištích, ani v okolí pracoviště, aby neohrožovaly podzemní a povrchové vody a aby neunikaly do ovzduší v koncentraci škodící zdraví, tj. nesmí být překročeny nejvyšší přípustné koncentrace pro pracovní prostředí. Musí být rovněž zajištěny asanační prostředky pro případ havárie.
- Hlavní zásadou při práci se škodlivými látkami a přípravky je preventivně se vyvarovat všech možností vzniku otrav (vyložit přímý kontakt pracovníků s těmito látkami), použít všech nezbytných ochranných prostředků (ochranných brýlí, rukavic, obličejových štítů, masek, atd.) a dodržovat všechny bezpečnostní předpisy.
- Při práci s látkami škodlivými zdraví není dovoleno jíst ani pít nebo kouřit. Před jídlem, pitím a kouřením v pracovních přestávkách a po skončení práce si musí pracovníci důkladně umýt ruce a obličej, podle povahy práce musí po jejím skončení provést důkladnou očistu celého těla. Pokud pracovník pracuje v ochranném oděvu, nesmí jíst ani pít po celou dobu, po kterou je v tomto obleku.
- Při práci je nutno se řídit zásadami správné laboratorní praxe.
- Při rozsypaní nebo rozlití škodlivé látky je nutno okamžitě zajistit její zneškodnění.
- Žíraviny nesmějí být přechovávány ve větší výšce, než je výše ramen pracovníka, který s nimi manipuluje (max. ve výšce 165 cm).
- Při zředování se vždy lije kyselina do vody a nikdy naopak. Kyselina se nalévá pomalu a opatrně, zvláště kyselina sírová.
- Při rozpouštění tuhého hydroxidu se musí sypat hydroxid po malých částech do vody za stálého míchání. Nikdy se nenalévá voda na hydroxid.
- Rozlitá kyselina dusičná se nesmí odstraňovat pilinami, hadry a jinými organickými látkami. Před odstraněním musí být zneutralizována a není-li to možné, tedy alespoň maximálně zředěna. Nádobí znečištěné organickými látkami se nesmí čistit kyselinou dusičnou (nebezpečí bouřlivých reakcí, vývin oxidů dusíku a samovznícení).
- Rozlité kyseliny, zejména koncentrované, je třeba nejprve opatrně zředit vodou, mírně zneutralizovat posypáním uhličitanem (např. soda, křída apod.) nebo politím zředěnými roztoky alkálií, následuje opatrné spláchnutí vodou nebo tekutinu necháme vsáknout do pilin, hadrů, apod. Při asanaci je nutno dbát na to, aby se nezamořila příliš velká plocha.
- Jakékoliv manipulace s látkami dýmovými, dráždivými, zapáchajícími a toxickými plyny se smějí provádět jedině v digestoři.
- Tuhé chemikálie se nesmí nikdy brát nechráněnou rukou.
- Žíravé, toxické a infekční kapaliny se smějí pipetovat jedině za použití bezpečnostních pipet, popř. sacího zařízení, které nedovolí vniknout kapalině do úst.
- Při všech manipulacích s látkami ve zkumavkách a otevřených nádobách musí být ústí nádob odvrácené od pracovníků do volného prostoru.
- Zátky lahví se nesmějí pokládat potřísněnou plochou na desku stolu (snížení možnosti poleptání, otravy a kontaminace).

## Základy studia environmentálních procesů

- Kyselinu chloristou je nutno uchovávat v lahvích se zabroušeným hrdlem a odděleně od ostatních chemikálií, zejména organických. Lahve s kyselinou chloristou se nesmějí pokládat na dřevěné regály, nýbrž na skleněné, porcelánové, keramické nebo jiné ohnivzdorné a jiné neabsorbující podložky, aby se stopy po rozlití mohly snadno odstranit.
- Chemické nádobí, které bylo použito pro práci s toxickými látkami nebo žiravinami, je nutné před dalším použitím dokonale vypláchnout. Obdobně musí být všechny lahve od toxických látek před jejich likvidací zbaveny zbytku obsahu.
- Laboratorní úlohy se vykonávají podle připraveného návodu pod dohledem určeného vedoucího. Manipulace s tlakovými lahvemi a redukčními ventily je povolena jen v přítomnosti a pod dozorem vedoucího praktika.
- Každý úraz, nehoda a způsobená škoda musí být neprodleně oznámeny vedoucímu laboratorního cvičení.

Potvrzuji svým podpisem, že jsem porozuměl(a) školené tématice a je mi známa odpovědnost za případné nedodržení či vědomé porušování uvedených pravidel.

| Poř. č. | UČO | Příjmení a jméno<br>(tiskacím písmem) | Studijní obor |  | ročník | Podpis |
|---------|-----|---------------------------------------|---------------|--|--------|--------|
|         |     |                                       |               |  |        |        |
|         |     |                                       |               |  |        |        |
|         |     |                                       |               |  |        |        |
|         |     |                                       |               |  |        |        |
|         |     |                                       |               |  |        |        |

## Organizace cvičení

Filosofií praktika je samostatná práce studentů. Pro cvičení je vytvořen časový harmonogram, který je předán studentům na začátku praktika. Harmonogram se může lišit podle počtu dnů praktika a počtu skupin studentů.

Každý student vypracuje protokoly pro všechny úlohy samostatně. Protokoly obsahují stručný popis cíle úlohy, popis případných odchylek postupu od návodu, přehledné výsledky včetně grafické podoby, komentář výsledků a odpovědi na stanovené otázky.

### Laboratorní cvičení 2019 - Rozpis úloh

Vstupní test+bezpečnost, hodnocení

- Úloha 1 str.8 Rozdělovací koeficient n-oktanol/voda,  
Lenka Sedláčková, sedlackova@recetox.muni.cz
- Úloha 2 str. 12 Jehličí jako pasivní vzorkovač ovzduší,  
Barbora Nežiková, nezikova@recetox.muni.cz/Jiří Palát, palat@recetox.muni.cz
- Úloha 3 (6) str. 27 Stanovení lipidů, polychlorovaných bifenyly a  
organochlorových pesticidů v másle, Pavla Fialová, fialova@recetox.muni.cz
- Úloha 4 (8) str. 31 Stanovení persistentních organických polutantů ve vodě pomocí  
pasivního vzorkování, Jaromír Sobotka, sobotka@recetox.muni.cz
- Úloha 5 (9) str. 35 Stanovení bromovaných zpomalovačů hoření (BFR),  
polyaromatických uhlovodíků (PAH), polychlorovaných bifenyly (PCB) a  
organochlorovaných pesticidů (OCP) ve filtru z klimatizační jednotky, Simona  
Jílková, simonaxjilkova@gmail.com

| <b>Rotace skupin</b> |           |               |                          |         |         |
|----------------------|-----------|---------------|--------------------------|---------|---------|
|                      |           |               | Sk. 1                    | Sk. 2   | Sk. 3   |
| úterý                | 12.3.2019 | 9:00 - 9:30   | vstupní test, bezpečnost |         |         |
|                      |           | 9:30 - 12:30  | úloha 1                  | úloha 2 | úloha 3 |
| úterý                | 12.3.2019 | 13:00 – 16:30 | úloha 2                  | úloha 3 | úloha 4 |
| středa               | 13.3.2019 | 9:00 – 12:30  | úloha 3                  | úloha 4 | úloha 5 |
| čtvrtek              | 14.3.2019 | 9:00 – 12:30  | úloha 4                  | úloha 5 | úloha 1 |
| čtvrtek              | 14.3.2019 | 13:00 – 16:30 | Úloha 5                  | úloha 1 | úloha 2 |

|   |   |
|---|---|
| <u>roztok naftalenu v n-oktanolu:</u><br>0,011 g naftalenu /5 ml n-oktanolu | Pozn. je nutné, aby byl naftalen dobře rozpuštěný |
| CAS No.*  | – je vhodné použít ultrazvuk                      |
| naftalen  | 91-20-3   |
| oktanol   | 111-87-5  |

\* Chemical Abstract Service Registry Number

## Úloha 1 – Rozdělovací koeficient n-oktanol/voda

**Úvod:** Distribuce organických nepolárních sloučenin mezi vodou a přírodní tuhé fáze (půda, sedimenty, aj.) nebo organismy může být v mnoha případech vyjádřena rozdělovacím procesem mezi vodnou fází a organickou hmotou přítomnou v přírodních tuhých fázích nebo biotě. Jako model s vodou nemísitelné organické fáze kumulující tyto látky byl vybrán n-oktanol, který reprezentuje lipidy v organismech nebo organický uhlík v půdách.

Bezrozměrný rozdělovací koeficient n-oktanol/voda ( $K_{ow}$ ) je jedním z nejdůležitějších a nejpoužívanějších deskriptorů chování chemických látek v životním prostředí. Rozdělovací koeficient n-oktanol/voda je definován jako poměr koncentrací látky v n-oktanolu ( $C_o$ ) a vodě ( $C_w$ ):  $K_{ow} = C_o/C_w$ . Často je vyjádřen také v logaritmickém tvaru  $\log K_{ow}$ .

**Princip:** Při stanovení rozdělovacích koeficientů máme dvě nemísitelné fáze a přidáme k nim malé množství chemické látky, která má schopnost rozpouštět se v obou. Po protřepání, když se ustaví rovnováha, změříme koncentrace látky v jednotlivých fázích. Pokud vyneseme do grafu závislost koncentrace v jedné fázi na koncentraci ve fázi druhé a pohybujeme-li se v oblasti nízkých koncentrací dostaneme lineární závislost, jejíž směrnice je rozdělovací koeficient. Přímková závislost pokračuje až do okamžiku, kdy je dosaženo stavu nasycení čili rozpustnosti.

**Úkol:** Stanovte rozdělovací koeficient n-oktanol/voda ( $K_{ow}$ ) naftalenu metodou třepací láhve

- 1.A Příprava a extrakce vzorku pomocí metody třepací láhve
- 1.B Stanovení naftalenu plynovou chromatografií
- 1.C Vyhodnocení GC chromatogramu
- 1.D Zpracování výsledků



1.A – Příprava a extrakce vzorku pomocí metody třepací láhve

**Pomůcky:**

- ✓ 1 x stojan
- ✓ 1 x dělicí nálevka s teflonovým kohoutem (500 ml)
- ✓ ultrazvuková lázeň
- ✓ 2 x odměrný válec (50 ml, 500 ml)
- ✓ 1 x nálevka
- ✓ 2 x kádinka (500 ml, 100 ml)
- ✓ Pasteurovy pipety
- ✓ 5 x vialka (22 ml)
- ✓ 2 x vialka (2 ml)
- ✓ pipety, špičky
- ✓ laboratorní rukavice
- ✓ dusík pro odpařování

**Chemikálie:**

- ✓ destilovaná voda
- ✓ dichlormethan (DCM) CAS No.\* 75-09-2
- ✓ bezvodý síran sodný 7757-82-6

\* Chemical Abstract Service Registry Number

**Postup práce:**

- ✓ do dělicí nálevky nalijte 500 ml destilované vody a roztok naftalenu v n-oktanolu
- ✓ směs třepajte přibližně 10 minut (pozn. během třepání je nezbytné postupně upouštět nahromaděné plyny v dělicí nálevce)
- ✓ po ustavení rovnováhy oddělte vrstvy (vodná fáze x oktanolová fáze)



vodná fáze:

- vodnou fázi přelijte zpět do destilovanou vodou promyté dělicí nálevky
- přidejte 20 ml DCM a třepejte přibližně 10 min
- po ustavení rovnováhy oddělte vrstvy
- organickou fázi vysušte síranem sodným a přefiltrujte přes Pasteurovu pipetu
- pod proudem dusíku vzorek zahustěte na 1 ml

oktanolová fáze:

- oktanolovou fázi odpusťte do předem připravené vialky
- přesušte síranem sodným a zfiltrujte přes vatičku v Pasteurově pipetě
- vzorek 10x nařed'te (900  $\mu$ l DCM a 100  $\mu$ l vzorku) a převed'te do vialky o objemu 2 ml

1.B - Stanovení naftalenu plynovou chromatografií

**Pomůcky:**

- ✓ plynový chromatograf s plamenově ionizačním detektorem HP6890
- ✓ přečištěný extrakt vzorku ve vialce

**Postup práce:**

- ✓ analýzu proved'te na GC-FID
- ✓ vialky se vzorkem postavte na zásobník dávkovače a podívejte se, jaké číslo patří tomuto místu
- ✓ zkontrolujte, zda je v dávkovači umístěna mikrolitrová stříkačka, nádobky s rozpouštědlem a nádobky na odpad
- ✓ v dialogovém okně zkontrolujte jméno metody JANA60.M
- ✓ **Sequence – save Sequence as** – pojmenovat
- ✓ v okně **Sequence/Sequence Parameters** запиšte jméno operátora, název souboru a popis vzorků
- ✓ **Sequence/Sequence Table** – vyplňte sekvenční tabulku a uložte sekvenci **Sequence/Save Sequence**
- ✓ spusťte analýzu **run Control – run Sequence**

### 1.C - Vyhodnocení GC chromatogramu

#### **Postup práce:**

- ✓ pro vyhodnocení výsledků přepněte program na analýzu dat (**View/Data Analysis**)
- ✓ otevřete si příslušnou kalibrační tabulku **Calibration/Calibration Table**
- ✓ otevřete soubor analýzy (**File/Load Signal**), zintegrujte chromatogramy (**Integration/AutoIntegrate**)
- ✓ vytiskněte report (**Report/Print Report**)
  
- ✓ v reportu je uvedena zjištěná koncentrace naftalenu ve vodě a n-oktanolu ve vialce v ng/ml

### 1.D - Zpracování výsledků

#### **Postup práce:**

- ✓ z experimentálně stanovených koncentrací naftalenu ve vodě a n-oktanolu vypočtete hodnotu  $\log K_{ow}$
- ✓ sestavte protokol, uveďte experimentálně zjištěnou hodnotu  $\log K_{ow}$  naftalenu a porovnejte ji s údaji v tabulkách

## Úloha 2 - Jehličí jako pasivní vzorkovač ovzduší

### Úvod:

Perzistentní organické polutanty (POPs) jsou skupinou látek, které jsou ve velké míře nebezpečné pro člověka z důvodu jejich toxicity, perzistence, akumulace v živých organizmech a schopnosti dálkového transportu. Jednou z možností vzorkování perzistentních organických polutantů je také biomonitoring a konkrétně využívání rostlinných indikátorů, které představují užitečný nástroj k hodnocení kontaminace volného ovzduší.

Jehličnaté stromy jako matrice vyskytující se v prostředí disponují dlouhou životností a dokážou efektivně sorbovat POPs během dlouhých časových období, nakolik obsahují na svém povrchu voskovou vrstvu, která je vysoko lipofilní.

### Princip:

Jehličí se vysuší v lyofilizátoru a vyextrahuje v organickém rozpouštědle. Po rozdělení vzorku na dvě části se převede sloupcová kapalinová chromatografie, kdy dojde k přečištění vzorků a volbou vhodného rozpouštědla k eluci analytů. Na gelové chromatografii dochází k rozdělování látek mezi pohyblivou část a nepohyblivou část mobilní fáze, čištění vzorků PAHs, které komplikuje značný podíl tuků. Instrumentálním finálním krokem je použití plynové chromatografie.

### Pomůcky:

alobal, PE sáček (zip lock)  
mlýnek  
laboratorní váhy  
automatický extraktor BUCHI  
papírové patrony  
přečištěná vata (DCM, 8 hodin)  
pasteurove pipety  
skleněné kolony (velké, malé)  
laboratorní sklo  
koncentrační turbovap nádobka  
Turbovap

### Chemikálie:

dichlormethan  
chloroform  
standarty na výtěžnost (PAHs a PCBs + OCPs)

čištěný silikagel (DCM, 8 hodin), aktivovaný silikagel (muflova pec), aktivovaný silikagel modifikovaný kyselinou sírovou

kyselina sírová

*n*-hexan

nonan

vnitřní standardy na výtěžnost (terfenyl a PCB-121)

### **Postup práce:**

Z vysušených jehlic si navažte přibližné množství 10 gramů a pomocí gumových rukavic oddělte jehlice od brachyblastů.

Jehlice rozemelte použitím mlýnku a zjistěte přesní navážku po vložení do papírové extrakční patrony. Do druhé patrony vložte a zvažte na analytických vahách brachyblasty. Na vrch položte kousek přečištěné vaty.

Patrony vložte do automatického extraktoru BUCHI a extrahujte použitím dichlormethanu jako rozpouštědla za použití programu 1 a 2. Zahuštěné vzorky převed'te do vialek.

Vzorky zkoncentrujte pod proudem dusíku na objem 1 ml a pomocí laboratorních vah a Pasteurovy pipety rozdělte na dva stejné objemy (analýza PAHs a analýza PCBs + OCPs).

Vzorky zasypte malým množstvím přečištěného silikagelu tak, aby vznikla homogenní sypká směs.

Sloupcová kapalinová chromatografie pro vzorky určené na analýzu PAHs:

do kolony dejte na spodek kousek přečištěné vaty, nasypte 5 g aktivovaného silikagelu + vzorek. Na vzorky opatrně nalijte 10 ml *n*-hexanu a poté co hladina *n*-hexanu klesne na úroveň silikagelu, dolijte 20 ml dichlormethanu. Eluáty jímejte do 40 ml vialek.

Sloupcová kapalinová chromatografie pro vzorky určené na analýzu PCBs + OCPs:

do velké kolony dejte na spodek kousek přečištěné vaty, nasypte 5 g aktivovaného silikagelu + 25 g aktivovaného silikagelu modifikovaného kyselinou sírovou (22 ml kyseliny sírové na 50 g aktivovaného silikagelu) + vzorek. Na vzorky opatrně nalijte 100 ml směsi *n*-hexan: dichlormethan (1:1). Eluáty jímejte do koncentračních turbovapových nádobek.

Použijte k přečištění vzorků PAHs gelovou permeační chromatografií, analyty jsou eluovány v době 25:00 – 41:40 (v minutách).

Vzorky PAHs zkoncentrujte pod proudem dusíku a vzorky PCBs + OCPs v odpařovacím systému Turbovap a převed'te do kónických minivialek, přidejte 50 µl nonanu.

Po odpaření vzorků na konečný objem 50 µl přidejte vnitřní standardy na výtěžnost (50 µl terfenylu pro PAHs a 50 µl PCB-121 pro PCBs + OCPs).

Vzorky jsou měřeny na stroji metodou GC-MS.

**Otázky:**

Porovnejte výsledné koncentrace látek PAHs, PCBs, OCPs jehlic a brachyblastů v přepočtu na navážku. S čím souvisí výška těchto koncentrací?

Porovnejte výšku koncentrací PAHs, PCBs a OCPs v jehlicích. Jaké jsou zdroje těchto látek v ovzduší a čím by se dali vysvětlit v případě tohoto vzorku, jestli víte, že vzorek byl odebrán ve Vysokých Tatrách v nadmořské výšce cca 1500 m.n.m.?

Zamyslete se, jestli se liší koncentrace celých jehlic, nastříhaných a namletých. Jestli ano, jakým způsobem?

0,01 M roztok CaCl<sub>2</sub>

0,5525 g/500 ml destilované vody

CAS No.\*

chlorid vápenatý

10043-52-4

roztok fenolu v ACN (100 mg/l):

0,002 g 2,4,6 trichlorfenol /20 ml acetonitril

## Úloha 3 - Adsorpce na půdu

### Úvod:

Znalost chování látek v půdě, sedimentu či kalu je z environmentálního hlediska velmi důležitá. Distribuce látky mezi půdu a vodní fází je komplexní proces, který je závislý na řadě faktorů: chemické vlastnosti látky, charakteru půdy, klimatických faktorech (teplota, déšť, sluneční záření, proudění vzduchu ...). Proto nemůže být proces jako takový simulován v laboratoři v jeho reálné šíři. Přesto může následující metodika poskytnout alespoň představu o adsorpční charakteristice látky.

Stěžejním parametrem osudu látek v těchto matricích je adsorpční koeficient  $K_d$ , který je definován jako poměr mezi koncentrací látky v půdě a koncentrací látky ve vodné fázi při adsorpční rovnováze.

$$K_d = C_{\text{soil}}/C_{\text{aq}}$$

### Princip:

Známé objemy roztoku testované látky o známé koncentraci v 0,01M roztoku CaCl<sub>2</sub> jsou přidány k půdnímu vzorku o známé hmotnosti. Směs se třepe stanovený čas. Půdní suspenze je poté oddělena centrifugací. Půdní i vodné vzorky jsou extrahovány a analyzovány.

### Úkol:

#### **Stanovte $K_d$ fenolu s využitím HPLC**

- 3.A Adsorpce fenolu na půdu
- 3.B Extrakce vzorků půdy ultrazvukem
- 3.C Stanovení fenolu pomocí HPLC
- 3.D Vyhodnocení HPLC chromatogramu

### 3.A – Adsorpce fenolu na půdu

#### **Pomůcky:**

- ✓ 4 x centrifugační zkumavka (objem 50 ml)
- ✓ třepačka
- ✓ centrifuga
- ✓ pipety, špičky
- ✓ 1 x odměrný válec (50 ml)
- ✓ 4 x vialka (2 ml)
  
- ✓ analytické váhy
- ✓ filtrační papír
- ✓ laboratorní rukavice
  
- ✓ půda – více uhlíku (5,5%), málo jílu

#### **Chemikálie:**

- ✓ 0,01M roztoku  $\text{CaCl}_2$
- ✓ roztok fenolu v methanolu (100 mg/l)

#### **Postup práce:**

- ✓ do 4 centrifugačních zkumavek ( $V = 50$  ml) navažte přibližně 5 g přesáté půdy a zkumavky popište
  
- ✓ ke vzorkům půd přidejte 36 ml 0,01M roztoku  $\text{CaCl}_2$  a 4 ml roztoku fenolu v methanolu
- ✓ vše umístěte na třepačku
- ✓ v časových intervalech 0, 3, 6 a 24 hodin odeberte vždy jednu zkumavku
- ✓ centrifugací oddělte půdní a vodnou suspenzi (4000 rpm/10 min)
- ✓ ve všech časech odeberte 1 ml vodné fáze do předem připravené minivialky a uložte do lednice do provedení analýzy
- ✓ v časech 0, 6 a 24 hodin oddělte půdní suspenzi a nechte ji do druhého dne vysušit na filtračním papíře



### 3.B – Extrakce vzorků půdy ultrazvukem

#### Pomůcky:

- ✓ ultrazvuková lázeň
- ✓ analytické váhy
- ✓ vakuové filtrační zařízení Baker
- ✓ 8 x kádinka (100 ml)
- ✓ 2 x odměrný válec (25 ml)
- ✓ stopky
- ✓ Pasteurovy pipety
- ✓ 4 x vialka (40 ml)
- ✓ 4 x vialka (2 ml)
- ✓ 3 x nylonový filtr
- ✓ dusík na odpařování

#### Chemikálie:

- ✓ methanol

#### Postup práce:

- ✓ připravte ultrazvukovou lázeň
- ✓ vysušenou půdu zvažte a nasypete do kádinky
- ✓ ke vzorku půdy nalijte 15 ml methanolu
- ✓ extrahujte 3x15 minut
- ✓ vždy po každém 15-minutovém cyklu extrakce odeberte Pasteurovou pipetou rozpouštědlo do předem připravené kádinky
- ✓ extrakt přefiltrujte přes Bakera



- ✓ objem roztoku ve vialce odpařte pod proudem dusíku na objem 1 ml

- ✓ pomocí Pasteurovy pipety převed'te zahuštěný extrakt do předem připravené minivialky a vialku vypláchněte malými dávkami methanolu
- ✓ je-li nutné, přefiltrujte vzorek přes filtrík
- ✓ vialku dobře uzavřete a uložte v ledničce do dalšího zpracování  
CAS No.\*
- ✓ methanol 67-56-1

### 3.C Stanovení fenolu pomocí HPLC

#### Pomůcky:

- ✓ kapalinový chromatograf
- ✓ chromatografická kolona Supelcosil LC-18

#### Chemikálie:

- ✓ voda čištěná na zařízení Milli-Q  
CAS No.\*
- ✓ methanol 67-56-1
- ✓ kyselina fosforečná 7664-38-2

#### Postup práce:

- 1) *příprava mobilní fáze*
  - ✓ solvent A: 150 ml redestilované vody + 80  $\mu$ l kyseliny fosforečné + 100 ml methanolu
  - ✓ solvent B: 100 ml methanolu
  - ✓ průtok mobilní fáze: 0,15 ml/min
  - ✓ isokratická eluce: 90% A+10% B
  - ✓ nástřik 20  $\mu$ l
  - ✓ analýza 1 vzorku ~ 13 min
- 2) *detekce*  
detekce – 230 nm, 280 nm
- 3) *metoda: c/2/hpchem/methods/Petra/fenol.m*

### 3.D - Vyhodnocení HPLC chromatogramu

#### Postup práce:

##### Úkoly:

- ✓ z koncentrací získaných z HPLC stanovení fenolu ve vodné a půdní frakci vypočítejte adsorpční koeficient  $K_d$

roztok fenolu v methanolu (100 mg/l):  
0,002 g 2,4,6 trichlorfenol /20 ml acetonitril

## Úloha 4 - Vytěkávání z půdy: Stanovte $K_{sa}$ fenolu s využitím HPLC

### Úvod:

Těkání z půdy je velmi složitý proces, který závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech látky (rozpuštnost ve vodě, tenze par, konstanta Henryho zákona, rozdělovací koeficient n-oktanol-voda  $K_{ow}$  nebo sorpční koeficient pro organickou složku půdy  $K_{oc}$ , fotolytická stabilita), environmentálních podmínkách (velikost povrchu půdy, holá půda vs. půda krytá vegetací, půdní struktura a pórovitost, teplota vzduchu a půdy, vlhkost půdy, vlhkost vzduchu, proudění vzduchu, obsah půdní organické hmoty, množství srážek apod.), skupenství aplikované látky (s, l, g) a typu aplikace (aplikace na povrch půdy vs. vpravení do půdy, aplikované množství). Některé látky se mohou vyskytovat jak v neutrální, tak v iontové formě v půdním roztoku. V závislosti na  $pK_a$  pesticidu, může být těkání ovlivněno hodnotou pH půdy.

Směr a velikost gradientu difúze jsou řízeny koncentrací (fugacitou) látky ve vzduchu a v půdě a rovnovážným rozdělovacím koeficientem půda/vzduch  $K_{sa}$ . Aby došlo k těkání látky z půdy, musí nejprve koncentrace (fugacita) látky v půdě překročit hodnotu koncentrace (fugacity) látky v okolním vzduchu. Koeficient  $K_{sa}$  je kritickým parametrem tohoto procesu.

### Princip:

Provedení experimentu s odpařovací komorou spočívá v přesávání vzduchu „zbaveného“ sledovaných látek pomocí 2 předčištěnými polyuretanovými filtry přes povrch půdy, která je kontaminovaná známou koncentrací látky, a následném zachycení látky odpařené z půdy na polyuretanovém filtru umístěném na výstupu komory.

### Úkol:

#### **Stanovte $K_{sa}$ fenolu s využitím HPLC**

- 4.A Příprava experimentu a odběr vzorku vzduchu nad kontaminovanou půdou
- 4.B Extrakce vzorku půdy ultrazvukem
- 4.C Extrakce exponovaného filtru ultrazvukem
- 4.D Stanovení fenolu pomocí HPLC
- 4.E Vyhodnocení HPLC chromatogramu

4.A – Příprava experimentu a odběr vzorku vzduchu nad kontaminovanou půdou

**Pomůcky:**

- ✓ 1 x odpařovací komora
  - ✓ 1 x nízkoobjemové čerpadlo
  - ✓ Pasteurovy pipety
  - ✓ 4 x polyuretanový filtr (2x čištěný, 2x nečištěný)
  - ✓ analytické váhy
  - ✓ laboratorní rukavice
- 
- ✓ půda – více uhlíku, málo jílu (5,5%)



**Chemikálie:**

- ✓ roztok fenolu v methanolu (100 mg/l)

**Postup práce:**

- ✓ do předem připravené odpařovací komory umístěte ~ 5g přesáté půdy
- ✓ na půdu pomocí Pasteurovy pipety aplikujte ve formě kapek 1 ml roztoku fenolu v methanolu
- ✓ přes noc nechejte ustavit rovnováhu
- ✓ na vstupu odpařovací komory umístěte nečištěný PUF
- ✓ na výstupu odpařovací komory umístěte nízkoobjemové čerpadlo spolu s čištěným PUF
- ✓ ráno spusťte 24-hodinový odběr
- ✓ запиšte stav timeru před odběrem do protokolu
- ✓ po 24 hodinách vypněte čerpadlo a запиšte stav timeru
- ✓ vyjměte exponovaný filtr a zabalte ho do dvou vrstev alobalu a uskladněte v mrazícím boxu

#### 4.B – Extrakce vzorku půdy ultrazvukem

##### **Pomůcky:**

- ✓ ultrazvuková lázeň
- ✓ analytické váhy
  
- ✓ vakuové filtrační zařízení Baker
- ✓ 2 x kádinka (100 ml)
- ✓ 1 x odměrný válec
- ✓ 2 x vialka (40 ml)
- ✓ 1 x vialka (2 ml)
- ✓ 1 x nylonový filtr
- ✓ dusík na odpařování

##### **Chemikálie:**

- ✓ methanol

##### **Postup práce:**

- ✓ připravte ultrazvukovou lázeň
- ✓ vysušenou půdu zvažte a nasypete do kádinky
- ✓ ke vzorku půdy nalijte 15 ml methanolu
- ✓ extrahujte 3x15 minut
- ✓ vždy po každém 15-minutovém cyklu extrakce odeberte Pasteurovou pipetou rozpouštědlo do předem připravené kádinky
- ✓ extrakt přefiltrujte přes Bakera
- ✓ objem roztoku ve vialce odpařte pod proudem dusíku na objem 1 ml
- ✓ pomocí Pasteurovy pipety převed'te zahuštěný extrakt do předem připravené minivialky a vialku vypláchněte malými dávkami methanolu
- ✓ je-li nutné, přefiltrujte vzorek přes filtřík
- ✓ vialku dobře uzavřete a uložte v ledničce do dalšího zpracování

#### 4.C Extrakce exponovaného filtru ultrazvukem

##### **Pomůcky:**

- ✓ ultrazvuková lázeň
- ✓ Pasteurovy pipety
- ✓ 2 x kádinka
- ✓ 1 x odměrný válec
- ✓ 1 x vialka (20 ml)
- ✓ 1 x vialka (2 ml)

##### **Chemikálie:**

- ✓ methanol

**Postup práce:**

- ✓ připravte ultrazvukovou lázeň
- ✓ exponovaný PUF vložte do kádinky
- ✓ přilijte 100 ml methanolu
- ✓ extrahujte 45 minut
- ✓ po celém cyklu extrakce odeberte Pasteurovou pipetou rozpouštědlo do předem připravené kádinky
- ✓ objem roztoku ve vialce odpařte pod proudem dusíku na objem 1 ml
- ✓ pomocí Pasteurovy pipety převed'te zahuštěný extrakt do předem připravené minivialky a vialku vypláchněte malými dávkami methanolu
- ✓ vialku dobře uzavřete a uložte v ledničce do dalšího zpracování

4.D Stanovení fenolu pomocí HPLC

**Pomůcky:**

- ✓ kapalinový chromatograf
- ✓ chromatografická kolona Supelcosil LC-18

**Chemikálie:**

- ✓ voda čištěná na zařízení Milli-Q
- ✓ kyselina fosforečná
- ✓ methanol

**Postup práce:**

*příprava mobilní fáze*

- ✓ solvent A: 150 ml redestilované vody + 80  $\mu$ l kyseliny fosforečné + 100 ml methanolu
- ✓ solvent B: 100 ml methanolu
- ✓ průtok mobilní fáze: 0,15 ml/min
  
- ✓ isokratická eluce: 90% A+10% B
- ✓ nástřik 20  $\mu$ l
- ✓ analýza 1 vzorku ~ 13 min

detekce – 230 nm, 280 nm

*metoda: c/2/hpchem/methods/Petra/fenol.m*

4.E - Vyhodnocení HPLC chromatogramu

**Postup práce:**

Úkoly:

- ✓ z koncentrací získaných z HPLC stanovení fenolu ve vzduchu a půdní frakci vypočítejte rozdělovací koeficient půda-vzduch  $K_{sa}$

## Úloha 5 – Analytická extrakce pesticidů z půdy a jejich stanovení metodou LC-MS/MS

### Úvod:

Pesticidy jsou látky určené k prevenci, ničení, potlačení, odpuzení či eliminaci škodlivých činitelů, tedy nežádoucích mikroorganismů, rostlin a živočichů během výroby, skladování, transportu, distribuce a zpracování potravin, zemědělských komodit a krmiv (definice FAO - Food and Agricultural Organization).

Využívání pesticidů umožňuje významné zvýšení zemědělské produkce a omezení ztrát produktů během sklizně a skladování. Pozitivním aspektem eliminace škůdců je také zvýšení kvality zemědělských produktů. Do životního prostředí se tak ovšem dostává nezanedbatelné množství cizorodých látek, které mohou působit i na jiné než cílové činitele a mohou působit na půdní a vodní ekosystém a také ohrozit lidské zdraví. Z těchto důvodů je sledování osudu a transportu pesticidů v prostředí nezbytné pro zhodnocení obsahu reziduí pesticidů ve složkách životního prostředí a navržení vhodných opatření pro jejich snížení. K tomuto účelu je nezbytné mít spolehlivou analytickou metodu zahrnující úpravu a zpracování vzorku analyzované matrice, extrakci pesticidů ze vzorku a finální analytickou instrumentální metodu. Stanovení obsahu pesticidů v jednotlivých matricích se uskutečňuje po jejich účinné extrakci metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. V současné době je jednou z nejrozšířenějších metod pro stanovení pesticidů metoda označovaná zkratkou QuEChERS (**Quick, Easy, Cheap, Effective Rugged, Safe**) založená na extrakci a vysolení pesticidů z homogenního vzorku s dostatečnou vlhkostí do organického rozpouštědla. K finální instrumentální analýze se používá především kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS).

Cílem této praktické úlohy je seznámení a zvládnutí metody QuEChERS pro stanovení vybraných pesticidů v půdách a zhodnocení účinnosti extrakce analytu z environmentální matrice porovnáním vstupní koncentrace a koncentrace stanovené metodou LC/MS/MS.

### Princip:

#### *Metoda QuEChERS má dvě základní etapy, extrakční a čistící.*

Vzorek půdy se proseje, aby se dosáhlo sjednocení povrchu půdních částic pro dosažení optimální extrakční účinnosti. Vzorek půdy musí být mít pro extrakci vlhkost minimálně 80%; proto musí být do půdy v extrakční zkumavce přidána voda. Následuje extrakce po přidání acetonitrilu a následné vysolení cílových analytů směsí solí (bezvodý síran hořečnatý, chlorid sodný a směs citronanů pro nastavení vhodného pH) do organické fáze. Směs solí vyvolá rozdělení směsi kapalin na vodnou fázi a fázi organického rozpouštědla. Extrakční zkumavka se uzavře, důkladně protřepe a odstředí.

Druhou etapou metody QuEChERS (obvykle pro vzorky rostlinného materiálu) je čištění extraktu metodou extrakce na pevnou fázi pomocí pevných částic sorbentu rozptýlených v extraktu (dispersive SPE). Část organické acetonitrilové fáze se přenesse do čisté zkumavky, která obsahuje bezvodý síran hořečnatý a různou kombinací sorbentů pro odstranění

nežádoucích složek v závislosti na typu vzorku. Síran hořečnatý odstraňuje zbytky vody v organické fázi. Sorbent PSA (silikagel s chemicky vázanou ethylenediamin-N-propyl fází obsahující primární a sekundární amíny) slouží k odstranění mastných organických kyselin, polárních pigmentů a cukrů při provádění analýzy pesticidů v potravinách. Chemicky modifikovaný oxid křemičitý (Silica-C18) k odstranění hydrofobních látek ve vzorku. Grafitizovaný neporezní uhlík (Envi-Carb) pro odstranění necílových polárních i nepolárních sloučenin. Tím se snižuje účinek matrice na finální instrumentální analýzu a zvýší se robustnost metody. V případě běžných vzorků půdy bez rostlinného materiálu lze čistící krok eliminovat a finální přípravu zjednodušit

### *Atributy metody*

**Quick** - má vysokou propustnost vzorků. Typicky osm vzorků lze připravit za méně než 30 min.

**Easy** - vyžaduje méně manipulaci s extrakty, než ostatní techniky; tj., je zapotřebí méně kroků.

**Cheap** - je zapotřebí méně sorbentu a méně času pro zpracování vzorků ve srovnání s jinými technikami.

**Effective** - jednoduchá technika poskytuje vysokou a přesnou úroveň výtěžků extrakce pro celou řadu různých typů sloučenin.

**Robust** - metoda vyhovuje pro velký počet sloučenin, včetně nepolárních a polárních sloučenin.

**Safe** - na rozdíl od jiných metod, nevyžaduje použití jakýchkoli chlorovaných rozpouštědel. Extrakce se typicky provádí za použití acetonitrilu, což je kompatibilní s GC i LC.

### **Cíl laboratorní úlohy:**

- Seznámit se prakticky s metodou extrakce pesticidů QuEChERS vhodnou pro extrakce pesticidů ze vzorků životního prostředí.
- Prakticky porovnat vybrané varianty metody QuEChERS s použitím SPE a bez SPE pro vzorky půdy obohacené směsí pesticidů.
- Seznámit se s instrumentací metody LC-MS/MS použité pro analýzu pesticidů v extraktech z půdy

### **Pomůcky:**

- polypropylenové zkumavky
- laboratorní váhy
- ultrazvuková lázeň
- centrifuga
- laboratorní sklo
- pipety



**Chemikálie:**

- bezvodý síran hořečnatý,  $MgSO_4$
- acetonitril pro reziduální analýzu pesticidů,  $CH_3CN$
- acetonitril pro LC/MS,  $CH_3CN$
- chlorid sodný,  $NaCl$
- směs citronanů sodných, 1 g  $Na_2Citr.2H_2O$  + 0.5 g  $Na_2HCitr.1.5H_2O$
- PSA (silikagel s chemicky vázanou ethylenediamin-N-propyl fází obsahující primární a sekundární amíny)
- Silica – C18 (silikagel modifikovaný uhlovodíkovými řetězci C18)
- Směs standardů pesticidů: Tebuconazol, Propiconazol, Pendimetalin, Chlorpyrifos.
- 5% roztok kyseliny mravenčí v acetonitrilu.

**Postup práce:****A. Extrakce pesticidů ze vzorků půdy obohacených směsí pesticidů.**

1. K navážce 5 gramů půdy v 50 ml PP zkumavce přidejte 100  $\mu$ l roztoku směsi standardů pesticidů ve směsi acetonitrilu a vody 20/80 v/v tak, aby výsledná koncentrace každého pesticidu byla 500ng/gram půdy. Půdu obohacenou pesticidy důkladně promýchejte na třepačce cca 1 hodinu a uchovejte 1 týden v chladničce k ustavení sorpční rovnováhy. (**Poznámka:** V případě blokových cvičení připraví předem vedoucí cvičení).
2. K půdě obohacené pesticidy a k půdě bez přidaných pesticidů (blank) přidejte 5 ml demineralizované vody a 10 ml acetonitrilu. Směs protřepejte ručně jednu minutu a poté 15 minut v ultrazvukové lázni.
3. K vytvořené suspenzi přidejte 4g  $MgSO_4$  + 1 g  $NaCl$  + směs citronanů (1 g  $Na_2Citr.2H_2O$  + 0.5 g  $Na_2HCitr.1.5H_2O$ ) a protřepejte po každém přidání cca 1 minutu. **Poznámka:** Po přidání síranu hořečnatého nutno dobře protřepat, aby se vytvořily ze síranu hrudky. Po přidání citronanů dochází k uvolnění tepla, proto je vhodné vzorky po prvotním protřepání ochladit kvůli méně stabilním pesticidům.
4. Zkumavku se směsí vložte do odstředivky na 5 minut při 3000 rpm.
5. Z horní oddělené kapalné vrstvy odeberte alikvotní podíl 5 x 1 ml pro další zpracování do PP zkumavky.

**B. Čištění extraktu pesticidů ze vzorků půdy a příprava vzorků k analýze.**

1. K 1 ml alikvotního podílu extraktu přidejte:
  - a. NIC
  - b. 150 mg  $MgSO_4$
  - c. 50mg PSA + 150 mg  $MgSO_4$
  - d. 50mg Silica-C18 + 150 mg  $MgSO_4$
  - e. 50mg Envi Carb + 150 mg  $MgSO_4$
2. Uzavřete zkumavku a protřepte v ruce 1 minutu.
3. Zkumavku vložte do odstředivky na 5 minut při 3000 rpm

4. Odeberte 0,5 ml extraktu do 2 ml vialky, přidejte 0,5ml H<sub>2</sub>O a 10 µl 5% HCOOH v acetonitrilu a 30 µl roztoku interního standardu IS (2µg/ml Metolachloru v acetonitrilu).

### C. LC/MS/MS analýza pesticidů v extraktech z půdy

Analýzu připravených vzorků a její vyhodnocení uskutečňte pod vedením analytika vyškoleného pro práci s LC-MS/MS. Součástí cvičení je demonstrace principů analytické techniky LC-MS/MS a analýza reálných vzorků.

### D. Objem experimentů

Část A-B proveďte v trojím opakování se vzorky půdy s různým obsahem organického uhlíku (TOC), jejichž počet bude stejný jako je počet pracovních skupin ve cvičení.

## Úkoly

1. Porovnejte účinnosti použitých postupů extrakce a čištění extraktů pro jednotlivé pesticidy.
2. Zhodnoďte rozdíly v účinnosti extrakce pro použité pesticidy z hlediska jejich fyzikálně chemických vlastností.
3. Na základě výsledků všech pracovních skupin zhodnoťte vliv TOC na účinnost extrakce pesticidů metodou QuEChERS.
4. Do závěrečné zprávy vložte fotografie (mobilním telefonem) zachycující a demonstrující jednotlivé části úlohy.
5. Navrhněte případné úpravy/rozšíření návodu do cvičení, umožňující zlepšit srozumitelnost textu a/nebo účinnost výuky.
6. Definujte problémy, které se vyskytli při v průběhu cvičení a navrhněte řešení.

## **Úloha 6 - Stanovení lipidů, polychlorovaných bifenyků a organochlorových pesticidů v másle**

### **Úvod:**

Polychlorované bifenyly (PCBs) a organochlorované pesticidy (OCPs) jsou perzistentní, toxické a bioakumulativní látky, které mohou podléhat dálkovému transportu. Na základě vlastností těchto látek a jejich škodlivosti pro člověka a ekosystém, je nutné tyto látky sledovat.

V této úloze budeme analyzovat vybrané látky v másle, jakožto reprezentanta živočišné produkce. Právě zvířata přichází během pastvy do těsného kontaktu s půdou a rostlinami, což vede k expozici vysokým koncentracím těchto látek.

### **Princip:**

Principem této metody je převést máslo do organické fáze, přičemž organickou fází rozdělíme na dvě části. Jedna část je využita na zjištění obsahu tuků, druhá část na samotnou analýzu polychlorovaných bifenyků a organochlorovaných pesticidů.

### **Pomůcky:**

- Laboratorní sklo

### **Chemikálie:**

- Dichlormethan (DCM)
- bezvodý síran sodný
- standardy na výtěžnost (PCB 30 a PCB 185)
- vnitřní standard (PCB 121)
- čištěný silikagel (DCM, 8 hodin), aktivovaný silikagel (muflová pec), silikagel modifikovaný kyselinou sírovou
- kyselina sírová
- hexan
- cyklohexan
- isopropanol

### **Postup práce:**

1. Navažte 2 g připraveného másla do zvážené skleněné nádoby (zapište si všechny váhy, nikoliv pouze navážku)
2. Přidejte 50 µl standardu na výtěžnost přímo na máslo.

3. Přidejte 32 ml isopropanolu a 40 ml cyklohexanu ke vzorku (poloviční objem rozpouštědel použijte jako blank), třepejte v ruce 1-2 min., dokud se máslo nerozpustí.
4. Přidejte 44 ml MQ vody (22 ml k blanku). Připravené vzorky třepejte 10 min. na třepače.
5. Abyste dosáhli dobrého rozdělení obou vrstev, centrifugujte vzorky. Poté převed'te organickou část do baňky s kulatým dnem.
6. Přidejte 40 ml směsi cyklohexan/isopropanol (20 ml k blanku) k vodné fázi a 10 min. třepejte na třepače. Odeberte organickou část a přidejte ji k již odebranému extraktu. Tento krok zopakujte ještě jednou.
7. Zvažte si hliníkové misky a 22ml vialky na analytických vahách.
8. Odpařte extrakt na rotační vakuové odparce na objem 10 ml, přidejte 50 ml hexanu a tuto směs odpařte na 10 ml. Kvantitativně převed'te vzorek do zvážené 22ml vialky.

#### **Stanovení obsahu tuků v másle**

9. Rozdělte získaný extrakt na poloviny podle hmotnosti, jednu část převed'te do zvážené hliníkové misky, druhá část zůstává ve vialce.
10. Odpařte alikvot v hliníkové misce pod proudem dusíku při teplotě 80 °C do sucha a poté zvažte.
11. Vložte hliníkovou misku do pece (105 °C/12 h), aby se vzorek úplně vysušil.

#### **Čištění a analýza**

12. Příprava kolony: předčištěná vata, 1 g aktivovaného silikagelu, 8 g silikagelu modifikovaného kyselinou sírovou, 1 g aktivovaného silikagelu and 2 g bezvodého síranu sodného.
13. Odpařte alikvot ve vialce na 2 ml a kvantitativně převed'te na připravenou kolonu.
14. Vzorek eluujte 40 ml směsí hexan/DCM (1:1).
15. Odpařte vzorek pod proudem dusíku při teplotě 30 °C na méně než 1 ml, převed'te do konické vialky, přidejte 50 µl vnitřního standardu PCB 121 a 50 µl nonanu. Takto připravený vzorek odpařte na konečný objem 50 µl.
16. PCBs/OCPs analýza probíhá na GC/MS-MS.

#### **Otázky:**

Jaké jsou zdroje PCBs a OCPs v půdách a rostlinách?

Existují nějaké limity pro obsah OCPs v másle? Pokud ano, porovnejte Vaše naměřené koncentrace s limity.

Existují i jiné metody pro extrakci lipidů? Pokud ano, uveďte do protokolu a citujte zdroj.

## Úloha 7 - Stanovení pesticidů v kávě

### Úvod:

Káva je jedním z nejrozšířenějších nápojů na světě nejenom kvůli stimulačnímu účinku kofeinu, který obsahuje. Podobně jako u většiny užitkových plodin, aplikace pesticidů na pěstování kávy je běžnou praxí pro zvýšení výnosů z produkce. Pesticidy se tak dostávají i do kávových zrn a mohou se vyskytovat i v nápojích připravených z nich.

Jedním z opatření zajištění bezpečnosti potravin je testování reziduí pesticidů. Analýza pesticidů v kávě je však náročná, protože káva obsahuje velké množství kofeinu a kyselé a polyfenolové matricové složky. Tyto látky jsou obvykle extrahovány spolu s cílovými analyty, tj. pesticidy a jejich rezidui, těžko se odstraňují a mohou způsobit komplikace během instrumentální analýzy.

V současné době je jednou z nejpoužívanějších metod pro stanovení pesticidů metoda označovaná zkratkou QuEChERS (**Q**uick, **E**asy, **C**heap, **E**ffective **R**obust, **S**afe) založená na extrakci a vysolení pesticidů z homogenního vzorku do organického rozpouštědla. Tato metoda se skládá z 2 kroků - extrakce a čištění. Přidání organického rozpouštědla ke vzorku a následné použití anorganických solí (bezvodý síran hořečnatý, chlorid sodný a směs citronanu pro nastavení vhodného pH) způsobí extrakci analytů do organické fáze. Směs solí vyvolá rozdělení směsi kapalin na vodní fázi a fázi organického rozpouštědla. Obvykle následuje čištění extraktu metodou extrakce na pevnou fázi pomocí pevných částic sorbentu rozptýlených v extraktu (dispersive SPE). Pro čištění vzorků kávy ale disperzní čištění SPE není vhodné, protože v konečném extraktu zůstává velké množství kofeinu. Z tohoto důvodu se používá čištění na silikagelové SPE koloně, které minimalizuje matricové efekty a zároveň snižuje množství kofeinu ve finálním extraktu. Na detekci a kvantifikaci pesticidů použijeme GC-MS.

### Postup:

1. Upravte pH připravených vzorků překapávané kávy na přibližně 8 pomocí 1M NaOH.
2. 10 ml kávy přeneste do 50ml centrifugační zkumavky, přidejte 10 ml acetonitrilu a 500 µl recovery standardu.
3. Do zkumavky přidejte extrakční soli z QuEChERS kitu a prudce míchejte 1 min.
4. Směs centrifugujte 5 min na 3000 g, přeneste 5 ml supernatantu do čisté vialky, přidejte 1.5 ml toluenu a vzorek odfoukejte pod proudem N<sub>2</sub> na přibližně 1 ml v termobloku vyhřátém na 40°C.
5. Silikagelovou SPE kolonu vypláchněte 2.5 ml dichlormethanu a 1 min ji sušte použitím vakua.
6. Na kondicionaci SPE kolony použijte 2x 2.5 ml n-hexanu.
7. Do manifoldu vložte sběrné vialky a koncentrované vzorky naneste na SPE kolony. Vialky vypláchněte 2x 1.5 ml 15% acetonu v hexanu (v/v) a roztok naneste na kolonu.
8. Analyty eluujte 2x 2.5 ml 15% acetonem v hexanu (v/v).
9. Vzorky odfoukejte pod proudem N<sub>2</sub> na přibližně 1 ml v termobloku vyhřátém na 40°C.
10. Přidejte 100 µl vnitřního standardu a vzorky odfoukejte pod proudem N<sub>2</sub> na přibližně 1 ml. Takto připravený vzorek bude analyzovaný na GC-MS.

**Úkoly:**

- naměřené koncentrace pesticidů [ng/vzorek] proved'te na [g/1 kg kávy] (data prezentujte ve vhodných zlomcích gramu, pokud je to nutné). Uvažujte, že hustota vzorku kávy je stejná jako hustota vody a pro přípravu 50 ml vzorku se použilo 8 g kávy. Uveďte postup výpočtu.
- získané koncentrace [g/kg kávy] porovnejte s evropskými limity pro obsah pesticidů v kávových zrnech (Maximum Residue Levels) a uveďte tyto limity do protokolu.
- vysvětlíte, jaké metody kontroly kvality jsme během práce se vzorkem používali a na co slouží.

## Úloha 8 - Stanovení persistentních organických polutantů ve vodě pomocí pasivního vzorkování

### Úvod:

Persistentní organické polutanty (POPs) jsou hydrofobní látky, téměř nerozpustné ve vodě a tudíž velmi složitě stanovitelné ve vodě s dostatečnou přesností. Rutinní vzorkování vody pomocí bodového odběru poskytuje informaci o kvalitě vody jako celku a pro daný okamžik. Při bodovém odběru jsou koncentrace POPs často pod limitem kvantifikace. Avšak pasivní vzorkování má výhodu poskytnout časově integrovaný vzorek díky dlouhé expozici v prostředí (měsíce). Pasivní vzorkování může být použito pro screeningové hodnocení (ne)přítomnosti POPs, které jsou volně rozpuštěné ve vodě v nesmírně nízkých koncentracích. Proto je pasivní vzorkování vhodně pro monitoring POPs ve vodním prostředí.

### Princip:

Exponované silikonové gummy jsou extrahovány organickým rozpouštědlem v Soxhletově extraktoru. Poté jsou vzorky převedeny do vhodného rozpouštědla pro přečištění na destruktivní silikagelové kolonce, kde je odstraněna většina matrice. Vzorky jsou dále změřeny na GC-MS/MS.

### Pomůcky:

- 70mL Soxhlety
- 250mL baňky se špičkou
- Chladicí systém
- Kuderna-Danish destilátor
- Laboratorní lžička
- Laboratorní váhy
- Pasteurovy pipety
- Pinzety
- Předčištěná bavlna (8h, dichlormethan)
- Silikonová guma 5.5×9.5×0.05 cm (homogenně nadávkovaná s performačními referenčními látkami)
- Varné kamínky
- Vodní lázeň

### Chemikálie:

- Aceton
- Dichlormethan
- Hexan
- Kyselina sírová
- Methanol
- Nonan
- Performační referenční látky (PRCs): D<sub>10</sub>-Biphenyl, PCB-1, PCB-2, PCB-3, PCB-10, PCB-14, PCB-21, PCB-50, PCB-55, PCB-78, PCB-104, PCB-145, PCB-204

- Předčištěný (aktivovaný) silikagel (Čištění: 12h, Dichlormethan, Soxhlet; Aktivace: 12h, 150 °C, Pec)
- Standard s nativními látkami (PCBs, OCPs, PBDEs)
- Standardy na výtěžnost (PCB-29,-185, 13C-PBDEs)
- Vnitřní standardy (PCB-121, 13C-BDE-77)

*PCBs = Polychlorované bifenyly; OCPs = Organochlorované pesticidy; PBDEs = Polybromované difenyl ethery*

### Postup:

- 1) Vytáhni exponované silikonové gummy z mrazničky a nech je zahřát na laboratorní teplotu.
- 2) Rozlož silikonové gummy na připravený kus hliníkové fólie s papírovými utěrkami.
- 3) Osuš silikonové gummy od zbytkové vody. Pokud jsou gummy pokryty rzí nebo biofilmem namokři si papírovou utěrku MQ vodou.
- 4) Připrav 250mL baňky se špičkou s varnými kamínky, naplněnou ~150 mL methanolu.
- 5) Vlož 6 silikonových gum do 70mL Soxhletů poskládaných do harmoniky.
- 6) Pro rozpouštědlový slepý vzorek použij přečištěný kousek bavlny.
- 7) Pro fabriční slepý vzorek použij 6 neexponovaných silikonových gum.
- 8) Přidej standardy pro výtěžnost (a nativní látky k jednomu fabričnímu slepému vzorku) na gummy v Soxhletu (přidej aliquot do referenční vialky):

| Standardy pro výtěžnost | Koncentrace (ng/mL) | Přídavek (μL) | Množství ng/vzorek |
|-------------------------|---------------------|---------------|--------------------|
| 13C-PBDEs               | 20                  | 50            | 1                  |
| PCB-29,-185             | 200                 | 50            | 10                 |
| Nativní látky           | Koncentrace (ng/mL) | Přídavek (μL) | Množství ng/vzorek |
| PBDEs                   | 20                  | 50            | 1                  |
| PCBs, OCPs              | 200                 | 50            | 10                 |

- 9) Extrahuj vzorky po dobu 1 hodiny na vodní lázni při 85 °C.
- 10) Po extrakci rozlož silikonové gummy na papírovou utěrku, aby vyschly.
- 11) Připoj Kuderna-Danish destilátor na baňku s extraktem.
- 12) Zredukuj extrakt na vodní lázni (85 °C) na minimální objem (1 mL).
- 13) Přidej 30 mL hexanu pro převod extraktu do hexanu a zredukuj objem na ~2 mL.
- 14) Destruktivní čištění:
  - a. Kolonka  $\varnothing$ 1cm naplněná odspodu: kousek bavlny, 1 g aktivovaného silikagelu, 8 g H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (44% hm.) modifikovaného silikagelu, 1 g neaktivovaného silikagelu, 2 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
  - b. Kvantitativně (3× vypláchni) přenes extrakt pomocí Pasteurovy pipety.
  - c. Proveď eluci se 40 mL roztoku DCM:hexan (1:1; V/V).
- 15) Zredukuj objem vzorku na vodní lázni (Kuderna-Danish destilátor; 55 °C, poté co se odpaří DCM zvyš teplotu na 80 °C) a přenes do minivialky (pokud nutné, tak více zredukuj pod jemným proudem dusíku).
- 16) Přidej 50 μL nonanu.
- 17) Přidej vnitřní standardy:



| Standard        | Koncentrace (ng/mL) | Přídavek (μL) | Množství ng/vzorek |
|-----------------|---------------------|---------------|--------------------|
| 13C-BDE-77,-138 | 100                 | 10            | 1                  |
| PCB-121         | 200                 | 50            | 10                 |

18) Zredukuj objem vzorku na 100 μL pod jemným proudem dusíku.

19) Změř vzorky pro obsah PCBs, OCPs, PBDEs na GC-MS/MS.

20) Zvaž vysušené silikonové gummy na laboratorních vahách.

### Úkoly do protokolu:

- 1) Proveď korekci surových dat na slepé vzorky a standardy na výtěžnost.
  - a. Add slepé vzorky: Odečti hodnotu slepého vzorku dané lokality s korespondujícím exponovaným vzorkem (pokud je hodnota rozpouštědlového slepého vzorku vyšší než hodnota slepého vzorku dané lokality, tak odečti hodnotu rozpouštědlového vzorku)
  - b. Add výtěžnost: Vypočti relativní výtěžnost standardu PCB-29 a PCB-185 na vypočtený průměr hodnot vzorků 100% Recovery. Poté hodnoty korigované na slepý vzorek normalizuj na průměr relativních výtěžností PCB-29 a PCB-185.
- 2) Vypočti relativní výtěžnost nativních látek pro určení výtěžnosti metody (data pouze po korekci na slepé vzorky)
  - a. Vypočti průměr hodnot ze vzorků 100% Recovery. Normalizuj hodnoty fabrikačního slepého vzorku z přidanými nativními látkami na průměr hodnot vzorků 100% Recovery.
- 3) Vypočti výtěžnost PRCs pro výpočet pomocí modelu a normalizuj data na PCB-104, PCB-145 a PCB-204.
  - a. Vypočti relativní výtěžnost exponovaného vzorku na průměr všech slepých vzorků a fabrikačních slepých vzorků (bez rozpouštědlového slepého vzorku).
  - b. Normalizuj na průměr PCB-104, PCB-145 a PCB-204
- 4) Dostaneš specifické hodnoty pro vzorek (parametry FA) vypočtené pomocí modelu a látkově specifické hodnoty rozdělovacího koeficientu mezi polymerem a vodou. Vypočti koncentrace ve vodě pomocí přiložených rovnic. Nejprve vypočti vzorkovací rychlost ( $R_s$ ; rov. 1), poté stupeň rovnováhy (DEQ; rov. 2) a nakonec koncentrace ve vodě ( $c_w$ ; rov. 3).

### Co musí protokol obsahovat:

- 1) Úvod – jeden odstavec obecně o pasivním vzorkování (2× reference)
- 2) Krátký popis metody – maximálně 4 řádky textu, musí obsahovat informace o množství přidaných standardů
- 3) Výsledky:
  - a. QA/QC
    - i. Úpravy dat (zda byly odečteny slepé vzorky, byla provedena korekce na standardy, atd. – co nejpodrobněji)
    - ii. Napiš zda byly nějaké slepé vzorky nad limitem kvantifikace, případně kolikrát vyšší hodnoty byly.
    - iii. Tabulka s výtěžností nativních látek = výtěžnost metody.
  - b. Tabulky s vypočtenými hodnotami (vypočtené  $R_s$ , DEQ a  $c_w$ ; vše zvlášť)
  - c. Vytvoř přehledové grafy

- d. Srovnaj nejvyšší vypočtené koncentrace pro skupiny látek PCB, OCP a PBDE s jinými lokalitami (př. polární oblasti)
- e. Srovnaj sumu koncentrace PBDEs s limity vodní rámcové směrnice (napíš, které kongenery jsou v sumě zastoupeny)

4) Závěr

Pošli také excelový soubor s výpočty.

**Otázky:**

- 1) Myslíš, že je pasivní vzorkování vhodné pro monitorování POPs ve vodě? (reference)
- 2) Proč je nutné využívat PRCs? A jaké typy látek se mohou využívat jako PRCs? (reference)
- 3) Jaký typ materiálu může být použit jako pasivní vzorkovač (příklad)? Můžeme vzorkovat také polární látky ve vodě pomocí pasivního vzorkování? (reference)
- 4) Najdi a porovnej rozdělovací koeficient mezi n-oktanolem a vodou ( $K_{ow}$ ) s danými rozdělovacími koeficienty mezi polymerem a vodou ( $K_{pw}$ ) (nižší, vyšší, trend?)

**Rovnice 1:**

$$R_s = FA \times M^{-0.47}$$

Kde  $R_s$  (L/d) je vzorkovací rychlost specifická pro látku a vzorek,  $FA$  (L/d) je hodnota specifická pro vzorek získaná z výpočtu z modelu,  $M$  je molární hmotnost látky.

**Rovnice 2:**

$$DEQ = 1 - \exp\left(-\frac{R_s t}{m_p K_{pw}}\right)$$

Kde  $DEQ$  je stupeň rovnováhy,  $t$  je vzorkovací čas (d),  $m_p$  je hmotnost vzorkovače použitého při extrakci (kg) a  $K_{pw}$  je specifická hodnota rozdělovací koeficientu mezi polymerem a vodou pro látku (L/kg)

**Rovnice 3:**

$$c_w = \frac{N_t}{m_p K_{pw} DEQ}$$

Kde  $c_w$  je koncentrace ve vodě (pg/L),  $N_t$  je naměřené množství ve vyextrahovaném vzorku (pg/sample)

## **Úloha 9 - Stanovení bromovaných zpomalovačů hoření (BFR), polyaromatických uhlovodíků (PAH), polychlorovaných bifenyliů (PCB) a organochlorovaných pesticidů (OCP) ve filtru z klimatizační jednotky**

*Extrakce filtru automatizovanou Soxhletovou extrakcí, zakoncentrování extraktu*

### **Pomůcky:**

- vzorek filtru z klimatizační jednotky
- jednorázové extrakční patrony
- předčištěná vata
- automatický extraktor Büchi B-811
- extrakční nádobka
- teflonové varné úštipky
- vialky EPA 20 ml
- jednorázové skleněné Pasteurovy pipety
- předvážky
- ochranné pracovní prostředky – rukavice, brýle, plášť

### **Chemikálie:**

- recovery standardy
- dichlormethan

### **Postup práce:**

- ustrižený kousek filtru (cca 1 g) navažte do jednorázové extrakční patrony
- v patroně vzorek přikryjte kouskem čišťené vaty a zavřete
- do extrakční nádobky nalijte rozpouštědlo (dichlormethan), cca 150 ml, přidejte teflonový varný úštipek
- extrahujte programem č. 1 (40 minut horký Soxhlet, 20 minut prokapávání rozpouštědlem)
- po ukončení extrakce zakoncentrujte vzorek programem č. 2 na objem menší než 10 ml
- převed'te vzorek do vialky 20 ml, původní extrakční nádobku promyjte alespoň 2x 1-2 ml dichlormethanem a přidejte k extraktu ve vialce
- odpařte extrakt pod proudem dusíku na objem cca 3-5 ml

*Rozdělení extraktu v poměru 3:7*

### **Pomůcky:**

- předvážky
- vialky EPA 10 ml

- jednorázové skleněné Pasteurovy pipety

**Postup práce:**

- vzorek rozdělte v hmotnostním poměru 7:3
- odfoukejte pod proudem dusíku na 0,5 – 1 ml, přidejte 5 ml hexanu a opět odfoukejte

***Čištění extraktu kolonovou chromatografií – 70 % frakce (PCB, OCP, PBDE)***

**Pomůcky:**

- skleněná kolona, vnitřní průměr 1 cm
- vialka o objemu 20 ml
- Pasteurova pipeta, vata
- minivialka o objemu 1 ml

**Chemikálie:**

- čištěný aktivovaný silikagel (aktivace 12 hod při 150°C)
- čištěný neaktivovaný silikagel
- silikagel modifikovaný kyselinou sírovou (22 ml koncentrované H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 50 g aktivovaného silikagelu)
- hexan, dichlormethan, nonan
- vnitřní standardy

**Postup práce:**

- připravte kolonu k separaci:
  - na dno kolony vložte smotek vaty
  - na něj nasypete asi 1 cm vysoký sloupec čištěného aktivovaného silikagelu, nad tuto vrstvu 5 g čištěného aktivovaného silikagelu modifikovaného kyselinou sírovou
  - tyčinkou mírně sklepejte
  - na vrchol sloupce nasypete 1-2 cm vrstvu neaktivovaného silikagelu a opět sklepejte
- aplikujte vzorek mokrou cestou na kolonu, promyjte původní vialku alespoň 2x 1 ml dichlormethanem, přidejte ke vzorku v koloně
- proveďte eluci 30 ml 50% dichlormethanu v hexanu do 20 ml vialky
- vzorek odfoukejte pod mírným proudem dusíku na cca 500 μl
- vzorek kvantitativně převedte do předem označené minivialky, přidejte 40 μl nonanu a odpařte na finální objem 40 μl
- přidejte vnitřní standardy
- minivialku pečlivě uzavřete a uschovejte v ledničce až do provedení analýzy

**Čištění extraktu kolonovou chromatografií – 30 % frakce (NFR, PAH)**

**Pomůcky:**

- skleněná kolona, vnitřní průměr 1 cm
- vialky o objemu 20 ml
- Pasteurovy pipety, vata
- minivialky o objemu 1 ml

**Chemikálie:**

- čištěný aktivovaný silikagel (aktivace 12 hod při 150°C)
- čištěný neaktivovaný silikagel
- síran sodný pro organickou analýzu
- hexan, dichlormethan, nonan
- vnitřní standardy

**Postup práce:**

- připravte kolonu k separaci:
  - na dno kolony vložte smotek vaty
  - na něj nasypete 5 g čištěného aktivovaného silikagelu
  - tyčinkou mírně sklepejte
  - na vrchol sloupce nasypete 1 cm vrstvu síranu sodného
- nejprve naneste dichlormethan do 1/3 kolony
- aplikujte vzorek mokrou cestou na kolonu, promyjte původní vialku alespoň 2x 1 ml dichlormethanem, přidejte ke vzorku v koloně
- proveďte eluci 20 ml dichlormethanem do 20 ml vialky
- proveďte eluci 20 ml acetonem:dichlormethanem v objemovém poměru 7:3 do 20 ml vialky
- vzorky odfoukejte pod mírným proudem dusíku na cca 500  $\mu$ l
- vzorky kvantitativně převedte do předem označených minivialek, přidejte 40  $\mu$ l nonanu a odpařte na finální objem 40  $\mu$ l
- přidejte vnitřní standardy
- minivialky pečlivě uzavřete a uschovejte v ledničce až do provedení analýzy

**Stanovení analytů plynovou chromatografií a vyhodnocení GC chromatogramu**

**Pomůcky:**

- plynový chromatograf s vysokorozlišovací hmotnostní detekcí
- přečištěný extrakt vzorku v minivialce