

**MUNI | RECETOX**

Přírodovědecká fakulta, Brno, Česká republika

# **Základy studia environmentálních procesů**

## **Laboratorní cvičení**

RNDr. Petra Růžičková, Ph.D.  
Mgr. Pavla Fialová  
Mgr. Petra Fišerová  
Mgr. Simona Rozárka Jílková, Ph.D.  
Mgr. Barbora Nežiková  
Mgr. Jiří Palát  
Mgr. Tomáš Persaň  
Mgr. Jaromír Sobotka  
Prof. RNDr. Jana Klánová, Ph.D.

© 2020 Masarykova univerzita  
ISBN 978-80-210-9684-4

## Obsah

1	Obecné informace a cíle předmětu .....	3
1.1	Organizace cvičení .....	4
1.2	Vzorový protokol .....	5
2	Bezpečnost práce v laboratoři .....	6
3	Úvod.....	8
4	Rozdělovací koeficient n-oktanol/voda .....	10
5	Stanovení Henryho konstanty .....	14
6	Adsorpce a vytěkávání analytů z půdy .....	16
6.1	Stanovení adsorpce fenolu na půdu.....	17
6.2	Stanovení rovnovážného koeficientu $K_{sa}$ pro fenol .....	19
7	Fotochemická degradace.....	21
8	Stanovení lipidů, polychlorovaných bifenyly a organochlorovaných pesticidů v másle .....	22
9	Stanovení persistentních organických polutantů ve vodě pomocí pasivního vzorkování.....	27
10	Extrakce mikrocystinů ze vzorků vody metodou SPE .....	34
11	Extrakce pesticidů v půdě metodou QuEChERS .....	39
12	Stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků (PAHs) ve vzorku ovzduší metodou GC-MS/MS 44	
13	Jehličí jako pasivní vzorkovač ovzduší .....	49
14	Stanovení zpomalovačů hoření ve vzorku prachu .....	54
14.1	Stanovení halogenovaných zpomalovačů hoření ve vzorku prachu .....	59
14.2	Stanovení organofosfátových esterů ve vzorku prachu .....	61
15	Stanovení metabolitů endokrinních disruptorů ve vzorcích moči.....	64

# 1 Obecné informace a cíle předmětu

Laboratorní cvičení Základy studia environmentálních procesů (E1230) je předmět určený studentům prvního semestru navazujícího magisterského studijního programu Životní prostředí a zdraví na Přírodovědecké fakultě, Masarykovy univerzity, vyučovaný v podzimním semestru.

Předmět volně navazuje na přednášky a výpočtový seminář předmětů E6050 a E6051 Osud toxických látek v životním prostředí. Náplní těchto kurzů je seznámení studentů s chemickými a fyzikálními zákonitostmi, které umožňují kvalitativní a kvantitativní popis osudu chemických látek v životním prostředí, zahrnující transport a rovnováhy látek mezi kompartmenty a jejich chemii v matricích a biomu. Cílem předmětu Základy studia environmentálních procesů je poté přenést teoretické poznatky o chování chemických látek v prostředí a procesech na fázových rozhraních do úrovně praktických dovedností. V rámci cvičení jsou zařazeny laboratorní úlohy zaměřené na environmentální procesy, transport a rovnováhu látek mezi kompartmenty, a látky z hlediska lidského zdraví, v souladu s náplní nového studijního oboru Životní prostředí a zdraví.

*Na konci kurzu bude student schopen:*

- rozumět a orientovat se v transportu, distribuci a chemii látek na základě vlastností jednotlivých látek a matric
- 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

Studenti v průběhu cvičení získají cenné praktické dovednosti s aktuálně používanými trendy, technikami a instrumentací moderní environmentální chemie. Studenti navíc budou postupovat maximálně samostatně tak, aby získali co nejvíce vlastních praktických laboratorních zkušeností a mohli samostatně realizovat všechny etapy laboratorních postupů, a to včetně vlastního vnímání souvislostí. Navíc si upevní znalost anglické terminologie, která je pro mezinárodní charakter environmentální chemie stěžejní.

## **Doporučená literatura:**

SCHWARZENBACH, René P., P. M. GSCHWEND a Dieter M. IMBODEN. Environmental organic chemistry. Third edition. Hoboken, New Jersey: Wiley, 2016. xvii, 1005. ISBN 9781118767238. info

SCHWARZENBACH, René P., P. M. GSCHWEND a Dieter M. IMBODEN. Environmental organic chemistry. 2nd ed. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2003. xiii, 1313. ISBN 0471357502. info

## 1.1 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.

Výuka cvičení probíhá blokově, v případě většího počtu studentů pravidelně na týdenní bázi dle rozvrhu, v dobře vybavených studentských laboratořích, umožňující praktické provedení i složitějších laboratorních úloh.

### Požadavky před započítáním praktika a jeho průběh:

Na začátku praktika budete proškoleni o bezpečnosti práce v laboratoři a pro práci s chemickými látkami. Pro přípravu na práci v laboratoři a vstupní test z bezpečnosti si před zahájením praktika důkladně prostudujte kapitulu 2. Bez úspěšného složení testu nemůžete praktikum absolvovat.

Prostudujte si, prosím, pečlivě všechny návody k úlohám a odpovězte si na přípravné otázky. Na začátku dané úlohy budete psát vstupní test, ze kterého je pro absolvování úlohy nutno získat 80 %.

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

Pozornost věnujte hlavně výsledkům a následné diskusi.

Předmět je zakončen získáním zápočtu a 4 ECTS kreditů.

### *Podmínky k získání zápočtu:*

1. docházka – **100%** účast na všech laboratorních cvičeních
2. vstupní test bezpečnost – získání **minima 9 bodů (max. 15 bodů)**
3. práce v laboratoři – každá z úloh se hodnotí jednotlivě – hodnotí se zájem o danou problematiku, příprava (vstupní test ke každé úloze), správná laboratorní praxe, pečlivost (**max. 4 body** za každou úlohu)
4. protokoly – každý protokol se hodnotí jednotlivě – za každý protokol **minimum 3 body (max. 5 bodů)**. Každý student vypracuje samostatně protokol ke každé úloze 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.

## 1.2 Vzorový protokol

Jméno a příjmení:	
Studijní program, semestr:	
Název předmětu:	
Datum zadání úlohy:	
Datum odevzdání protokolu:	
Název úlohy:	

---

**Úvod:** V úvodu uveďte co je předmětem (cílem) experimentální práce. . Stručně a jasně shrňte zdroje konkrétních látek a proč nás zajímá daná matrice. Uveďte možné způsoby vzorkování a následné zpracování vzorku. K faktům uveďte citace.

**Postup práce:** Postup práce je uveden ve studijních materiálech, a proto není nutné jej do protokolu kopírovat. Zdůrazněte princip daného zpracování vzorku a uveďte případné odchylky od postupu.

**Výsledky a vyhodnocení:** V této sekci uveďte výpočty, tabulky, grafy, případně jiné grafické znázornění výsledků. Při zpracování dat nezapomeňte na zaokrouhlování.

**Diskuse a závěr:** Konkrétní požadavky k této stěžejní sekci jsou uvedeny u jednotlivých úloh či se dozvíte od vyučujícího v konkrétním cvičení. Obecně uveďte slovní hodnocení a shrnutí dané úlohy. Diskutujte, o čem zjištěné výsledky vypovídají, například ve srovnání s naměřenými hodnotami z jiných studií. Odpovězte na otázky na konci úlohy.

**Reference:** Vložte použité zdroje citačním programem.

## 2 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. Při rozsypání nebo rozlití škodlivé látky je nutno okamžitě zajistit její zneškodnění.
- Hlavní zásadou při práci se škodlivými látkami a přípravky je preventivně se vyvarovat všech možností vzniku intoxikace (vyloučit přímý kontakt pracovníků s těmito látkami), použít všech nezbytných ochranných prostředků (pracovního oděvu ochranných brýlí, vhodného typu rukavic, obličejových štítů, masek atd.) a dodržovat všechny bezpečnostní předpisy.
- Při práci s chemikáliemi 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.
- Žíraviny nesmějí být přechovávány ve větší výšce, než je výše ramen pracovníka, který s nimi manipuluje (a zároveň 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, musí být 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, hader apod. Při asanaci je nutno dbát na to, aby se nezamořila příliš velká plocha.
- Jakékoliv manipulace s látkami dýmavými, 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 nebo balonku.
- 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 intoxikace a kontaminace).
- 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 žíraviny, 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 nebo jiná závada musí být neprodleně oznámeny vedoucímu laboratorního cvičení.
- Při práci s chemikáliemi a biologickými materiály je třeba se řídit souvisejícími statěmi Provozního řádu RECETOX, včetně příloh 1 a 2.

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

Datum a délka školení		30 min
Způsob ověření znalostí	Ústní	
Školící materiál:	Tento dokument; Související statě platné verze Provozního řádu RECETOXu včetně příloh č. 1 a 2; Provozních řádů laboratoří	
Jméno a podpis školitele		

č.	UČO	Příjmení a jméno	Studijní obor	sem/ročník	Podpis
1.					

### 3 Úvod

Životní prostředí je kontaminováno mnoha chemickými látkami, a to především díky lidské činnosti. Problematika vstupu látek do prostředí, jejich transportu a přeměn je komplikovaná a porozumění těmto jednotlivým fyzikálně-chemickým procesům může pomoci pochopit toxické působení na organismy včetně člověka.

Organické chemické polutanty dnes můžeme najít rozšířené prakticky po celé planetě, a to i na místech tisíce kilometrů vzdálených od místa původního použití. Dostávají se do jednotlivých složek prostředí z různých zdrojů, a to jak přírodních, tak i antropogenních. Ve většině případů dnes dominují vstupy z různých antropogenních technologií. Látky mohou být transportovány ve složkách, kam byly primárně emitovány, mohou přecházet přes mezifázové rozhraní do dalších složek prostředí, během tohoto svého transportu mohou být chemicky transformovány a vytvářet sekundární znečištění. Mohou se také díky svým vlastnostem kumulovat jak v abiotických složkách prostředí, tak v živých organismech, včetně člověka. Po vstupu do živých organismů mohou negativně ovlivnit zdraví, a proto je nezbytné porozumět vnějším a vnitřním koncentracím těchto látek s cílem hodnocení expozičních cest.

Laboratorní studie environmentálních procesů, které ovlivňují chování organických látek v prostředí, jsou nezbytné pro snazší pochopení těchto dějů a k získání dat sloužících jako podklad pro environmentální modelování. Specializované laboratorní kurzy, pro studenty magisterských programů vysokých škol, zaměřené na tuto problematiku, jsou přesto velmi ojedinělé.

Kurz zahrnuje experimenty stanovení fázových rovnováh, rozdělovacích a distribučních koeficientů, transportu látek mezi kompartmenty, bioakumulace a degradace. Úvodní úlohy jsou zaměřené na pochopení základních principů, které jsou pak aplikovány ve stanovování organických polutantů v běžně vzorkovaných matricích.

1. Stanovení rozdělovacího koeficient n-oktanol/voda  $K_{ow}$
2. Stanovení Henryho konstanty
3. Adsorpce a vytěkávání chemických látek z půdy
4. Fotochemická degradace
5. Stanovení lipidů, polychlorovaných bifenylů a organochlorových pesticidů v másle
6. Stanovení persistentních organických polutantů ve vodě pomocí pasivního vzorkování
7. Extrakce mikrocystinů ze vzorků vody metodou SPE
8. Extrakce pesticidů v půdě metodou QuEChERS
9. Stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků (PAHs) ve vzorku ovzduší metodou GC-MS/MS



10. Jehličí jako pasivní vzorkovač ovzduší
11. Stanovení zpomalovačů hoření ve vzorku prachu
12. Stanovení metabolitů endokrinních disruptorů ve vzorcích moči

## 4 Rozdělovací koeficient n-oktanol/voda

### Teoretický úvod:

V praxi (například při posuzování nebezpečnosti vybrané látky a povolení jejího užívání v průmyslu) se je nezbytné kvantifikovat vlastnosti látky. Důraz je kladen především na vlastnosti, které jsou potenciálně rizikové pro člověka či pro životní prostředí. Žíravost látky můžeme například odhadovat podle pH, těkavost podle teploty varu, radioaktivitu podle poločasu rozpadu a tak dále.

Z hlediska enviromentální chemie je jednou z nejdůležitějších charakteristik látky její chování v reálných ekosystémech. Bylo by jistě z určitého pohledu ideální, pokud by naše předpovědi (modely) a měření byly natolik přesné, že bychom s absolutní jistotou mohli říct, že pokud umístíme jeden gram této látky do prostředí, tak takové procento najdeme v půdě, jiné ve vodě a zase jiné množství ve flóře či fauně. Takto přesné údaje však nemáme. Navíc by se snadno mohlo stát, že tato přehnaná přesnost by byla více ku škodě než k užitku. Představme si modelovou situaci, že cisterna vezoucí určitou látku spadne do řeky a potřebujeme rychle vědět, jak nebezpečná je situace pro ryby. Při tak detailním popisu se musíme rozhodovat podle stovek čísel pro každý druh ryb.

Odhad toho, jak se látka bude chovat v systému ryba (živočich) - voda, tkví ve vytvoření modelového prostředí, které bude podobné rozhraní ryba-voda, se kterým se zároveň bude dobře pracovat v laboratoři. Z historických, praktických a ekonomických důvodů se role ryby ujal oktanol [1]. Ten dobře modeluje buněčnou membránu a díky tomu v něm naměřené koncentrace odpovídají koncentracím, které by pro danou látku byly naměřeny v biotě. Při experimentu přidáme sledovanou látku do nemísitelné soustavy voda/oktanol a po protřepání a ustanovení rovnováhy zjistíme koncentraci v oktanolu a ve vodě. Tím vlastně měříme lipofilitu (hydrofilitu) dané látky. Z těchto koncentrací můžeme dosazením do následujícího vzorce vypočítat rozdělovací koeficient oktanol voda [2].

$$K_{ow} = \frac{C_{oktanol}}{C_{voda}}$$

Všimněte si, že jednotky koncentrace látky v oktanolu a ve vodě se pokrátí a koeficient je tak bezrozměrná veličina. Dále si povšimněte, že čím větší je hodnota  $K_{ow}$ , tím musí být větší hodnota  $C_{oktanol}$  (případně menší hodnota  $C_{voda}$ ). Tudíž platí, že čím má látka větší hodnotu  $K_{ow}$ , tím je lipofilnější (hydrofobnější). Pro usnadnění se v praxi často pracuje s hodnotou  $\log(K_{ow})$ , jelikož  $K_{ow}$  různých látek se může lišit přes mnoho řádů.

### Princip:

Při stanovení rozdělovacích koeficientů máme dvě nemísitelné fáze a přidáme k nim malé množství chemické látky, která se rozpouští v obou. Směs protřepeme a po ustanovení rovnováhy změříme

koncentrace látky v obou fázích. Vyneseme-li do grafu závislost koncentrace v jedné fázi na koncentraci ve fázi druhé, budeme v oblasti nízkých koncentrací pozorovat lineární závislost, jejíž směrnice je totožná s rozdělovacím koeficientem. Lineární závislost pokračuje až do okamžiku, kdy je dosaženo stavu nasycení, resp. 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 Instrumentální analýza (provede pracovník stopové laboratoře)

1.C 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)
- automatické pipety, špičky
- odpařovací systém s dusíkem LabEva

#### Chemikálie:

- destilovaná voda
- dichlormethan (DCM)
- bezvodý síran sodný
- roztok naftalenu v oktanolu (0,011 g naftalenu v 5 ml oktanolu)
  - je důležité, aby byl naftalen dobře rozpuštěn, je proto vhodné použít ultrazvuk

#### Postup práce:

- do dělicí nálevky nalijte 5 ml roztoku naftalenu v *n*-oktanolu a 500 ml destilované vody

- směs třepajte přibližně 10 minut (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 dělicí nálevky promyté destilovanou vodou
- přidejte 20 ml DCM a třepajte 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
- odeberte 100  $\mu$ l vzorku, 10x jej naředte D převedte do mini-vialky



*Obrázek 1 Správné držení lahve při třepání*

## 1.B – Analýza

- bude provedena pomocí plynového chromatografu s hmotnostní detekcí

## 1.C – Zpracování výsledků

- z experimentálně stanovených koncentrací naftalenu ve vodě a *n*-oktanolu vypočtete hodnotu  $\log K_{ow}$
- sestavte strukturovaný protokol (úvod, princip, pracovní postup, výpočet a závěr), připojte odpovědi na následující dotazy

### *Doplňující dotazy*

*Porovnejte vypočtenou hodnotu s tabulkovou hodnotou, pokud se nerovnájí, vysvětlete, kde mohl vzniknout rozdíl?*

*Vyjmenujte důvody, proč se místo oktanolu nemůže použít ethanol?*

*Lze podle vás určit  $K_{ow}$  všech látek?*

*Proč je lepší určovat  $K_{ow}$  ze směrnice než z bodu?*

*Při jaké hodnotě rozdělovacího koeficientu je látka považována za silně lipofilní?*

### **Zdroje**

- [1] D. Mackay, A. K. D. Celsie, and J. M. Parnis, "The evolution and future of environmental partition coefficients," *Environ. Rev.*, vol. 24, no. 1, pp. 101–113, 2016.
- [2] S. Amézqueta, X. Subirats, E. Fuguet, M. Rosés, and C. Ràfols, "Octanol-Water Partition Constant," in *Handbooks in Separation Science*, C. F. B. T.-L.-P. E. Poole, Ed. Elsevier, 2020, pp. 183–208.

## 5 Stanovení Henryho konstanty

### Teoretický úvod

#### Rozdělovací koeficient

Pro popis distribuce látek mezi vodou a vzduchem se používá rozdělovací koeficient vzduch/voda  $K_{AW}$ , který je definován jako poměr rovnovážné koncentrace dané látky ve vzduchu k rovnovážné koncentraci ve vodě. Často bývá vyjádřen jako Henryho konstanta - H. Vztah mezi  $K_{AW}$  a Henryho konstantou může být vyjádřen pomocí zákona ideálního plynu touto rovnicí:

$$K_{AW} = \frac{c_A}{c_W} = \frac{H}{RT}$$

kde  $c_A$  je koncentrace analytu ve vzduchu,  $c_W$  je koncentrace ve vodě, H je Henryho konstanta, R je molární plynová konstanta a T je teplota. Pokud vyjádříme množství sloučeniny ve vzduchu a ve vodě jako  $c_A$  a  $c_W$ , můžeme získat tzv. bezrozměrnou Henryho konstantu, která odpovídá  $K_{AW}$ . Rozdělovací koeficient vzduch/voda se hojně používá v modelech osudu polutantů v životním prostředí.

*Jaké znáte jiné rozdělovací koeficienty?*

*Vyjmenujte příklady reálných situací v prostředí, pro jejichž modelování byste použili Henryho konstantu.*

Při stanovení Henryho konstanty pomocí headspace analýzy předpokládáme, že platí rovnice:

$$c_0 = c_A V_A + c_W V_W$$

kde  $c_0$  je koncentrace zkoumané látky na počátku experimentu v mg/ml,  $c_W$  je koncentrace ve vodné fázi po ustavení rovnováhy,  $c_A$  koncentrace v plynné fázi po ustavení rovnováhy,  $V_W$  je objem kapalné fáze a  $V_A$  objem plynné fáze.

*Otázky po absolvovaném praktiku:*

*Porovnejte Vámi změřenou Henryho konstantu s literaturou.*

### Úkol:

#### Stanovení Henryho konstanty pro benzen metodou head-space

I. Head-space

#### Pomůcky:

- 100 ml odměrná baňka

- kádinka
- 6x nádobka na head-space (25 ml)
- Plynotěsná stříkačka

**Chemikálie:**

- Mili-Q voda
- Benzen
- Dichloromethan (DCM)

**Postup práce:**

- připravte 100 ml roztoku 10  $\mu$ l benzenu ve vodě
- připravený roztok napipetujte do nádobek na head-space analýzu o objemech 1,5 ml, 2,5 ml, 3 ml, 5 ml, 7 ml a 10 ml
- nádobky pečlivě uzavřete a nechte ustanovit rovnováhu po dobu 24 hodin

II. Analýza plynné fáze pomocí plynové chromatografie

Stanovení množství benzenu v plynné fázi bude provedeno pomocí plynového chromatografu.

## 6 Adsorpce a vytěkávání analytů z půdy

### Teoretický úvod

#### Adsorpce na půdu

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 (např. 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:

$$K_d = \frac{c_{p\ddot{u}da}}{c_{voda}}$$

*Jaké znáte jiné rozdělovací koeficienty?*

*Vyjmenujte příklady reálných situací v prostředí pro které byste tento model použili?*

Znamé objemy roztoku testované látky o známé koncentraci v 0,01 M roztoku  $\text{CaCl}_2$  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.

#### Vytěkávání z půdy

Těkání z půdy je velmi složitý proces, který závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech látky (rozpuštnost ve vodě, tenze par, Henryho konstanta, 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.

*Těkání může být ovlivněno pH půdy. Jaké máme typy půd v ČR a jaké mají pH? Co z toho můžeme vyvodit?*

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

*Otázky po absolvovaném praktiku:*

*Diskutujte hlavní rozdíly mezi dříve používanými pesticidy (např. DDT nebo lindan) a nově používanými pesticidy (CUPs).*

## 6.1 Stanovení adsorpce fenolu na půdu

### I. Adsorpce na půdu

#### **Pomůcky:**

- 4 centrifugační zkumavky
- Třepačka
- Centrifuga
- Odměrný válec
- 4 minivialky (2 ml)
- Filtrační papír

#### **Chemikálie:**

- Půda (jíl do 5,5 %)
- Roztok fenolu v methanolu (100 mg/l)
- 0,01 M roztok  $\text{CaCl}_2$

#### **Postup práce:**

- do 4 centrifugačních zkumavek ( $V = 50 \text{ ml}$ ) navažte přibližně 5 g přesáté půdy
- ke vzorkům půd přidejte 36 ml 0,01M roztoku  $\text{CaCl}_2$  a 4 ml roztoku fenolu v methanolu
- vše umístěte na třepačku a 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

## II. Extrakce vzorku půdy

### Pomůcky:

- Ultrazvuková lázeň
- 2 kádinky
- Odměrný válec
- Vialky (2x 40 ml a 1x 2 ml)
- Nylonový filtr

### Chemikálie:

- Methanol

### Postup práce:

- vysušenou půdu zvažte a nasypete do kádinky
- ke vzorku půdy nalijte 15 ml methanolu
- extrahujte 3x 15 minut v ultrazvukové lázni
- vždy po každém 15ti minutovém cyklu extrakce odeberte extrakt do předem připravené kádinky
- extrakt přefiltrujte do vialky
- objem roztoku ve vialce odpařte pod proudem dusíku na objem 1 ml
- kvantitativně převedte zahuštěný extrakt do předem připravené minivialky
- je-li nutné, přefiltrujte vzorek přes nylonový filtr
- vialku dobře uzavřete a uložte v ledničce do dalšího zpracování

## III. Stanovení fenolu pomocí HPLC

Koncentrace fenolu ve vzorcích z půdy a z vody budou stanoveny pomocí HPLC.

## 6.2 Stanovení rovnovážného koeficientu $K_{sa}$ pro fenol

### I. Vzorkování vzduchu

#### Pomůcky:

- Odpařovací komora
- Nízkoobjemové čerpadlo
- Polyuretanové filtry (PUF) - čištěný a nečištěný
- Hliníková fólie

#### Chemikálie:

- Půda (jíl do 5,5 %)
- Roztok fenolu v methanolu (100 mg/l)

#### Postup práce:

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

### II. Extrakce vzorku půdy

#### Pomůcky:

- Ultrazvuková lázeň
- 2 kádinky
- Odměrný válec
- Vialky (2x 40 ml a 1x 2 ml)
- Nylonový filtr

#### Chemikálie:

- Methanol

#### Postup práce:

- vysušenou půdu zvažte a nasypete do kádinky
- ke vzorku půdy nalijte 15 ml methanolu
- extrahujte 3x 15 minut v ultrazvukové lázni

- vždy po každém 15ti minutovém cyklu extrakce odeberte extrakt do předem připravené kádinky
- extrakt přefiltrujte do vialky
- objem roztoku ve vialce odpařte pod proudem dusíku na objem 1 ml
- kvantitativně převedte zahuštěný extrakt do předem připravené minivialky
- je-li nutné, přefiltrujte vzorek přes nylonový filtr
- vialku dobře uzavřete a uložte v ledničce do dalšího zpracování

### III. Extrakce exponovaného filtru

#### Pomůcky:

- Ultrazvuková lázeň
- 2 kádinky
- Odměrný válec
- Vialky (2x 40 ml a 1x 2 ml)
- Hliníková fólie

#### Chemikálie:

- Methanol

#### Postup práce:

- Exponovaný PUF vložte do kádinky
- Přilijte 100 ml methanolu a přikryjte hliníkovou fólií
- extrahujte 45 minut v ultrazvukové lázni
- odeberte extrakt do vialky
- objem roztoku ve vialce odpařte pod proudem dusíku na objem 1 ml
- kvantitativně převedte zahuštěný extrakt do předem připravené minivialky
- vialku dobře uzavřete a uložte v ledničce do dalšího zpracování

### IV. Stanovení fenolu pomocí HPLC

Koncentrace fenolu ve vzorkách z půdy a z PUF budou stanoveny pomocí HPLC.

## 7 Fotochemická degradace

### Teoretický úvod

Fotochemické reakce hrály rozhodující úlohu v evoluci atmosféry i života na Zemi. Život na Zemi je zcela závislý na slunečním záření, a to nejen díky fotosyntéze rostlin. Na jedné straně fotochemické reakce mohou znamenat vznik nových a často nežádoucích sloučenin z přirozeného či antropogenního původu, na druhé naopak likvidaci látek životní prostředí znečišťujících díky foto degradaci - fotolýze. Fotolýza patří k nejdůležitějším přírodním degradačním procesům. Například v atmosféře je přímá fotolýza důležitou reakcí, nejefektivnějším eliminačním procesem v atmosféře pro většinu látek je reakce s fotochemicky generovanými reagenty jako jsou OH radikály, ozón nebo dusičnanové radikály.

*Jmenujte situace z běžného života, kdy se s fotochemií setkáváte.*

*Proč při užití některých léků nesmí pacient na sluneční záření?*

*Uvažujte, jak by se fotochemie dala využít v lékařství.*

## 8 Stanovení lipidů, polychlorovaných bifenyků a organochlorovaných pesticidů v másle

### **Teoretický úvod:**

Polychlorované bifenyly (PCBs) a organochlorované pesticidy (OCPs) jsou perzistentní, toxické, bioakumulativní a lipofilní látky, které mohou podléhat dálkovému transportu ("The Stockholm Convention" 2019). I přesto, že jsou tyto látky Stockholmskou úmluvou již zakázané, stále je v prostředí nacházíme.

*Zamyslete se, jak je možné, že i přes zákaz jsou tyto látky stále v prostředí.*

V minulém století se OCPs začaly aplikovat na pole proti působení škůdců. Rostliny vypěstované na těchto polích se buď využívaly jako krmivo pro dobytek anebo byly dále zpracovány na potraviny. Mohlo se stát, že nedošlo k okamžitému zpracování a bylo nutné uskladnění v silech. V 70. letech minulého století se PCBs používaly jako příměsi do barev, které se aplikovaly v silech anebo na krmné žlaby pro dobytek. Tímto způsobem se PCBs a OCPs dostávaly potravním řetězcem skrze dobytek až do člověka (Langenbach 2013).

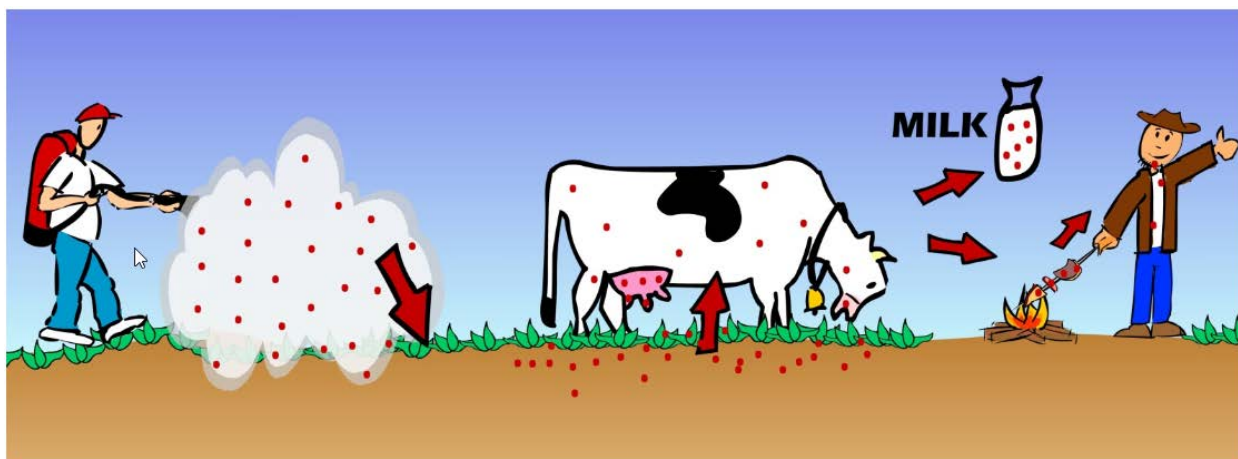
*Zamyslete se nad možnými důvody využívání těchto látek i přes jejich známou toxicitu, která byla potvrzena už v 70. letech minulého století. Myslíte si, že se něco podobného děje i teď?*

*Co byste zvolili jako vhodnou matici pro vzorkování PCBs a OCPs s ohledem na expozici člověka?*

Pro monitoring je tedy vhodné využívat například živočišné produkty, které mohou obsahovat vysoké množství tuku. Po konzumaci takového výrobku, např. másla, dojde k přesunu látek do lidského těla, kde dojde k opětovné akumulaci v tukové tkáni. Pokud by PCBs nebo OCPs byly obsaženy ve větším než povoleném množství, může se stát, že při každodenním přísunu dojde k negativním zdravotním projevům (Santillo et al. 2003).

*Jaké jsou vaše stravovací návyky? Kolik sníte másla týdně? A kolik jiných živočišných výrobků?*

*Vidíte výhodu bioproduktů nebo živočišných produktů z malých farem?*



Obrázek 1: Transport POPs biomagnifikací skrz dobytek až do živočišných produktů (Langenbach 2013)

### 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 bifenylů a organochlorovaných pesticidů.

### Pomůcky:

- laboratorní sklo
- nerezová špachtle
- laboratorní/analytické váhy
- hliníkové kalíšky
- horizontální třepačka
- centrifuga
- Pasteurovy pipety
- automatické pipety
- rotační vakuová odparka
- zahřívaný odpařovací systém s dusíkem
- pec

### Chemikálie:

- dichlormethan (DCM)
- bezvodý síran sodný
- standardy na výtěžnost (směs  $^{13}\text{C}$ -značených PCBs)

- vnitřní standard ( $^{13}\text{C}$ -PCB 95)
- čištěný silikagel (DCM, 8 hodin)
- aktivovaný silikagel (muflová pec)
- silikagel modifikovaný kyselinou sírovou (44% hm.)
- kyselina sírová, 98%
- hexan
- cyklohexan
- isopropanol
- mili-Q voda
- nonan

#### **Postup práce:**

1. navažte ~2 g připraveného másla ( $m_1$ ) do skleněné nádoby
2. přidejte 50  $\mu\text{l}$  standardu na výtěžnost přímo na vzorek másla, přidejte stejné množství do mini-vialky jako referenci
3. přidejte 32 ml isopropanolu a 40 ml cyklohexanu ke vzorku (poloviční objem rozpouštědel použijte jako blank), třepajte v ruce 1-2 minuty, dokud se máslo nerozpustí
4. přidejte 44 ml mili-Q vody (22 ml k blanku), připravené vzorky třepajte 10 minut na horizontální třepačce, mezitím si připravte směs cyklohexan:isopropanol (87:13, v:v)
5. abyste dosáhli dobrého rozdělení obou vrstev, centrifugujte vzorky a poté převed'te organickou část do 250ml baňky s kulatým dnem
6. přidejte 40 ml směsi cyklohexan/isopropanol (20 ml k blanku) k vodné fázi a 10 minut třepajte na třepačce - pokud je to nutné, použijte centrifugu, poté odeberte organickou část, přidejte ji k již odebranému extraktu a tento krok zopakujte ještě jednou
7. zvažte si hliníkové misky na organickou fázi (část vzorku obsahující máslo -  $m_2$ ), 22ml vialky na všechny vzorky a blanky ( $m_3$ ) na analytických vahách
8. odpařte extrakty na rotační vakuové odparce na objem ~10 ml, přidejte ~50 ml hexanu a tuto směs dále odpařte na rotační vakuové odparce na objem ~10 ml
9. kvantitativně převed'te vzorek do zvažené 22ml vialky

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

10. část vzorku obsahující máslo rozdělte na poloviny podle hmotnosti, jednu část převed'te do zvažené hliníkové misky, druhá část zůstává ve vialce
11. odpařte rozpouštědlo v hliníkové misce pod proudem dusíku při teplotě 80 °C do sucha a



poté zvažte ( $m_4$ )

12. vložte hliníkovou misku do pece (105 °C/12 h), aby se vzorek úplně vysušil a opět zvažte ( $m_5$ )

#### **Čištění a analýza PCBs a OCPs**

13. příprava kolony: předčištěná vata, 1 g aktivovaného silikagelu, 8 g silikagelu modifikovaného kyselinou sírovou, 1 g aktivovaného silikagelu a 2 g bezvodého síranu sodného
14. odpařte alikvoty ve 22ml vialkách na ~2 ml a kvantitativně převedte na připravené kolony
15. vzorky eluujte 40 ml směsí hexan:DCM (1:1)
16. odpařte vzorky pod proudem dusíku při teplotě 35 °C na méně než 1 ml a převedte do kónických mini-vialek
17. přidejte 50 µl vnitřního standardu <sup>13</sup>C-PCB 95 a 50 µl nonanu, takto připravené vzorky odpařte na konečný objem 100 µl

#### **Vyhodnocení:**

1. Vypočítejte procentuální množství tuku v másle a porovnejte s deklarovaným množstvím tuku udávaným na obalu.
2. Přepočítejte výsledky z ng/vzorek na ng/g tuku.
3. Vytvořte přehledové grafy pro PCBs a OCPs.

#### *Otázky:*

*Jaké jsou zdroje PCBs a OCPs v půdách a rostlinách? (uved'te reference)*

*Existují nějaké limity pro obsah PCBs v másle? Pokud ano, porovnejte naměřené*

*koncentrace s limity. (uved'te reference)*

*Existují jiné metody pro extrakci lipidů? Uved'te příklady. (uved'te reference)*

#### **Reference:**

Langenbach, Tomaz. 2013. "Persistence and Bioaccumulation of Persistent Organic Pollutants (POPs)." In *Applied Bioremediation - Active and Passive Approaches*. InTech. <https://doi.org/10.5772/56418>.

Santillo, D, A Fernandes, R Stringer, R Alcock, M Rose, S White, K Jones, and P Johnston. 2003. "Butter as an Indicator of Regional Persistent Organic Pollutant Contamination: Further Development of the Approach Using Polychlorinated Dioxins and Furans (PCDD/Fs), and Dioxin-like Polychlorinated Biphenyls (PCBs)." *Food Additives and Contaminants* 20 (3): 281–90. <https://doi.org/10.1080/0265203021000057494>.

"The Stockholm Convention." 2019. 2019. <http://chm.pops.int/Home/tabid/2121/Default.aspx>.

## 9 Stanovení persistentních organických polutantů ve vodě pomocí pasivního vzorkování

### **Teoretický úvod:**

Persistentní organické polutanty (POPs) jsou hydrofobní látky, ve vodě téměř nerozpustné, bioakumulativní s dlouhým poločasem rozpadu ("The Stockholm Convention" 2019). I přesto, že jsou ve vodě velmi složitě stanovitelné s dostatečnou přesností, je důležité znát v jakých koncentracích se ve vodě nachází právě díky řadě problémům, které mohou způsobovat, a které nemusí být na první pohled znatelné. Jedná se převážně o biomagnifikaci skrze potravní řetězce, přes ryby až do člověka, který je na vrcholu potravního řetězce (Deribe et al. 2011). V lidském těle mohou způsobovat řadu problémů jako alergie, hormonální nerovnováhu, či rakovinu (El-Shahawi et al. 2010).

*Popište jak se POPs dostávají skrze vodní prostředí až do oceánů.*

Otázkou je, jak se tyto látky do vodního prostředí dostávají. Pokud se POPs z primárního zdroje dostanou do řek, tak jsou potom tyto látky unášeny až do oceánů anebo může dojít k odpaření do atmosféry. Existuje několik procesů, které jsou spojené s transportem a distribucí POPs ve vodě. Ve spojení s atmosférou se POPs mohou dostávat do vody pomocí suché a mokré atmosférické depozici a naopak může docházet k vypařování POPs zpět do atmosféry (Holoubek and Klánová 2007). Dále ve spojení se sedimenty může docházet k usazování POPs, které se navážou na pevné částice, anebo jsou na částicích unášeny oceánskými proudy. Právě sedimentace v oceánech v chladnějších oblastech je předpokládanou „studní“ pro POPs v globální měřítku (Dachs et al. 2002).

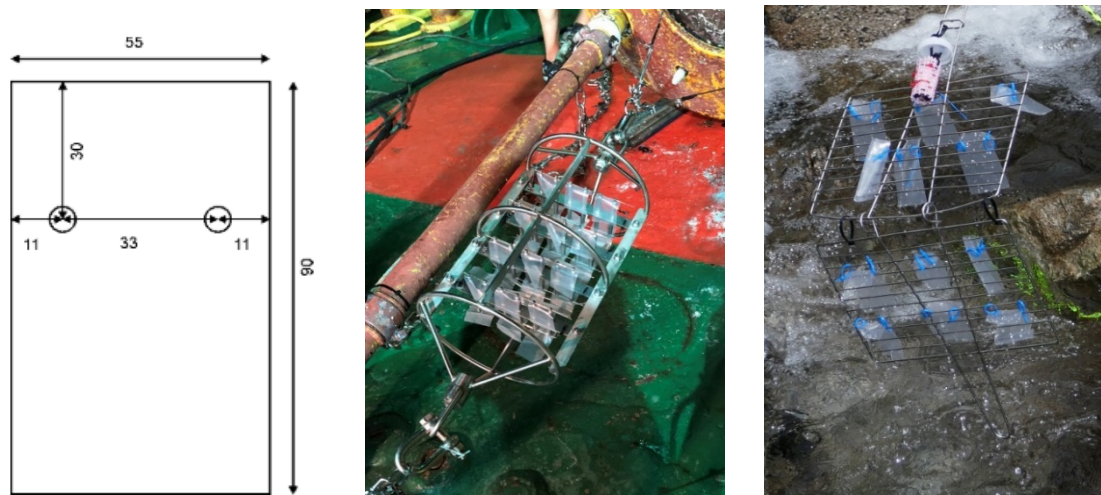
*Jaké jsou rozdíly a principy aktivního a pasivního vzorkování?*

*Jaké jsou hlavní výhody a nevýhody pasivního a aktivního vzorkování?*

Jak tedy můžeme tyto látky změřit? Rutinní vzorkování vody pomocí bodového odběru poskytuje informaci o kvalitě vody jako celku (částice, volně rozpuštěné látky, koloidy) a pro daný okamžik. Při bodovém odběru jsou koncentrace POPs často pod limitem kvantifikace. Oproti tomu pasivní vzorkování má výhodu poskytnout časově integrovaný vzorek díky dlouhé expozici v prostředí (neustálá absorpce po dobu expozice). Pasivní vzorkování může být použito pro ověřovací hodnocení (ne)přítomnosti POPs, které jsou volně rozpuštěné ve vodě v nesmírně nízkých koncentracích (fg/l) (Greenwood, Mills, and Vrana 2007). Je také možné použít pouze jeden typ pasivního vzorkovače na různé typy vod – mořská voda, čerstvá voda, brakická voda. Expozice je také možná v oblastech se složitým přístupem bez zdroje elektrické energie – Arktické oblasti, vysokohorská jezera, oceánské

bóje. Proto je pasivní vzorkování vhodné pro monitoring POPs ve vodním prostředí (Lohmann et al. 2017).

*Myslíte si, že různé podmínky na vzorkovacích lokalitách ovlivňují vzorkování? Berte v potaz salinitu a teplotu vody s množstvím slunečního záření.*



**Obrázek 1:** Vlevo – standardní rozměr štítu pasivního vzorkovače používaného pro expozici ve vodním prostředí. Uprostřed – Vzorkovací klec využívaná pro expozice pasivních vzorkovačů v oceánech, na monitorovacích bójích. Vpravo – Mřížka na grilování adaptovaná jako základní kostra pro expozici pasivních vzorkovačů ve sladkovodních tělesech (řeky, jezera)

#### **Princip:**

Exponované silikonové gummy jsou extrahovány organickým rozpouštědlem v Soxhletově extraktoru. Poté jsou vzorky převedeny do vhodného rozpouštědla pro přečištění na koloně s modifikovaným silikagelem ( $H_2SO_4$ ), 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/skelná vata (8h, dichlormethan)

- silikonová guma 5,5×9,5×0,05 cm (homogenně nadávkovaná s performačními referenčními látkami; performance reference compounds (PRCs))
- varné kamínky
- vodní lázeň

#### Chemikálie:

- aceton
- dichlormethan (DCM)
- destilovaná voda
- hexan
- kyselina sírová, 98%
- methanol
- nonan
- 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)
- standardy na výtěžnost (<sup>13</sup>C-značený mix PCBs a OCPs, <sup>13</sup>C-značené PBDEs)
- vnitřní standardy (<sup>13</sup>C-značený PCB 95, <sup>13</sup>C-značený BDE 77, 138)

*PCBs = polychlorované bifenyly; OCPs = organochlorované pesticidy; PBDEs = polybromované difenyl ethery*

#### Postup:

- 1) vytáhněte exponované silikonové gummy z mrazničky a nechte je zahřát na laboratorní teplotu
- 2) rozložte silikonové gummy na připravený kus hliníkové fólie s papírovými utěrkami
- 3) osušte silikonové gummy od zbytkové vody, pokud jsou pokryty rzi nebo biofilmem, namokřete papírovou utěrku destilovanou vodou a otřete
- 4) připravte 250ml baňku se špičkou a varnými kamínky, naplněnou ~150 ml methanolu
- 5) vložte 6 silikonových gum poskládaných do harmoniky do 70ml Soxhletů
- 6) na rozpouštědlový slepý vzorek použijte prázdný 70mL Soxhlet
- 7) na procesní slepý vzorek použijte 6 neexponovaných silikonových gum (s nadávkovanými PRCs)

- 8) přidejte standardy pro výtěžnost na gummy v Soxhletu (přidejte stejné množství do referenční vialky):

Standardy pro výtěžnost	Koncentrace (ng/ml)	Přídavek ( $\mu$ l)	Množství ng/vzorek
$^{13}$ C-značené PBDEs	20	50	1
$^{13}$ C-značené PCBs a OCPs	200	50	10



*Obrázek 2: Vlevo – Sestavená aparatura pro extrakci silikonových gum – 250ml baňka se špičkou, Soxhlet se silikonovými gumami poskládanými do harmoniky, chladič. Vpravo – Neočištěné silikonové gummy po expozici.*

- 9) extrahujte vzorky po dobu 1 hodiny na vodní lázni při 85 °C
- 10) po extrakci rozložte silikonové gummy na papírovou utěrku, aby vyschly
- 11) připojte Kuderna-Danish destilátor na baňku s extraktem
- 12) zredukujte extrakt na vodní lázni (85 °C) na minimální objem (1 ml)
- 13) přidejte 30 ml hexanu pro převod extraktu do hexanu a zredukujte objem na ~2 ml
- 14) čištění na koloně:
  - a. kolonka  $\varnothing$ 1cm naplněná odspodu: kousek bavlny/skelné vaty, 1 g aktivovaného silikagelu, 8 g  $H_2SO_4$  (44% hm.) modifikovaného silikagelu, 1 g neaktivovaného silikagelu, 2 g  $Na_2SO_4$
  - b. kvantitativně (3× vypláchněte) přeneste extrakt pomocí Pasteurovy pipety
  - c. proveďte eluci se 40 ml roztoku DCM:hexan (1:1; V/V)
- 15) zredukujte objem vzorku na vodní lázni (Kuderna-Danish destilátor; 55 °C, poté co se odpaří DCM zvyšte teplotu na 80 °C) a přeneste kvantitativně do minivialky (pokud nutné, tak více zredukujte pod jemným proudem dusíku)
- 16) přidejte 50  $\mu$ l nonanu
- 17) přidejte vnitřní standardy:

Standard	Koncentrace (ng/ml)	Přídavek ( $\mu$ l)	Množství ng/vzorek
<sup>13</sup> C-značené BDE 77, 138	100	10	1
<sup>13</sup> C-značené PCB 95	200	50	10

18) zredukujte objem vzorku na 100  $\mu$ l pod jemným proudem dusíku

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

20) zvažte vysušené silikonové gumy na laboratorních vahách

### Úkoly do protokolu:

#### Výpočet PRCs

- 1) vypočtete výtěžnost PRCs pro výpočet pomocí modelu a normalizujte data na PCB 104, PCB 145 a PCB 204 (vždy použijte data z předcházejícího kroku)
  - a. nejprve přepočtete hodnoty PRC z ng/vzorek na ng/g gumy (použijte hmotnosti uvedené v excelovém souboru, list *info* pro všechny vzorky a slepé vzorky, pro něž je uvedena hodnota hmotnosti)
  - b. vypočtete relativní výtěžnost *exponovaného vzorku* na průměr všech *slepých vzorků* a *procesních slepých vzorků* (bez *rozpouštědlového slepého vzorku*)
  - c. normalizujte na průměr PCB 104, PCB 145 a PCB 204 vždy pro daný vzorek

#### Výpočet PCBs, OCPs a PBDEs

- 2) proveďte korekci surových dat na *slepé vzorky*
  - a. odečtete hodnotu *slepého vzorku dané lokality* s korespondujícím *exponovaným vzorkem* (pokud je hodnota *rozpouštědlového slepého vzorku* vyšší než hodnota *slepého vzorku dané lokality*, tak odečtete *hodnotu rozpouštědlového slepého vzorku*), pokud jsou hodnoty pod limitem (se znakem <), nic se neodečítá
- 3) dostanete specifické hodnoty pro vzorek (parametry FA) vypočtené pomocí modelu a látkově specifické hodnoty rozdělovacího koeficientu mezi polymerem a vodou; vypočtete koncentrace ve vodě pomocí rovnic níže - nejprve vypočtete 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
- 3) výsledky:
  - a. QA/QC
    - i. úpravy dat (zda byly odečteny slepé vzorky, sloučeniny pod limitem)

- ii. napište, zda byly některé slepé vzorky nad limitem kvantifikace, případně kolikrát vyšší hodnoty byly
  - b. tabulky s vypočtenými hodnotami (vypočtené  $R_s$ , DEQ a  $c_w$ )
  - c. vytvořte přehledové grafy
  - d. srovnejte látky s nejvyšší vypočtenou koncentrací pro každou skupinu látek PCBs, OCPs a PBDEs s jinými lokalitami (př. polární oblasti)
  - e. srovnejte sumu koncentrace PBDEs s limity vodní rámcové směrnice (napište, které kongenery jsou v sumě zastoupeny)
- 4) závěr

**Pošlete také excelový soubor s výpočty!**

*Otázky:*

*Myslíte, že je pasivní vzorkování vhodné pro monitorování POPs ve vodě? (reference)*

*Proč je nutné využívat PRCs? Jaké typy látek se mohou využívat jako PRCs? (reference)*

*Jaký typ materiálu může být použit jako pasivní vzorkovač (příklad)? Můžete vzorkovat také polární látky ve vodě pomocí pasivního vzorkování? Pokud ano, uveďte i jaký typ vzorkovače lze použít. (reference)*

*Najděte a porovnejte rozdělovací koeficienty mezi n-oktanolem a vodou ( $K_{ow}$ ) s danými rozdělovacími koeficienty mezi polymerem a vodou ( $K_{pw}$ ) pro skupinu PRCs (nižší, vyšší, trend?) – vytvořte graf.*

**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 rozdělovacího 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),  $N_i$  je naměřené množství ve vyextrahovaném vzorku (pg/vzorek)

#### Reference:

- Dachs, Jordi, Rainer Lohmann, Wendy A. Ockenden, Laurence Méjanelle, Steven J. Eisenreich, and Kevin C. Jones. 2002. "Oceanic Biogeochemical Controls on Global Dynamics of Persistent Organic Pollutants." *Environmental Science and Technology* 36 (20): 4229–37. <https://doi.org/10.1021/es025724k>.
- Deribe, Ermias, Bjørn Olav Rosseland, Reidar Borgstrøm, Brit Salbu, Zinabu Gebremariam, Elias Dadebo, Hans Ragnar Norli, and Ole Martin Eklo. 2011. "Bioaccumulation of Persistent Organic Pollutants (POPs) in Fish Species from Lake Koka, Ethiopia: The Influence of Lipid Content and Trophic Position." *Science of the Total Environment* 410–411 (December): 136–45. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.09.008>.
- El-Shahawi, M S, A Hamza, A S Bashammakh, and W T Al-Saggaf. 2010. "An Overview on the Accumulation, Distribution, Transformations, Toxicity and Analytical Methods for the Monitoring of Persistent Organic Pollutants." *Talanta* 80 (5): 1587–97. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.09.055>.
- Greenwood, R., G. Mills, and B. Vrana. 2007. "Comprehensive Analytical Chemistry - Passive Sampling Techniques in Environmental Monitoring." In *Comprehensive Analytical Chemistry*, 453. [https://doi.org/10.1016/S0166-526X\(06\)48007-7](https://doi.org/10.1016/S0166-526X(06)48007-7).
- Holoubek, Ivan, and Jana Klánová. 2007. "Spatial and Temporal Trends of Global, Regional, and Local Pops Distribution." In *The Fate of Persistent Organic Pollutants in the Environment*, 219–28. Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6642-9\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6642-9_17).
- Lohmann, Rainer, Derek Muir, Eddy Y. Zeng, Lian Jun Bao, Ian J. Allan, Kenneth Arinaitwe, Kees Booij, et al. 2017. "Aquatic Global Passive Sampling (AQUA-GAPS) Revisited: First Steps toward a Network of Networks for Monitoring Organic Contaminants in the Aquatic Environment." *Environmental Science and Technology* 51 (3): 1060–67. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05159>.
- "The Stockholm Convention." 2019. 2019. <http://chm.pops.int/Home/tabid/2121/Default.aspx>.

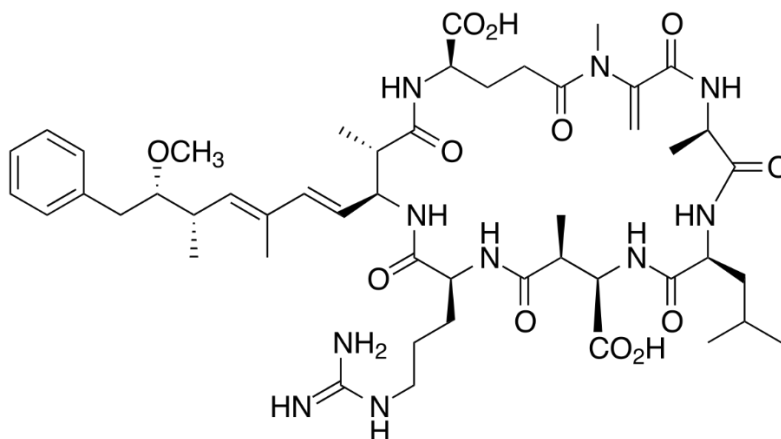
## 10 Extrakce mikrocytinů ze vzorků vody metodou SPE

### Teoretický úvod:

Sinice (cyanobakterie) jsou organismy přirozeně se vyskytující ve vodním prostředí, které jsou součástí fytoplanktonu. Pokud je ve vodě dostatek živin (důležitý je zejména obsah dusíku a fosforu) a příznivé podmínky pro růst biomasy, dochází k jejich přemnožení a vzniká tzv. vodní květ (Babica, Maršálek, and Bláha 2005). K rozvoji vodního květu dochází při teplém a slunném počasí, tedy převážně v létě a začátkem podzimu. Při odumírání a rozkladu sinic pak dochází k uvolňování cyanotoxinů do vodního prostředí.

*Z jakých zdrojů se do vodního prostředí může dostávat nadměrné množství živin? Jak nazýváme jev spojený s nadměrným přísunem živin do vodního prostředí? Za jakých podmínek bude docházet k odumírání a rozkladu sinic?*

Mikrocytiny jsou široce rozšířenou podskupinou cyanotoxinů, které jsou produkovány sinicemi rodu *Microcystis*, *Planktothrix*, *Anabaena* či *Oscillatoria* (Babica, Maršálek, and Bláha 2005). Mikrocytiny jsou cyklické heptapeptidy a obsahují tedy 7 aminokyselin. Jsou pojmenovány podle aminokyselin, navázaných ve své struktuře. Jeden z nejčastěji se vyskytujících a nejvíce studovaných mikrocytinů je mikrocytin-LR, který ve své struktuře má aminokyseliny leucin (L) a arginin (R).



Obr. 1: Strukturální vzorec mikrocytinu-LR.

Mikrocytiny jsou netěkavé a hydrofilní látky, které jsou stabilní na slunci, a také stabilní v širokém rozmezí teplot a pH (USEPA, 2006a). Ve vodním prostředí tak mohou toxiny přetrvávat v řádech týdnů až měsíců (USEPA, 2006b). Mikrocytiny jsou obecně hepatotoxiny. Kromě toho mohou způsobit podráždění kůže, očí a jícnu (World Health Organization, 2003). Mikrocytiny tedy mohou představovat

zdravotní riziko převážně tehdy, když vodní nádrže s nadměrným výskytem sinic slouží k rekreaci a nebo jsou využívány jako zdroj pitné vody.

*Jak můžeme být nejčastěji vystaveni působení sinicových toxinů? Jaké budou hlavní expoziční cesty?*

### **Extrakce mikrocystinů ze vzorků vody metodou SPE**

#### **Princip:**

Mikrocystiny jsou ze vzorku vody zakoncentrovány pomocí extrakce na tuhou fázi (solid phase extraction – SPE). Mikrocystiny jsou navázány na pevný sorbent a poté jsou eluovány malým množstvím rozpouštědla. Takto zpracovaný extrakt je připraven k analýze mikrocystinů pomocí HPLC-MS (vysoko účinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí).

#### **Chemikálie a spotřební materiál:**

- methanol
- 1% kyselina chlorovodíková
- roztok thiosíranu sodného (c = 10 g/l)
- GF (glass fiber) filtry (0,45 $\mu$ m)
- SPE kolonky se sorbentem C18
- čisté 1,5ml skleněné vialky, víčka, septa
- stříčka s destilovanou vodou

#### **Přístroje:**

- filtrační aparatura Nalgene DS0320
- aparatura pro SPE
- elektrická olejová (membránová) vývěva
- odpařovací systém s dusíkem
- pH metr

#### **Postup:**

##### Příprava vzorků

- vzorek o objemu 100 ml přefiltrujte přes GF filtr (0,45 $\mu$ m)

*Pozn. V případě použití kohoutkové vody není potřeba vzorek filtrovat.*

- přidejte methanol v množství do 10 % celkového objemu (v/v) vzorku
- vzorek okyselíte přidáním HCl na pH $\sim$ 6, pH zkontrolujte pomocí pH metru
- přidejte 1 ml roztoku thiosíranu sodného

### Aktivace a ekvilibrace SPE kolony

- pokyny ke konkrétním typům kolon jsou uvedeny na příbalových letáčích od výrobce
- v případě použití kolon Supelclean LC-18 3ml Tubes postupujte takto:
  - aktivace 5 ml 100% methanolu (bez použití podtlaku)
  - ekvilibrace 5 ml vody (možno použít podtlak)
- v průběhu aktivace, ekvilibrace a přetahování vzorku kolona nesmí vyschnout!

### Přetažení vzorku

- vzorek přetáhněte přes kolonku za použití podtlaku, průtok 5 ml/min
- po přetažení vzorku sušte kolonu proudem vzduchu (1 min)
- vysušenou kolonu promyjte 5 ml 20% methanolu

### Eluce analytů

- eluci proveďte 5 ml 100% methanolu za použití podtlaku
- eluát v případě potřeby skladujte v mrazáku (při teplotě -18°C)

### Zakoncentrování eluátu

- eluát odpařte do sucha pod proudem dusíku
- odparek rozpustěte v 500 µl 50% methanolu a převedte do mini-vialky
- vzorky v minivialkách před analýzou skladujte v mrazáku (t = -18 °C)

### **Vyhodnocení:**

Přepočítejte naměřenou koncentraci ve vzorku na původní objem vzorku, koncentraci uveďte v µg/l. Zjistěte, zda existuje limit pro mikrocystiny v pitné vodě. Pokud ano, porovnejte s naměřenými výsledky.

### *Otázky:*

*Z jakého důvodu jsou vodním květem postiženy vodní nádrže a ne tekoucí řeky?*

*Jak lze předcházet přemnožení sinic ve vodních nádržích?*

*Jakým způsobem lze odstranit cyanotoxiny z vody při její úpravě na vodu pitnou?*

## Stanovení mikrocystinů v lyofilizované biomase sinic

### Princip:

Navážka lyofilizované biomasy sinic je extrahována ultrazvukem. Buněčný debris je oddělen centrifugací, supernatant je zfiltrován a připraven pro analýzu mikrocystinů.

### Chemikálie a spotřební materiál:

- 50% methanol
- 1,5ml Eppendorf zkumavky
- plastové stříkačky 2ml
- stříkačkové nylonové filtry (0,45  $\mu\text{m}$ )
- minivialky, víčka, septa

### Přístroje:

- analytické váhy
- automatická pipeta
- vortex
- ultrazvukový homogenizátor nebo lázeň
- centrifuga

### Postup:

- do Eppendorf zkumavky navažte cca 5 mg lyofilizované biomasy (zaznamenejte si přesnou navážku)
- přidejte 1 ml 50% methanolu a důkladně vortexujte
- extrahujte pomocí ultrazvukového homogenizátoru (2 x 20 s, cycle 0,8 x 10%, power 90%), mezi oběma extrakcemi nechejte vzorek vychladnout
- centrifugací oddělte buněčný debris (maximální otáčky, 10 min)
- supernatant přefiltrujte pomocí stříkačky a filtru do minivialky
- takto získaný vzorek 10x zřeďte 50% methanolem na objem 1 ml
- vzorky před analýzou skladujte při teplotě  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$

### Vyhodnocení:

Naměřené hodnoty obsahu mikrocystinů ve vzorku biomasy přepočítejte na původní navážku.

*Otázky:*

*Proč je lepší použít pro extrakci ultrazvukový homogenizátor než ultrazvukovou lázeň?*

*Jaké další cyanotoxiny sinice produkují?*

**Reference:**

Babica, Pavel, Blahoslav Maršálek, and Luděk Bláha. 2005. "Microcystiny–Cyklické Heptapeptidy Sinic."  
<http://www.sinice.cz/res/file/popular/microcystiny.pdf>.

USEPA, 2006a; Toxicological reviews of Cyanobacterial Toxins: Microcystins LR, RR, YR and LA;  
Toxicological reviews of Cyanobacterial Toxins: Microcystins LR, RR, YR and LA; NCEA-C-1765.  
National Center for Environmental Assessment, USEPA, Cincinnati, OH.

USEPA; 2006b; Regulatory Determinations Support Document for Selected Contaminants from the  
Second Drinking Water Contaminant Candidate List (CCL2); Regulatory Determinations Support  
Document for Selected Contaminants from the Second Drinking Water Contaminant Candidate  
List (CCL2); EPA Report 815-D-06-007. Chapter 15 pp. 14-15. Office of Ground Water and Drinking  
Water, U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

World Health Organization; 2003; Cyanobacterial Toxins: Microcystin-LR in Drinking Water;  
Cyanobacterial Toxins: Microcystin-LR in Drinking Water; WHO/SDE/WSH/03.04/57. World  
Health Organization, Geneva, Switzerland.

## 11 Extrakce pesticidů v půdě metodou QuEChERS

### **Teoretický úvod:**

Pesticidy jsou nezbytné pro zajištění dostatku potravy pro lidskou populaci. Jejich použití lze sledovat už od starověku. Pesticidy jsou širokou skupinou látek, liší se chemickou strukturou a tím i svými vlastnostmi. Velká část jich byla postupně zakázána, protože se odhalily jejich problematické vlastnosti jako je perzistence, toxicita pro necílové organismy či dálkový transport.<sup>1,2</sup>

*Které látky se používaly jako pesticidy dříve?*

*Jsou pesticidy detekovány i v potravinách? Pokud ano, jak je lze z potravin před konzumací eliminovat?*

Pesticidy se dostávají aplikací či špatným skladováním do životního prostředí, kde mohou negativně ovlivňovat ekosystémy i organismy. Ačkoli jsou pesticidy primárně aplikovány na rostliny, dostávají se postupně do ovzduší, podzemní vody i půdy. Půda pak může být rezervoárem těchto látek a sekundárně je uvolňovat do prostředí.<sup>2</sup>

*Jak různé aplikace pesticidů ovlivňují jejich osud v životním prostředí?*

V současné době je jednou z nejrozšířenějších metod pro přípravu vzorků půdy metoda označovaná zkratkou QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe). Je založená na extrakci a vysolení pesticidů z homogenního vzorku s dostatečnou vlhkostí do organického rozpouštědla. QuEChERS má vysokou propustnost vzorků, má méně kroků přípravy, je potřeba méně materiálu, je velmi efektivní a rychlá, vhodná pro široké spektrum sloučenin a nevyžaduje použití žádného chlorovaného rozpouštědla. Metoda QuEChERS má dvě základní etapy, extrakční a čistící. V případě běžných vzorků půdy bez rostlinného materiálu lze čistící krok eliminovat. Použitím vhodných sorbentů se sníží účinek matrice na finální instrumentální analýzu a zvýší se robustnost metody.<sup>3</sup>

*Proč jsou chlorovaná rozpouštědla považována za problematická?*

*Jak může matrice ovlivnit finální instrumentální analýzu?*

Tabulka 1 - Typy sorbentů a jimi vázané látky

Sorbent	Zachycené látky
Síran hořečnatý (bezvodý)	Voda
PSA (směs primárních a sekundárních aminů)	Mastné kyseliny, polární pigmenty a cukry
Oxid křemičitý (Silica-C18)	Hydrofobní látky
Grafitizovaný neporézní uhlík (EnviCarb)	Necílové sloučeniny

### Postup práce

#### Pomůcky:

- polypropylenové (PP) zkumavky
- laboratorní váhy
- ultrazvuková lázeň
- centrifuga
- laboratorní sklo
- automatické pipety

#### Chemikálie:

- bezvodý síran hořečnatý
- acetonitril
- chlorid sodný
- směs hydrátů citronanů sodných
- PSA (směs primárních a sekundárních aminů)
- silica-C18 (silikagel modifikovaný uhlovodíkovými řetězci C18)
- směs standardů pesticidů
- 5% roztok kyseliny mravenčí v acetonitrilu
- mili-Q voda

#### **Zpracování vzorků:**

- navažte si přibližně 5 g půdy do 50ml PP zkumavky
- ke vzorku přidejte směs standardů pesticidů (dle pokynů vyučujícího)
- půdu obohacenou pesticidy důkladně promíchejte na třepačce cca 1 hodinu a uchovejte 1 týden v chladničce, aby došlo k ustavení sorpční rovnováhy. *(V případě blokových cvičení připraví předem vedoucí cvičení.)*
- ke vzorku půdy obohacené pesticidy přidejte 5 ml mili-Q vody a 10 ml acetonitrilu



- směs třepajte jednu minutu a poté 15 minut extrahujte pomocí ultrazvuku (viz. Obr. 1 a 2)



**Obrázek 1 a 2 – Extrakce vzorků půdy v ultrazvukové lázni**

- k vytvořené suspenzi postupně přidávejte 4 g  $MgSO_4$  + 1 g NaCl + směs citronanů (1 g  $Na_2Citr.2H_2O$  + 0.5 g  $Na_2HCitr.1.5H_2O$ ), po každém přidavku cca 1 minutu třepajte

**Poznámka:** Po přidání síranu hořčnatého důkladně protřepajte, aby se netvořily hrudky. Po přidání citronanů dochází k uvolnění tepla, proto je vhodné vzorky během třepání chladit, aby nedošlo k rozkladu méně stabilních pesticidů.

- zkumavku centrifugujte po dobu 5 minut při 3000 rpm (viz. Obr. 3)



**Obrázek 3 – Centrifugace vzorků**

- z horní vrstvy odeberte 5 x 1 ml do čistých PP zkumavek
- k 1 ml alikvotního podílu extraktu přidejte:
  1. –
  2. 150 mg MgSO<sub>4</sub>
  3. 50 mg PSA + 150 mg MgSO<sub>4</sub>
  4. 50 mg Silica-C18 + 150 mg MgSO<sub>4</sub>
  5. 50 mg EnviCarb + 150 mg MgSO<sub>4</sub>



*Obrázek 4 – Kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí*

- zkumavky uzavřete, protřepejte přibližně 1 minutu a následně centrifugujte po dobu 5 minut při 3000 rpm
- odeberte 0,5 ml extraktu do 2ml vialky, přidejte 0,5 ml mili-Q vody, 10 µl 5% HCOOH v acetonitrilu a vnitřní standard dle pokynů vyučujícího
- měření bude provedeno pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (LC-MS/MS) (viz. Obr. 4)

### *Otázky*

*Jaké další metody se dají využít pro extrakci půdy?*

*Proč je důležité na začátku důkladně prosít vzorek půdy?*

*Pro který další typ vzorků je vhodné použít metodu QuEChERS?*

*Uveďte 3 příklady pesticidů, jejich zařazení do skupiny a jejich používání.*

## Reference

- (1) Gavrilesco, M. Fate of Pesticides in the Environment and Its Bioremediation. *Eng. Life Sci.* **2005**, 5 (6), 497–526. <https://doi.org/10.1002/elsc.200520098>.
- (2) Martínez Vidal, J. L.; Plaza-Bolaños, P.; Romero-González, R.; Garrido Frenich, A. Determination of Pesticide Transformation Products: A Review of Extraction and Detection Methods. *J. Chromatogr. A* **2009**, 1216 (40), 6767–6788. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.08.013>.
- (3) Asensio-Ramos, M.; Hernández-Borges, J.; Ravelo-Pérez, L. M.; Rodríguez-Delgado, M. A. Evaluation of a Modified QuEChERS Method for the Extraction of Pesticides from Agricultural, Ornamental and Forestal Soils. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 396 (6), 2307–2319. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3440-2>.

## 12 Stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků (PAHs) ve vzorku ovzduší metodou GC-MS/MS

### **Teoretický úvod:**

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs) jsou lipofilní, všudypřítomné, organické sloučeniny, které se skládají alespoň ze dvou kondenzovaných aromatických jader<sup>(1, 2)</sup>. Mají nespočet zástupců, a tak se v drtivé většině případů měří jen 16 EPA PAHs, které se označují jako prioritní<sup>(3)</sup>. Mezi těchto vybraných 16 zástupců patří i benzo(a)pyren, který je pro lidi prokazatelně karcinogenní<sup>(3)</sup>. Toxicita PAHs je různá pro každého zástupce, ale obecně to jsou dráždivé látky, mohou poškozovat ledvinovou a jaterní tkáň, jsou karcinogenní, mutagenní a teratogenní<sup>(1)</sup>.

*Je vybraných 16 zástupců opravdu reprezentativních? Co jejich deriváty nebo PAHs s více jádry, které mohou být více toxické?*

PAHs nejsou perzistentní, v atmosféře degradují, a přesto podléhají dálkovému přenosu<sup>(3)</sup>. Jsou semi-volatilní, což znamená, že se v atmosféře vyskytují v plynné i částicové fázi a dělí se mezi ně na základě svých vlastností a meteorologických podmínek (např. teplota)<sup>(3)</sup>. PAHs jsou produktem nedokonalého spalování jakékoli organické hmoty<sup>(4)</sup>. Záměrně se vyrábějí jen výjimečně, většinou pro vědecké použití<sup>(4)</sup>. Do prostředí se dostávají lidskou činností (doprava, domácí topeniště, ...), ale i z přírodních zdrojů (sopky, přírodní požáry, ...) <sup>(4)</sup>. Primárně jsou emitovány do ovzduší, a proto bývají v ovzduší i nejčastěji měřeny či monitorovány. Mezi jednotlivými částmi životního prostředí však můžou volně přecházet<sup>(5)</sup>.

*Jaké zdroje PAHs budou dominovat na různých lokalitách? Jaké jsou zdroje PAHs ve vnitřním prostředí?*

Vzorkovat ovzduší lze dvěma základními přístupy – aktivně a pasivně<sup>(6)</sup>. Aktivní vzorkovače mají v sobě pumpu a vyžadují stálý přívod elektřiny. Jsou také drahé a náročné<sup>(6)</sup>. Z těchto důvodů se začalo používat pasivní vzorkování<sup>(6)</sup>. Pasivní vzorkování využívá principu difuze, během kterého se látky sorbují na vzorkovací médium<sup>(6)</sup>. Jako vzorkovací médium může být použit váleček z polyuretanové pěny nebo XAD pryskyřice<sup>(7)</sup>.

*Myslíte si, že se vzorkovací média liší ve svých vlastnostech? Pokud ano, ovlivní to vzorkování?*

U pasivního vzorkovače se nedá určit přesná koncentrace látek v ovzduší, pro tyto účely se používají různé modely a extrapolace<sup>(8)</sup>. V této úloze bude použit vzorkovač z obrázku 1. Není tolik efektivní při

vzorkování částic, ale používá se například pro srovnání jednotlivých lokalit mezi sebou nebo jako prvotní screening znečištění vzorkovací lokality<sup>(9)</sup>.

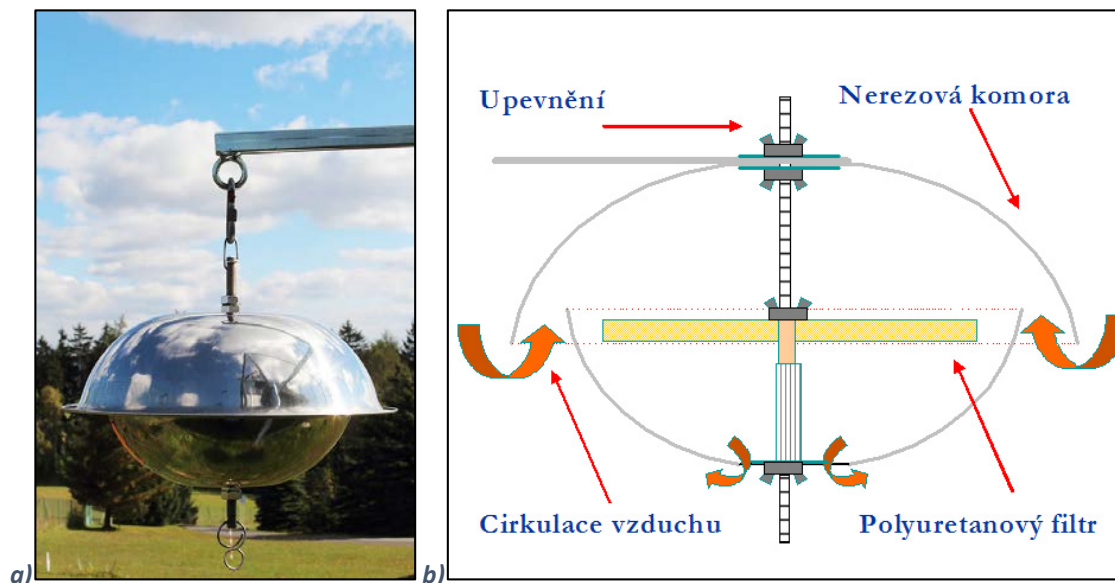
*Proč je důležité vzorkovat i částice? Která informace se zanedbá, když vzorkujeme jen částice nebo jen volné ovzduší?*

### Postup práce

**Demonstrace odběru vzorku ovzduší na polyuretanový filtr (PUF) pasivního vzorkovače:**

#### Pomůcky:

- pasivní vzorkovač (Obrázek 1)
- předčištěný polyuretanový filtr (8h aceton, 8h dichlormethan), zabalený ve dvou vrstvách alobalu
- laboratorní rukavice
- alobal, PE sáček (zip lock)
- odběrový protokol



Obrázek 1 Pasivní vzorkovač ovzduší na a) fotografii a b) schématu (www.monairnet.eu)

#### Vzorkování:

- uchopte středovou tyč pasivního vzorkovače za zavěšovací hák
- navlečte dvě bezpečnostní matky, které zakotvují horní část vzorkovače
- navlečte podložku a svrchní část vzorkovače (nerezová polokoule o průměru 30 cm)
- následuje podložka, matička a delší nerezová trubička
- umístěte na středovou tyč předčištěný polyuretanový filtr s vloženým nerezovým středem

- pokračujte s navlékáním v pořadí podložka, kratší nerezová trubička, matička, podložka, spodní část vzorkovače, podložka a dvě bezpečnostní matičky
- jako poslední zahákněte do otvoru na středové tyči bezpečnostní háček
- obvyklá doba expozice takto sestaveného pasivního vzorkovače je 28 dní

### Práce v laboratoři:

#### Pomůcky:

- automatický extraktor Büchi, extrakční baňka s varnými kamínky, extrakční patrona
- vialky
- automatická pipeta a Pasteurova pipeta
- skleněná trubička
- skleněná kolona
- mini-vialka
- předčištěná vata
- laboratorní sklo

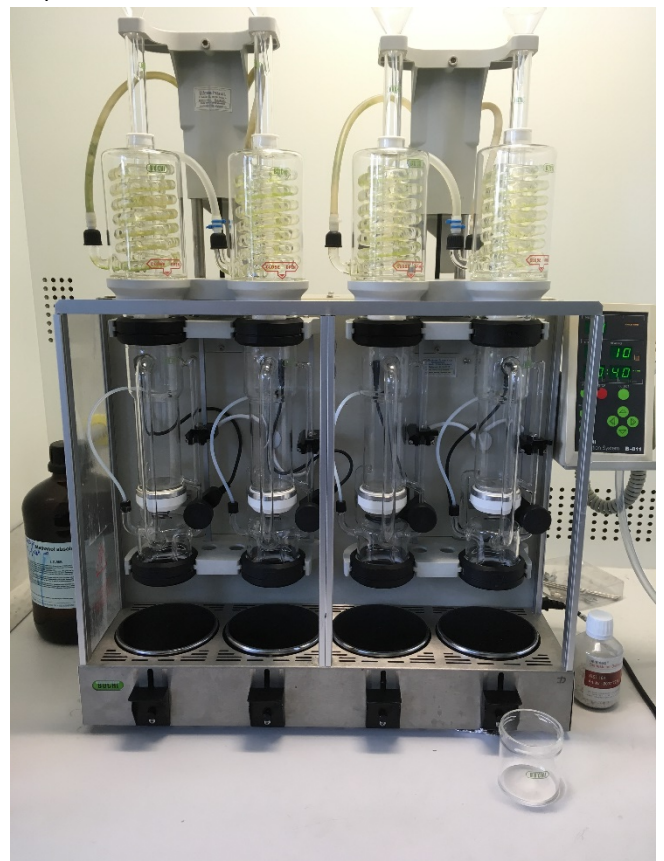
#### Chemikálie:

- dichlormethan, *n*-hexan, nonan
- recovery standard (izotopicky značené sloučeniny PAHs)
- aktivovaný silikagel (12 h při 150 °C)
- vnitřní standard

#### Zpracování vzorků:

do tří čtvrtin varné baňky nalijte extrakční rozpouštědlo (DCM) a přidejte 3-4 varné kamínky

- vyjměte exponovaný polyurethanový filtr (PUF) z alobalu a vložte jej spolu se skleněnou trubičkou do extrakční patrony
- přidejte k PUF recovery standard podle pokynu vyučujícího a umístěte patronu do těla automatického extraktoru
- ujistěte se, zda jsou všechny části dobře utěsněné, otevřete proud chladící vody a zapněte extraktor, zvolte program pro extrakci dichlormethanem (horká extrakce 40 minut, proplachování 20 minut)



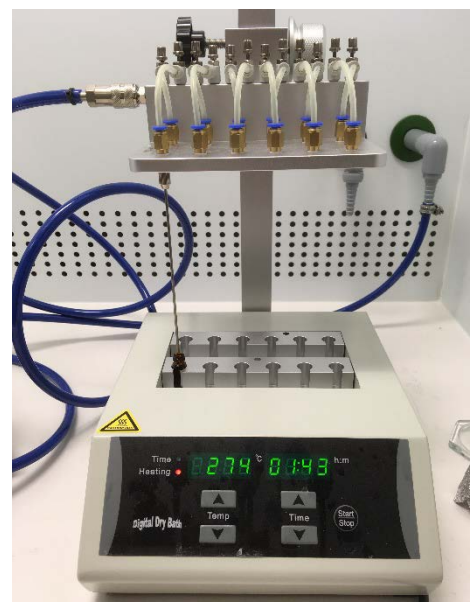
Obrázek 2 Fotka automatického extraktoru Büchi



- po skončení programu vyjměte patronu s filtrem a extrakt odpařte na objem asi 5 ml příslušným programem
- pomocí Pasteurovy pipety kvantitativně převedte zahuštěný extrakt do vialky
- vzorky zkoncentrujte pod proudem dusíku na objem 1 ml
- připravte kolonu k čištění:
  - na dno skleněné kolony vložte smotek předčištěné vaty
  - nad něj nasypete 5 g aktivovaného silikagelu a tyčinkou mírně sklepejte
- naneste vzorek, proveďte eluci 10 ml hexanu a 20 ml dichlormethanu
- eluáty jímejte do vialek
- eluát odpařte pod mírným proudem dusíku na 1 ml
- vzorek převedte do mini-vialky, přidejte 50 µl nonanu
- přidejte vnitřní standard podle pokynů vyučujícího
- mini-vialku pečlivě uzavřete a předejte vyučujícímu
- měření bude provedeno pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní detekcí (GC-MS/MS)



Obrázek 3 Fotka skleněných kolon



Obrázek 4 Fotka dusíkového koncentrátoru

### Otázky

*Jak se mění koncentrace PAHs v ovzduší v průběhu roku?*

*Jaké jsou rozdíly v koncentracích PAHs mezi městem a vesnicí?*

*Jaká další vzorkovací média se dají použít pro PAHs v ovzduší?*

*V jakých jednotkách budou Vaše výsledky? Dají se převést na  $\text{ng m}^{-3}$ ?*

## Zdroje

1. Kim, K.-H., Jahan, S. A., Kabir, E. and Brown, R. J. C.: A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects, *Environ. Int.*, 60, 71–80, doi:10.1016/J.ENVINT.2013.07.019, 2013.
2. Andersson, J.T., Achten, C., 2015. Time to Say Goodbye to the 16 EPA PAHs? Toward an Up-to-Date Use of PACs for Environmental Purposes. *Polycycl. Aromat. Compd.* 35, 330–354. <https://doi.org/10.1080/10406638.2014.991042>
3. Keyte, I.J., Harrison, R.M., Lammel, G., 2013. Chemical reactivity and long-range transport potential of polycyclic aromatic hydrocarbons-a review. *Chem. Soc. Rev.* 42, 9333–9391. <https://doi.org/10.1039/c3cs60147a>
4. Dat, N.D., Chang, M.B., 2017. Review on characteristics of PAHs in atmosphere, anthropogenic sources and control technologies. *Sci. Total Environ.* 609, 682–693. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.204>
5. Cetin B, Öztürk F, Keles M, Yurdakul S (2017) PAHs and PCBs in an Eastern Mediterranean megacity, Istanbul: their spatial and temporal distributions, air-soil exchange and toxicological effects. *Environ Pollut* 220:1322–1332. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.11.002>
6. Pöhlker C., Baumann K., Lammel G.: Air sampling methods, in: Foken T. (ed.): Handbook of atmospheric measurements, Springer, Cham, Switzerland, 2020
7. Wania, F., Shen, L., Lei, Y.D., Teixeira, C., Muir, D.C.G., 2003. Development and Calibration of a Resin-Based Passive Sampling System for Monitoring Persistent Organic Pollutants in the Atmosphere. *Environ. Sci. Technol.* 37, 1352–1359. <https://doi.org/10.1021/es026166c>
8. Melymuk, L., Robson, M., Helm, P.A., Diamond, M.L., 2011. Evaluation of passive air sampler calibrations: Selection of sampling rates and implications for the measurement of persistent organic pollutants in air. *Atmos. Environ.* 45, 1867–1875. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2011.01.011>
9. Jaward, F.M., Farrar, N.J., Harner, T., Sweetman, A.J., Jones, K.C., 2004. Passive air sampling of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated naphthalenes across Europe. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1355–1364. <https://doi.org/10.1897/03-420>



## 13 Jehličí jako pasivní vzorkovač ovzduší

### **Teoretický úvod:**

Termín perzistentní organické polutanty (POPs) byl zaveden v rámci Stockholmské úmluvy o persistentních organických polutantech, která byla podepsána v roce 2001 ve Stockholmu pod patronátem Programu OSN pro životní prostředí (UNEP)<sup>(1)</sup>. POPs jsou jednou z nejproblematičtějších skupin organických sloučenin v životním prostředí. Tyto látky jsou lipofilní, toxické, bioakumulativní, semi-volatile a odolné vůči degradaci. Podléhají dálkovému transportu a dostávají se tak i do oblastí, ve kterých nebyly nikdy vyráběny ani používány<sup>(2)</sup>.

### *Dokážete vysvětlit princip atmosférického dálkového transportu?*

Mezi POPs patří řada organických látek, jako jsou organochlorované pesticidy (OCPs, např. DDT), polychlorované bifenyly (PCBs) nebo polychlorované dibenzo-dioxiny a dibenzo-furany (PCDDs, PCDFs). Často se k POPs přiřazují i polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs), ačkoli nejsou perzistentní. Sdílejí však ostatní problematické vlastnosti, a tak se často monitorují společně.

### *Jaké jsou rozdíly ve struktuře POPs a PAHs? Které vlastnosti spolu tyto dvě skupiny sdílejí?*

Vzorkují se ve všech složkách životního prostředí a jsou zahrnuty v mnoha monitorovacích projektech<sup>(3)</sup>. POPs a PAHs lze také měřit v biologických matricích. Na RECETOXu se tyto látky měří například v krevním séru nebo v jehličí. V této úloze budete zpracovávat jehličí, které představuje užitečný nástroj k hodnocení kontaminace volného ovzduší<sup>(4)</sup>. Výhodou jehličnatých stromů je jejich dlouhá životnost. Dokážou efektivně sorbovat POPs a PAHs během dlouhých časových období, protože jehlice obsahují na svém povrchu voskovou vrstvu, která je lipofilní<sup>(4)</sup>. Slouží tak jako přírodní pasivní vzorkovač ovzduší<sup>(4)</sup>.

### *Jakou výhodu má jehličí oproti klasickému vzorkovači ovzduší? Kterými různými procesy se polutanty do jehličí mohou dostat? Na čem jsou tyto procesy závislé?*



## Postup práce

### Pomůcky:

- alobal, PE sáček (zip lock)
- mlýnek
- laboratorní váhy
- automatický extraktor Büchi
- extrakční patrony
- přečištěná vata
- Pasteurova pipeta, automatická pipeta
- skleněné kolony (velké, malé)
- laboratorní sklo
- Turbovap nádobka
- Turbovap

### Chemikálie:

- dichlormethan, *n*-hexan, nonan
- recovery standardy (Izotopově značené sloučeniny PAHs, odpovídající sloučeniny pro PCBs a OCPs – upřesní vyučující)
- přečištěný silikagel
- aktivovaný silikagel (12 h při 150 °C)
- aktivovaný silikagel (12 h při 150 °C) modifikovaný kyselinou sírovou (22 ml kyseliny sírové na 50 g aktivovaného silikagelu)
- kyselina sírová
- vnitřní standard

### Zpracování vzorků:

- z vysušených jehlic si navažte přibližně 10 gramů a v laboratorních rukavicích oddělte jehlice od brachyblastů



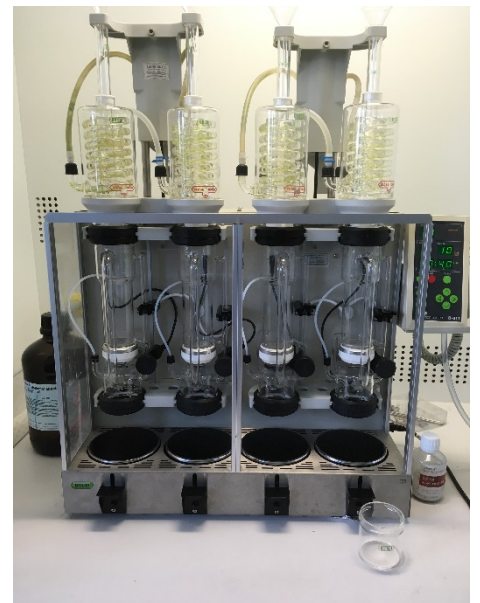
*Obrázek 5 Fotka oddělených jehlic a brachyblastů*

- jehlice rozemelte použitím mlýnku a zjistěte přesnou navážku u jehlic i brachyblastů



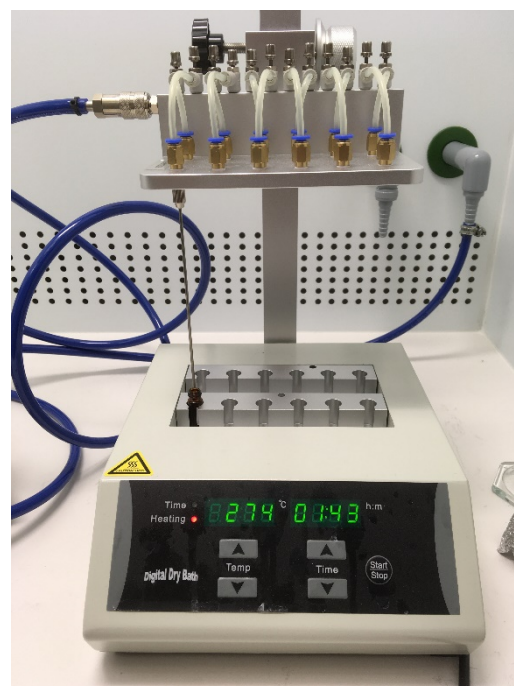
*Obrázek 6 Fotka mlýnku na jehlice*

- jehlice a brachyblasty vložte do papírových extrakčních patron. Nahoru položte kousek přečištěné vaty
- přidejte recovery standard podle pokynu vyučujícího a patrony vložte do automatického extraktoru
- do tří čtvrtin varné baňky nalijte extrakční rozpouštědlo (DCM) a přidejte 3-4 varné kamínky
- ujistěte se, zda jsou všechny části dobře utěsněné, otevřete proud chladící vody a zapněte extraktor, zvolte program pro extrakci dichlormethanem (horká extrakce 40 minut, proplachování 20 minut)
- po skončení programu vyjměte patronu a extrakt odpařte na objem asi 5 ml příslušným programem



*Obrázek 7 Fotka automatického extraktoru*

- pomocí Pasteurovy pipety kvantitativně převedte zahuštěný extrakt do vialky
- vzorky zakonzentrujte pod proudem dusíku, nebo přidejte rozpouštědlo (DCM) tak, aby závěrečný objem byl 10 ml a rozdělte na dva podle pokynů vyučujícího (analýza PAHs a analýza PCBs + OCPs)
- odpařte obě frakce pod jemným proudem dusíku na objem 1 ml
- vzorky nasypete malým množstvím přečištěného silikagelu tak, aby vznikla homogenní sytká směs
- připravte kolonu k čištění pro vzorky určené na analýzu PAHs:
  - na dno skleněné kolony dejte na spodek kousek přečištěné vaty
  - nasypete 5 g aktivovaného silikagelu
- naneste vzorek, proveďte eluci 10 ml *n*-hexanu a 20 ml dichlormethanu
- eluáty jímejte do vialek
- připravte kolonu k čištění pro vzorky určené na analýzu PCBs + OCPs:
  - do velké kolony dejte na spodek kousek přečištěné vaty
  - nasypete 5 g aktivovaného silikagelu a 25 g aktivovaného silikagelu modifikovaného kyselinou sírovou
- naneste vzorek
- proveďte eluci 100 ml směsí *n*-hexan:dichlormethan (1:1)
- eluáty jímejte do turbovapových nádobek
- použijte k přečištění vzorků PAHs gelovou permeační chromatografii
- vzorky PAHs zkoncentrujte pod proudem dusíku a vzorky PCBs + OCPs v odpařovacím systému Turbovap
- vzorek převedte do mini-vialky, přidejte 50 µl nonanu
- přidejte vnitřní standard podle pokynů vyučujícího
- mini-vialku pečlivě uzavřete a předejte vyučujícímu
- měření bude provedeno pomocí plynové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní detekcí (GC-MS/MS)



Obrázek 8 Fotka odpařovacího systému

### Otázky

*Porovnejte výsledné koncentrace látek PAHs, PCBs, OCPs jehlic a brachyblastů v přepočtu na navážku. Co mohlo způsobit jejich rozdíly?*

*Porovnejte koncentrace jednotlivých skupin mezi sebou. Jaké jsou zdroje těchto látek v ovzduší?*

*Proč není vhodné používat listy z listnatých stromů?*

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

## **Zdroje**

1. UNEP (2008) United Nations Environment Programme. Stockholm Convention. <http://chm.pops.int/Portals/0/download.aspx?d=UNEP-POPS-COP-CONVTEXT-2017.English.pdf> (21.5.2020)
2. El-Shahawi, M.S., Hamza, A., Bashammakh, A.S., Al-Saggaf, W.T., 2010. An overview on the accumulation, distribution, transformations, toxicity and analytical methods for the monitoring of persistent organic pollutants. *Talanta* 80, 1587–1597. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.09.055>
3. Klánová, J., Harner, T., 2013. The challenge of producing reliable results under highly variable conditions and the role of passive air samplers in the Global Monitoring Plan. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 46, 139–149. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2012.07.021>
4. I. Holoubek, P. Kořínek, Z. Šeda, E. Schneiderová, I. Holoubková, A. Pacl, J. Tříška, P. Cudlín, J. Čáslavský, 2000. The use of mosses and pine needles to detect persistent organic pollutants at local and regional scales. *Environmental Pollution*, Volume 109, Issue 2, 283-292, [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(99\)00260-2](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(99)00260-2).

## 14 Stanovení zpomalovačů hoření ve vzorku prachu

### **Teoretický úvod:**

#### **Vnitřní prostředí**

Vnitřním prostředím nazýváme místa v uzavřených prostorách jako jsou například naše domy, kanceláře, školy, veřejné prostory nebo dopravní prostředky. Vzhledem k faktu, že v naší moderní společnosti trávíme nad 90 % času v těchto prostorách<sup>1</sup>, je vnitřní prostředí stěžejní pro lidské zdraví.

*Kolik času trávíte ve vnitřním prostředí? Pozorujete rozdíly mezi pracovním a víkendovým dnem nebo létem a zimou?*

#### **Prach**

Ve vnitřním prostředí můžeme vzorkovat vzduch, samotné materiály, anebo usazený prach. Prach je všudypřítomná matrice, která obsahuje heterogenní směs částic složených například z vláken, usazených částic z ovzduší, vlasů, popela, hlíny, drobků nebo bakterií, pylu či plísně<sup>2</sup>. Zároveň obsahuje směs chemikálií (semivolatilní a netěkavé) reflektujících složení okolního prostředí. Kvůli tomu má prach významný podíl na expozici. Tato expozice je ovlivněna jak lidským chováním ve vnitřním prostředí, tak obsahem chemikálií v prachu. Pro některé látky (např. zpomalovače hoření) je prach hlavní matricí pro lidskou expozici<sup>3</sup>. Velká výhoda prachu je, že je snadno získatelný. Díky výše zmíněným vlastnostem je prach důležitý pro posuzování expozice a je hodnotnou matricí pro zkoumání vnitřního prostředí<sup>4</sup>.

*Kolik jste za svůj život snědli prachu? Průměrně dítě do jednoho roku sní 30 mg/den, dítě ve věku jednoho až šesti let 60 mg/den a od šesti let je pak průměrné množství snědeného prachu 30 mg/den.*

#### **Možnosti vzorkování**

Prach je možné vzorkovat dvěma různými metodami: (1) stěry – Obr. 1a; a (2) vysávání – Obr. 1b.<sup>2</sup>

Stěry mohou být jak suché, tak mokré, například použitím isopropylalkoholu. K samotnému stěru bývají používány jak předčištěné ubrousky, tak speciální zařízení, která mohou regulovat tlak na povrch stíraného materiálu.<sup>2</sup> Metody stěru se používají především pro hladké povrchy nábytku, elektrospotřebičů nebo oken.

V závislosti na druhu informace, kterou chceme získat, lze zvolit různé přístupy vzorkování vysáváním. Můžeme analyzovat prach z celého sáčku vysavače, nebo vysát vysavačem samostatně do sáčku plochu celého bytu, případně se můžeme zaměřit na vysávání jednotlivých částí prostoru. K tomu se pak používají např. nylonové ponožky, které se vloží do hlavičky vysavače a prach se v nich zachytí. Další



možností je použití speciální hlavice s mřížkou pro filtr, na kterém se zachytí vzorkovaný prach. Tato metoda se používá především pro podlahy, koberce a čalouněný nábytek.

*Jaké vidíte limity dvou uvedených vzorkovacích metod? V jakých jednotkách byste prezentovali získané výsledky?*

*Stěry mohou být jak suché, tak mokré. Předpokládáte nějaký rozdíl ve výsledcích v závislosti na použití metody? Pokud ano, jaký?*



*Obr. 1: a – vlhký stěr hladkého povrchu TV, b – nástavec na domácí vysavač pro vzorkování prachu, který je zadržen na křemenném filtru.*

### **Homogenizace prachu**

Jak již bylo zmíněno, prach je tvořen z usazených heterogenních částic. Pro lepší reprodukovatelnost a spojitost s expozicí se prach prosívá a rozděljuje do frakcí podle velikosti částic., Zatím však není definovaná doporučená velikost částic pro jednotné vzorkování. Na Obr. 2 můžete vidět frakce od velikosti částic  $>2$  mm po  $<0,25$  mm.



*Obr. 2: Prach ze sáčku z vysavače a) před prosíváním, podle velikosti částic b)  $>2\text{ mm}$ , c)  $2\text{ mm} > x > 1\text{ mm}$ , d)  $1\text{ mm} > x > 0,5\text{ mm}$ , e)  $0,5\text{ mm} > x > 0,25\text{ mm}$  a f)  $0,25\text{ mm} > x$ .<sup>5</sup>*

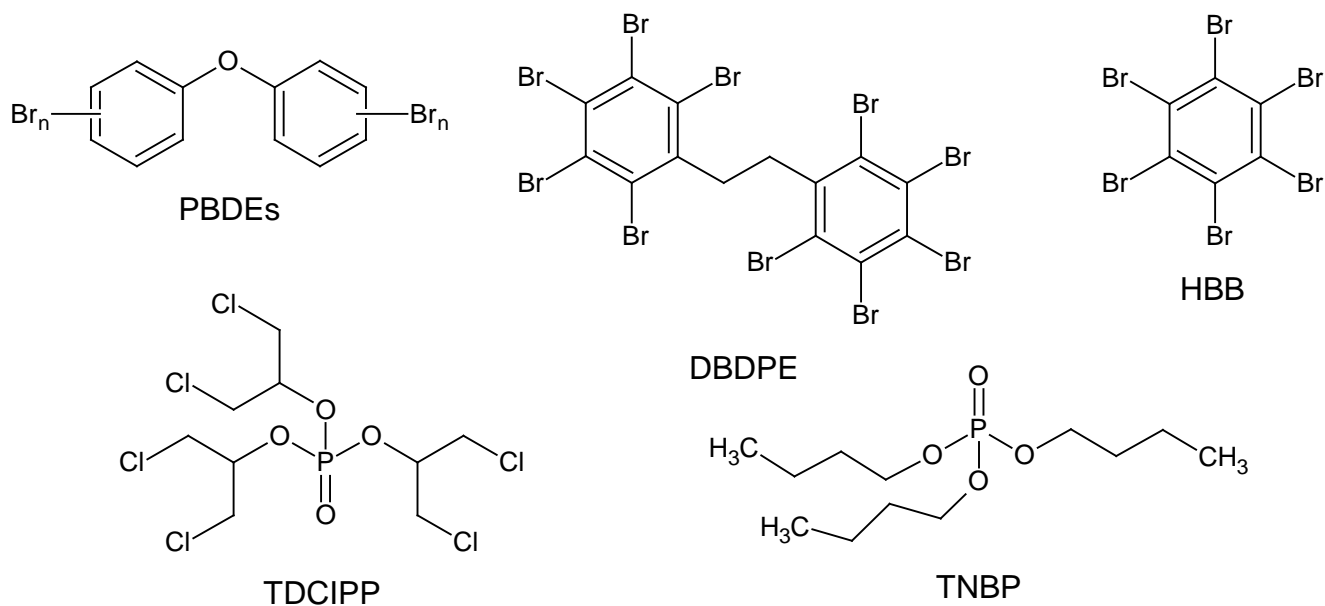
*Která frakce je podle vás nejvíce relevantní, co se týče expozice?*

*Myslíte si, že je problém, že není ustanovena jednotná velikost pro analýzu prachu? Proč? Jakou velikost byste zvolili vy?*

### **Zpomalovače hoření**

Jednou z mnoha skupin chemikálií, které detekujeme v prachu, jsou zpomalovače hoření.<sup>4</sup> Zpomalovače hoření jsou používány v mnoha hořlavých materiálech (např. elektronika, plasty nebo textil) k omezení jejich hořlavosti a k prodloužení času na útěk.<sup>6</sup> Zpomalovače hoření jsou nespočetnou skupinou látek a mohou být jak anorganické, tak organické. Organické zpomalovače hoření dělíme do dvou skupin, které se liší jak fyzikálně-chemickými vlastnostmi, tak použitím v jednotlivých materiálech. První skupinou jsou halogenované zpomalovače hoření<sup>7</sup> (např. polybromované difenylethery (PBDE) nebo hexabromobenzen) a druhou skupinou jsou polárnější organofosfátové estery,<sup>8</sup> které jsou používány i jako změkčovadla (př. zástupců na Obr. 3). Kvůli všudypřítomnosti zpomalovačů hoření v různorodých prostředích a evidencím o jejich možné toxicitě je sledování těchto látek důležité.





**Obr. 3:** Vybraní zástupci zpomalovačů hoření: obecný vzorec polybromovaných difenyetherů (PBDEs), dva zástupci nových zpomalovačů hoření (DBDPE a HBB) a dva zástupci organofosfátových estrů s chlorem (TDCIPP) a bez chloru (TNBP).

*Jakým způsobem mohou být zpomalovače hoření toxické?*

*Otázky po absolvovaném praktiku:*

*Popište mechanismus, jakým PBDE zpomalují hoření.*

*Které organické zpomalovače hoření jsou polárnější? Bude to mít vliv na volbu přípravy vzorku k analýze?*

*Během cvičení byla několikrát zmíněna rovnováha. Při kterých částech přípravy vzorku jsme využívali ustanovování rovnováhy?*

#### Reference:

- (1) Schweizer, C.; Edwards, R. D.; Bayer-Oglesby, L.; Gauderman, W. J.; Ilacqua, V.; Jantunen, M. J.; Lai, H. K.; Nieuwenhuijsen, M. J.; Künzli, N. Indoor Time-Microenvironment-Activity Patterns in Seven Regions of Europe. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* **2007**, *17* (2), 170–181.
- (2) Lioy, P. J.; Freeman, N. C. G.; Millette, J. R. Dust: A Metric for Use in Residential and Building Exposure Assessment and Source Characterization. *Environ. Health Perspect.* **2002**, *110* (10), 969–983. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110969>.
- (3) Jones-Otazo, H. a.; Clarke, J. P.; Diamond, M. L.; Archbold, J. a.; Ferguson, G.; Harner, T.; Richardson, G. M.; Ryan, J. J.; Wilford, B. Is House Dust the Missing Exposure Pathway for

- PBDEs? An Analysis of the Urban Fate and Human Exposure to PBDEs. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39* (14), 5121–5130. <https://doi.org/10.1021/es048267b>.
- (4) Melymuk, L.; Demirtepe, H.; Jílková, S. R. Indoor Dust and Associated Chemical Exposures. *Curr. Opin. Environ. Sci. Heal.* **2020**, *15*, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.01.005>.
- (5) Jílková, S. R. Endocrine Disrupting Chemicals, Masaryk UNiversity, 2019.
- (6) De Wit, C. A. An Overview of Brominated Flame Retardants in the Environment. *Chemosphere* **2002**, *46* (5), 583–624. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00225-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00225-9).
- (7) de Wit, C. A. *An Overview of Brominated Flame Retardants in the Environment*; 2002; Vol. 46. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(01\)00225-9](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(01)00225-9).
- (8) van der Veen, I.; de Boer, J. Phosphorus Flame Retardants: Properties, Production, Environmental Occurrence, Toxicity and Analysis. *Chemosphere* **2012**, *88* (10), 1119–1153. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.03.067>.

## 14.1 Stanovení halogenovaných zpomalovačů hoření ve vzorku prachu

### I. Soxhletova extrakce

#### Pomůcky:

- vzorek domácího prachu z vysavače
- jednorázové extrakční patrony
- předčištěná vata
- automatický extraktor Büchi
- extrakční baňka
- teflonové varné kamínky
- vialky EPA 20 ml, EPA 40 ml
- jednorázové skleněné Pasteurovy pipety
- předvážky

#### Chemikálie:

- extrakční standardy
- dichlormethan (DCM)

#### Postup práce:

- vzorek domácího prachu (cca 0,1 g) navažte do jednorázové extrakční patrony
- přidejte ke vzorku extrakční standardy
- v patroně vzorek přikryjte kouskem předčištěné vaty a zatěžte malou skleněnou zátkou
- do extrakční nádoby nalijte rozpouštědlo (DCM), cca 150 ml, přidejte teflonový varný kamínek
- extrahujte programem pro extrakci DCM (40 minut horký Soxhlet, 20 minut prokapávání rozpouštědlem)
- po ukončení extrakce zkoncentrujte vzorek příslušným programem na objem menší než 10 ml
- vzorek kvantitativně převedte do 20ml vialky (původní extrakční nádobku promyjte alespoň 2x 1-2 ml DCM a přidejte k extraktu ve vialce)
- odpařte extrakt pod proudem dusíku na objem cca 1-2 ml

### II. Čištění

#### Pomůcky:

- skleněná kolona, vnitřní průměr 1 cm
- vialka o objemu 40 ml
- Pasteurova pipeta, vata
- mini-vialka o objemu 1 ml



Obr. 4: Automatický extraktor Büchi

**Chemikálie:**

- čišťený aktivovaný silikagel (aktivace 12 hod při 150°C)
- čišťený neaktivovaný silikagel
- silikagel modifikovaný kyselinou sírovou (22 ml koncentrované  $H_2SO_4$  + 50 g aktivovaného silikagelu)
- hexan, DCM, nonan

**Postup práce:**

- připravte kolonu k separaci:
    - na dno kolony vložte smotek vaty
    - na něj nasypete asi 1 cm vysoký sloupec čišťeného aktivovaného silikagelu, nad tuto vrstvu 5 g čišťeného aktivovaného silikagelu modifikovaného kyselinou sírovou
    - tyčinkou mírně sklepejte
    - na vrchol sloupce nasypete 1-2 cm vrstvu neaktivovaného silikagelu a opět sklepejte
  - vzorek kvantitativně naneste na kolonu
  - proveďte eluci 30 ml 50% DCM v hexanu do 40ml vialky
  - vzorek zakonzentrujte pod mírným proudem dusíku na cca 100  $\mu$ l
  - vzorek převedte do předem označené mini-vialky, přidejte 40  $\mu$ l nonanu
- a odpařte na finální objem 40  $\mu$ l
- přidejte vnitřní standardy
  - mini-vialku pečlivě uzavřete a uschovejte v ledničce až do provedení analýzy



*Obr. 5: Eluce vzorku z kolony se silikagelem modifikovaným kyselinou sírovou*

### III. Stanovení analytů pomocí GC-MS

Stanovení BFR bude provedeno pomocí GC-MS.

## 14.2 Stanovení organofosfátových esterů ve vzorku prachu

### I. Extrakce v methanolu

#### Pomůcky:

- vzorek prachu
- extrakční nádobka (vialka nebo kádinka)
- vialky EPA 20 ml
- jednorázové skleněné Pasteurovy pipety
- předvážky

#### Chemikálie:

- izotopicky značené extrakční standardy OPEs
- methanol

#### Postup práce:

- navažte přibližně 100 mg prachu do vialky
- ke vzorku ve vialce přidejte izotopicky značené extrakční standardy OPEs
- extrakci proveďte třikrát:
  - o do vialky přidejte 3 ml methanolu

- o extrahujte v ultrazvukové lázni 20 min
- o 10 minut nechte usadit
- o převedte extrakt do nové vialky
- výsledek: 9 ml extraktu ve vialce



*Obr. 6: Extrakce v ultrazvukové lázni*

## II. Čištění

### Pomůcky:

- injekční stříkačky 2ml
- stříkačkové nylonové filtry (0,45  $\mu$ m)
- mini-vialky (2 ml)
- jednorázové skleněné Pasteurovy pipety
- předvážky

### Chemikálie:

- methanol
- Mili-Q voda

### Postup práce:

- extrakt zakonzentrujte pod proudem dusíku a při ohřevu na teplotu 35 °C na přibližně 1 ml
- extrakt přefiltrujte přes stříkačkový nylonový filtr
- filtrát zakonzentrujte pod proudem dusíku na méně než 0,5 ml
- přidejte methanol tak, abyste měli přesně 0,5 ml vzorku
- přidejte 0,5 ml Mili-Q vody



*Obr. 7: Filtrace extraktu přes stříkačkový nylonový filtr*

### **III. Stanovení analytů pomocí LC-MS**

Stanovení OPEs bude provedeno pomocí LC-MS.

## 15 Stanovení metabolitů endokrinních disruptorů ve vzorcích moči

### **Teoretický úvod:**

Lidé jsou vystaveni působení množství látek, u kterých jsou známé nebo předpokládané negativní účinky na zdraví. Látky známé jako endokrinní disruptory (ED) narušují hormonální rovnováhu a tím způsobují další nežádoucí zdravotní efekty (WHO, 2013). Tyto látky jsou hojně průmyslově využívány a nacházejí se v množství výrobků kolem nás. Proto je důležité znát jejich množství v lidských organismech (Esteban and Castaño, 2009). ED jsou lidským tělem poměrně snadno odbourávány, tudíž je možné sledovat jejich koncentrace ve formě metabolitů například v moči (Barr et al., 2002). Avšak i přesto, že jsou snadno odbouratelné, jejich koncentrace v lidských organismech neklesají. Naopak kvůli vysoké expozici hladiny ED v lidských tkáních stále vzrůstají. Proto jsou tyto látky často označovány za pseudopersistentní.

*Jaké mohou být expoziční cesty ED do lidského organismu?*

### **Ftaláty**

Ftaláty jsou průmyslově používány jako změkčovače plastů, rozpouštědla nebo stabilizační činidla. Existuje mnoho výrobků s obsahem ftalátů, například plastové součástky automobilů, lékařské vybavení apod. (Kolarik et al., 2008). Ftaláty jsou často obsaženy i v kosmetických produktech, jako jsou parfémy, laky na vlasy nebo nehty, apod. (Bernard et al., 2014). Jsou rovněž používány při výrobě PVC (polyvinylchloridu) nebo výrobků obsahujících PVC, jako jsou například plastové tašky, obaly na skladování kosmetiky apod. V kosmetických prostředcích se tedy ftaláty mohou objevovat jak cíleně (např. jako rozpouštědla), tak neúmyslně, kdy se do výrobku dostanou z plastového obalu. Ftaláty jakožto přísady totiž nejsou pevně chemicky vázány na plast, proto se z něj mohou časem uvolňovat, dostávat se do prostředí a různě v něm migrovat (Gimeno et al., 2014).

### **Alternativní náhrady**

Vzhledem k tomu, že některé ftaláty jsou kvůli svému negativnímu působení legislativně omezeny, používají se v průmyslu tzv. alternativní náhrady. To jsou látky, které mají velmi podobné vlastnosti jako ftaláty, ale v současné době jsou považovány za bezpečné. Bohužel, právě díky jejich podobným vlastnostem v produktech se dá předpokládat podobné působení taktéž v organismech, proto je vhodné monitorovat i tyto látky (Schütze et al., 2012). V našem případě se jedná o látku s názvem DINCH (Diisononyl ester 1,2-cyclohexan dikarboxylové kyseliny). Ta je v současné době hojně používána, a to i v takových produktech, jako jsou výrobky pro děti nebo lékařské vybavení.



## **Bisfenoly**

Bisfenoly jsou syntetické sloučeniny hojně používané v množství výrobků. Jsou definovány jako nepersistentní látky s krátkým poločasem života (okolo 6 hodin) v lidském organismu (Sakhi et al., 2018). Dekonjugované bisfenoly v moči jsou často používány jako biomarkery k určení celkové expozice bisfenolům (Moos et al., 2014). Nejběžnějším zástupcem je bisfenol A (BPA), který je používán v různých produktech, jako jsou dentální tmely, konzervy, termopapíry, produkty osobní péče nebo potravinové obaly (Geens et al., 2014). Vliv BPA na estrogenní aktivitu a reprodukční toxicitu je dobře znám, kvůli svým endokrinně disruptivním účinkům a toxicitě ošetřen legislativou REACH (ECHA, 2013). Proto bylo jeho použití v kojeneckých lahvích v Evropě od roku 2011 legislativně omezeno (EU, 2011) a později dokonce zakázáno Evropskou komisí (ECHA, 2016). Vhodné látky k nahrazení BPA v některých produktech jsou bisfenol S a bisfenol F.

## **Pesticidy**

Pesticidy jsou široce používané látky, které jsou často aplikovány a nadvyžívány v zemědělství, ale i na residenčních plochách, což vede k jejich rozšíření do všech složek prostředí. Je tedy nemožné se expozici pesticidům zcela vyhnout. Většina akutních efektů expozice je dobře známá, ale chronická expozice nízkým dávkám může způsobit závažné problémy, navíc je to téma, o kterém není dostatek informací (Baker et al., 2000). Existuje mnoho skupin pesticidů, jako jsou karbamátové insekticidy, organofosfátové insekticidy, organochlorované pesticidy nebo pyrethroidy. V tomto případě bude kladen důraz na metabolity organofosfátových insekticidů a pyrethroidů, jelikož mají vyšší polaritu, a proto bude výskyt jejich metabolitů v moči více očekávaný/pravděpodobný.

*Zamyslete se nad průběhem svého normálního dne. Kolikrát a kde přijdete do kontaktu s těmito látkami?*

*Napadají vás nějaké kroky, jak zmenšit potenciální expozici výše zmíněným látkám?*

Následující postup přípravy vzorku je vhodný pro všechny zmíněné skupiny látek, limitující je pouze přítomnost konkrétních isotopicky značených standardů.

## **Postup práce**

### **Pomůcky**

- 2,5ml Eppendorf zkumavky
- skleněné Pasteurovy pipety
- manifold na SPE
- kolonky Oasis HLB (60 mg, 3cc)
- mini-vialky

## Chemikálie

- octan amonný
- $\beta$ -glukuronidáza
- kyselina octová
- acetonitril
- methanol
- mili-Q voda
- směsný standard příslušných izotopicky značených metabolitů

## Zpracování vzorků

- do čisté 2,5ml Eppendorf zkumavky napipetujte 0,5 ml moči (do slepého vzorku 0,5 ml Mili-Q vody), značený standard (10 ng/ml; 5 ng/vzorek) a 127,5  $\mu$ l roztoku  $\beta$ -glukuronidázy v octanu amonném (6,25 ml 1mM octanu amonného a 125  $\mu$ l  $\beta$ -glukuronidázy)
- zkumavku zavřete, vortexujte po dobu 10 sekund a nechejte inkubovat při 37 °C po dobu 90 minut



Obrázek 1 Aparatura pro inkubační enzymatickou reakci (37 °C, 90 minut)

*Proč necháváme reagovat naše cílové analyty s enzymem ( $\beta$ -glukuronidázou) při teplotě 37 °C?*

## Přečištění vzorku

Pro přečištění vzorku a zároveň extrakci cílových analytů použijte extrakci na tuhé fázi, neboli solid-phase extraction (SPE):

- do manifoldu umístěte kolonky s C18 sorbentem (Oasis HLB, 60 mg, 3 cc)
- kolonky nejprve aktivujte 1 ml methanolu, poté ekvilibrujte 1 ml 0,1% kyseliny octové

- poté přes kolonku převedte vzorek
- kolonku promyjte 1 ml 0,1% kyseliny octové a 1 ml vody
- nakonec vzorek eluujte 1 ml methanolu, z tohoto eluátu odeberte 500 µl do mini-vialek
- vzorky budou poté analyzovány za použití HPLC-MS/MS systému



**Obrázek 2** Manifold a kolonky pro SPE

### Otázky

*Vysvětlete princip SPE.*

*Jaké další látky byste očekávali, že naleznete v moči a proč?*

*Jaké další metody zpracování vzorků moči se používají?*

*Které další nežádoucí látky se mohou ve vzorcích moči vyskytovat, a od čeho je tedy pomocí SPE přečišťujeme?*

### Reference:

- Baker, S.E., Barr, D.B., Driskell, W.J., Beeson, M.D., Needham, L.L., 2000. Quantification of selected pesticide metabolites in human urine using isotope dilution high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* 10, 789–798.
- Barr, D.B., Barr, J.R., Maggio, V.L., Whitehead, R.D., Sadowski, M.A., Whyatt, R.M., Needham, L.L., 2002. A multi-analyte method for the quantification of contemporary pesticides in human serum and plasma using high-resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 778, 99–111. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(01\)00444-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(01)00444-3)

- Bernard, L., Décaudin, B., Lecoœur, M., Richard, D., Bourdeaux, D., Cueff, R., Sautou, V., 2014. Analytical methods for the determination of DEHP plasticizer alternatives present in medical devices: A review. *Talanta* 129, 39–54. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.04.069>
- ECHA, 2016. Annex XV report PROPOSAL FOR IDENTIFICATION OF A SUBSTANCE OF VERY HIGH CONCERN ON THE BASIS OF THE CRITERIA SET OUT IN REACH ARTICLE 57 1, 80.
- ECHA, 2013. Inclusion of Substances of Very High Concern in the Candidate List for eventual inclusion in Annex XIV 1, 1–4.
- Esteban, M., Castaño, A., 2009. Non-invasive matrices in human biomonitoring: A review. *Environ. Int.* 35, 438–449. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.09.003>
- EU, 2011. Commission Regulation (EU) No 10/2011 of 14 January 2011 on plastic materials and articles intended to come into contact with food. *Off. J. Eur. Union*. Geens, T., Bruckers, L., Covaci, A., Schoeters, G., Fierens, T., Sioen, I., Vanermen, G., Baeyens, W., Morrens, B., Loots, I., Nelen, V., de Belleaux, B.N., Larebeke, N. Van, Hond, E. Den, 2014. Determinants of bisphenol A and phthalate metabolites in urine of Flemish adolescents. *Environ. Res.* 134, 110–117. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.07.020>
- Gimeno, P., Thomas, S., Bousquet, C., Maggio, A.-F., Civade, C., Brenier, C., Bonnet, P.-A., 2014. Identification and quantification of 14 phthalates and 5 non-phthalate plasticizers in PVC medical devices by GC-MS. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 949–950, 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.12.037>
- Kolarik, B., Bornehag, C.G., Naydenov, K., Sundell, J., Stavova, P., Nielsen, O.F., 2008. The concentrations of phthalates in settled dust in Bulgarian homes in relation to building characteristic and cleaning habits in the family. *Atmos. Environ.* 42, 8553–8559. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2008.08.028>
- Moos, R.K., Angerer, J., Wittsiepe, J., Wilhelm, M., Brüning, T., Koch, H.M., 2014. Rapid determination of nine parabens and seven other environmental phenols in urine samples of German children and adults. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 217, 845–853. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2014.06.003>
- Sakhi, A.K., Sabaredzovic, A., Papadopoulou, E., Cequier, E., Thomsen, C., 2018. Levels, variability and determinants of environmental phenols in pairs of Norwegian mothers and children. *Environ. Int.* 114, 242–251. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.02.037>
- Schütze, A., Palmke, C., Angerer, J., Weiss, T., Brüning, T., Koch, H.M., 2012. Quantification of biomarkers of environmental exposure to di(isononyl)cyclohexane-1,2-dicarboxylate (DINCH) in urine via HPLC–MS/MS. *J. Chromatogr. B* 895–896, 123–130. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.03.030>

WHO, 2013. Endocrine DisruptiState of the Science of Endocrine Disrupting Chemicals 2012. Summary  
for Decision-Makers. <https://doi.org/10.1002/9781118346747.ch1>



*Tato práce byla provedena za podpory projektu MUNI/FR/1160/2019 a výzkumné infrastruktury RECETOX (LM2018121, MŠMT).*