

Univerzita Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem

VÍCEROZMĚRNÉ A KOMBINOVANÉ TECHNIKY
NÁVODY K PRAKTICKÝM ÚLOHÁM

Doc. Dr. Ing. Pavel Kuráň



EVROPSKÁ UNIE
Evropské strukturální a investiční fondy
Operační program Výzkum, vývoj a vzdělávání



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

OPVVV STUVIN – Studium, výzkum a inovace - rozvoj přírodovědných a technických doktorských programů na Univerzitě J. E. Purkyně v Ústí n. L., reg. č.: CZ.02.2.69/0.0/0.0/16_018/0002735.

1) Analýza ovzduší - Stanovení BTEX v trubičkách s aktivním uhlím

1. CÍL PRÁCE

Cílem práce je stanovení BTEX (benzen, toluen, etylbenzen, xyleny), které jsou zachycené v sorpčních trubičkách s aktivním uhlím.

2. OBLAST POUŽITÍ

Analýza ovzduší - Stanovení BTEX (benzen, toluen, ethylbenzen, xyleny) zachycených v sorpčních trubičkách s aktivním uhlím.

3. CHEMIKÁLIE A MATERIÁLY

Sirouhlík p.a. nebo lepší kvality (předestilovaný a sušený bezvodým síranem sodným aktivovaným 7-8 hodin při 600°C), standardy BTEX čistoty p.a. nebo lepší kvality, aktivní uhlí (doporučeno používat kokosové uhlí CSC = „coconut shell carbon“ od americké firmy SKC).

4. PŘÍSTROJE

Plynový chromatograf Varian 3800 s hmotnostním detektorem Saturn 4000, kapilární kolona s nepolární stacionární fází (Restek RTX-VMS), pinzeta, tenká kovová tyčinka o průměru asi 1 mm a délky 10 cm, nůž na řezání skla, nůž na řezání umělé hmoty, řezák na kapilární kolony, umělohmotný otvírák na zatavené ampule, dvě duté kovové trubičky o vnitřním průměru 5-7 mm a délce 15-16 cm, automatická pipeta o objemu 1-5 ml, 2 ml vialky se septem a šroubovým uzávěrem, 4 ml vialky se septem a šroubovým uzávěrem, dělená pipeta o objemu do 1 ml, dělená pipeta o objemu do 5 ml, pipetovací pumpa, injekční stříkačky o objemu 10 µl, 50 µl, 100 µl, 200 µl a 500 µl.

Údržba laboratorního skla:

Mytím vodou s přísadkou saponátu a následně oplachováním deionizovanou vodou.

5. POSTUP ZKOUŠKY

5.1. Desorpce vzorku

Z obou konců sorpční trubice (ampulky) s aktivním uhlím se s pomocí nože na řezání umělé hmoty sundají červené kryty a trubice se nožem na sklo nařízne v prostoru mezi vatou a prázdným koncem. Poté se každý konec sorpční trubice zasune do jedné duté kovové trubice tak, aby naříznutá část byla v prostoru mezi trubicemi, a opatrně se zlomí. Začíná se od hlavní sorpční vrstvy, tj. ze strany od naznačené šipky označující směr odběru. Pinzetou se vyjme zátka ze skelné nebo křemenné vaty a přenesení se do připravené suché a předem vychlazené 4 ml vialky. Poté se do té samé vialky přesype aktivní uhlí z hlavní sorpční vrstvy (v případě testů ALME značena jako 1.sekce aktivního uhlí, tj. část první od šipky ve směru odběru). Kontrolní (sekundární) sorpční vrstva (v případě testů ALME značena jako 2.sekce aktivního uhlí, tj. část druhá od šipky ve směru odběru) se spolu s oběma zátkami z polyuretanové pěny, které tuto část aktivního uhlí mezi sebou uzavírají, pomocí kovové tyčinky vytlačí do jiné předem vychlazené 4 ml vialky. Vialky se uzavřou uzávěrem se septem, označí a zvaží na analytických vahách. Poté se vialky znovu otevrou, nakloní a po stěně se do každé z nich automatickou pipetou nastavenou na objem 2 ml opatrně přidá sirouhlík těsně před použitím

vytažený z lednice – je důležité, aby se předešlo úniku par stanovovaných látek v důsledku tepla uvolněného při desorpci. Vialky se znovu uzavřou a znovu se zvaží na analytických vahách. Poté se uzavřené 4 ml vialky intenzivně třepou 2 minuty v ruce. Po extrakci se vialky nechají stát 30 minut; během této doby se s nimi třikrát zamíchá. Po posledním promíchání a usazení největších kousků aktivního uhlí (maximálně 10 minut) se z každé 4 ml vialky odlije 0,5 až 1 ml extraktu do 2 ml vialek určených pro automatický dávkovač plynového chromatografu. Hladina zbylého objemu extraktu ve 4 ml vialkách se označí fixou.

5.2. GC analýza

Analýza extraktu se provede na plynovém chromatografu s plamenovým ionizačním detektorem nebo hmotnostním spektrometrem za použití optimalizovaných parametrů.

5.3. Kalibrace při GC analýze

Kalibrační roztoky se připravují za použití stejného rozpouštědla, jakého bylo použito k extrakci trubiček, tj. do sirouhlíku.

Kalibrace externím standardem (ESTD)

Kalibrace externím standardem se provádí tehdy, pokud není k dispozici daný typ aktivního uhlí, nebo z časových a finančních důvodů. Kalibrace se provádí přípravou standardů BTEX o známých koncentracích (50 mg/l, 150 mg/l, 500 mg/l, 1500 mg/l, 5000 mg/l) v sirouhlíku. Postup přípravy standardů BTEX v sirouhlíku je následující:

1) Připraví se základní roztok BTEX v sirouhlíku o koncentracích každé látky 5000 mg/l: 5000 mg/l BTEX v sirouhlíku = 22,7 μ l benzenu + 23,0 μ l toluenu + 23,1 μ l ethylbenzenu + 23,3 μ l xylenů + 3907,9 μ l sirouhlíku do 4 ml vialky

Poznámka: Pro přepočítání hmotností a objemů se používají hustoty uvedené výrobcem na dodaných lahvích. Použité hustoty pro jednotlivé BTEX jsou v následující tabulce:

Látka:	benzen	toluen	ethylbenzen	xyleny
Hustota (kg/l):	0,88	0,87	0,867	0,86

2) Ostatní standardy se získají ředěním základního roztoku sirouhlíkem, jak ukazuje následující tabulka:

koncentrace standardu	postup přípravy
5000 mg/l	1 ml základního roztoku do 2 ml vialky
1500 mg/l	700 μ l sirouhlíku + 300 μ l základního roztoku
500 mg/l	900 μ l sirouhlíku + 100 μ l základního roztoku
150 mg/l	970 μ l sirouhlíku + 30 μ l základního roztoku
50 mg/l	990 μ l sirouhlíku + 10 μ l základního roztoku
0 mg/l	1 ml čistého sirouhlíku do 2 ml vialky

Nastříkuje se zpravidla 2-3x po 1 μ l extraktu každého kalibračního roztoku za použití optimalizovaných parametrů uložených v souboru Restek2.M (viz. Příloha 1). Pro každý z analytů se sestrojí kalibrační graf vynesením ploch piků analytu korigovaných o hodnoty slepého pokusu proti koncentraci analytu v mg/l. Kalibrační funkce se vyjádří lineární funkcí:

$$A_i = k_i \cdot x_i$$

kde A_i - zjištěná plocha standardu i (i = benzen, toluen, ethylbenzen, xyleny)
 k_i - směrnice kalibrační přímky pro daný standard i
 x_i - koncentrace standardu i v mg/l

6. VÝPOČTY, VYJADŘOVÁNÍ VÝSLEDKŮ

Z plochy GC píků se pomocí zjištěné kalibrační funkce určí koncentrace každé ze sledovaných složek v mg/l. Tato koncentrace odpovídá hmotnosti složky v mg v jednom litru extrakčního činidla. Zjištěná koncentrace v mg/l se musí přepočítat na objem použitého extrakčního činidla. Ten se zjistí z rozdílu hmotností uzavřené vialky se vzorkem po přidavku sirouhlíku a před přidavkem sirouhlíku v gramech, následným vydělením tohoto rozdílu hustotou sirouhlíku, která je 1,263 kg/l, a nakonec vynásobením faktorem 1/1000. Tím získáme množství složky v mg na vzorek (mg/vz).

V případě, že zjištěná plocha některé ze stanovovaných látek ve vzorku leží mimo kalibrační křivku, vzorek se přeměří po vhodném naředění. Použitý faktor ředění ZF se musí zohlednit při výpočtu. Pokud nebylo nutno vzorek ředit, je faktor ZF = 1.

$$C_i = \frac{A_i}{k_i} \cdot \frac{m_1 - m_2}{1000 \cdot 1,263} \cdot ZF$$

kde C_i - koncentrace stanovované složky i v mg/vz
(i = benzen, toluen, ethylbenzen, xyleny)
 A_i - plocha píku stanovované složky i
 k_i - směrnice kalibrační přímky pro daný standard i
 m_1 - hmotnost uzavřené vialky se vzorkem po přidavku sirouhlíku v gramech
 m_2 - hmotnost uzavřené vialky se vzorkem před přidavkem sirouhlíku v gramech
ZF - faktor ředění ZF

2) STANOVENÍ UHLOVODÍKŮ C₁₀-C₄₀ a PAU v pevných vzorcích

Úloha 1: Posouzení stáří ropného znečištění v kontaminovaných půdách podle obsahu uhlovodíků C₁₀-C₄₀ a profilu chromatografického záznamu

Úloha 2: Porovnání výskytu a chromatografického profilu PAU v zemědělské půdě a v blízkosti frekventované silnice.

1. ÚVOD

Uhlovodíky C₁₀-C₄₀ a ropné zátěže

Čerstvou ropnou zátěž lze odlišit od staré ropné zátěže podle profilu chromatografického záznamu. U čerstvé ropné kontaminace lze pozorovat na chromatografickém profilu ropných látek (tzv. „obálce“) diskrétní píky alkanů a rozvětvených uhlovodíků fytan a pristan. U staré ropné zátěže uvedené píky jsou buď výrazně nižší nebo úplně chybí.

PAU a kontaminace poblíž silnic

PAU se běžně vyskytují i v zemědělské půdě na úrovních kolem 100 ppb. U frekventovaných silnic dochází v důsledku výfukových plynů a loužení asfaltu při dešti k významnému nárůstu obsahu PAU.

2. PRINCIP STANOVENÍ

Uhlovodíky C₁₀-C₄₀ a PAU se extrahují acetonem, převedou do hexanu a po přečištění a zakoncentrování se stanovují na plynovém chromatografu.

Vzorky čekající na zpracování se skladují v lednici; maximální doba skladování je 1 týden.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

PŘÍPRAVA PRACOVNÍHO ROZTOKU v závislosti na konečném objemu vzorku

Konečný objem vzorku	Minimální množství ZRRS v PR	Maximální množství ZRRS v PR
5 ml	0,75 ml ZRRS do 30 ml PR	1,5 ml ZRRS do 330 ml PR
1,5	1,5 ml ZRRS do 30 ml PR	3 ml ZRRS do 30 ml PR
20 ml	3 ml ZRRS do 30 ml PR	6 ml ZRRS do 30 ml PR
30 ml	4,5 ml ZRRS do 30 ml PR	9 ml ZRRS do 30 ml PR
40 ml	6 ml ZRRS do 30 ml PR	12 ml ZRRS do 30 ml PR
50 ml	7,5 ml ZRRS do 30 ml PR	15 ml ZRRS do 30 ml PR

PŘÍPRAVA ROZTOKU NaCl

Roztok chloridu sodného se připraví rozpuštěním pevného chloridu sodného v deionizované vodě v množství závislém na počtu vzorků, jak je uvedeno v tabulce.

Počet vzorků	Chlorid sodný (g)	Deionizovaná voda (g)
1	35	210
2	65	390
3	100	600
4	130	780
5	160	960

6	200	1200
7	230	1380
8	260	1560

Poznámka: při vysokých koncentracích C₁₀-C₄₀ ve vzorku připravíme roztok chloridu sodného 10x méně koncentrovaný.(na 1 vzorek rozpustíme 3,5 g NaCl ve 210 ml deionizované vody).

PŘÍPRAVA SMĚSI HEXAN-DICHLORMETHAN (2:1)

300 ml dichlormethanu + 600 ml hexanu

PŘÍPRAVA ZÁSOBNÍHO ROZTOKU REFERENČNÍCH SLOUČENIN (ZRRS)

Do 60ml vialky se naváží 15 mg n-tetrakontanu (C₄₀) a přidá se 50 ml hexanu. Vialka se uzavře a n-tetrakontan se v hexanu rozpouští ručním třepáním. Rozpouštění se usnadní zahříváním hexanu ve vialce – například občasným ponořením do vody ohřáté na 50 °C v kádince na magnetické míchače. Po rozpouštění se roztok kvantitativně převede přes nálevku do 500ml odměrné baňky a dolije se čistý hexan asi 2 až 3 cm pod rysku. Poté se k roztoku přidá ještě 15 µl n-dekanu (C₁₀) a baňka se doplní hexanem po rysku. Skladuje se za laboratorní teploty.

AKTIVACE Na₂SO₄

Bezvodý síran sodný se suší 7,5 hodiny v porcelánových kelímcích v peci při 600°C. Po vychladnutí na teplotu 110 až 120°C se přesype do 60 ml vialek a uchovává se uzavřený v exikátoru.

AKTIVACE VARNÝCH KORÁLKŮ

Varné korálky se předem vyextrahovaly v CH₂Cl₂ a poté aktivovaly 30 minut v sušárně při 120°C

Pokud je vysoká vlhkost vzduchu (v létě), provádí se aktivace 1x měsíčně.

AKTIVACE FLORISILU

(Florisil je bezvodý křemičitan hořečnatý)

Florisil o průměru částic 60 až 100 Mesh se suší v sušárně na Petriho misce 16 hodin při 140°C. Poté se přesype do 60 ml vialek a uchovává se uzavřený v exikátoru.

Poznámka: Při otevření nové lahve se provádí zkouška vhodnosti Florisilu.

NAVÁŽENÍ A EXTRAKCE VZORKU

- do 250 ml konické baňky (erlenky) se naváží 5,50 g vzorku (zeminy – frakce < 3,15 mm)
- s každou sadou vzorků se provádí stanovení slepého pokusu úplným postupem, tedy s použitím všech činidel, přístrojů a nádobí stejným způsobem jako u vzorků.(Vzorek neobsahuje žádnou zeminu).
- ke vzorku se odměrným válcem přidá 40 ml acetonu
- baňka se vloží na 5 minut do ultrazvuku
- poté se do baňky vloží magnetické míchadlo dlouhé asi 3 cm, přidá se 30 ml pracovního roztoku a míchá se 30 minut na magnetické míchače při optimálních otáčkách
- rozpouštědla by neměla příliš stříkat po stěnách baňky, ale zároveň se musí míchat celý objem baňky
- směs se pomocí 20 ml acetonu kvantitativně převede do dvou centrifugačních kyvet a kyvety se vyváží (doplněním acetonu do lehčí z nich)

- kyvety se používají dvě na jeden vzorek z důvodu jejich nedostatečně velkého objemu
- směs je třeba vylévat z erlenky opatrně, aby se nevyhlila, avšak rychle, aby se do kyvety dostala i zem.

Poznámka: při vysokých koncentracích C₁₀-C₄₀ ve vzorku se naváží přibližně 3 g vzorku.

Poznámka: při stanovení PAH nahradíme 30 ml pracovního roztoku pouze hexanem.

ODSTŘEĐOVÁNÍ

- Vyvážené kyvety se vzorkem se vloží do centrifugy, uzavře se víko, nastaví se otáčky a doba odstřeďování a odstřeďuje se 10 minut při 4000 ot/min.

PROMÝVÁNÍ EXTRAKTU

- celý supernatant po odstřeďování se přelije do 250 ml dělicí nálevky, do níž už se předem nalilo 65 ml roztoku NaCl v demi vodě
 - při přelévání se pokud možno nesmí zvrít kal na dně kyvety
 - kyveta se nevyplachuje
 - NaCl se přidává kvůli lepšímu oddělování fází a zřetelnějšímu fázovému rozhraní
- třepe se 1 minutu
- poté se vodná fáze, do níž přejde i aceton, odpustí a přidá se dalších 65 ml roztoku NaCl v deionizované vodě a postup se opakuje
- celkově se extrakce vodou s přídavkem NaCl provádí 3x
- po posledním promývání extraktu a odpuštění roztoku chloridu sodného se hexanová fáze vypustí přes analytickou nálevku se skelnou vatou předem propláchnutou 2x 2 ml čistého hexanu do 250 ml konické baňky (erlenky) pomocí vaty se odstraní klky vyskytující se na fázovém rozhraní a bránící přesnějšímu oddělení vodné a hexanové fáze
- dělicí nálevka se 2x propláchne malým množstvím čistého hexanu
- pokud se do 250 ml konické baňky (erlenky) dostalo větší množství vody, odebere se pipetou

SUŠENÍ SÍRANEM SODNÝM

Provádí se bezprostředně před čištěním vzorku přes Florisil.

- k hexanové fázi do 250 ml konické baňky (erlenky) se přidá dostatečné množství síranu sodného (předem aktivovaného 7-8 hodin při 600°C)
 - nejprve se přidá 8 g síranu a podle potřeby se přisype další množství, pokud je vidět, že 8 g nestačí
 - dostatečné množství síranu je takové, kdy v baňce zůstávají volně se přesypající krystalky
- síran se nechá 30 minut působit (během této doby se několikrát promíchá)

Poznámka: při vysokých koncentracích C₁₀-C₄₀ ve vzorku se do erlenky se vzorkem a síranem přidá ještě přibližně 2 g aktivovaného florisilu.

ČIŠTĚNÍ VZORKŮ NA CHROMATOGRAFICKÉ KOLONĚ NAPLNĚNÉ FLORISILEM

Při stanovení C₁₀-C₄₀ se provádí postupnou elucí 18 ml hexanu, rozdělenými na 2 dávky po 9 ml.

Při stanovení PAH se provádí elucí 18 ml směsi hexan-dichlormethan (2:1).

Stanovení C₁₀-C₄₀

- malá skleněná kolonka ucpaná skelnou vatou se naplní 2 g florisilu

- na kolonku se nasadí analytická nálevka se skelnou vatou (předem propláchnutou 2x 2 ml čistého hexanu)
- kolonka se nejprve promyje 10 ml hexanu
- když je promývání skončeno a hladina hexanu se téměř dotkne chromatografického sloupce, začne se na florisil nalévat vzorek
- eluát se jímá do 250 ml baňky (erlenky) nebo do 60 ml vialky ~~(frakce „a“)~~
- eluce se provádí 2 krát 9 ml hexanu (baňka, v níž byl vzorek, se každou dávkou propláchne)
- kolona nesmí vyschnout, jinak by se mohla potrhat
- čištění kolony:
 - florisil se z kolonky vysype, skelná vata se vyhodí a kolonka se umyje vodou s jarem, opláchne demí vodou a případně vysuší acetonem

Stanovení PAH

- malá skleněná kolonka ucpaná skelnou vatou se naplní 2 g florisilu
- na kolonku se nasadí analytická nálevka se skelnou vatou (předem propláchnutou 2x 2 ml čistého hexanu)
- kolonka se nejprve promyje 10 ml hexanu
- když je promývání skončeno a hladina hexanu se téměř dotkne chromatografického sloupce, začne se na florisil nalévat vzorek
- eluát se jímá do 250 ml baňky (erlenky) nebo do 60 ml vialky.
- eluce se provádí 18 ml směsi hexan:dichlormetan (baňka, v níž byl vzorek, se propláchne)
- kolona nesmí vyschnout, jinak by se mohla potrhat
- čištění kolony:
 - florisil se z kolonky vysype, skelná vata se vyhodí a kolonka se umyje vodou s jarem, opláchne demí vodou a případně vysuší acetonem

ZAHUŠŤOVÁNÍ VZORKŮ

Pročištěný extrakt se zahušťuje dle potřeby:

BUĎ nejprve na aparatuře podle Kuderna-Danische a poté pomocí dusíku NEBO pouze pomocí dusíku (v závislosti na konečném objemu vzorku).

ZAHUŠŤOVÁNÍ HEXANOVÉHO EXTRAKTU

Zahušťování hexanového extraktu se provádí na aparatuře podle Kuderna-Danische, která je vhodná zejména na zahušťování dichlormethanu a hexanu. Hexan má teplotu varu 69°C.

Před zahušťováním se ke vzorku přidává 50 µl xylenu.

Zahušťuje se na co nejmenší objem, ale musí se hlídat, aby se všechen hexan z varné baňky nevyvařil!

Při práci se používá ochranný štít!

- nejprve se zapne topné hnízdo, na kterém stojí vodní lázeň. Regulátor intenzity topení se nastaví na hodnotu 7 a nechá se vyhřát na požadovanou počáteční teplotu, která je 95-100°C.
 - na vodní lázeň stačí použít vodovodní vodu, ale lepší je destilovaná
 - do vodní lázně se dávají varné kamínky s otvory
 - počáteční teplota nesmí být příliš nízká, aby nedošlo k utajenému varu hexanu!
 - rozpouštědlo se při zahušťování zahřívá na teplotu aspoň o 20°C, lépe však o 30°C vyšší než je jeho bod varu – vodní lázeň může vřít
 - pokud se v průběhu práce voda v lázni částečně vyvaří, je třeba ji doplňovat
- hruškovitá baňka se spojí s varnou nádobkou a nalije se do ní vzorek (hexanový extrakt)

- baňka s nádobkou se při plnění staví do čisté kádinky, abychom v případě netěsnosti spoje nepřišli o vzorek
- je lepší použít analytickou nálevku, aby nedošlo ke ztrátě části vzorku
- extrakt se lije opatrně po stěně baňky
- baňka, ze které se vzorek přelával, se oplachuje asi 5 až 10 ml čistého hexanu (odhadem)
- do varné nádoby nesmíme zapomenout dát 10 až 15 varných korálků s otvorem uprostřed (prstenec)
 - na varné korálky se nemá sahat rukou
 - korálky se dávají do varné nádoby co nejkratší dobu před zahájením zahušťování
- hruškovitá baňka se napojí na Snyderovu kolonu a zkontroluje se, zda jsou všechny spoje pořádně utěsněné
- nezapomenout pustit vodu do chladiče !
- před zahájením vaření se ještě musí ovlhčit Snyderova kolona 2 ml hexanu (nalije se na ni seshora), protože při případném vniknutí PAH na suchou kolonu by mohlo dojít k nevratné sorpci
- varná baňka se trošku ponoří do vyhřáté vodní lázně a sleduje se reakce varných korálků
 - z korálků musejí během pár sekund začít stoupat vzduchové bubliny
 - pokud nezačnou z korálků stoupat vzduchové bubliny, poklepe se na kruh držící hruškovitou baňku kovovou tyčí, aby se var nastartoval
- teprve když je var dostatečně intenzivní (z korálku stoupá velký proud bublin), ponoří se varná nádobka tak, aby vodní hladina sahala asi do poloviny rozšířené části nebo 1 cm od plastového těsnění
- při zahušťování se sleduje rychlost vytékání destilátu z chladiče (měl by rychle kapat)
- zahušťuje se tak dlouho, dokud hladina neklesne k zúžené části varné nádoby
- po ukončení zahušťování se spustí vozík, aby se varná nádobka dostala z vodní lázně (případně se může lázeň sundat z topného hnízda a dát chvíli stranou), vypne se topné hnízdo (vytáhne se ze zásuvky) a vše se nechá asi 10 minut vychladnout
- zahušťování trvá asi 15 minut
 - je to přibližný čas potřebný k zahuštění vzorku, nezahrňuje přípravné práce a proplachování aparatury
- zahuštěný vzorek se přelije do 20 ml vialky a varná nádobka se oplachuje asi 2 ml čistého hexanu (odhad)
 - je lepší použít analytickou nálevku, aby nedošlo ke ztrátě části vzorku
 - varné korálky se zachycují na předem propláchnuté křemenné vatě v analytické nálevce
- celkový objem zahuštěného vzorku je asi 12 ml (přibližně 10 ml se získá při zahušťování plus asi 2 ml na oplach)
- nezapomenout vypnout vodu do chladiče !

ZAHUŠŤOVÁNÍ POMOCÍ DUSÍKU

Hexanový extrakt se zahušťuje ve 20 ml vialce na objem 5 ml.

- Po zahuštění na K-D se vzorek převádí do předem zvážené 20 ml vialky s uzávěrem s nepropíchaným septem a s předem vyznačenou ryskou na objemu 10 ml.
- Před zahušťováním pomocí dusíku se ke vzorku už nepřidává xylen.
- Během zahušťování pomocí dusíku se na 20 ml vialku dává víčko s propíchaným septem.

ZAHUŠŤOVÁNÍ POMOCÍ DUSÍKU – POSTUP

- průtok dusíku se na tlakové lahvi nastaví tak, aby se hladina vzorku pouze mírně čeřila

- nejprve se pustí dusík s teprve potom se zavede pomocí injekční stříkačky (jehly) do vialky (propíchně se septum), z níž se pomocí druhé jehly a hadičky odvádí ven
- může se provádět kontrola, zda dusík skutečně vialkou prochází – konec trubičky se na chvíli ponoří do kádinky s vodou a sledují se bubliny
- při ukončení zahušťování se nejprve vytáhne injekční jehla z vialky a teprve potom se vypne tlaková lahev s dusíkem

ODBĚR VZORKU KE STANOVENÍ NA GC-FID NEBO GC-MS

Na analýzu na GC-FID nebo GC-MS se odebírá (odlívá) asi 0,5 až 1 ml vzorku do 2 ml vialky.

Odběr se provádí bezprostředně před analýzou.

Důležité: Pokud se odběr vzorku neprovádí bezprostředně po doplnění a zvažení vzorku ve 20 ml, je třeba před odběrem vzorku zkontrolovat hmotnost 20 ml vialky (převážit vzorek)!

Po odběru (odlití) vzorku do 2 ml vialky se 20 ml vialka se zbylým vzorkem znovu zváží a hladina vzorku se poté označí novou ryskou!

4. KALIBRACE A VÝSLEDKY

PŘÍPRAVA EXTERNÍCH STANDARDŮ NA C₁₀ AŽ C₄₀

PŘÍPRAVA ZÁKLADNÍHO ROZTOKU BAM O KONCENTRACI 40 000 mg/l (ZR)

Ampule s kalibračním standardem BAM-K010f se opatrně rozlomí a obsah se převede do 2 ml skleněné vialky.

Vlastní příprava

Do 20 ml vialky se naváží přesně 0,4 g BAM standardu BAM-K010f. Standard se rozpustí v 5 ml zásobního roztoku referenčních sloučenin (ZRRS). Obsah 20 ml vialky se kvantitativně převede do 10 ml odměrné baňky a doplní po rysku roztokem referenčních sloučenin. Základní roztok se poté přelije zpět do 20 ml vialky a uzavře se víčkem s vloženým septem.

Příprava kalibračních standardů

Kalibrační standardy se připraví ředěním základního roztoku zásobním roztokem referenčních sloučenin s přídatkem 20 µl xylenu.

Příprava kalibračních standardů.

koncentrace	postup přípravy
0 mg/l	(hexan)
400 mg/l	10 µl ZR + 20 µl xylenu + 970 µl ZRRS
2000 mg/l	50 µl ZR + 20 µl xylenu + 930 µl ZRRS
5000 mg/l	125 µl ZR + 20 µl xylenu + 855 µl ZRRS
7000 mg/l	175 µl ZR + 20 µl xylenu + 805 µl ZRRS
10 000 mg/l	250 µl ZR + 20 µl xylenu + 730 µl ZRRS

Kromě kalibračních standardů jsou připravovány tzv. kontrolní standardy (ozn. jako „KK“) pro ověření funkčnosti systému.

Příprava kontrolních standardů.

KK 2000 mg/l	Viz příprava kalibračního standardu
--------------	-------------------------------------

GC analýza při stanovení uhlovodíků C₁₀-C₄₀Analýza standardů

Nastříkujete se zpravidla 1x nebo 2x po 1 µl každého kalibračního roztoku za použití optimalizovaných parametrů uložených v příslušné metodě na GC DANI. Sestrojí se kalibrační graf s vynesením součtů ploch píků standardu MoNa + HCVD (1:1), nacházejících se v retenčním okně vymezeném n-dekanem a n-tetrakontanem, korigovaných o hodnoty slepého pokusu (čistého hexanu) ve stejném retenčním okně, proti koncentracím MoNa + HCVD (1:1) v mg/l. Integrace se začíná hned za píkem n-dekanu na úrovni signálu před píkem rozpouštědla a ukončí se právě před začátkem píku n-tetrakontanu na stejné úrovni signálu. Korekce na slepý pokus se provádí odečtením chromatogramu slepého pokusu od chromatogramu vzorku a integrací získaného chromatogramu v retenčním okně vymezeném n-dekanem a n-tetrakontanem. Kalibrační funkce se vyjádří lineární funkcí:

$$A_i = k_i \cdot x_i$$

kde A_i - zjištěná plocha standardu i , kde $i = \text{MoNa} + \text{HCVD} (1:1)$

k_i - směrnice kalibrační přímky pro daný standard i

x_i - koncentrace standardu i v mg/l

Analýza vzorků

Chromatogramy vzorků a slepého pokusu úplným postupem se nejdříve korigují na slepý pokus hexanem. Korekce se provádí jako rozdíl chromatogramu vzorku nebo slepého pokusu úplným postupem a slepého pokusu hexanem elektronickým odečtením záznamů. Výsledné chromatogramy se integrují jako jeden pík v rozmezí píků n-dekanu a n-tetrakontanu. Získaná hodnota plochy slepého pokusu úplným postupem se poté odečte od hodnot ploch získaných pro jednotlivé vzorky. Ze zjištěné kalibrační funkce pro MoNa + HCVD (1:1) se určí koncentrace uhlovodíků C₁₀ až C₄₀ v hexanu v mg/l. Tato koncentrace se musí korigovat na výtěžnost metody zjištěnou při validaci (použít hodnotu 90 %) a dále přepočítat na sušinu původního vzorku. Výsledek se udává v množství uhlovodíků C₁₀ až C₄₀ ve vzorku v mg/kg sušiny. Výsledky se zaokrouhlují na desítky nebo na 2 platné číslice.

$$C = \frac{\sum A - \sum A_B}{k_i} \cdot \frac{100}{v} \cdot \frac{100}{m \cdot s} \cdot \frac{m_2 - m_1}{\rho}$$

kde c - množství uhlovodíků C₁₀ až C₄₀ ve vzorku v mg/kg sušiny

$\sum A$ - součet ploch všech GC píků vzorku nacházejících se mezi píky n-dekanu a n-tetrakontanu korigovaných o hodnoty slepého pokusu hexanem

$\sum A_B$ - součet ploch všech GC píků blanku úplným postupem nacházejících se mezi píky n-dekanu a n-tetrakontanu korigovaných o hodnoty slepého pokusu hexanem

k_i - směrnice kalibrační přímky pro daný standard i , kde $i = \text{MoNa} + \text{HCVD} (1:1)$

v - výtěžnost této metody zjištěná při validaci v %

m - navážka vzorku v gramech

s - obsah sušiny ve vzorku v %

m_1 - hmotnost prázdné 2 ml vialky s uzávěrem v gramech

m_2 - hmotnost 2 ml vialky naplněné vzorkem a uzavřené uzávěrem v gramech

ρ - hustota hexanu v kg/l

Do protokolu je třeba uvést i případný výskyt píků před n-dekanem, který naznačuje přítomnost nízkovroucích těkavých uhlovodíků ve vzorku, nebo výskyt píků za n-tetrakontanem nebo zvyšující se základní linii na konci chromatogramu, což naznačuje přítomnost uhlovodíků s vysokým bodem varu ve vzorku.

Poznámka: Při integraci se postupuje podle návodu „Stanovení uhlovodíků C₁₀ až C₄₀ v půdách na GC DANI s detekcí plamenově-ionizačním detektorem“.

GC-MS analýza při stanovení PAU

Analýza PAU se provádí pomocí systému GC-MS. Sestrojí se nejdříve kalibrační závislost změřením kalibračních standardů.

STANDARDY PRO EXTERNÍ KALIBRAČNÍ KŘIVKU PAH

Kalibrační standardy se připravují ze standardu 610 PAH Calibration Mix A (Restek).

Jedná se o 16 PAH v dichlormethanu o následujících koncentracích:

	koncentrace
naftalen	1000 µg/ml
acenaftthylen	1000 µg/ml
acenaftthen	1000 µg/ml
fluoren	1000 µg/ml
fenanthren	500 µg/ml
anthracen	1000 µg/ml
fluoranthen	500 µg/ml
pyren	500 µg/ml
benzo(a)anthracen	500 µg/ml
chrysen	500 µg/ml
benzo(b)fluoranthen	500 µg/ml
benzo(k)fluoranthen	500 µg/ml
benzo(a)pyren	500 µg/ml
indeno(1,2,3-cd)pyren	500 µg/ml
dibenzo(a,h)anthracen	500 µg/ml
benzo(g,h,i)perylen	500 µg/ml

Postupuje se tak, že se připraví ZR o koncentraci 40 + 20 mg/l PAH a z něho se připraví 5 kalibračních standardů o koncentracích 0,2 + 0,1 mg/l PAH, 0,6 + 0,3 mg/l PAH, 2 + 1 mg/l PAH, 6 + 3 mg/l PAH a 20 + 10 mg/l PAH (2 ml každého standardu). Do každého kalibračního standardu se přidává také 9,10-dimethylantracen jako VS.

1. Příprava základního roztoku 40 + 20 mg/l PAH:

1920 µl hexanu + 80 µl standardu 610 PAH Calibration Mix A (Restek) do 4 ml vialky (celkem 2 ml ZR)

2. Příprava kalibračních standardů:

Standardy se připravují do 4 ml vialek, do nichž se přidává nejprve xylen, pak hexan, pak ZR a nakonec VS.

koncentrace	postup přípravy
20 + 10 mg/l PAH	1000 µl ZR + 20 µl VS (200 mg/l) + 200 µl xylenu + 780 µl hexanu
6 + 3 mg/l PAH	300 µl ZR + 20 µl VS (200 mg/l) + 200 µl xylenu + 1480 µl hexanu

2 + 1 mg/l PAH	100 µl ZR + 20 µl VS (200 mg/l) + 200 µl xylenu + 1680 µl hexanu
0,6 + 0,3 mg/l PAH	30 µl ZR + 20 µl VS (200 mg/l) + 200 µl xylenu + 1750 µl hexanu
0,2 + 0,1 mg/l PAH	10 µl ZR + 20 µl VS (200 mg/l) + 200 µl xylenu + 1770 µl hexanu
0 mg/l	(hexan)

3. Odběr na analýzu

Z každého kalibračního standardu ve 4 ml vialce se odlije cca 0,5 ml do 2 ml vialky.

KALIBRAČNÍ KŘIVKA

Kalibrační funkce se vyjádří lineární funkcí:

$$A_i = k_i \cdot x_i$$

kde A_i - zjištěná plocha standardu i , kde i = fenantren, antracen.....
 k_i - směrnice kalibrační přímky pro daný standard i
 x_i - koncentrace standardu i v mg/l

Ze zjištěné kalibrační funkce pro jednotlivé koncentrační úrovně PAU se určí koncentrace jednotlivých PAU v hexanu v mg/l.

Tato koncentrace se musí korigovat na výtěžnost metody zjištěnou při validaci (90 %) a dále přepočítat na sušinu původního vzorku. Výsledek se udává v množství jednotlivých PAU ve vzorku v mg/kg sušiny. Výsledky se zaokrouhlují na desítky nebo na 2 platné číslice.

$$C = \frac{A}{k_i} \cdot \frac{100}{v} \cdot \frac{100}{m \cdot s} \cdot \frac{m_2 - m_1}{\rho}$$

kde c - množství jednotlivých PAU ve vzorku v mg/kg sušiny
 A - plocha GC píku pro daný polyaromát
 k_i - směrnice kalibrační přímky pro daný standard i , kde i = FENANTRÉN, ANTRACEN...
 v - výtěžnost této metody zjištěná při validaci v %
 m - navážka vzorku v gramech
 s - obsah sušiny ve vzorku v %
 m_1 - hmotnost prázdné 2 ml vialky s uzávěrem v gramech
 m_2 - hmotnost 2 ml vialky naplněné vzorkem a uzavřené uzávěrem v gramech
 ρ - hustota hexanu v kg/l