

Metodický postup pro stanovení PAU v půdách volných hracích ploch metodou HPLC a GC

Počet listů : 12
Strana : 1
Datum : 11. 9. 2000
Platnost od: 11.9.2000
Zpracovala: RNDr. Balasová
Ing. Vláčil
Schválil: Ing. Lepší

1. Úvod

1.1. Předmět a vymezení působnosti

Stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků v půdách volných hracích ploch . Tyto analyty se běžně stanovují:

A: HPLC metodou s fluorescenčním a DA detektorem / HPLC-FLU+DAD/

B: metodou plynové chromatografie s hmotnostním detektorem / GC-MS/.

Jedná se o tyto analyty dle U.S. EPA s příslušnými detekčními limity:

	A: HPLC	B: GC - MS
naftalen	50µg/kg	40 µg/kg
acenaften	100µg/kg	40 µg/kg
acenaftylen	50µg/kg	40 µg/kg
fluoren	50µg/kg	40 µg/kg
fenantren	10 µg/kg	40 µg/kg
antracen	5 µg/kg	40 µg/kg
fluoranten	5 µg/kg	40 µg/kg
pyren	5 µg/kg	40 µg/kg
benzo/a/antracen	5 µg/kg	40 µg/kg
chrysen	5 µg/kg	40 µg/kg
benzo/k/fluoranten	5 µg/kg	40 µg/kg
benzo/b/fluoranten	5 µg/kg	40 µg/kg
benzo/a/pyren	1 µg/kg	40 µg/kg
dibenzo/a,h/antracen	10 µg/kg	40 µg/kg
benzo/g,h,i/perylen	5 µg/kg	40 µg/kg
indeno(1,2,3-cd)pyren	10 µg/kg	40 µg/kg
Přesnost metody :	20 %	20 %

1.2. Princip

Analyty jsou extrahovány ze zeminy do organického rozpouštědla a po zakoncentrování jsou stanoveny citlivou analytickou metodou.

Metodický postup pro stanovení PAU v půdách volných hracích ploch metodou HPLC a GC

Počet listů : 12
Strana : 2
Datum : 11. 9. 2000
Platnost od: 11.9.2000
Zpracovala: RNDr. Balasová
Ing. Vláčil
Schválil: Ing. Lepší

1.3. Bezpečnost

Při práci s přístrojem se postupuje dle manuálu. Benzo/a/pyren a mnoho dalších PAU jsou zařazeny do seznamu karcinogenních látek. Při manipulaci se standardy a extrakty je nutno dodržovat zásady pro bezpečnou práci v laboratoři dle ČSN 01 8003 a dbát zvýšenou pozornost s ohledem na charakter těchto látek.

2. Chemikálie a spotřební materiál

2.1. Základní chemikálie

metanol , gradient grade	Merck
n-hexan , extra pure	Merck
aceton , extra pure	Merck
dichlormetan, extra pure	Merck

2.2. Roztoky

A: HPLC

1.standard I / Polynuclear Aromatic Hydrocarbons Mixture 610-M
Cat.No.4-8743 SUPELCO /
standard II. /standard I ředěný 1:100 metanolem /
standard III / standard I ředěný 1:1000 metanolem /

2.standard I S /Polynuclear Aromatic Hydrocarbons Mixture 610-M
Cat.No. 4S-8743 SUPELCO /
standard II S /standard I S ředěný 1:100 metanolem /
standard III S / standard I S ředěný 1:1000 metanolem /

B: GC-MS

1. Roztoky standardů

1.1. Zásobní roztok standardů

10007 (Absolute standards, USA), koncentrace uhlovodíků 2 mg/ml, tj. 2000 ng/μl, rozpuštěný v dichlormethanu

1.2. Primární roztok standardů

Metodický postup pro stanovení PAU v půdách volných hracích ploch metodou HPLC a GC

Počet listů : 12
Strana : 3
Datum : 11. 9. 2000
Platnost od: 11.9.2000
Zpracovala: RNDr. Balasová
Ing. Vláčil
Schválil: Ing. Lepší

200x zředěný zásobní roztok standardů 10007 do dichlormethanu, výsledná koncentrace primárního roztoku PAH 10 µg/ml, tj. 10 ng/µl.

2. Roztoky surogátů

2.1. Zásobní roztok surogátů

8500-6051 (Hewlett-Packard, USA), 4,0 mg/ml, tj. 4000 ng/µl, v dichlormethanu.

2.2. Primární roztok surogátů

200 x ředěný zásobní roztok surogátů 8500-6051 do dichlormethanu. Výsledná koncentrace primárního roztoku je 20 µg/ml, tj. 20 ng/µl.

3. Kalibrační roztoky

Do hnědé 1,8 ml vialky se k 1 ml n-hexanu přidá 1, 5, 10 a 16 µl primárního roztoku standardů (1.2.) a 8 µl primárního roztoku surogátů (2.2). V 1 ml takto připravených kalibračních roztocích je 10, 50, 100 a 160 ng PAH a 160 ng surogátů. Při zpracování 2g vzorku podle bodu 4.B odpovídají kalibrační roztoky koncentraci 0,10; 0,50; 100 a 160 µg/kg.

4. Roztoky kontrolního vzorku (dále jen QC checku)

4.1. Zásobní roztok QC checku

M-525-1-5X, (Accu standards, USA), 0,5 mg/ml, tj. 500 ng/µl, v acetonu.

4.2. Primární roztok QC checku

50 x ředěný zásobní roztok QC checku do acetonu. Výsledná koncentrace primárního roztoku je 10 µg/ml, tj. 10 ng/µl.

5. QC check

Do hnědé 1,8 ml vialky se k 1 ml n-hexanu přidá 8 µl primárního roztoku QC checku (4.2.) a 8 µl primárního roztoku surogátů (2.2.). V 1 ml takto připraveného QC checku je 80 ng PAU a 160 ng surogátů.

Standardy jsou uchovávány v ampulích , pouze po omezenou dobu v zapečetěných zábrusových zkumavkách. Jsou skladovány v temnu v mrazničce .

2.3 Referenční materiál

Certifikovaný referenční materiál - č.7005 - Český metrologický institut
Certifikovaný referenční materiál 524 - BCR

Metodický postup pro stanovení PAU v půdách volných hracích ploch metodou HPLC a GC

Počet listů : 12
Strana : 4
Datum : 11. 9. 2000
Platnost od: 11.9.2000
Zpracovala: RNDr. Balasová
Ing. Vláčil
Schválil: Ing. Lepší

3. Přístroje a pomocná zařízení

3.1. Použité přístroje a zařízení

A: HPLC

HPLC chromatografický systém HP 1100 s fluorescenčním a DA detektory
HPLC chromatografický systém: HP 1050 s fluorescenčním detektorem 1046A
Analytická kolona Li Chrospher PAH 250-3 (Merck), ev. ekvivalent

B: GC-MS

Plynový chromatograf HP 6890 series s hmotnostním detektorem HP 5973 MSD, Hewlett Packard, USA
Chromatografická kolona PTE-5 5% Phenyl Methyl Siloxane (30m x 0.25mm I.D., film 0.25µm), Supelco, USA, ev. ekvivalent

3.2. Ostatní vybavení

Rotační vakuová odparka
Ultrazvuková lázeň
IKA extraktor –extrakce v kombinaci s podtlakovou filtrací
Analytické váhy
Extrakční mikrovlnný přístroj MICRODIGEST 3.6. (PROLABO, FRA)

4. Postup

Navaž 1-5 g analytického vzorku (dle Metodiky odběru půdního vzorku -návodu zpracování vzorků pro analytické účely) a proved' extrakci vzorku směsí dichlormethan : aceton (1 : 1) dle následujícího schématu:

A: HPLC

vzorek 1-5 g



Metodický postup pro stanovení PAU v půdách volných hracích ploch metodou HPLC a GC

Počet listů : 12
Strana : 5
Datum : 11. 9. 2000
Platnost od: 11.9.2000
Zpracovala: RNDr. Balasová
Ing. Vláčil
Schválil: Ing. Lepší

extrakce v IKA extraktoru
(20 ml směsi, 3 extrakční cykly)
↓
vysušení extraktu přes bezvodý Na₂SO₄
↓
po přidavku 0,5 ml 20% propandiolu v isopropanolu
zakoncentrování na RVO na objem 1 ml metanolem
↓

HPLC analýza (po event. naředění)

B: GC-MS

vzorek 1-5 g
↓
přídavek 160 μl primárního roztoku surogátů (2.2.),
30 ml směsi (H:A) vložení magnetického míchadélka
↓
extrakce v mikrovlnném extraktoru MICRODIGEST 3.6.
(výkon 80 %, čas 60 min)
↓
přídavek 20 ml vody s obsahem analytů < 4 ng/l, protřepání
(odstranění polárních interferencí)
↓
oddělení vrchní organické fáze a její
vysušení přes bezvodý Na₂SO₄
↓
GC-MS analýza alikvotního podílu extraktu
(po event. naředění)

4.1. Sběr , doprava , předání vzorků

Vzorky jsou odebírány, homogenizovány a předávány do laboratoře dle Metodiky odběru vzorku půdy volných hracích ploch. Z dodaných vzorků je připravován analytický vzorek dle postupu Zpracování vzorků pro analytické účely.

4.2. Uchovávání vzorků

Metodický postup pro stanovení PAU v půdách volných hracích ploch metodou HPLC a GC

Počet listů : 12
Strana : 6
Datum : 11. 9. 2000
Platnost od: 11.9.2000
Zpracovala: RNDr. Balasová
Ing. Vláčil
Schválil: Ing. Lepší

Dodané vzorky jsou zaevidovány na příjmu vzorků , transportovány do laboratoře, kde jsou zpracovány, popřípadě uchovávány dobře uzavřené v lednici. Vzorky jsou zpracovávány nejpozději do měsíce po dodání vzorků do laboratoře .

4.3. Uvedení měřícího přístroje do chodu

A: HPLC

Po zapnutí měřícího systému si přístroj provádí autotesty. V případě pozitivních testů je navolena analytická metoda pro stanovení PAU, je uložena ve složce Metody.

Základní parametry metody:

1. Autosampler:

nastavení injektovaného objemu: 0,1-20 μ l

další standardní nastavení (nastavení jehly, doba injektáže) viz manuál přístroje

2. Vysokotlaká pumpa

složení mobilní fáze: A - 40% metanol, B - 100 % metanol

tlakový limit: 400 barr:

stop time: 40-50 minut

post time: 5 minut

Gradiendový program je uveden v následující tabulce.

čas (min)	složení mobilní fáze
0	0,45 ml/min
0	75% B
5	75 % B
14	82 % B
13	0.5 ml/min
17	100 % B
22	0.6 ml/min
22	100 % B
29	0.6 ml/min
35	0.7 ml/min
40	100 % B
40	0.7 ml/min

Metodický postup pro stanovení PAU v půdách volných hracích ploch metodou HPLC a GC

Počet listů : 12
Strana : 7
Datum : 11. 9. 2000
Platnost od: 11.9.2000
Zpracovala: RNDr. Balasová
Ing. Vláčil
Schválil: Ing. Lepší

50	75 % B
----	--------

3. Nastavení detektoru:

Změna excitační a emisní vlnové délky v závislosti na čase se nastavuje podle standardu na počátku analýzy tak, aby naftalen, acenaften a fluoren se měřil při 218/334 nm, fenantren při 250/380 nm, antracen, fluoranten a pyren při 237/440nm benzo/a/antracen, chrysen při 277/376nm,benzo/b/fluoranten,benzo/k/fluoranten,benzo/a/pyren,dibenzo/a,h/antracen, benzo/g,h,i/perylen při 290/420 nm a indeno/1, 2, 3- cd/pyren při 247 / 504 nm.

Acenaftylen se měří DA detektorem při 228 nm.

Další standardní nastavení dle manuálu přístroje

Vyhodnocení analýzy se provádí příslušným softwarem HP ChemStation.

B: GC-MC

Kalibrace hmotnostního detektoru HP 5973 MSD

Po naladění detektoru a porovnání parametrů ladění / viz. manuál přístroje / je pomocí software HP ChemStation navolena metoda pro analýzu PAH.

Základní chromatografické podmínky

Injektovaný objem: 1 µl

Typ nástřiku: EPC Split-Splitless - pulzní

Nosný plyn: He

Průtok: 0,9 ml/min

Teplotní program:

Oven Ramp	°C/min	Next °C	Hold min	Run Time
Initial		50	1.7	1.7
Ramp 1	10	300	10.0	36.7
Ramp 2	0			

Základní detekční podmínky

Detekce v SIM modu s následujícími parametry

Group ID	Time	Resolution	m/z	Dwell Per Ion
Group 1	9.0	Low	128	100
Group 2	12.4	Low	152, 53, 64	100

**Metodický postup pro stanovení PAU
v půdách volných hracích ploch
metodou HPLC a GC**

Počet listů : 12
Strana : 8
Datum : 11. 9. 2000
Platnost od: 11.9.2000
Zpracovala: RNDr. Balasová
Ing. Vláčil
Schválil: Ing. Lepší

Group 3	15.6	Low	166	100
Group 4	17.6	Low	178, 188	100
Group 5	20.5	Low	202	100
Group 6	23.8	Low	228, 240	100
Group 7	26.0	Low	252, 253	100
Group 8	29.8	Low	276, 278	100

Analýza dat

Kvantifikace dle následujících parametrů

Compound	Tgt	Q1	Rel. Resp.
Naftalen	TIC		
Acenaftalen	152		
Acenaftalen-d10	164		
Acenaften	153		
Fluoren	TIC		
Fenanthren-d10	188		
Fenanthren	178		
Anthracen	178		
Fluoranthen	TIC		
Pyren	TIC		
Chrysen	228		
Chrysen-d12	240		
Benzo(a)anthracen	228	240	
Benzo(b)fluoranthen	252	253	22.1
Benzo(k)fluoranthen	252	253	20.6
Benzo(a)pyren	252	253	18.4
Indeno(1,2,3-c,d)pyren	276		
Dibenzo(a,h)anthracen	278	276	38.6
Benzo(g,h,i)perylene	276	278	4.0

4.4. Analytické schéma

Metodický postup pro stanovení PAU v půdách volných hracích ploch metodou HPLC a GC

Počet listů : 12
Strana : 9
Datum : 11. 9. 2000
Platnost od: 11.9.2000
Zpracovala: RNDr. Balasová
Ing. Vláčil
Schválil: Ing. Lepší

A: HPLC

Na sérii 20 vzorků přísluší:

1. Spikovaný reagenční blank standardem III

Spikovaný reagenční blank standardem III S

1 ml standardu III nebo III S je napipetován k extrakční směsi a zpracován stejným postupem jako vzorek.

2. Reagenční blank

Je provedena extrakce a zpracování stejným postupem jako u vzorku.

3. Standard směsný PAU III

4. Referenční materiál

0,1-1 g práškového referenčního materiálu je zpracován stejným postupem jako vzorek.

B: GC-MS

1. Analýza přístrojového blanku

Přístrojový blank se získá nástřikem čistého rozpouštědla (n-hexan).

2. Analýza kalibračních roztoků

Pomocí lineární regrese se určí kalibrační funkce a sestrojí kalibrační křivky pro jednotlivé analyty.

3. Analýza kontrolního vzorku (QC checku)

4. Analýza laboratorního blanku

Je provedena extrakce a zpracování stejným postupem jako u vzorku.

5. Průběžná kontrola kvality

Provádí se analýza ověřovacího standardu 100 ng/ml hexanu

5. Analýzu vzorku

6. Průběžná kontrola kvality

Provádí se analýza ověřovacího standardu 100 ng/ml hexanu po každých 10-ti vzorcích.

4.5. Kalibrace

Je prováděna vícestupňová kalibrace. V každé serii 20 a méně vzorků je prováděna průběžná kontrola kvality ověřovacím standardem. V případě zásadní změny v systému je kalibrace ověřena.

4.6. Interference

Mohou být způsobeny kontaminovanými rozpouštědly, chemikáliemi a sklem. Proto se věnuje velká pozornost čistotě chemikálií, rozpouštědel a skla. Čištění skla: Umyté sklo se

Metodický postup pro stanovení PAU v půdách volných hracích ploch metodou HPLC a GC

Počet listů : 12
Strana : 10
Datum : 11. 9. 2000
Platnost od: 11.9.2000
Zpracovala: RNDr. Balasová
Ing. Vlášil
Schválil: Ing. Lepší

ponoří na 6 - 12 hodin do kys. chromsírové, potom se důkladně vypláchne vodou, destilovanou vodou a nakonec metanolem. Suší se při teplotě 150⁰C. Sklo se uchovává v uzavřených vitrinách, aby se zabránilo jeho znečištění.

Teplo, ozon, oxid dusičitý a ultrafialové záření způsobují degradaci PAU, proto je nutno tyto vlivy při zpracování vzorků vyloučit.

Ve vzorku mohou být přítomny org. látky, které se extrahují spolu s PAU a mohou vykazovat pozadřovou fluorescenci.

5. Výpočet

A: HPLC

Vzorky jsou vyhodnocovány dle jednobodové kalibrace příslušné každé serii vzorků Výpočty jsou prováděny podle vzorce:

$$x = \frac{P_V - P_{rb}}{z \cdot k \cdot n} \cdot S^{-1} \cdot 100$$

x.....koncentrace PAU /ng.g⁻¹/

P_V.....plocha píku vzorku

P_{rb}.....plocha reagenčního blanku

z.....zředění

k.....kalibrační faktor /ng.plocha⁻¹/

n.....navážka vzorku /g/

S.....sušina /%/

V případě dosažení výtěžnosti extrakčního postupu menší jak 80 % je prováděna korekce na výtěžnost použitím hodnot spikovaných reagenčních blanků.

B: GC-MS

Výpočet koncentrace analytů a surogátu je prováděn pomocí přímého srovnání odezev analytů a surogátů v kalibračních směsích a odezev analytů a surogátů v reálných vzorcích. Výsledek je korigován na sušinu.

Metodický postup pro stanovení PAU v půdách volných hracích ploch metodou HPLC a GC

Počet listů : 12
Strana : 11
Datum : 11. 9. 2000
Platnost od: 11.9.2000
Zpracovala: RNDr. Balasová
Ing. Vláčil
Schválil: Ing. Lepší

Vliv matrice vzorku je sledován pomocí roztoku surogátu. Ke každému vzorku je přidáno 160 µl základního roztoku surogátu. Odezva značeného surogátu je srovnána s odezvou surogátu v kalibračním roztoku. Tu pak použijeme pro výpočet návratnosti (recovery) daného vzorku.

Vyjadřování výsledků

Výsledky se vyjadřují na 2 platné číslice s nejistotou stanovení.

Chromatogramy vzorků, standardů, spikovaných reagenčních blenků, referenčního materiálu, reagenčního blenku s příslušnou kalibrací , výstupem z PC a výpočtem jsou archivovány v sequenčních záznamech.

6. Kontrola kvality

6.1.Vnitřní kontrola

Systém vnitřní kontroly laboratoře zahrnuje pravidelné sledování a vyhodnocování přesnosti a správnosti dat.

6.1.1.Kontrola přesnosti analýzy

- ze dvou paralelních stanovení (spikovaný reag. blank nebo vzorek)
- vypočítat rozpětí R
- vypočítat relativní směrodatnou odchylku za podmínek opakovatelnosti

$$s = kn \cdot R \quad \text{pro } n = 2$$

$$s = 0,8862 \cdot R$$

- vypočítat relativní směrodatnou odchylku RSD (%)

$$\text{RSD} = \frac{100 \cdot 0,8862}{x}$$

x - průměr hodnot paralelních stanovení

aritmetický průměr výsledků (mg/kg, mg/l)	RSD %
0,010	20-50
0,010 -0,100	20

Metodický postup pro stanovení PAU v půdách volných hracích ploch metodou HPLC a GC

Počet listů : 12
Strana : 12
Datum : 11. 9. 2000
Platnost od: 11.9.2000
Zpracovala: RNDr. Balasová
Ing. Vláčil
Schválil: Ing. Lepší

TABULKA: Doporučené hodnoty ret. směr. odchylky průměrů RSD dle EEC
(Hajšlová: Projekt - Monitoring potravních řetězců, 1992)

Opakované překročení hodnot RSD o více jak 50% signalizuje, že metoda není pod statistickou kontrolou a je potřeba odstranit zdroj nepřesností.

Rovněž pokud výtěžnost opakovaně klesne pod 60%, je potřeba ověřit postup extrakce a zpracování vzorků.

6.1.2.Kontrola správnosti analýzy

Použitím: a/ standardů z různých zdrojů
b/ certifikovaného referenčního materiálu

Výsledky analýz standardů se zpracovávají do regulačních diagramů .

Účastí na tuzemských i zahraničních mezilaboratorních porovnávacích zkouškách.