

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Vývoj, optimalizace a validace analytické metody na
stanovení polyaromatických uhlovodíků ve vodě
pomocí HPLC-PDA**

Bakalářská práce

Pavel Pilík

Školitel: Ing. David Kahoun, Ph.D.

České Budějovice 2015

Pilík, P., 2015: Vývoj, optimalizace a validace analytické metody na stanovení polyaromatických uhlovodíků ve vodě pomocí HPLC-PDA. [Development, optimization and validation of analytical method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water using HPLC-PDA. Bc. Thesis, in Czech.] – 40 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Abstract

This bachelor thesis deals with the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water using HPLC-PDA. Firstly the development and optimization of the analytical method was performed. The following parameters were chosen for optimization: column temperature, wavelength of ultraviolet detection, mobile phase flow rate and injection volume. Then the method was successfully validated and applied to the evaluation of the sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons from water onto a magnetic sorbent (magnetic chitosan).

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 15. 11. 2015

.....
Pavel Pilík

Poděkování

Chtěl bych velice poděkovat mému školiteli Ing. Davidu Kahounovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky, ochotu a trpělivost.

Seznam použitých zkratk a symbolů

aceen	Acenaften
b[g,h,i]p	Benzo[g,h,i]perylene
C18	Oktadecyl
CVGZ AV ČR	Centrum výzkumu globální změny Akademie věd České republiky
FDA	Food and Drug Administration
flu	Fluoren
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry
HPLC	High performance liquid chromatography
i[1,2,3-c,d]p	Indeno[1,2,3-c,d]pyren
ICH	International Conference on Harmonisation
LC-MS	Liquid chromatography-mass spectrometry
LLE	Liquid-liquid extraction
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
MF	Mobilní fáze
MSPE	Magnetic solid phase extraction
PAU	Polycyklické aromatické uhlovodíky
PDA	Photodiode array detector
RSD	Relative standard deviation
SBSE	Stir bar sorptive extraction
SPE	Solid phase extraction
SPME	Solid phase microextraction

SRM	Selected reaction monitoring
UDSA-DLLME	Up-and-down shaker-assisted dispersive liquid-liquid microextraction
U.S. EPA	United States Environmental Protection Agency
VS	Vnitřní standard
WLSEME	Water with low concentration of surfactant in dispersed solvent-assisted emulsion dispersive liquid-liquid microextraction

Obsah

1 Teoretická část.....	1
1.1 Polyaromatické uhlovodíky	1
1.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	2
1.2.1 Kapalinový chromatograf.....	2
1.2.2 Vývoj a optimalizace analytické metody	5
1.2.3 Validace analytické metody	5
1.3 Metody přípravy vzorků vod ke stanovení PAU pomocí chromatografických technik .	7
1.3.1 Postupy využívající extrakce analytů z vody	7
1.3.1 Extrakce kapalinou.....	7
1.3.1.1 Klasické postupy extrakce kapalinou	7
1.3.1.2 Disperzní mikroextrakce.....	8
1.3.2 Extrakce tuhou fází.....	8
1.3.2.1 SPE kolonky plněné sorbentem	9
1.3.2.2 SPME.....	10
1.3.2.3 Disky C ₁₈	10
1.3.2.4 Sorbenty na bázi ftalocyaninu mědi	11
2 Materiál a metody.....	13
2.1 Přístroje a pomůcky	13
2.2 Chemikálie	13
2.3 Příprava mobilních fází.....	14
2.4 Příprava roztoků standardních sloučenin a vnitřního standardu	14
2.5 Příprava modelového vzorku pro optimalizaci metody.....	14
2.6 Příprava kalibračních roztoků	15
2.7 Příprava modelového vzorku pro testování magnetického chitosanu.....	15
3 Výsledky a diskuze.....	17
3.1 Identifikace píků standardních sloučenin a vnitřního standardu.....	17
3.2 Validace metody	26
3.3 Extrakce PAU z vody pomocí magnetického chitosanu.....	30
4 Závěr.....	34
5 Seznam použitých literárních zdrojů	36
6 Přílohy	40

Cíle práce:

- 1) Vypracovat rešerši na dané téma.
- 2) Vypracovat analytickou metodu na stanovení polyaromatických uhlovodíků pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) se spektrofotometrickou detekcí s diodovým polem (PDA) včetně provedení základní optimalizace této analytické metody.
- 3) Provést validaci analytické metody.
- 4) Provést základní testování analytické metody pro její plánované použití na testování sorpce polyaromatických uhlovodíků z vody na magnetický sorbent.

1 Teoretická část

1.1 Polyaromatické uhlovodíky

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) jsou aromatické uhlovodíky tvořené dvěma a více kondenzovanými aromatickými jádry (1). Jejich rozpustnost ve vodě klesá s molekulovou hmotností (2) a pohybuje se od 32 mg/l do 0,00026 mg/l (platí pro 16 PAU podle U.S. EPA). Nejvyšší hodnotu rozpustnosti z těchto uhlovodíků má naftalen, nejnižší benzo[g,h,i]perylen (3). Polyaromatické uhlovodíky patří k perzistentním organickým látkám, mají mutagenní a karcinogenní účinky (2), a proto je jejich výzkum velmi důležitý. Člověk je přijímá s potravou, vdechováním nebo při kontaktu s kůží (4). Americká agentura na ochranu životního prostředí (U.S. EPA) sestavila seznam 16 prioritních PAU (5), který obsahuje: naftalen, acenaftylen, acenaften, fluoren, fenantren, antracen, fluoranthen, pyren, benzo[a]antracen, chrysen, benzo[b]fluoranthen, benzo[k]fluoranthen, benzo[a]pyren, dibenzo[a,h]antracen, benzo[g,h,i]perylen, indeno[1,2,3-c,d]pyren (6).

Polyaromatické uhlovodíky se vyskytují v atmosféře, vodě i půdě (7). Pocházejí jak z přírodních, tak z antropogenních zdrojů, které zahrnují spalování a pyrolýzy fosilních paliv a uvolňování z ropných produktů, kdy při nedokonalém spalování vznikají fragmenty uhlovodíků, které se spojují a tvoří polycyklické struktury. Z přírodních zdrojů jsou to především lesní požáry, přirozené prosakování ropy a transformace biogenních prekurzorů (8). Množství PAU v atmosféře se zvyšuje na podzim a v zimě, což je způsobeno zejména intenzivnějším vytápěním objektů (9). Polycyklické aromatické uhlovodíky patří mezi vysoce lipofilní chemické látky. Vzhledem k jejich nízké rozpustnosti ve vodě a hydrofobnímu charakteru se adsorbují na suspendované částice a ukládají se v sedimentech. Analýzou sedimentů tak lze stanovit antropogenní polutanty ve vodním prostředí (8).

Polyaromatické uhlovodíky se do zdrojů pitné vody dostávají z odpadních vod, z průmyslových odpadů, při úniku ropy během přepravy, při rafinaci ropy, ze skládek odpadů (4), ze zemědělství a ze silnic (10). Díky nízké rozpustnosti a vysoké afinitě k pevným částicím se PAU ve vodě nevyskytují v příliš vysokých koncentracích. Ve vodovodní vodě se celková koncentrace PAU pohybuje v rozmezí od 2,5 do 9,0 ng/l, v podzemní vodě od 1,0 do 10 ng/l, v dešťové vodě od 2,7 do 7,3 ng/l a v povrchové vodě od 10 do 830 ng/l (11). Podle zákona č. 83/2014 Sb. je limit pro pitnou a teplou vodu 0,1 µg/l pro součet benzo[b]fluoranthenu, benzo[k]fluoranthenu, indeno[1,2,3-c,d]pyrenu

a benzo[g,h,i]perylenu (12). Pro povrchové vody stanovuje zákon č. 61/2003 Sb. imisní limit 0,2 µg/l pro součet fluoranthenu, benzo[b]fluoranthenu, benzo[k]fluoranthenu, benzo[a]pyrenu, benzo[g,h,i]perylenu a indeno[1,2,3-c,d]pyrenu (13). Limit pro podzemní vody je podle metodického pokynu ministerstva životního prostředí (Věstník 3/1996) 0,15 µg/l pro součet fenantrenu, fluoranthenu, pyrenu, chrysenu, benzo[a]antracenu, benzo[k]fluoranthenu, benzo[a]pyrenu, benzo[g,h,i]perylenu a indeno[1,2,3-c,d]pyrenu (14).

1.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Chromatografie je separační metoda založená na rozdílné distribuci dělených látek mezi dvěma fázemi – stacionární a mobilní. U kapalinové chromatografie je mobilní fází kapalina a stacionární fází pevná látka nebo kapalina ukotvená na tuhém nosiči (15).

Pro účely kvantitativní analýzy se nejčastěji používá tzv. vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography – HPLC). U tohoto typu chromatografie je mobilní fáze hnána vysokotlakým čerpadlem přes chromatografickou kolonu, která obsahuje stacionární fázi. Vzorek je do mobilní fáze dávkován ručně nebo tzv. autosamplerm. Eluce v HPLC může být isokratická nebo gradientová. U isokratické eluce je složení mobilní fáze konstantní po celou dobu analýzy, u gradientové eluce se složení mobilní fáze v průběhu analýzy mění, a to zpravidla ve prospěch složky s vyšší eluční silou. Separace analytů je ovlivněna oběma fázemi. Separované zóny analytů vycházející z kolony jsou zaznamenány při průchodu detektorem a získaný signál je převeden do podoby chromatografického záznamu – chromatogramu. Chromatografický záznam obsahuje křivky, které mají v ideálním případě tvar křivky Gaussova rozdělení a nazývají se píky (15). Na ose x je vynesena retenční čas a na ose y je vynesena odezva detektoru. „Retenční čas je doba, která uplyne od nástřiku vzorku do dosažení vrcholu píku“ (15); retenční objem je objem mobilní fáze, která za tuto dobu proteče kolonou. Retenční čas je kvalitativní charakteristika píku analytu, plocha nebo výška píku je údaj pro účely kvantitativní analýzy. Cílem HPLC je co nejlepší rozdělení látek za co nejkratší dobu (15).

1.2.1 Kapalinový chromatograf

Kapalinový chromatograf se skládá z těchto základních částí: zásobník pro uchovávání mobilní fáze, čerpadlo mobilní fáze, dávkovač vzorku (autosampler nebo manuální ventil), chromatografická kolona, detektor a počítač s příslušným programovým vybavením.

Zásobníky mobilní fáze musí být uzavřeny tak, aby mohla mobilní fáze odtékat, ale aby zároveň neunikaly páry a nedocházelo k vniknutí prachových částic. Zásobníky obsahují

filtry pro zachycení tuhých částic. Filtry bývají kovové nebo teflonové s porozitou 0,2 μm (15). Aby nedocházelo k uvolnění bublinek rozpuštěných plynů, musí být mobilní fáze dostatečně odplyněna. Odplyněním mohou být zmírněny některé problémy jako nestabilita základní linie a nízká odezva detektoru, neopakovatelné retenční časy, špatná opakovatelnost dávkovaného objemu vzorku, nestabilita průtoku mobilní fáze, zavzdušnění hlavy čerpadla. Odplynění je prováděno probubláváním heliem nebo použitím vakuového odplyňovače. Na zavzdušnění může mít vliv i umístění zásobníku mobilní fáze. Ten musí být umístěn výše než čerpadlo a jeho uzávěr musí umožnit vyrovnání atmosférického tlaku (15). Čerpadla v HPLC musí být odolná vůči korozi, vysokým tlakům a pracovat tak, aby průtok mobilní fáze byl stabilní, bezpulsní, přesný a správný. Mohou pracovat za konstantního tlaku nebo konstantního objemového průtoku (15).

V současné době se používá ruční dávkování pomocí smyčkového dávkovače nebo automatické dávkování pomocí autosampleru, který je navíc vybaven zásobníkem vialek se vzorky. Vialky jsou nejčastěji vyrobené z plastu nebo skla a jsou uzavřeny perforovanou polypropylenovou zátkou nebo pryžovým septem, které může být z vnitřní strany pokryté teflonem. Mohou mít šroubovací nebo krimpovací uzávěr (15).

Chromatografická kolona se skládá z kovového pláště uzavřeného porézní fritou, která zabraňuje uvolnění stacionární fáze a umožňuje plynulý průtok mobilní fáze. Aby byla kolona chráněna před nečistotami, zařazuje se před ní filtr mobilní fáze a/nebo předkolona. Použití kolony závisí na typu stacionární fáze. Nejčastěji jsou používány kolony o vnitřním průměru 2 – 5 mm a s velikostí částic stacionární fáze 2 – 5 μm (15). Kolony jsou velmi často umístěny v kolonovém termostatu, který zabraňuje nežádoucím teplotním výkyvům v průběhu analýzy (15).

Rozdělení analytů charakterizuje míra relativní separace dvou sousedních píků. Při optimalizaci podmínek není cílem co největší rozlišení, ale nezbytné minimální rozlišení, jehož hodnota bývá zpravidla 1,5 nebo 2 (15). S účinností kolony souvisí symetrie píku. Ideální hodnota faktoru symetrie je 1, přijatelné je rozmezí 0,8 – 1,5 (16).

Detektory zaznamenávají rozdíl v signálu mezi průchodem samotné mobilní fáze a mobilní fáze obsahující eluované složky, kterými mohou být analyt a/nebo interferující složka (15). Nejčastěji se používají detektory spektrofotometrické, fluorescenční a hmotnostní.

Spektrofotometrický detektor je založen na měření absorbance při vlnových délkách v oblasti ultrafialové (UV) nebo viditelné (VIS) oblasti elektromagnetického záření. Aby daná sloučenina absorbovala v UV a/nebo VIS oblasti, musí obsahovat tzv. chromofor, což je část molekuly s určitým uspořádáním atomů a vazeb. Výraznou absorpci vykazují např. sloučeniny s konjugovanými násobnými vazbami, s karbonylovou skupinou nebo azoskupinou. Existují čtyři základní typy spektrofotometrických detektorů: s fixní vlnovou délkou, s měnitelnou vlnovou délkou, s programovatelnou vlnovou délkou a s diodovým polem (15). Hlavní výhodou spektrofotometrického detektoru je jeho nízká cena v porovnání s detektorem fluorescenčním nebo hmotnostním (17).

Fluorescenční detektor je založen na měření fluorescence, tzn. na měření sekundárního emisního záření, které látka vydá po absorpci primárního excitačního záření. Po absorpci excitačního záření o vhodné vlnové délce přecházejí molekuly ze základního singletového elektronového stavu do vyšších vibračních hladin excitovaného singletového elektronového stavu a při následné deexcitaci dochází k uvolnění absorbované energie mj. ve formě emisního záření, která má zpravidla vyšší vlnovou délku, než excitační záření. Pokud je v roztoku přítomen kyslík, dochází k tzv. zhášení, což snižuje výtěžek luminiscence (15). Fluorescenční detektor je více selektivní (snižuje vliv matrice) a dosahuje nižších mezí detekce než UV detektor (18). Kapalinovou chromatografií s fluorescenční detekcí použili Vinci a kol. ke stanovení 16 polyaromatických uhlovodíků podle U. S. EPA v dešťové vodě. Před samotnou HPLC analýzou byla provedena mikroextrakce z kapaliny do kapaliny. Mez detekce pro 15 fluoreskujících PAU se pohybovala mezi 0,02 a 0,22 $\mu\text{g/l}$, mez stanovitelnosti mezi 0,09 a 0,73 $\mu\text{g/l}$. Acenaftylen neobsahuje fluorofor, a tak nemůže být detekován fluorescenčním detektorem, ale byl stanoven UV detektorem (18).

Hmotnostní detektor je založen na převedení molekul na ionty a následném rozlišení těchto iontů na základě poměru hmotnosti a náboje. Hmotnostní detektor bývá citlivější než ostatní typy detektorů a poskytuje důležité informace o struktuře sloučeniny, ale je dražší a vyžaduje chemikálie vyšší čistoty i náročnější přípravu vzorku (18). Mezi hlavní výhody hmotnostního detektoru patří možnost odhalení koeluze píků, větší jistota identifikace analytů (kromě retenčního času jsou získány i důležité strukturní informace), možnost analýzy složitých směsí, menší spotřeba vzorku, lepší spolehlivost kvantitativní analýzy při použití izotopicky značených standardů. Toto spojení je vysoce citlivé, selektivní a univerzální (15). Ramirez a kol. stanovili PAU v dešťové vodě pomocí online SPE systému a LC-MS. Detekční limit se pohyboval od 7,9 do 34 ng/l (19).

1.2.2 Vývoj a optimalizace analytické metody

Vývoj a optimalizace analytické metody spočívá ve zvolení takových podmínek separace, aby analyty byly dostatečně chromatograficky odděleny, co nejselektivněji detekovány a doba analýzy byla co nejkratší. Podle fyzikálně-chemických vlastností analytů a případného negativního vlivu interferujících sloučenin se provede volba vhodného detektoru a volba vhodné stacionární i mobilní fáze. Z fyzikálně-chemických vlastností jsou pro HPLC důležité vlastnosti jako struktura látky, její polarita, molekulová hmotnost, rozpustnost v použitých rozpouštědlech, hodnota pK_a , stabilita aj. (20).

Mezi optimalizované parametry patří např. chromatografická kolona (typ stacionární fáze, rozměry kolony, velikost částic), mobilní fáze (složení, objemový průtok, gradientový program), objem nástřiku, teplota separace, podmínky detekce dle typu detektoru (vlnová délka, excitační a emisní vlnová délka, specifická hmotnost iontu, SRM přechod apod.).

Objem nástřiku vzorku je nutné volit s ohledem na kapacitu kolony. Velikost nástřiku nemá vliv na účinnost kolony, pokud množství vzorku zabírá v koloně prostor rovný polovině druhé odmocniny počtu teoretických pater. Při optimalizaci objemu nástřiku se obvykle postupuje tak, že se dávkovaný objem zvyšuje až do takové hodnoty, při které ještě nedochází k významným negativním změnám v rozlišení kritických párů a/nebo v symetrii píků. S rostoucím objemem nástřiku roste množství analytu dávkované na kolonu a klesá mez detekce metody. Při optimalizaci objemového průtoku mobilní fáze se rovněž postupně zvyšuje tento parametr, a to až na takovou úroveň, při které ještě nedochází k významným negativním změnám v rozlišení kritických párů a k příliš vysokému tlaku v chromatografu. S rostoucím objemovým průtokem mobilní fáze klesá doba analýzy. Při optimalizaci teploty chromatografické separace může v některých případech docházet k výrazným změnám v separaci některých analytů (rozlišení kritických párů, změna pořadí eluce), které se mohou velmi obtížně predikovat, a musí se zjišťovat experimentálně. S rostoucí teplotou separace zpravidla klesá tlak v chromatografu a doba analýzy (20).

1.2.3 Validace analytické metody

Validaci analytické metody lze definovat jako prokázání vhodnosti metody pro její plánované použití. Mezi základní validační parametry patří linearita, přesnost, správnost, rozsah, mez detekce, mez stanovitelnosti (20).

Linearita je schopnost poskytnout lineární korelaci mezi odezvou detektoru a koncentrací analytu. Pro hodnocení linearity lze použít korelační koeficient

a QC koeficient. Přijatelná hodnota korelačního koeficientu je většinou $> 0,9990$, přijatelná hodnota QC koeficientu je většinou $< 5 \%$ (20).

Přesnost je těsnost shody mezi navzájem nezávislými měřeními. Přesnost lze vyjádřit jako opakovatelnost, mezilehlou přesnost a reprodukovatelnost. Opakovatelnost je těsnost shody mezi nezávislými výsledky získanými za podmínek opakovatelnosti (stejný postup, stejný materiál, stejná laboratoř, stejný pracovník, stejný přístroj). Mezilehlá přesnost je přesnost získaná měřením stejným postupem, na stejném místě, ale třeba jiným pracovníkem, v jiný den apod. Reprodukovatelnost je těsnost shody mezi nezávislými výsledky z téhož vzorku, ale provedených za různých podmínek (laboratoř, pracovník, přístroj). Pro hodnocení přesnosti lze použít relativní směrodatnou odchylku (20). Přijatelné hodnoty přesnosti na různých koncentračních úrovních analytu vyjádřené jako relativní směrodatná odchylka (%) jsou uvedeny např. v doporučení Guidelines for Standard Method Performance Requirements vydané organizací Association of Analytical Communities (21).

Správnost je těsnost shody mezi naměřenou a přijatou referenční hodnotou. Rozdíl mezi těmito hodnotami se nazývá chyba výsledku. Poměr získané hodnoty a přijaté referenční hodnoty se nazývá výtěžnost (20). Přijatelné hodnoty správnosti na různých koncentračních úrovních analytu vyjádřené jako výtěžnost (%) jsou uvedeny např. v doporučení Guidelines for Standard Method Performance Requirements vydané organizací Association of Analytical Communities (21).

Rozsah je interval koncentrací analytu, v němž je metoda použitelná, tzn. je prokázáno, že v daném intervalu koncentrací analytu vyhovuje požadavkům pro linearitu, přesnost a správnost (20).

Mez detekce představuje nejnižší koncentraci analytu, kterou lze detekovat, tzn. při které je signál analytu dostatečně odlišný od šumu. Nejčastěji bývá vypočtena jako trojnásobek poměru signálu analytu k šumu (20).

Mez stanovitelnosti představuje nejnižší koncentraci analytu, při které lze provést kvantifikaci s dostatečnou přesností a správností. Nejčastěji bývá vypočtena jako desetinásobek poměru signálu analytu k šumu (20).

Zdroje požadavků na rozsah validace jsou např. ICH (22) nebo FDA (23).

1.3 Metody přípravy vzorků vod ke stanovení PAU pomocí chromatografických technik

Polyaromatické uhlovodíky jsou obvykle stanovovány pomocí plynové nebo kapalinové chromatografie. V případě plynové chromatografie se téměř výhradně používá hmotnostní detektor, v případě kapalinové chromatografie se používá fluorescenční detektor nebo detektor s diodovým polem. V posledních letech je na vzestupu propojení kapalinové chromatografie s hmotnostním detektorem (LC-MS). Volba vhodného postupu přípravy vzorku k analýze je ovlivněna zejména typem použité chromatografické techniky. Mezi další významné parametry však patří i koncentrační úroveň analytů ve vzorku, požadované meze detekce či kvantifikace, matrice vzorku, množství vzorku k analýze aj.

1.3.1 Postupy využívající extrakce analytů z vody

Extrakce analytů ze vzorku je prováděna za účelem odstranění vlivu matrice (negativní vliv interferujících sloučenin) a zakoncentrování analytu, aby bylo možné dosáhnout co nejnižších mezí stanovitelnosti (24). Mezi nejčastější způsoby extrakce patří extrakce kapalinou nebo extrakce tuhou fází (4).

1.3.1 Extrakce kapalinou

Extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE) je pro svou robustnost a spolehlivost stále využívána pro extrakci organických kontaminantů z vodních matric i přesto, že jsou v dnešní době vyvíjeny rychlejší, bezpečnější a ekologičtější extrakční techniky. Lze ji totiž aplikovat i na vzorky odpadních vod bez nutnosti filtrace (25). Extrakční rozpouštědlo by mělo mít co nejnižší rozpustnost ve vodě, co nejvyšší rozpustnost pro extrahovaný analyt, nižší hustotu než voda a v ideálním případě by mělo být kompatibilní se zvolenou separační technikou. Pro extrakci PAU z vody se jako extrakční rozpouštědla nejčastěji používají toluen, hexan, dichlormethan-aceton 1:1 (v/v) a hexan-aceton 1:1 (v/v) (26).

1.3.1.1 Klasické postupy extrakce kapalinou

Tento typ extrakce je založen na rozdělovací rovnováze dvou nemísitelných kapalin. Podmínkou je ustavení rovnováhy mezi těmito kapalinami (27). Klasickou extrakci kapalina – kapalina lze rozdělit na jednostupňovou, mnohostupňovou a kontinuální, při které se nemísitelné fáze stýkají po celou dobu extrakce a pohybují se proti sobě (28). Brum a kol. pomocí této extrakce stanovili PAU ve vodě. Jako extrakční rozpouštědlo byl použit hexan. Optimalizovanými parametry byly objem rozpouštědla, doba extrakce a počet extrakčních kroků. U objemu rozpouštědla byly testovány hodnoty 20, 30, 40, 50, 60, 70 a 80 ml. Doba extrakce byla 5, 10, 15, 20 a 25 min. Extrakce byla prováděna ve 2, 3 a 4 krocích. Optimální

hodnoty byly vypočteny pro každý uhlovodík podle rovnic $\delta Y/\delta V = 0$, $\delta Y/\delta t = 0$ a $\delta Y/\delta n = 0$, kde Y je procentuální množství vyextrahovaných PAU. Optimální objem rozpouštědla se pohyboval od 59 ml do 77 ml, optimální doba extrakce od 11 min do 18 min a optimální počet kroků byl 3 a 4 (4). Běžné postupy extrakce z kapaliny do kapaliny jsou poměrně pracné, časově náročné a vyžadují i relativně velké objemy organických rozpouštědel, čímž představují riziko pro zdraví a životní prostředí (29).

1.3.1.2 Disperzní mikroextrakce

Pro stanovení PAU ve vodě byly vyvinuty metody dispersní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny pomocí vertikální třepačky (UDSA-DLLME) a dispersní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny využívající vodu s nízkou koncentrací povrchově aktivní látky v emulzi s rozpouštědlem (WLSEME). Tseng a kol. použili metody UDSA-DLLME a WLSEME pro stanovení PAU ve vodných vzorcích. Mikrozkušavka o objemu 8 ml byla naplněna 5 ml vzorku vody, který obsahoval PAU o koncentraci 10 $\mu\text{g/l}$ a 0,25 g chloridu sodného. Poté bylo pomocí 25 μl stříkačky Hamilton přidáno 14 μl 1-heptanolu. Mikrozkušavka byla vložena do držáku a třepána na vertikální třepačce při 350 otáčkách za minutu. Po odstředění při 5000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut byla organická fáze plovoucí na povrchu rozpouštědla odebrána pomocí 10 μl stříkačky SGE a odstředěna při 12000 G po dobu 1 minuty. Poté byla vrácena do horní části mikrozkušavky. Tento přenos byl proveden za použití plynotěsné mikrostríkačky. Jeden mikrolitr této plovoucí fáze byl nadávkován pomocí autosampleru do GC-MS k analýze. V případě WLSEME bylo v mikrozkušavce smícháno 9 μl 1-nonanolu a 240 μl Tritonu X-100. Směs byla odebrána 500 μl stříkačkou Hamilton, ve které byl vytvořen emulgovaný roztok. Poté byl tento roztok odpipetován do 5 ml vodného vzorku obsahujícího PAU o koncentraci 10 $\mu\text{g/l}$ a 0,25 g chloridu sodného. Dále bylo postupováno jako v případě techniky UDSA-DLLME. U obou metod byl optimalizován typ rozpouštědla (1-hexanol, 1-heptanol, 1-oktanol a 1-nonanol; u WLSEME bez 1-hexanolu) a přísávek soli (0; 0,25; 0,50 a 0,75 g). U DLLME bylo optimální rozpouštědlo 1-heptanol, optimální přísávek soli 0,25 g. V případě WLSEME bylo optimální rozpouštědlo 1-nonanol, optimální přísávek soli 0,25 g. Výtěžnost UDSA-DLLME byla 84 – 113 %, výtěžnost WLSEME byla 86 – 114 %. Ve srovnání s jinými typy mikroextrakcí umožňují UDSA-DLLME a WLSEME rychlejší dosažení rovnováhy (30).

1.3.2 Extrakce tuhou fází

Extrakce tuhou fází (SPE) je široce používána pro matrice jako voda nebo potraviny a doplňuje či nahrazuje tradiční extrakci z kapaliny do kapaliny (24). Extrakce tuhou fází

může být v některých případech výhodnější než extrakce kapalinou. Mezi hlavní výhody patří možnost automatizace s on-line SPE extrakcí (31) a možnost práce s velkými objemy vzorků bez tvorby emulzí (32). Nevýhodou jsou však vyšší náklady na spotřební materiál (SPE kolonky, aparatura pro SPE) a nutnost předúpravy vzorku před prováděním SPE extrakce (filtrace, odstředění).

1.3.2.1 SPE kolonky plněné sorbentem

Pro extrakci PAU se často využívají SPE kolonky. Kolonky bývají vyrobeny ze skla nebo polypropylenu. Sorbenty v kolonkách jsou obvykle založeny na silikagelu, který je chemicky modifikovaný nepolární oktadecylovou skupinou (C18). K separaci dochází díky odlišným interakcím mezi analytem a sorbentem (van der Waalsovy síly, vodíkové můstky). Sorbent se volí podle vlastností analytu, jeho čistoty, vlastností matrice, kontaminantů vzorku a analytického postupu. Extrakce pomocí SPE kolonek má několik kroků. Prvním krokem je kondicionace, kdy se kolonka propláchne požadovaným rozpouštědlem. Během kondicionace dojde k vymytí nečistot a k přípravě kolonky na interakce vzorku s pevnou fází. Poté následuje dávkování vzorku. Předtím je však třeba vzorek upravit, a to rozpuštěním v roztoku a odstraněním pevných částic. Potom se provádí promývání, které odstraní zbytky matrice. Rozpouštědlo použité k promývání má stejnou nebo o trochu vyšší eluční sílu v porovnání s rozpouštědlem vzorku. Následuje sušení a eluce, při které dojde k vymytí požadované látky z kolonky. Extrakce pomocí SPE kolonek má řadu výhod. Mezi ty hlavní patří zejména úspora rozpouštědel, času, možnost automatizace a dobrá selektivita. Mezi nevýhody lze zařadit vysokou cenu nebo neexistenci vhodných sorbentů pro určité látky (27). Kayali-Sayadi a kol. extrahovali PAU z vody pomocí kolonky Sep-Pak vac tC-18. Kondicionace kolonky byla provedena methanolem a vodou (obojí dvakrát po 6 ml). Na kolonu bylo nadávkováno 1500 ml vzorku při průtoku 50 ml/min. Kolonka byla vysušena ve vakuu a centrifugována při 1200 otáčkách za minutu po dobu 5 min. Adsorbované složky byly eluovány 3 ml a poté 1 ml diethyletheru při průtoku 1,5 ml/min. Zbytek po odpaření extraktu byl rozpuštěn v 1 ml methanolu a po zfiltrování nadávkován do HPLC (33). Nirmaier a kol. použili kolonku naplněnou sorbentem C18. Kolonka byla kondicionována methanolem, dichlormethanem, propan-2-olem a směsí vody a propan-2-olu v poměru 20:3 (v/v). Každého rozpouštědla bylo použito 5 ml. Do vodného vzorku o objemu 500 ml bylo přidáno 75 ml propan-2-olu. Zfiltrovaný vzorek byl nanesen na kolonu při průtoku 2,5 ml/min, kolona byla dvakrát promyta 10 ml směsí voda-propan-2-ol (20:3, v/v) a vysušena ve vakuu. Extrahované složky byly eluovány dichlormethanem, nejprve 1 ml a poté dvakrát 500 μ l. Po vysušení proudem dusíku a rozpuštění v 350 μ l směsi

methanol-voda (85:15, v/v) byl vzorek nadávkován do HPLC (34). Moret a kol. použili kolonky Supelco ENVI-18. Eluce byla provedena směsí toluen-methanol v poměru 10:1 (v/v), methanolem a vodou. Každé rozpouštědlo bylo použito dvakrát po 6 ml. Po nanesení na kolonku byl vzorek vysušen ve vakuu a třikrát byla provedena eluce 1 ml směsi dichlormethan-acetonitril v poměru 10:1 (v/v). Eluát byl zakoncentrován proudem dusíku a rozpuštěn ve 120 μ l acetonitrilu (35).

1.3.2.2 SPME

Pro analýzu organických sloučenin ve stopových množstvích se často používá mikroextrakce tuhou fází (SPME). Tato metoda je založena na adsorpci nebo absorpci. Při této extrakci se nejčastěji využívá křemenného vlákna pokrytého sorbentem. Vlákno se ponoří do kapalného vzorku nebo v případě těkavého analytu se umístí nad vzorek, kde jsou páry z tohoto vzorku (27). Pro zvýšení iontové síly rozpouštědla a účinnosti extrakce se přidává sůl (chlorid sodný). Ovšem pro nepolární látky jako PAU přidání soli účinnost extrakce nezvýší a navíc může sůl poškodit vlákno. Jako sorbent se v SPME nejčastěji používá polydimethylsiloxan. Tato metoda nevyžaduje použití organických rozpouštědel a má výbornou reprodukovatelnost (36).

García-Falcón a kol. použili pro stanovení PAU ve vodě extrakci s míchadlem (SBSE) pokrytým polydimethylsiloxanem. Vzorek vody byl umístěn do 40 ml vialky s míchadlem, která byla po přidání 0,5 ml acetonitrilu a HPLC vody uzavřena silikonovým septem pokrytým polytetrafluorethylenem. Extrakce byla prováděna za stálého míchání pomocí magnetického míchadla po dobu 40 minut při teplotě 60 °C. Po extrakci bylo míchadlo vyndáno a osušeno papírovým kapesníčkem a poté vloženo do 350 μ l insertu s 200 μ l acetonitrilu, ve kterém bylo ponecháno 5 minut k dosažení úplné desorpce analytů. Metoda SBSE nevyžaduje předběžnou přípravu vzorku, protože spojuje vzorkování a zakoncentrování do jednoho kroku a nemusí být použita další rozpouštědla (24).

1.3.2.3 Disky C₁₈

Pro stanovení stopových množství organických polutantů ve velkých vodních vzorcích byly vyvinuty disky C₁₈, kde je médium C₁₈ impregnováno na polytetrafluorethylen nebo na skleněné mikrovlákně (37). Použití metody disku C₁₈ umožňuje pracovat s větším objemem vzorku (až 2500 ml) a dosáhnout nízkých detekčních limitů v koloidní fázi (až 0,02 ng/l). Disky vyžadují minimální přípravu, interference nejsou téměř žádné a lze takto rychle připravit i velké vzorky o objemu až 2500 ml (37).

1.3.2.4 Sorbenty na bázi ftalocyaninu mědi

Ftalocyaniny jsou makrocyclické sloučeniny, které se používají jako barviva. Jsou stálé, málo rozpustné ve všech rozpouštědlech a vzhledem k silné absorpci v červené oblasti viditelného světla mají modré nebo zelené zbarvení. Ftalocyanin mědi má velkou afinitu k polycyclickým sloučeninám se třemi a více jádry a snadno se imobilizuje na nosiče aminoskupin a hydroxylových skupin (38). Tyto vlastnosti jej tak předurčují pro použití jako selektivní sorbent pro extrakci určitých polycyclických sloučenin z nejrůznějších kapalných matric.

Polycyclické sloučeniny tvoří ve vodném prostředí komplex s ftalocyaninem mědi v poměru 1:1, ze kterého mohou být následně (po separaci z matrice) uvolněny přidavkem elučního rozpouštědla. Jako eluční rozpouštědlo bývá téměř výhradně použita směs methanolu a koncentrovaného vodného roztoku amoniaku (50:1, v/v). Techniky založené na sorpci pomocí ftalocyaninu mědi jsou selektivní např. pro heterocyclické aminy, polycyclické aromatické uhlovodíky, psoraleny, aflatoxiny. Tyto metody jsou jednoduché a v kombinaci s vhodným biologickým testem mohou být použity k monitorování polycyclických mutagenů v životním prostředí (39).

Modré hedvábí je vyrobeno z hedvábných vláken, na která je kovalentně navázán ftalocyanin mědi (modré barvivo). Ftalocyanin má vysokou afinitu ke sloučeninám se třemi a více kondenzovanými jádry. Extrakce modrým hedvábím je pro některé tyto zástupce PAU efektivnější než extrakce z kapaliny do kapaliny nebo extrakce z pevné fáze do kapaliny (40). Kira a kol. provedli pomocí modrého hedvábí extrakci benzo[a]pyrenu z vody. Modré hedvábí bylo opláchnuto destilovanou vodou a tato voda byla odstraněna odsátím a osušením na papírovém ubrousku. Modré hedvábí bylo eluováno směsí methanolu a koncentrovaného amoniaku (50:1, v/v) a eluát byl vysušen. Zbytek byl rozpuštěn v methanolu a analyzován HPLC (41). Ren a kol. extrahovali 16 PAU podle U.S. EPA z mořské vody. Vysušené modré hedvábí bylo vloženo do skleněné lahve se silikonovým víčkem, kde bylo 150 ml směsi methanolu a koncentrovaného amoniaku (50:1, v/v). Láhev byla ručně třepána šestkrát v pětiminutových intervalech. Extrakce byla provedena třikrát a všechny eluáty byly zakonzentrovány ve vakuu při 20 °C do 2 ml. Tento koncentrát byl zředěn na 10 ml methanolem v odměrné baňce. Jeden mililitr byl rozdělen do dvou vialek a uchován při -30 °C. Zmrzlé vzorky byly rozmrazeny při pokojové teplotě, přefiltrovány, nality do čistých vialek a skladovány v chladničce až do provedení analýzy. Koncentrace PAU ve vzorcích se pohybovala od 30,40 do 120,29 ng/l. Nejméně byly zastoupeny antracen,

fluoren, fenantren, dibenzo[a,h]antracen, benzo[g,h,i]perylene a indeno[1,2,3-c,d]pyren. Naopak acenaftylen, naftalen a benzo[a]antracen byly ve vzorcích obsaženy nejvíce (40).

Magnetický chitosan je přírodní polysacharid chitosan s přidavkem oxidu železato-železitého a s kovaletně navázaným ftalocyaninem mědi (42). Hydratované oxidy železa jsou uzavřené uvnitř porézní polymerní struktury tvořené chitosanem, na kterém je kovaletně navázané barvivo ftalocyanin mědi. Přítomnost magnetické složky v sorbentu umožňuje jeho selektivní fyzické oddělení nejen z pravých roztoků, ale i ze suspenzí. Magnetický sorbent může být totiž přitahován magnetem ke stěně extrakční nádoby, čímž dojde k jeho oddělení od nemagnetických částic (43). Imobilizace ftalocyaninu mědi na magnetických částicích tak umožňuje specifickou separaci specificky vázaných látek, jakými jsou i některé PAU. Tyto techniky se nazývají extrakce magnetickou tuhou fází (MSPE). Pomocí MSPE lze připravit i komplikované vzorky přírodních nebo odpadních vod bez nutnosti filtrace (44). Šafařík a Šafaříková použili MSPE k extrakci PAU a jejich derivátů. Vodný roztok analytů byl smíchán s 0,4 ml suspenze modrého magnetitu. Suspenze byla míchána 4 h a potom byla usazena silným magnetem. Supernatant byl odlit a usazený magnetický adsorbent byl přenesen do testovací trubice. Po magnetické separaci a odstranění vodného roztoku byly přidány 4 ml methanolu jako elučního činidla. Po dvacetiminutovém míchání byl magnetický adsorbent pomocí magnetu přitažen ke stěně trubice. Obsah analytu, který byl extrahován do organického rozpouštědla, byl stanoven spektrofotometricky. Relativní směrodatná odchylka se pohybovala od 1,13 % do 6,86 %. Při analýze větších objemů vzorků je však přesnost nižší. Extrakce magnetickou tuhou fází je tedy vhodná pro vzorky o objemu maximálně 1000 ml. Magnetické separace našly uplatnění v mikrobiologii, buněčné biologii, molekulární biologii, biochemii, analytické chemii a biotechnologiích (45).

2 Materiál a metody

2.1 Přístroje a pomůcky

Chromatografické separace byly prováděny na kapalinovém chromatografu Dionex UltiMate 3000 od firmy Thermo Scientific (USA), který je vybaven následujícími komponentami:

- zásobník mobilní fáze SR – 3000 SOLVENT RACK
- čerpadlo LPG – 3400 SD
- autosampler WPS – 3000 TSL ANALYTICAL
- kolonový termostat TCC – 3000 SD
- přepínač kolon PD 715 – 025
- UV/VIS detektor DAD – 3000 RS

Na ovládání chromatografu a zpracování chromatogramů byl použit program Chromeleon 7.2.1.5537., validace metody byla provedena v programech EffiValidation 3.0 a Microsoft Excel 2013.

Byla použita chromatografická kolona Waters PAH C18 o rozměrech 250 x 3,0 mm a velikosti částic náplně 5 µm. Tato kolona je speciálně určená pro PAU.

Objemy kapalných látek byly odměřovány automatickou pipetou BIOHIT PROLINE o objemu 1000 µl od firmy Sartorius (Německo) a skleněnými stříkačkami o objemech 5; 10; 25; 50; 100, 250 a 500 µl od firmy Hamilton (USA). Deionizovaná voda byla připravena přístrojem Smart2Pure 6 UV/UF od firmy Thermo Scientific (USA). Třepání bylo prováděno na horizontální třepačce ORBIT 1000 od firmy Labnet (USA). Sorbent byl fixován pomocí silného magnetu VMM 7 20 730 o síle 130,1 N od firmy MAGSY (Česká republika).

2.2 Chemikálie

Během práce byly použity následující chemikálie:

- standard PAU MIX-9 od firmy Dr. Ehrenstorfer (Německo), šarže 30325AL, objem 10 ml, koncentrace 100 mg/l, který obsahoval 16 prioritních PAU podle EPA: naftalen, acenaftylen, acenaften, fluoren, fenantren, antracen, fluoranthen, pyren, benzo[a]antracen, chrysen, benzo[b]fluoranthen, benzo[k]fluoranthen, benzo[a]pyren, dibenzo[a,h]antracen, benzo[g,h,i]perylene, indeno[1,2,3-c,d]pyren.

- 9,10-difenylnantracen od firmy Sigma-Aldrich (Německo), šarže SZB8186XV
- acetonitril gradient grade pro kapalinovou chromatografii od firmy Merck (Německo)
- methanol gradient grade pro kapalinovou chromatografii od firmy Merck (Německo)
- 28 – 30 % vodný roztok hydroxidu amonného od firmy Merck (Německo)
- suspenze magnetického chitosanu, která byla připravena na Ústavu nanobiologie a strukturní biologie CVGZ AV ČR v Oddělení nanobiotechnologie (44)

2.3 Příprava mobilních fází

Mobilní fáze A (MF-A) byla připravena smícháním 500 ml vody a 500 ml acetonitrilu ve skleněné lahvi se šroubovacím uzávěrem. Mobilní fáze B (MF-B) byla připravena odlitím acetonitrilu ze zásobní lahve do skleněné lahve se šroubovacím uzávěrem.

2.4 Příprava roztoků standardních sloučenin a vnitřního standardu

Zásobní roztok 16 standardů PAU (PAU-ST-A-001) o koncentraci 100 mg/l byl komerčně dodán ve skleněné lahvičce se šroubovacím uzávěrem o objemu 10 ml. Zásobní roztok vnitřního standardu (PAU-VS-A-001) byl připraven navážením 50 mg 9,10-difenylnantracenu a rozpuštěním v 1000 ml acetonu. Výsledná koncentrace zásobního roztoku vnitřního standardu PAU-VS-A-001 byla 50 mg/l.

Pracovní roztok standardních sloučenin (PAU-ST-B-005) byl připraven smícháním 0,25 ml zásobního roztoku standardu PAU-ST-A-001 a 50 % acetonitrilu ve 25 ml odměrné baňce. Výsledná koncentrace pracovního roztoku standardu PAU-ST-B-005 byla 1000 µg/l. Pracovní roztok vnitřního standardu (PAU-VS-B-005) byl připraven smícháním 2 ml zásobního roztoku vnitřního standardu PAU-VS-A-001 a 50 % acetonitrilu ve 25 ml odměrné baňce. Výsledná koncentrace pracovního roztoku vnitřního standardu PAU-VS-B-005 byla 4000 µg/l. Uzávěr obou odměrných baněk byl překryt parafilmem. Takto připravené roztoky byly skladovány v chladničce při teplotě 4 °C po dobu maximálně 1 roku.

2.5 Příprava modelového vzorku pro optimalizaci metody

Pro optimalizaci metody byl použit směsný modelový vzorek připravený ve vialce o objemu 1,8 ml smícháním 0,5 ml pracovního roztoku standardu PAU-ST-B-005, 0,1 ml pracovního roztoku vnitřního standardu PAU-VS-B-005, a 0,4 ml MF-A. Výsledná

koncentrace standardních sloučenin byla 500 µg/l a koncentrace vnitřního standardu byla 400 µg/l.

2.6 Příprava kalibračních roztoků

V Tab. 1 je uvedena příprava kalibračních roztoků. Tyto roztoky byly připravovány v krimpovacích vialkách o objemu 1,8 ml smícháním pracovního roztoku standardu PAU-ST-B-005, pracovního roztoku vnitřního standardu PAU-VS-B-005 a MF-A. Roztok standardu i roztok vnitřního standardu byl dávkován stříkačkami Hamilton, roztok MF-A byl dávkován automatickou pipetou. Každá koncentrační úroveň byla provedena ve 3 nezávislých opakováních a roztoky byly spotřebovány v den přípravy.

Tab. 1: Příprava kalibračních roztoků.

Koncentrační úroveň [µg/l]	Dávkovaný objem [µl]		
	Pracovní roztok standardu	Pracovní roztok vnitřního standardu	Mobilní fáze A
1	1	100	899
2,5	2,5	100	897,5
5	5	100	895
10	10	100	890
25	25	100	875
50	50	100	850
100	100	100	800
250	250	100	650
500	500	100	400

2.7 Příprava modelového vzorku pro testování magnetického chitosanu

Ze zásobní lahve suspenze magnetického chitosanu bylo automatickou pipetou odpipetováno 2 ml do šroubovací vialky o objemu 4 ml a 2 ml destilované vody. Vialka byla postavena na magnet a suspenze se nechala usadit. Poté byl upraven poměr magnetického chitosanu a supernatantu na hodnotu 1:3 odpipetováním přebytečného supernatantu. Takto připravená pracovní suspenze magnetického chitosanu byla provedena pouze v jednom opakování a byla spotřebována v den přípravy.

Do čisté a suché srdcové baňky o objemu 250 ml bylo odpipetováno nedělenou skleněnou pipetou 100 ml destilované vody, 250 µl zásobního roztoku standardu PAU-ST-A-001 a 500 µl zásobního roztoku vnitřního standardu PAU-VS-A-001. Výsledná koncentrace standardů i vnitřního standardu v modelovém vzorku byla 248 µg/l. Modelový vzorek byl připraven ve 3 nezávislých opakováních a byl spotřebován v den přípravy. Stejným způsobem byl připraven v 1 opakování i slepý vzorek. Z každého opakování takto připravených modelových vzorků (včetně slepého pokusu) bylo automatickou pipetou odpipetováno 0,5 ml roztoku do vialky o objemu 1,8 ml, která obsahovala 0,5 ml acetonitrilu, čímž byl získán vzorek pro výchozí stav – čas 0 min.

Následně byla provedena homogenizace pracovní suspenze magnetického chitosanu pomocí vortexu po dobu asi 2 sekund a ihned poté bylo odpipetováno vždy 200 µl suspenze do každého připraveného modelového vzorku (včetně slepého pokusu), vzorky byly vloženy na třepačku a byl zaznamenán čas začátku extrakce. Extrakce byla prováděna v uzavřené srdcové baňce po dobu 8 hod za neustálého třepání, občas byl proveden ruční oplach jemných plovoucích částic usazených na vnitřní straně baňky nad hladinou otočením baňky. Po uplynutí doby extrakce byly srdcové baňky vyjmuty, roztočeny (aby se vytvořil vír) a vloženy do stojánku s magnetem na dobu 20 min, aby bylo dosaženo co nejlepší sedimentace. Poté bylo automatickou pipetou odpipetováno 0,5 ml roztoku do vialky o objemu 1,8 ml, která obsahovala 0,5 ml acetonitrilu, čímž byl získán vzorek pro koncový stav – čas 480 min.

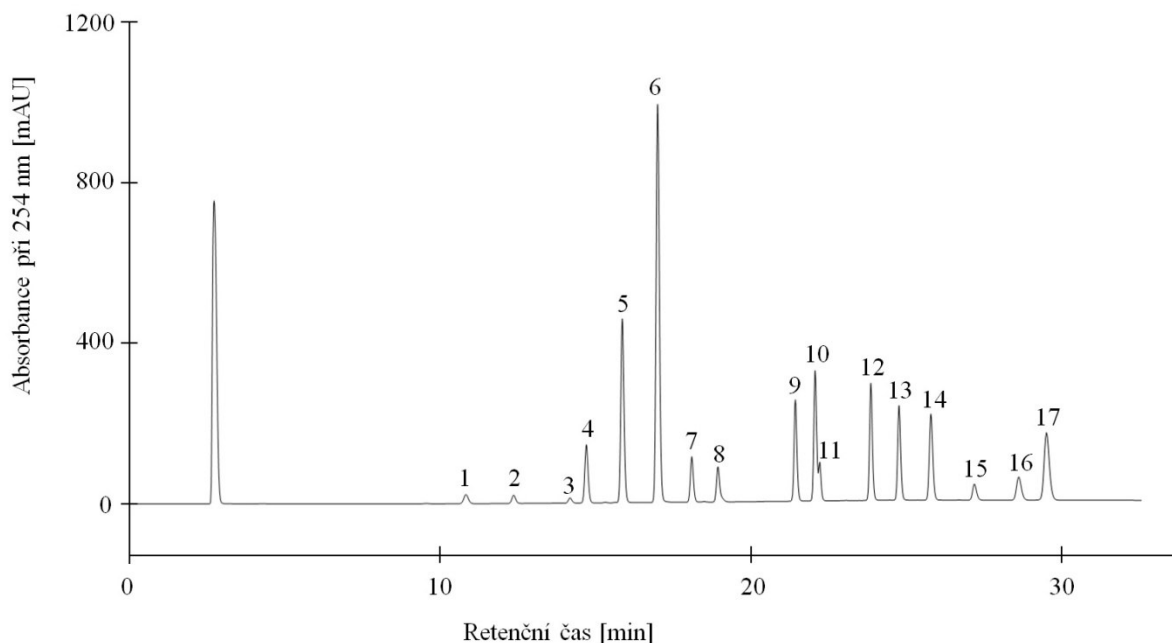
3 Výsledky a diskuze

3.1 Identifikace píků standardních sloučenin a vnitřního standardu

Prvním krokem v experimentální části této práce bylo provedení identifikace píků standardních sloučenin i vnitřního standardu. Chromatografické podmínky i podmínky detekce byly nastaveny dle doporučení výrobce kolony (viz Tab. 2). Získaný chromatogram byl porovnán s chromatogramem výrobce kolony, píky byly identifikovány a byly jim přiřazeny hodnoty retenčních časů (Obr. 1). Pro účely identifikace píků byl použit roztok připravený dle Kap. 2.5.

Tab. 2: Podmínky separace a detekce dle doporučení výrobce kolony.

Parametr	Hodnota
Teplota kolonového prostoru	30 °C
Objemový průtok mobilní fáze	0,5 ml/min
Objem nástřiku	10 µl
Vlnová délka spektrofotometrické detekce	254 nm
Gradientový program	0 – 5 min 0 % MF B
	5 – 20 min 0 → 100 % MF B
	20 – 28 min 100 % MF B
	28 – 32 min 100 → 0 % MF B
	32 – 37 min 0 % MF B



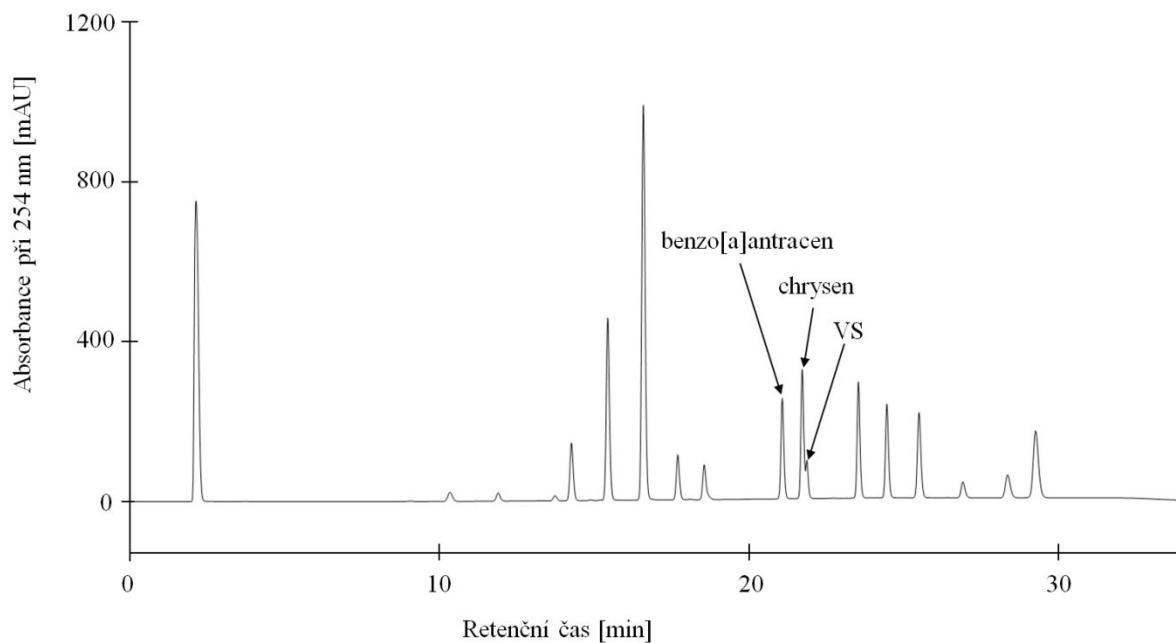
Obr. 1: Identifikace píků analytů a vnitřního standardu:

1 – Naftalen	10 – Chrysen
2 – Acenaftylen	11 – VS
3 – Acenaften	12 – Benzo[b]fluoranthen
4 – Fluoren	13 – Benzo[k]fluoranthen
5 – Fenantren	14 – Benzo[a]pyren
6 – Antracen	15 – Dibenzo[a,h]antracen
7 – Fluoranthen	16 – Benzo[g,h,i]perylen
8 – Pyren	17 – Indeno[1,2,3-c,d]pyren
9 – Benzo[a]antracen	

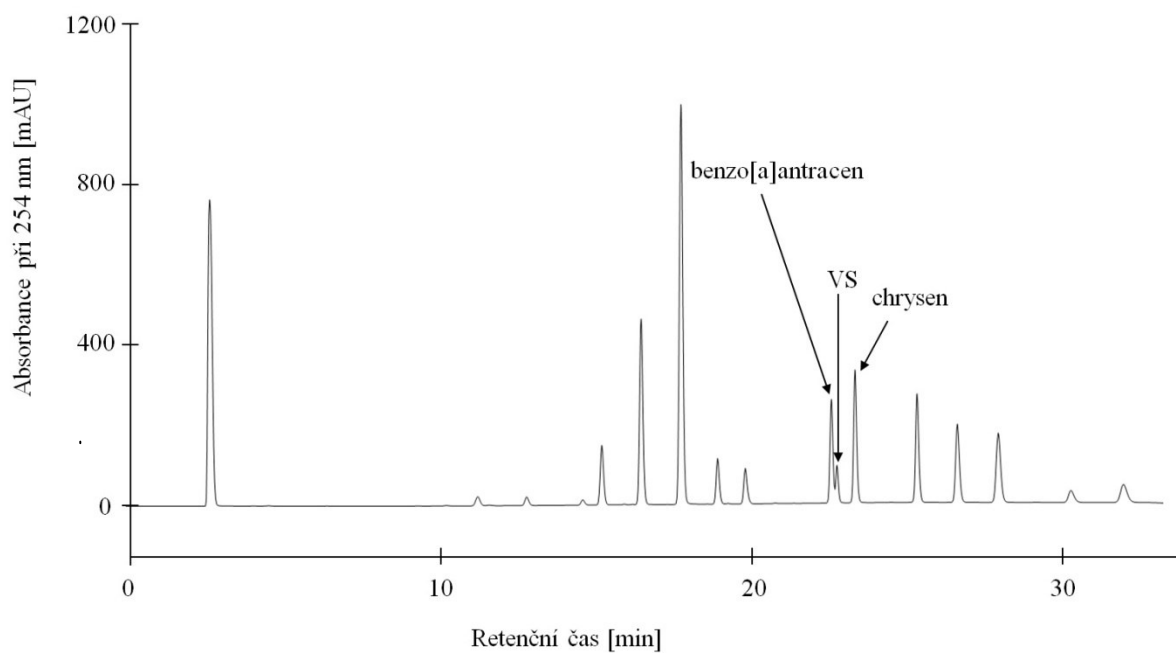
3.1 Optimalizace metody

Účelem optimalizace této analytické metody bylo nalezení takových podmínek analýzy, při kterých bude dosaženo dostatečného rozlišení všech 17 separovaných sloučenin při co nejkratší době analýzy a co nejnižších mezích detekce.

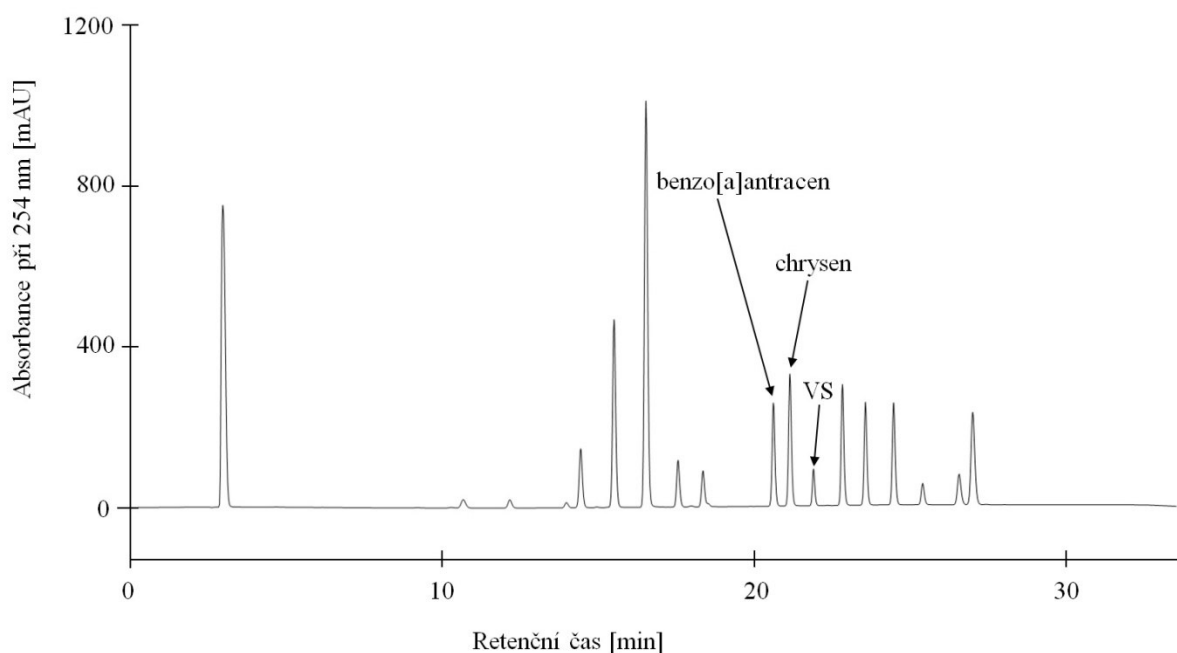
Při separaci dle doporučení výrobce kolony docházelo k částečné koeluci vnitřního standardu s chrysenem ve 23. minutě (Obr. 2). Nejprve byl testován vliv teploty kolonového prostoru na separaci. Byla proto provedena změna teploty z původních 30 °C na 25 °C a poté na 35 °C. Při 25 °C vnitřní standard částečně koeluoval s benzo[a]antracem (Obr. 3), ale při teplotě 35 °C (Obr. 4) již ke koeluci nedocházelo a navíc bylo možné zkrátit dobu analýzy z původních 37 minut na 34,5 minuty. Jako optimální teplota kolonového prostoru byla zvolena hodnota 35 °C.



Obr. 2: Chromatogram separace provedené při teplotě kolonového prostoru 30 °C.



Obr. 3: Chromatogram separace provedené při teplotě kolonového prostoru 25 °C.



Obr. 4: Chromatogram separace provedené při teplotě kolonového prostoru 35 °C.

Dalším optimalizovaným parametrem byl objemový průtok mobilní fáze (dále jen průtok). Zde byly testovány hodnoty 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 a 1,0 ml/min. Cílem bylo dosáhnout co nejkratší doby analýzy při minimálním přijatelném rozlišení kritických párů acenaften/fluoren a benzo[g,h,i]perylene/indeno[1,2,3-c,d]pyren (rozlišení $\geq 1,50$) a přijatelnému tlaku v chromatografu (tlak ≤ 180 bar).

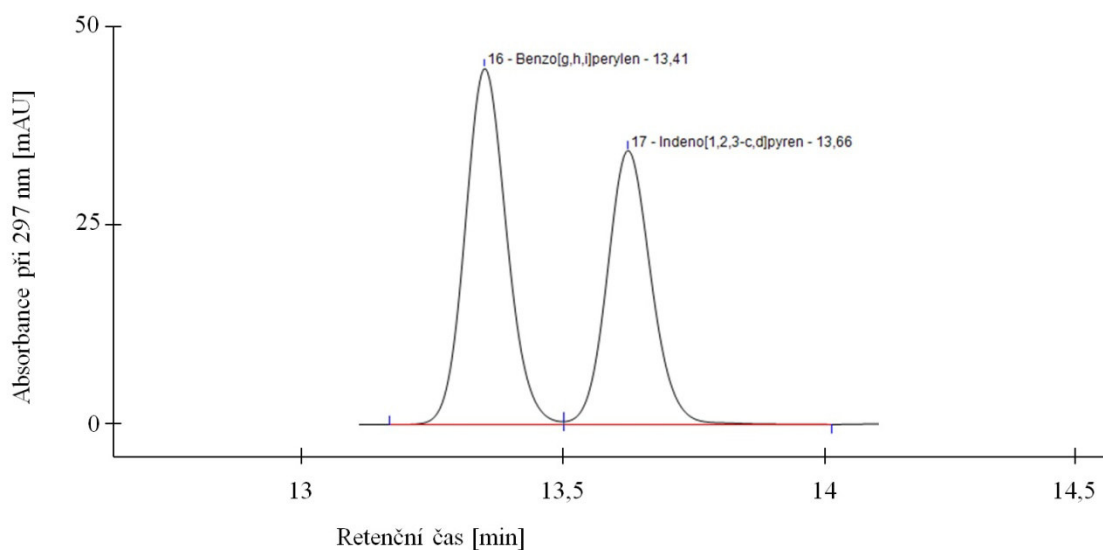
Výsledky testování vlivu průtoku na rozlišení kritických párů, tlak v chromatografu a dobu analýzy je uveden v Tab. 3.

Tab. 3: Vliv průtoku na rozlišení kritických párů, tlak v chromatografu a dobu analýzy.

Průtok [ml/min]	Tlak [bar]	Doba analýzy [min]	Rozlišení aceen/flu [1]	Rozlišení b[g,h,i]p/i[1,2,3-c,d]p [1]
0,5	90	37	2,29	2,01
0,6	107	30,8	2,28	1,98
0,7	124	26,4	2,26	1,94
0,8	140	23,1	2,23	1,92
0,9	157	20,6	2,21	1,87
1,0	173	18,5	2,19	1,85

Z naměřených dat vyplývá, že se zvyšujícím se průtokem klesá hodnota rozlišení kritických párů. Tento pokles je však minimální ($\leq 0,05$ oproti předchozí hodnotě průtoku) a i při průtoku 1 ml/min je splněno minimální požadované kritérium pro rozlišení píků a maximální tlak v chromatografu. Zvýšení průtoku mobilní fáze z původních 0,5 ml/min až na 1 ml/min také umožňuje zkrátit dobu analýzy z původních 37 min až na 18,5 min, což znamená zkrácení doby analýzy o 42,2 %.

Na Obr. 5 je pak uveden kritický pár benzo[g,h,i]perylene/indeno[1,2,3-c,d]pyren při průtoku 1,0 ml/min, který vykazoval nejhorší rozlišení ze všech separovaných párů.



Obr. 5: Kritický pár benzo[g,h,i]perylene/indeno[1,2,3-c,d]pyren při průtoku 1,0 ml/min.

Vzhledem k minimálnímu vlivu průtoku na rozlišení kritických párů a vzhledem k tomu, že při všech testovaných hodnotách průtoku byla splněna obě kritéria přijatelnosti, byla jako optimální hodnota průtoku zvolena hodnota 1,0 ml/min.

Andrade-Eiroa a kol. ve své práci řešili separaci 3 kritických párů: acenaften/fluoren, dibenzo[a,h]antracén/benzo[g,h,i]perylene a benzo[g,h,i]perylene/indeno[1,2,3-c,d]pyren. Do 45. minuty zvolili teplotu 15 °C a průtok 1,0 ml/min, od 45. minuty až do konce analýzy pak teplotu 40 °C a průtok 0,5 ml/min. Pro acenaften/fluoren dosáhli takto rozlišení 2,51, pro benzo[g,h,i]perylene/indeno[1,2,3-c,d]pyren dosáhli rozlišení 1,70 a pro dibenzo[a,h]antracén/benzo[g,h,i]perylene dosáhli rozlišení 1,94 (46). V této bakalářské práci byly kritické páry jen dva, a to acenaften/fluoren a benzo[g,h,i]perylene/indeno[1,2,3-c,d]pyren. Při teplotě 35 °C, průtoku 1,0 ml/min a více než 2x kratší době analýzy bylo dosaženo rozlišení 2,19 pro acenaften/fluoren a 1,85 pro

benzo[g,h,i]perylene/indeno[1,2,3-c,d]pyren, což jsou výrazně lepší výsledky než ve výše uvedené publikaci.

Za účelem lepšího rozdělení kritických párů a zkrácení doby analýzy byl testován vliv doby kondicionace kolony. Z původních 2,5 min byla doba kondicionace zvýšena na 4,5 min a 25 min. Jako testovaný analyt byl zvolen naftalen, protože jeho retenční čas je nejvíce ovlivněn změnou složení mobilní fáze. Dále byl testován i vliv na rozlišení kritických párů acenaften/fluoren a benzo[g,h,i]perylene/indeno[1,2,3-c,d]pyren. V Tab. 4 je uveden vliv doby kondicionace kolony na retenční čas naftalenu a rozlišení kritických párů.

Tab. 4: Vliv doby kondicionace kolony na retenční čas naftalenu a rozlišení kritických párů.

Doba kondicionace [min]	Retenční čas naftalenu [min]	Rozlišení aceen/flu [1]	Rozlišení b[g,h,i]p/i[1,2,3-c,d]p [1]
2,5	5,23	2,19	1,85
4,5	5,56	2,20	1,86
25	5,56	2,19	1,85

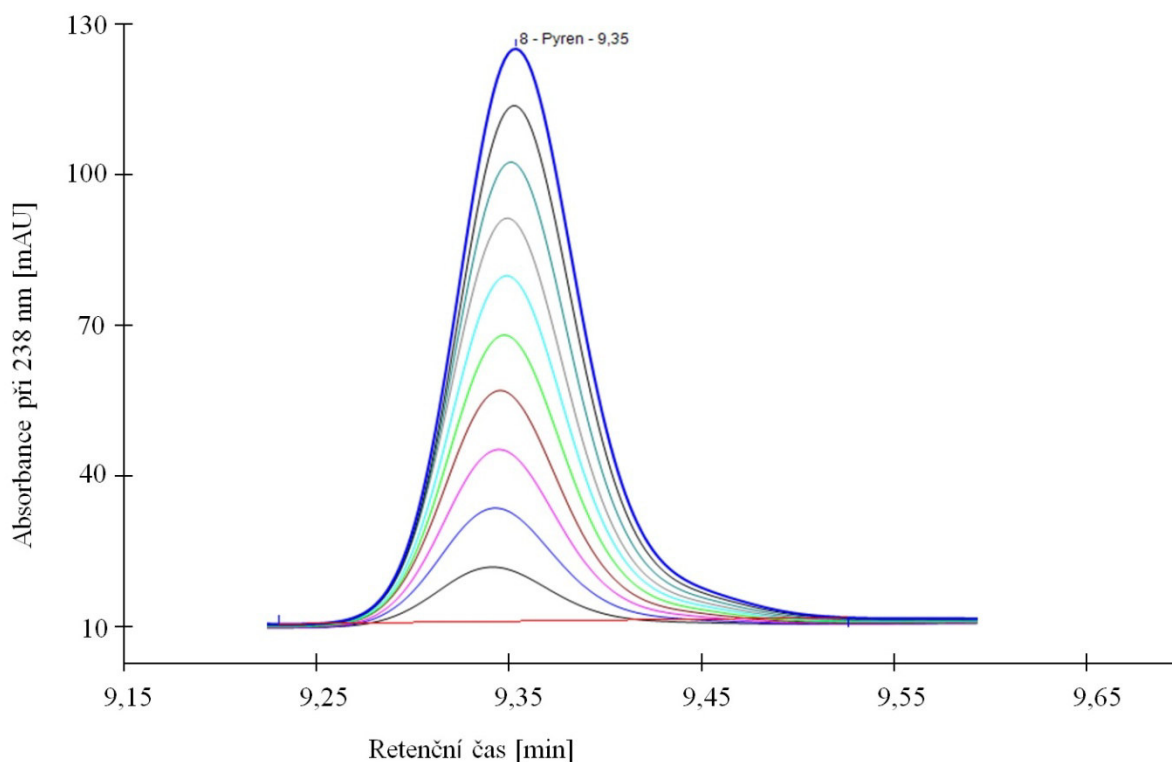
Z výše uvedených výsledků vyplývá, že doba kondicionace delší než 4,5 min je zbytečná, neboť již nedochází ke změně retenčních časů nebo ke zhoršení rozlišení kritických párů. Jako optimální doba kondicionace kolony byla zvolena hodnota 4,5 min.

Posledním optimalizovaným parametrem chromatografické separace byl objem nástřiku. Testovány byly hodnoty 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90 a 100 μ l. Bylo hodnoceno, zda nedochází ke zhoršení faktoru symetrie píku a zda se jeho hodnota pohybuje v přijatelném rozsahu, tj. 0,8 – 1,5 (16). Jako hodnocený analyt byl zvolen pyren, jehož pík vykazoval nejhorší hodnoty faktoru symetrie. V Tab. 5 je uveden vliv nástřiku na faktor symetrie píku, na Obr. 6 je znázorněn pík pyrenu při různých hodnotách nástřiku.

Tab. 5: Vliv nástřiku na faktor symetrie píku pyrenu.

Nástřik [μl]	Faktor symetrie [1]
10	1,24
20	1,23
30	1,23
40	1,25
50	1,24
60	1,24
70	1,24
80	1,24
90	1,26
100	1,23

Jak je vidět v Tab. 5, u jednotlivých velikostí nástřiku se hodnota faktoru symetrie liší jen minimálně a nachází se v přijatelném rozmezí 0,8 – 1,5 (16). Ideální hodnota symetrie píku je 1. Pokud je < 1 , dochází k frontování píku, pokud je > 1 , dochází k chvostování píku (15).



Obr. 6: Pík pyrenu při nástřiku 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90 a 100 μ l.

Z Tab. 5 a Obr. 6 je vidět, že pík pyrenu mírně chvostuje, hodnoty faktoru symetrie se ovšem pohybují v přijatelném rozmezí 0,8 – 1,5 (16). Jako optimální objem nástřiku však byla zvolena hodnota 90 μ l místo 100 μ l, protože 100 μ l je limitní hodnota nástřiku autosampleru.

Pro PAU bývá doporučována stacionární fáze C18. Jako modifikátor se používá acetonitril, protože jiná rozpouštědla mají vyšší viskozitu a způsobují vyšší tlak na koloně. Mění se pouze teplota, počáteční množství modifikátoru mobilní fáze, gradientový program a průtok. Pro gradientové eluce je doporučována směs acetonitril/voda. Nejlepší počáteční koncentrace acetonitrilu je 50 % (46). Stacionární i mobilní fáze v této bakalářské práci byly tedy vybrány vhodně, což bylo prokázáno i experimentálně.

Po úspěšně provedené optimalizaci chromatografické separace byla provedena optimalizace podmínek spektrofotometrické detekce. Přestože většina PAU absorbuje při 254 nm, tak nejnižších limitů detekce lze dosáhnout pouze při specifických vlnových délkách. Pro každou sloučeninu byla proto nalezena vlnová délka, která odpovídala absorpčnímu maximu dané sloučeniny. Detektor, který byl použit k analýze, však umožňuje simultánně měřit absorbanci pouze při 8 vlnových délkách. Bylo tedy nezbytné zvolit určité kompromisní vlnové délky společné pro více analytů a to tak, aby všechny analyty měly

přibližně stejnou odezvu a aby nedocházelo k případným interferencím s nečistotami z mobilní fáze či z přípravy vzorků. Vhodnost volby těchto vlnových délek byla průběžně experimentálně ověřována pomocí analýzy směsného roztoku standardu o koncentraci 10 µg/l. Výsledek optimalizace vlnové délky detekce pro jednotlivé sloučeniny je uveden v Tab. 6.

Tab. 6: Optimalizace vlnové délky spektrofotometrické detekce.

Analyt	Vlnová délka absorpčního maxima [nm]	Vlnová délka použitá k detekci [nm]
Naftalen	229	220
Acenaftylen	230	229
Acenaften	227	229
Fluoren	206	260
Fenantren	252	252
Antracen	252	252
Fluoranthen	236	238
Pyren	241	238
Benzo[a]antracen	288	287
Chrysen	268	268
VS	260	260
Benzo[b]fluoranthen	257	297
Benzo[k]fluoranthen	240	297
Benzo[a]pyren	296	297
Dibenzo[a,h]antracen	297	297
Benzo[g,h,i]perylene	300	297
Indeno[1,2,3-c,d]pyren	250	297

Nakonec bylo provedeno testování odezvy detektoru v různých koncentračních řádech (0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100 a 1000 µg/l), aby byly zjištěny meze detekce a meze stanovitelnosti jednotlivých sloučenin. Vzorky těchto koncentrací byly připraveny desetinasobným ředěním vzorku předchozí koncentrační úrovně. Bylo zjištěno, že sloučeniny fluoren, fenantren, antracen, benzo[a]antracen, chrysen, benzo[b]fluoranthen,

benzo[k]fluoranthen, benzo[a]pyren, benzo[g,h,i]perylene a indeno[1,2,3-c,d]pyren poskytují na koncentrační úrovni 1 µg/l nedostatečnou odezvu pro použití pro kvantitativní analýzu (poměr výšky píku k šumu < 10), a proto byla jako nejnižší koncentrační úroveň kalibrační řady zvolena koncentrační úroveň 2,5 µg/l, na které už byly odezvy všech analytů dostatečné.

3.2 Validace metody

Pro validaci metody byla použita řada kalibračních roztoků o koncentraci 2,5; 5; 10; 25; 50; 100 a 250 µg/l. Příprava těchto roztoků je uvedena v Tab. 1. Každá koncentrační úroveň byla analyzována ve třech opakováních. Validace metody byla provedena v programech EffiValidation 3.0 a Microsoft Excel 2013. Hodnoceny byly linearita, rozsah, přesnost, správnost, mez detekce, mez stanovitelnosti.

Linearita byla hodnocena pomocí korelačního koeficientu a QC koeficientu. Hodnoty těchto koeficientů pro kalibrační závislosti jednotlivých analytů jsou uvedeny v Tab. 7. Kritérium přijatelnosti je podle programu EffiValidation pro korelační koeficient $\geq 0,99000$, pro QC koeficient $\leq 5,00\%$.

Tab. 7: Korelační koeficient a QC koeficient.

Analyt	Korelační koeficient [1]	QC koeficient [%]	Analyt	Korelační koeficient [1]	QC koeficient [%]
Naftalen	0,99999	0,73	Benzo[a]antracen	0,99999	0,55
Acenaftilen	0,99999	0,48	Chrysen	0,99998	0,81
Acenaften	0,99998	0,93	Benzo[b]fluoranthen	0,99999	0,51
Fluoren	0,99999	0,64	Benzo[k]fluoranthen	0,99999	0,43
Fenantren	1,00000	0,40	Benzo[a]pyren	0,99999	0,69
Antracen	0,99999	0,73	Dibenzo[a,h]antracen	0,99999	0,57
Fluoranthen	0,99999	0,56	Benzo[g,h,i]perylene	0,99998	0,89
Pyren	0,99999	0,51	Indeno[1,2,3-c,d]pyren	0,99998	0,89

Z výše uvedených dat vyplývá, že hodnoty korelačního koeficientu a QC koeficientu kalibračních závislostí všech analytů vyhovují oběma kritériím přijatelnosti.

Následně byla hodnocena přesnost vyjádřená jako opakovatelnost pomocí relativní směrodatné odchylky (RSD), a to pro koncentrační úrovně 2,5; 25 a 250 µg/l. Každá

koncentrační úroveň byla změřena ve 3 nezávislých opakováních. Přijatelná hodnota RSD je pro koncentrační úroveň $2,5 \mu\text{g/l} \leq 30 \%$, pro koncentrační úroveň $25 \mu\text{g/l} \leq 21 \%$ a pro koncentrační úroveň $250 \mu\text{g/l} \leq 15 \%$.

Tab. 8: Přesnost vyjádřená jako opakovatelnost.

Analyt	RSD [%]			Analyt	RSD [%]		
	2,5 $\mu\text{g/l}$	25 $\mu\text{g/l}$	250 $\mu\text{g/l}$		2,5 $\mu\text{g/l}$	25 $\mu\text{g/l}$	250 $\mu\text{g/l}$
Naftalen	0,36	0,38	0,39	Benzo[a]antracen	0,33	0,48	0,33
Acenaftylen	2,7	0,47	0,40	Chrysen	1,4	0,36	0,34
Acenaften	0,64	0,23	0,40	Benzo[b]fluoranthen	4,6	0,56	0,28
Fluoren	3,3	0,23	0,41	Benzo[k]fluoranthen	2,9	1,2	0,20
Fenantren	3,0	0,20	0,39	Benzo[a]pyren	2,2	0,84	0,40
Antracen	1,3	0,35	0,40	Dibenzo[a,h]antracen	4,7	0,08	0,24
Fluoranthen	1,2	0,37	0,35	Benzo[g,h,i]perylene	1,5	0,06	0,44
Pyren	1,2	0,53	0,35	Indeno[1,2,3-c,d]pyren	7,3	0,47	0,37

Na základě naměřených dat uvedených v Tab. 8 bylo prokázáno, že přesnost vyjádřená jako opakovatelnost pomocí RSD se pohybuje v rozmezí od 0,06 % do 7,3 %, což vyhovuje všem 3 kritériím přijatelnosti na všech 3 koncentračních úrovních pro všechny testované analyty.

V rámci přesnosti byla testována mezilehlá přesnost pomocí RSD, a to pro koncentrační úrovně 2,5; 25 a 250 $\mu\text{g/l}$. Každá koncentrační úroveň byla změřena ve 3 nezávislých opakováních ve 2 různých sériích, přičemž každá série byla připravována a analyzována v různý den na témže přístroji. Přijatelná hodnota RSD je pro koncentrační úroveň $2,5 \mu\text{g/l} \leq 30 \%$, pro koncentrační úroveň $25 \mu\text{g/l} \leq 21 \%$ a pro koncentrační úroveň $250 \mu\text{g/l} \leq 15 \%$.

Tab. 9: Přesnost vyjádřená jako mezilehlá přesnost.

Analyt	RSD [%]			Analyt	RSD [%]		
	2,5 µg/l	25 µg/l	250 µg/l		2,5 µg/l	25 µg/l	250 µg/l
Naftalen	1,5	0,83	0,48	Benzo[a]antracen	2,4	0,69	0,43
Acenaftylen	2,7	1,1	0,69	Chrysen	3,4	0,58	0,33
Acenaften	2,1	0,38	0,63	Benzo[b]fluoranthen	8,5	0,82	0,63
Fluoren	5,5	1,3	0,80	Benzo[k]fluoranthen	3,6	0,91	0,50
Fenantren	2,0	0,7	0,70	Benzo[a]pyren	4,0	0,83	0,56
Antracen	1,2	0,33	0,33	Dibenzo[a,h]antracen	10,0	1,5	1,1
Fluoranthen	2,9	0,68	0,64	Benzo[g,h,i]perylene	3,2	0,73	1,0
Pyren	4,6	0,66	1,0	Indeno[1,2,3-c,d]pyren	8,0	0,81	0,57

Na základě naměřených dat uvedených v Tab. 9 bylo prokázáno, že přesnost vyjádřená jako mezilehlá přesnost pomocí RSD se pohybuje v rozmezí od 0,33 % do 10,0 %, což vyhovuje všem 3 kritériím přijatelnosti na všech 3 koncentračních úrovních pro všechny testované analyty. Nepatrně horší výsledky mezilehlé přesnosti jsou zapříčiněny zahrnutím dalších potenciálních zdrojů chyb (opakované přípravy vzorků, vypnutí přístroje, apod.)

V rámci měření přesnosti vyjádřené jako opakovatelnost byla hodnocena i správnost metody vyjádřená jako výtěžnost, a to ve stejném rozsahu a na stejných koncentračních úrovních. Přijatelná hodnota výtěžnosti pro koncentrační úroveň 2,5 µg/l činí 40 – 120 %, pro koncentrační úroveň 25 µg/l činí 60 – 115 % a pro koncentrační úroveň 250 µg/l činí 80 – 110 %.

Tab. 10: Správnost vyjádřená jako výtěžnost.

Analyt	Výtěžnost [%]			Analyt	Výtěžnost [%]		
	2,5 µg/l	25 µg/l	250 µg/l		2,5 µg/l	25 µg/l	250 µg/l
Naftalen	88	100	101	Benzo[a]antracen	92	100	101
Acenaftylen	91	100	101	Chrysen	90	101	101
Acenaften	85	101	101	Benzo[b]fluoranthen	96	100	101
Fluoren	93	100	101	Benzo[k]fluoranthen	90	99	101
Fenantren	95	100	101	Benzo[a]pyren	107	100	102
Antracen	92	101	101	Dibenzo[a,h]antracen	102	100	101
Fluoranthen	87	100	101	Benzo[g,h,i]perylen	118	102	102
Pyren	91	100	101	Indeno[1,2,3-c,d]pyren	106	100	101

Z hodnot uvedených v Tab. 10 vyplývá, že se výtěžnost pohybuje od 85 % do 118 %, což vyhovuje všem 3 kritériím přijatelnosti na všech 3 koncentračních úrovních pro všechny testované analyty. Poměrně vysoká hodnota výtěžnosti benzo[g,h,i]perylenu na úrovni 2,5 µg/l je způsobena přítomností nečistoty z mobilní fáze.

Na základě výsledků hodnocení linearitu, přesnosti, mezilehlé přesnosti a správnosti lze konstatovat, že rozsah analytické metody v rozmezí koncentrací analytů 2,5 – 250 µg/l byl potvrzen. Koncentrační úroveň 1 µg/l nevyhovuje kritériu přijatelnosti pro správnost v případě analytů acenaftylen, fluoren, fenantren, benzo[b]fluoranthen, benzo[k]fluoranthen, benzo[g,h,i]perylen a indeno[1,2,3-c,d]pyren. Na koncentrační úrovni 500 µg/l byly v případě některých analytů naměřeny již příliš vysoké hodnoty absorbance, které byly na hranici technické specifikace přístroje.

Jako poslední validační parametry byly hodnoceny mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ). Mez detekce (LOD) byla vypočítána jako trojnásobek poměru výšky signálu k šumu a mez stanovitelnosti (LOQ) byla vypočítána jako desetinásobek poměru signálu k šumu. K výpočtu obou mezí byly použity výšky píků z analýzy roztoků na koncentračních úrovních 0,1 µg/l a 1,0 µg/l a hodnota šumu byla odečtena ze slepého pokusu vždy v oblasti retenčního času dané sloučeniny, a to ve vzdálenosti dvacetinásobku šířky píku dané sloučeniny v polovině výšky. Konkrétní hodnoty mezí detekce a mezí stanovitelnosti testovaných analytů jsou uvedeny v Tab. 11.

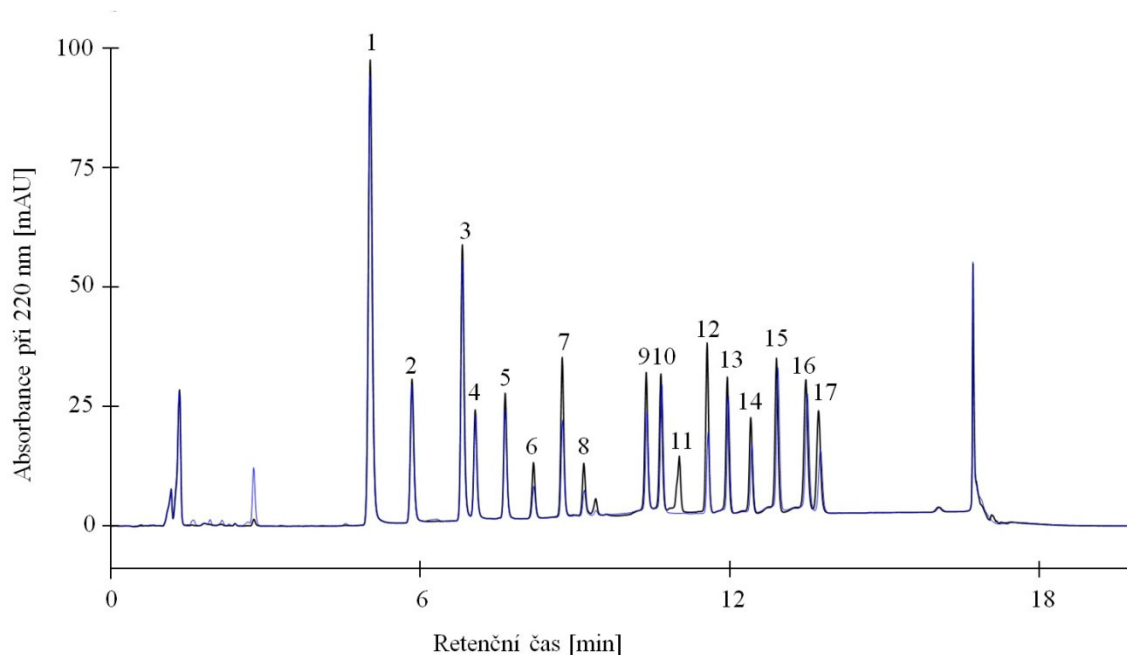
Tab. 11: Mez detekce a mez stanovitelnosti.

Analyt	LOD [µg/l]	LOQ [µg/l]	Analyt	LOD [µg/l]	LOQ [µg/l]
Naftalen	0,27	0,83	Benzo[a]antracen	0,54	1,7
Acenaftylen	0,27	0,79	Chrysen	0,65	2,1
Acenaften	0,36	0,90	Benzo[b]fluoranthen	0,47	1,9
Fluoren	0,76	2,4	Benzo[k]fluoranthen	0,45	1,4
Fenantren	0,82	2,5	Benzo[a]pyren	0,79	2,4
Antracen	0,33	1,3	Dibenzo[a,h]antracen	0,30	1,0
Fluoranthen	0,23	0,76	Benzo[g,h,i]perylene	0,56	1,8
Pyren	0,22	0,68	Indeno[1,2,3-c,d]pyren	0,53	1,7

3.3 Extrakce PAU z vody pomocí magnetického chitosanu

Vyvinutá a zvalidovaná analytická metoda na stanovení PAU ve vodě byla následně použita pro hodnocení extrakce PAU z vody pomocí magnetického chitosanu dle postupu uvedeném v Kap. 2.7. Modelový vzorek vody s koncentrací analytů na úrovni 248 µg/l byl extrahován po dobu 480 min. Poté bylo pro každý analyt provedeno objektivní hodnocení sorpce na magnetický chitosan, a to jako procentuální vyjádření plochy píku ve 480. min vzhledem k ploše píku v 0. min (tzn. těsně před přidavkem magnetického chitosanu).

Na následujícím obrázku jsou znázorněny výsledky extrakce PAU magnetickým chitosanem.



Obr. 7: Vzorek o koncentraci analytů 250 $\mu\text{g/l}$ v 0. minutě (černě) a ve 480. minutě (modře).

1 – Naftalen	10 – Chrysen
2 – Acenaftylen	11 – VS
3 – Acenaften	12 – Benzo[b]fluoranthen
4 – Fluoren	13 – Benzo[k]fluoranthen
5 – Fenantren	14 – Benzo[a]pyren
6 – Antracenu	15 – Dibenzo[a,h]antracenu
7 – Fluoranthen	16 – Benzo[g,h,i]perylen
8 – Pyren	17 – Indeno[1,2,3-c,d]pyren
9 – Benzo[a]antracenu	

Z Obr. 7 je patrné, že v průběhu 480 minut došlo k úplné sorpci pouze v případě 9,10-difenyланtracenu (vnitřní standard). Naopak naftalen, acenaftylen, acenaften a fluoren nebyly sorbovány téměř vůbec a pokles o pouhých $\leq 5\%$ plochy píku v 0. min lze spíše přisoudit nespecifické sorpci na stěny srdcové baňky či jiné ztráty. Ostatní analyty vykazovaly pokles koncentrace na úrovních 46 – 91 % plochy píku v 0. min. Vzhledem k velice rozdílné sorpci jednotlivých analytů i samotného vnitřního standardu nemůže být v rámci této metody přípravy vzorku použit jeden společný vnitřní standard.

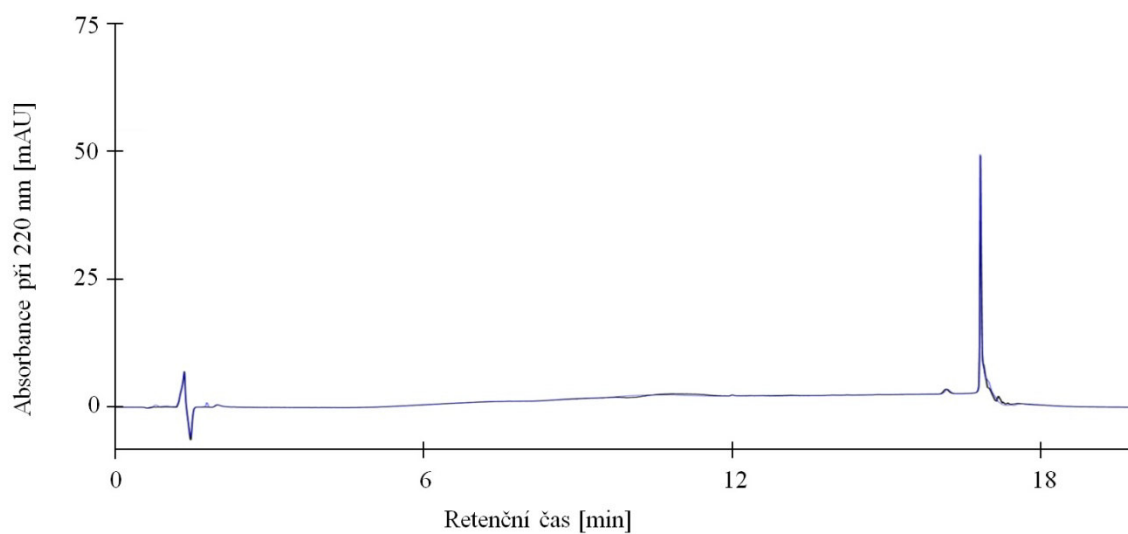
Přesnost stanovení vyjádřená jako dvojnásobek výběrové směrodatné odchylky se pohybovala v naprosté většině případů v přijatelném rozmezí 1 – 4 %, pouze v případě antracenu byla získána hodnota 8 %. Kompletní výsledky sorpce jednotlivých analytů uvedené jako aritmetický průměr ze 3 nezávislých opakování \pm dvojnásobek výběrové směrodatné odchylky jsou sumarizovány v Tab. 12.

Tab. 12: Pokles plochy píku v závislosti na době extrakce.

Analyt	Plocha píku ve 480. min [% z plochy píku v 0. min]
Naftalen	97 ± 2
Acenaftylen	95 ± 2
Acenaften	96 ± 3
Fluoren	95 ± 3
Fenantren	87 ± 2
Antracen	61 ± 8
Fluoranthén	59 ± 1
Pyren	48 ± 2
Benzo[a]antracen	68 ± 2
Chrysen	89 ± 3
Vnitřní standard	0
Benzo[b]fluoranthén	46 ± 1
Benzo[k]fluoranthén	83 ± 2
Benzo[a]pyren	71 ± 2
Dibenzo[a,h]antracen	91 ± 2
Benzo[g,h,i]perylene	87 ± 4
Indeno[1,2,3-c,d]pyren	63 ± 2

Analýzou slepého vzorku (viz Obr. 8) bylo rovněž potvrzeno, že modelový vzorek vody nebyl ničím kontaminován, nebyly zaznamenány žádné interferující látky a byla potvrzena dostatečná chemická stabilita magnetického chitosanu. Detekce byla totiž prováděna nejen na vybraných vlnových délkách (viz Tab. 6), ale i v celém rozsahu UV a VIS spektra detektoru (190 – 800 nm), a to po celou dobu analýzy. Detailním studiem získaných 2D chromatogramů bylo zjištěno, že supernatant získaný po 480 min extrakci má naprosto

totožný chromatogram jako supernatant v 0. min, takže lze konstatovat, že v průběhu extrakce nedocházelo k uvolňování ftalocyaninového barviva z magnetického chitosanu či k nějakým dalším nespecifikovaným nežádoucím reakcím.



Obr. 8: Chromatogram slepého vzorku v 0. minutě (černě) a ve 480. minutě (modře).

4 Závěr

V rámci této bakalářské práce byla nejprve provedena optimalizace separačních a detekčních podmínek metody pro stanovení 16 prioritních polyaromatických uhlovodíků dle U.S. EPA ve vodě pomocí HPLC s PDA detekcí. Na základě výsledků optimalizace separačních podmínek bylo zjištěno, že optimální teplota separace je 35 °C, optimální objemový průtok mobilní fáze je 1 ml/min, dostatečná doba kondicionace kolony je 4,5 min a velikost nástřiku je 90 µl. V rámci optimalizace detekčních podmínek bylo zvoleno 8 kompromisních vlnových délek pro měření absorbance, jejichž hodnoty byly zvoleny tak, aby všechny analyty poskytovaly při stejné koncentraci přibližně stejnou a co nejvyšší odezvu.

Po dostatečné optimalizaci analytické metody byla provedena její základní validace. Mezi hodnocené validační parametry patřila linearita, přesnost (vyjádřená jako opakovatelnost i mezilehlá přesnost), správnost, rozsah, mez detekce a mez stanovitelnosti. Bylo prokázáno, že analytická metoda vyhovuje všem požadovaným kritériím přijatelnosti v rozsahu koncentrací 2,5 – 250 µg/l a že je vhodná pro stanovení 16 vybraných polyaromatických uhlovodíků ve vodě.

V závěru této práce byla analytická metoda použita pro hodnocení extrakce 16 vybraných polyaromatických uhlovodíků a 1 vnitřního standardu z vody pomocí magnetického chitosanu. Analýzami modelového vzorku vody před přidavkem magnetického chitosanu a po 480 min extrakci bylo zjištěno, že magnetický chitosan silně sorbuje vnitřní standard (100 %), ale nesorbuje naftalen, acenaftylen, acenaften a fluoren (≤ 5 %), což koresponduje s dosavadními informacemi o vlastnostech použitého ftalocyaninového barviva. Bylo tedy experimentálně prokázáno, že při přípravě magnetického chitosanu nedošlo k degradaci tohoto barviva či ovlivnění jeho vlastností a na základě analýz slepého vzorku byla prokázána i dostatečná stabilita magnetického chitosanu. Důležitým závěrem je i skutečnost, že s ohledem na velice rozdílnou sorpci jednotlivých analytů nemůže být 9,10-difenylantracen (ani jiná sloučenina) použit jako jeden společný vnitřní standard pro tento typ přípravy vzorku.

Zvolená koncentrace sloučenin v testovaném roztoku 248 µg/l je však poměrně vysoká a přidavek pouze 200 µl suspenze magnetického chitosanu poměrně nízký, a tak míra sorpce jednotlivých sloučenin není příliš výrazná a problematická by byla i aplikace na reálné vzorky kontaminovaných vod. Vzhledem k možnostem PDA detektoru však nebylo možné

zvolit nižší výchozí koncentraci, protože rozsah analytické metody činil 2,5 – 250 µg/l. Z tohoto důvodu by bylo vhodné provádět stanovení pomocí fluorescenčního detektoru a k testování použít roztoky s koncentrací sloučenin o několik řádů nižší, které více odpovídají vzorkům reálných kontaminovaných vod. Mezi další směry výzkumu v této oblasti by bylo vhodné zařadit hodnocení sorpce těchto polyaromatických uhlovodíků v čase (provedení odběru po určitých časových intervalech), hodnocení distribuce analytů (množství v supernatantu, množství v extraktu a nedesorbované množství z magnetického chitosanu) nebo hodnocení různých elučních rozpouštědel. Oblast speciálních specifických magnetických sorbentů je poměrně málo prozkoumána a zcela jistě si zaslouží i další pozornost.

5 Seznam použitých literárních zdrojů

1. **Dost, K. a Ideli, C.** Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils and barbecued food by HPLC/UV-Vis detection. *Food Chemistry*. 2012. 133, stránky 193-199.
2. **Raclavská, H., Kuchařová, J. a Plachá, D.** Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU). *Podklady k provádění Protokolu o PRTR - Přehled metod a identifikace látek sledovaných podle Protokolu o registrech úniků a přenosů znečišťujících látek v únicích do půd*. 2008.
3. **Manoli, E. a Samara, C.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters: sources, occurrence and analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. 1999, 18(6), stránky 417-428.
4. **Brum, D.M., Cassella, R.J. a Pereira Netto, A.D.** Multivariate optimization of a liquid-liquid extraction of the EPA-PAHs from natural contaminated waters prior to determination by liquid chromatography with fluorescence detection. *Talanta*. 2008. 74, stránky 1392-1399.
5. **Pissinatti, R., a další.** Simultaneous analysis of 10 polycyclic aromatic hydrocarbons in roasted coffee by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry: Optimization, in-house method validation and application to an exploratory study. *Food Control*. 2015. 51, stránky 140-148.
6. **Escarrone, A.L.V., a další.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in rice grain dried by different processes: Evaluation of a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction method. *Food Chemistry*. 2014, 146, stránky 597-602.
7. **Fatemi, M.H., a další.** Extraction optimization of polycyclic aromatic hydrocarbons by alcoholic-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and their determination by HPLC. *J. Sep. Sci.* 2012. 35, stránky 86-92.
8. **Oluseyi, T., a další.** Comparison of extraction and clean-up techniques for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil samples. *African Journal of Environmental Science and Technology*. 2011. 5(7), stránky 482-493.
9. **Olenycz, M., a další.** Comparison of PCBs and PAHs levels in European coastal waters using mussels from the *Mytilus edulis* complex as biomonitors. *Oceanologia*. 2015, 57(2), stránky 196-211.
10. **Nagai, A., a další.** Mutagenic characteristics and contribution of polycyclic aromatic hydrocarbons to mutagenicity of concentrates from municipal river water by blue chitin column. *Journal of Health Science*. 2002. 48(3), stránky 232-241.
11. **Nkansah, M.A., a další.** The use of lightweight expanded clay aggregate (LECA) as sorbent for PAHs removal from water. *Journal of Hazardous Materials*. 2012. 217-218, stránky 360-365.

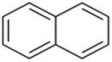


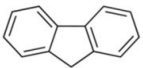

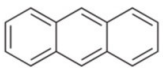
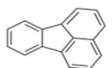

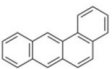
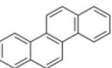

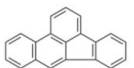
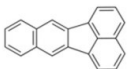
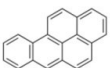
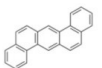

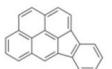
12. **ČESKÁ REPUBLIKA.** Vyhláška č. 83/2014 Sb., kterou se mění vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody, ve znění pozdějších předpisů. *Sbírka zákonů*. [Online] částka 34, 2014. [Citace: 30. 3 2015.] http://www.mzcr.cz/Legislativa/dokumenty/vyhlaska-c83/2004-sb-kterou-se-meni-vyhlaska-c252/2004-sb-kterou-se-stand_9091_2439_11.html.
13. **ČESKÁ REPUBLIKA.** Nařízení vlády č. 61/2003 Sb. o ukazatelích a hodnotách přípustného znečištění povrchových vod a odpadních vod, náležitostech povolení k vypouštění odpadních vod do vod povrchových a kanalizací a o citlivých oblastech. [Online] 2003. [Citace: 30. 03 2015.] [http://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/pripustne_znecisten_i_vod_narizeni/\\$FILE/OOV-NV_61_2003-20110610.pdf](http://www.mzp.cz/C1257458002F0DC7/cz/pripustne_znecisten_i_vod_narizeni/$FILE/OOV-NV_61_2003-20110610.pdf).
14. **Ministerstvo životního prostředí České republiky.** Věstník Ministerstva životního prostředí. [Online] 1996. [Citace: 30. 03 2015.] http://www.inisoft.cz/public/upload/attachments/k-strankam/legislativni-prirucka/metodicke-pokyny/prehled_legislativy.pdf.
15. **Nováková, L. a Douša, M. a kol.** *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.* Praha : Lucie Nováková, Michal Douša, 2013.
16. **Council of Europe.** Chromatographic separation techniques. *European Pharmacopoeia 5.0.* 2004. 2, stránky 69-73.
17. **Vella, J., a další.** A simple HPLC–UV method for the determination of ciprofloxacin in human plasma. *Journal of Chromatography B.* 2015. 989, stránky 80-85.
18. **Vinci, G., Antonelli, M.L. a Preti, R.** Rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in rainwater by liquid-liquid microextraction and LC with core-shell particles column and fluorescence detection. *J. Sep. Sci.* 2013, 36, stránky 461-468.
19. **Ramirez, C.E., Wang, C. a Gardinali, P.R.** Fully automated trace level determination of parent and alkylated PAHs in environmental waters by online SPE-LC-APPI-MS/MS. *Anal Bioanal Chem.* 2014. 406, stránky 329-344.
20. **Nováková, L. a Douša, M. a kol.** *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II.* Praha : Lucie Nováková, Michal Douša, 2013.
21. **AOAC INTERNATIONAL.** AOAC Official Methods of Analysis. *Guidelines for Standard Method Performance Requirements Appendix F.* [Online] 2012. [Citace: 15. 07 2015.] http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf.
22. **INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENT FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE.** Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1) . *ICH Harmonised of Tripartite Guideline.*

23. **U. S. Department of Health and Human Services; Food and Drug Administration; Center for Drug Evaluation and Research; Center for Veterinary Medicine.** Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. [Online] 2001. [Citace: 07. 04 2015.] <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf>.
24. **García-Falcón, M.S., Cancho-Grande, B. a Simal-Gándara, J.** Stirring bar sorptive extraction in the determination of PAHs in drinking waters. *Water Research*. 2004. 38(7), stránky 1679-1684.
25. **Robles-Molina, J., a další.** Comparative evaluation of liquid–liquid extraction, solid-phase extraction and solid-phase microextraction for the gas chromatography–mass spectrometry determination of multiclass priority organic contaminants in wastewater. *Talanta*. 2013, 117, stránky 382-391.
26. **Jánská, M., a další.** Appraisal of “classic” and “novel” extraction procedure efficiencies for the isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives from biotic matrices. *Analytica Chimica Acta*. 2004. 520, stránky 93-103.
27. **Šťastná, S.** Možnosti stanovení atrazinu ve vodách. Bakalářská práce. Zlín : Univerzita Tomáše Bati, Fakulta technologická, 2012.
28. **Pluhařová, L.** Využití extrakce přehřátou vodou při analýze různých matric. Bakalářská práce. Pardubice : Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, 2012.
29. **Dasgupta, S., a další.** Extraction of pesticides, dioxin-like PCBs and PAHs in water based commodities using liquid–liquid microextraction and analysis by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2011. 1218(38), stránky 6780-6791.
30. **Tseng, W.C., Chen, P.S. a Huang, S.D.** Optimization of two different dispersive liquid–liquid microextraction methods followed by gas chromatography–mass spectrometry determination for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) analysis in water. *Talanta*. 2014. 120, stránky 425-432.
31. **Pérez, S. a Barceló, D.** Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage reference sludge by liquid chromatography-atmospheric-pressure-chemical-ionization mass spectrometry. *Chromatographia*. 2001. 53, stránky 475-480.
32. **Hubka, T.** Extrakce významných metabolitů vznikajících biologickým rozkladem oxyethylenovaných 4-nonylfenolů z vody magneticky modifikovanými sorbenty. Disertační práce. Česká Skalice : Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, 2008.
33. **Kayali-Sayadi, M. N., a další.** Determination of PAHs in purified waste water by SPE clean-up and HPLC with fluorimetric detection. *Química Analítica*. 1997, 16, stránky 153-157.
34. **Nirmaier, H.-P., a další.** Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples using high-performance liquid chromatography with amperometric detection. *Journal of Chromatography A*. 1996, 730, stránky 169-175.

35. **Moret, S., a další.** Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water and water-based alcoholic beverages. *Z Lebensm Unters Forsch.* 1995, 201, stránky 322-326.
36. **Cheng, X., Forsythe, J. a Peterkin, E.** Some factors affecting SPME analysis and PAHs in Philadelphia's urban waterways. *Water Research.* 2013. 47(7), stránky 2331-2340.
37. **Brown, J.N. a Peake, B.M.** Determination of colloiddally-associated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in fresh water using C₁₈ solid phase extraction disks. *Analytica Chimica Acta.* 2003. 486(2), stránky 159-169.
38. **Rosáková, K.** Příprava optimalizovaných magnetických adsorbentů pro separaci cílových analytů. Diplomová práce. Olomouc : Univerzita Palackého, Přírodovědecká fakulta, 2011.
39. **Sakamoto, H., a další.** Evaluation of blue-chitin column, blue-rayon hanging, and XAD-resin column techniques for concentrating mutagens from two Japanese rivers. *Mutation Research.* 1996. 371, stránky 79-85.
40. **Ren, H., a další.** Continuous surface seawater surveillance on poly aromatic hydrocarbons (PAHs) and mutagenicity of East and South China Seas. *Estuarine, Coastal and Shelf Science.* 2010, 86, stránky 395-400.
41. **Kira, S., a další.** Improved blue rayon hanging technique that can measure a time-weighted average concentration of benzo(a)pyrene in sea water. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology.* 1997. 59, stránky 941-947.
42. **Chang, Y.C. a Chen, D.H.** Preparation and adsorption properties of monodisperse chitosan-bound Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for removal of Cu (II) ions. *Journal of Colloid and Interface Science.* 2005. 283, stránky 446-451.
43. **Šafařík, I.** Removal of organic polycyclic compounds from water solution with a magnetic chitosan based sorbent bearing copper phthalocyanine dye. *Water Research.* 1995. 29, stránky 101-105.
44. **Šafařík, I. a Šafaříková, M.** Detection of low concentrations of malachite green and crystal violet in water. *Water Research.* 2002. 36, stránky 196-200.
45. **Šafaříková, M. a Šafařík, I.** Magnetic solid-phase extraction. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials.* 1999, 194, stránky 108-112.
46. **Andrade-Eiroa, A., Diévert, P. a Dagaut, P.** Improved optimization of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) mixtures resolutions in reversed-phase high-performance liquid chromatography by using factorial design and response surface methodology. *Talanta.* 2010. 81, stránky 265-274.

6 Přílohy

Příloha 1: Seznam 16 prioritních polyaromatických uhlovodíků dle U.S. EPA s vnitřním standardem.

POLYAROMATICKÉ UHLOVODÍKY				
Analyt	Vzorec		M _r [g/mol]	CAS
	Strukturní	Sumární		
Naftalen		C ₁₀ H ₈	128,17	91-20-3
Acenaftylen		C ₁₂ H ₈	152,19	208-96-8
Acenaften		C ₁₂ H ₁₀	154,21	83-32-9
Fluoren		C ₁₃ H ₁₀	166,22	86-73-7
Fenantren		C ₁₄ H ₁₀	178,23	85-01-8
Antracen		C ₁₄ H ₁₀	178,23	120-12-7
Fluoranthen		C ₁₆ H ₁₀	202,25	206-44-0
Pyren		C ₁₆ H ₁₀	202,25	129-00-0
Benzo[a]antracen		C ₁₈ H ₁₂	228,29	56-55-3
Chrysen		C ₁₈ H ₁₂	228,29	218-01-9
Vnitřní standard		C ₂₆ H ₁₈	330,42	1499-10-1
Benzo[b]fluoranthen		C ₂₀ H ₁₂	252,31	205-99-2
Benzo[k]fluoranthen		C ₂₀ H ₁₂	252,31	207-08-9
Benzo[a]pyren		C ₂₀ H ₁₂	252,31	50-32-8
Dibenzo[a,h]antracen		C ₂₂ H ₁₄	278,35	53-70-3
Benzo[g,h,i]perylen		C ₂₂ H ₁₂	276,33	191-24-2
Indeno[1,2,3-c,d]pyren		C ₂₂ H ₁₂	276,33	193-39-5