

Analytická chemie životního prostředí

podzimní semestr, 2017/2018

Anton Kočan



Centrum pro výzkum
toxických látek
v prostředí



Národní centrum
pro perzistentní
organické polutanty



MŠMT
MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY

Učební osnova

1. Úvod

Význam analytické chemie při kontrole znečištění životního prostředí. Zdroje a transport polutantů v prostředí. Rozptyl, degradace a akumulace polutantů v prostředí, perzistence a biokoncentrace. Specifické problémy environmentální analýzy, obecné schéma analytického postupu.

2. Vzorkování

Kvalita vzorku, jeho velikost a počet, strategie odběru, vzorkovací plán, odběrový protokol, konzervace, transport a skladování vzorků. Techniky odběru vzorků ovzduší, aktivní a pasivní vzorkovače, atmosférická depozice, odběr srážkových, povrchových, podzemních vod, odběry tuhých vzorků, půd, odpadů, sedimentů, bioty, krmiv, potravin, biologických materiálů.

3. Zpracování vzorků

Úprava vzorku před analýzou, extrakce tuhých vzorků pomocí rozpouštědel, extrakce vodných vzorků (kapalinou, plynem, na tuhou fázi), analýza rovnovážné plynné fáze.

Čištění a frakcionace vzorku (kolonová kapalinová chromatografie, gelová permeační chromatografie)

4. Techniky analytického stanovení

Chromatografické techniky, jejich princip, instrumentace, využití, interpretace dat.

HPLC, GC, výběr kolon, fází, detektorů, GC-MS

5. Postupy stanovení významných polutantů ve složkách životního prostředí

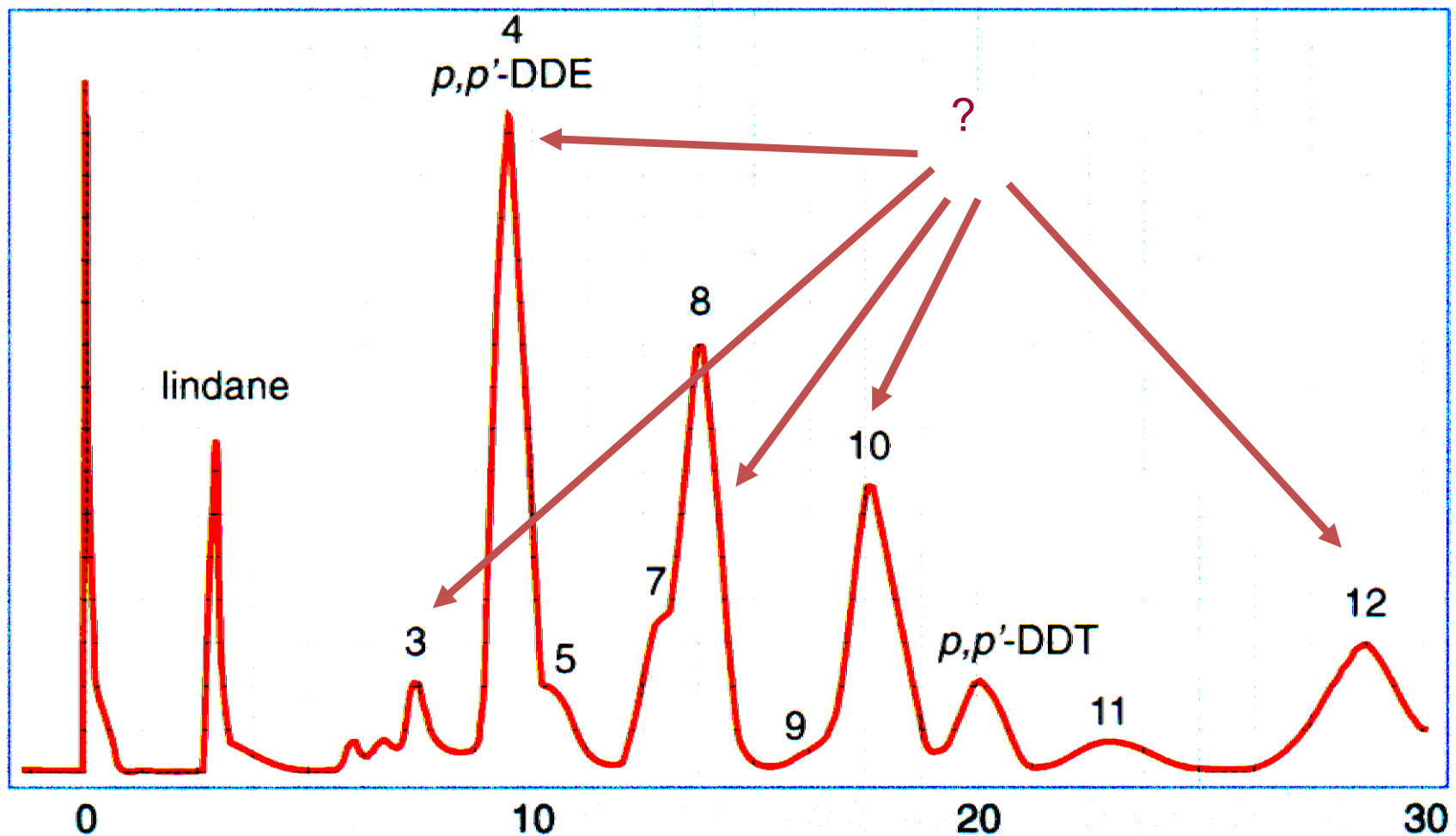
Prioritní polutanty, nové typy sledovaných polutantů, vlastnosti PCBs, PCDDs/Fs, PAHs, pesticidů, fenolů a chlorfenolů a jejich stanovení ve vzorcích ovzduší, vody, půd, sedimentů, bioty (homogenizace, extrakce, rozklad kyselinou, odstranění lipidů a interferentů, frakcionace, zakoncentrování, GC-ECD, GC-MS, HPLC).

6. Kvalita dat, základy QA/QC a GLP

Kalibrace, její rozsah a linearita. Citlivost metody, mez detekce a mez stanovitelnosti. Přesnost, správnost, shodnost analytických dat, reprodukovatelnost a opakovatelnost. Výťažnost metody, referenční a certifikované materiály, obohacené a slepé vzorky, regulační diagramy. Mezilaboratorní srovnávací testy. Základy GLP, validace a verifikace metod, dokumentace, plány, standardní operační postupy, protokoly, uchování dat, akreditace.

História detekcie PCB v životnom prostredí (1)

- Začiatkom 60. rokov minulého storočia sa švédsky výskumník, Dr. Jensen pokúšal študovať hladiny DDT v ľudskej krvi. Pri prezeraní plynovochromatografických záznamov pozoroval záhadnú skupinu chemických látok.



História detekcie PCB v životnom prostredí (2)

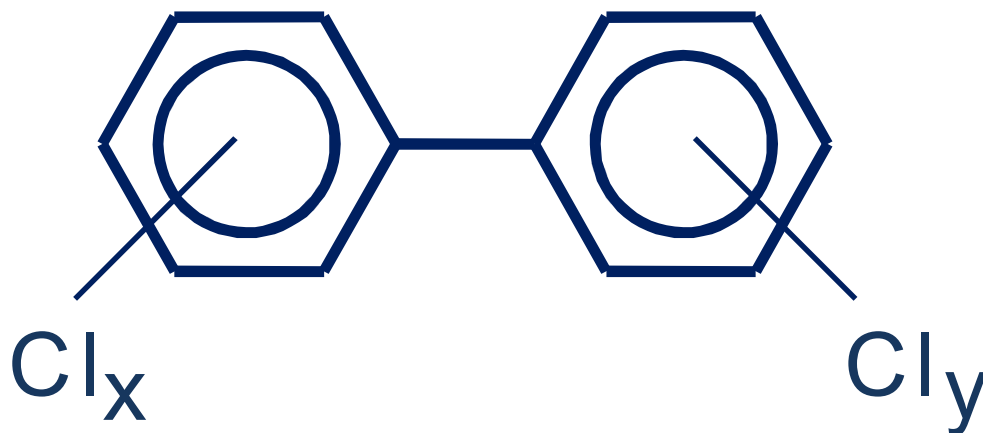
- Tieto zlúčeniny boli prítomné vo všetkých vzorkách, takže si nebol istý, či ide o prírodné alebo syntetické látky.**
- Po 2 rokoch skúmania zistil, že tieto látky obsahujú chlór a chemicky sa podobajú DDT.**
- Jensen zistil, že to nie sú pesticídy, pretože ich pozoroval aj v múzejných vzorkách pochádzajúcich z r. 1935, kedy sa ešte organochlórové pesticídy nepoužívali.**

História detekcie PCB v životnom prostredí (3)

- Zistil, že vzorky pochádzajúce zo Švédska a okolitých morí tiež obsahovali tieto látky. Dokonca vzorky vlasov jeho ženy a 3 detí obsahovali stopové množstvá. Najvyššie hladiny však pozoroval u svojej dcéry, ktorá bola ešte dojčená.**
- V tomto momente Jensen nebol schopný sa pohnúť ďalej. Bez použitia referenčných štandardov neumožňovala plynová chromatografia s klasickými detektormi identifikovať „nové“ zlúčeniny.**

História detekcie PCB v životnom prostredí (4)

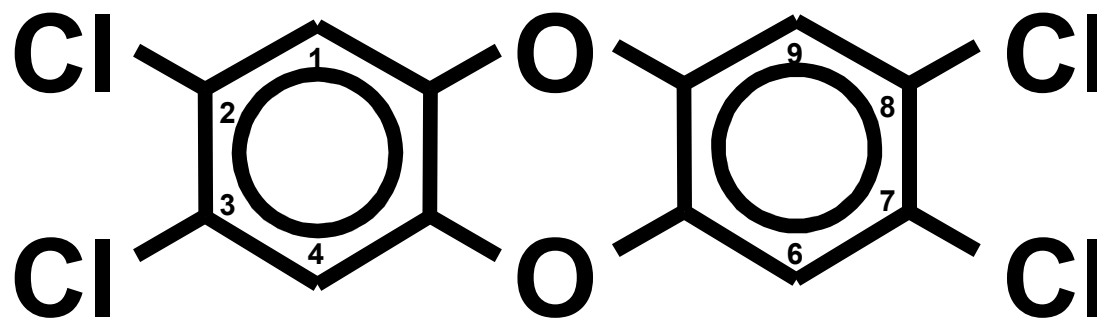
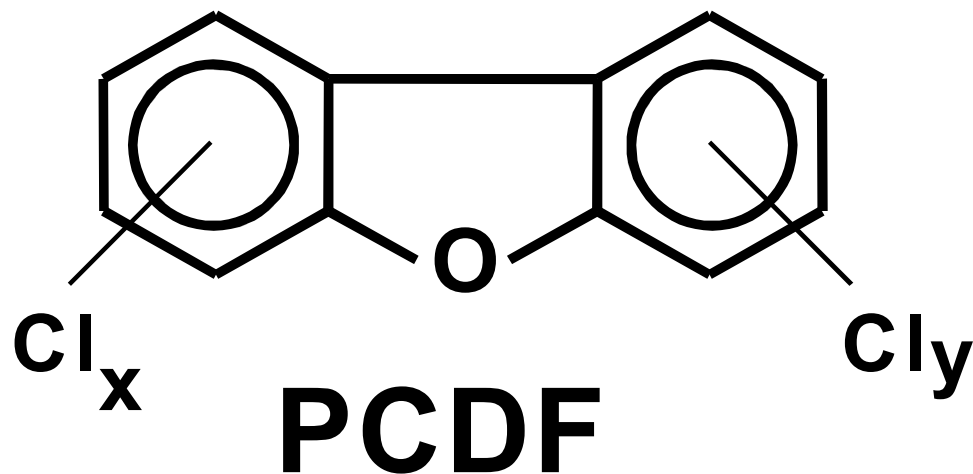
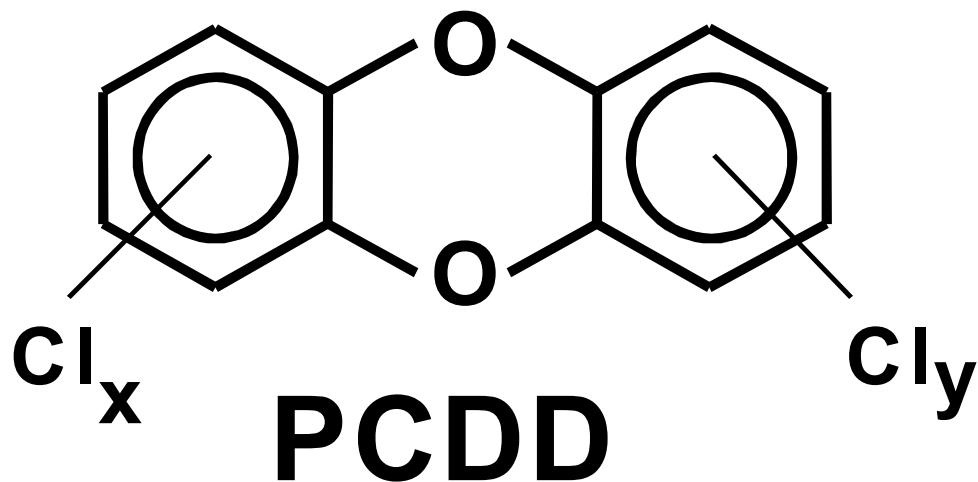
- Pretože obsah DDT a neznámych zlúčenín prítomných vo vzorke tuku z orla bol veľmi vysoký, Jensen využil hmotnostnú spektrometriu na identifikáciu, hoci v tom čase to nebol veľmi citlivý detektor pre plynovú chromatografiu. Získané hmotnostné spektrá ukázali, že tieto neznáme zlúčeniny sú polychlórované bifenyly (PCB).



<https://www.youtube.com/watch?v=NKiIM6WJZfQ>

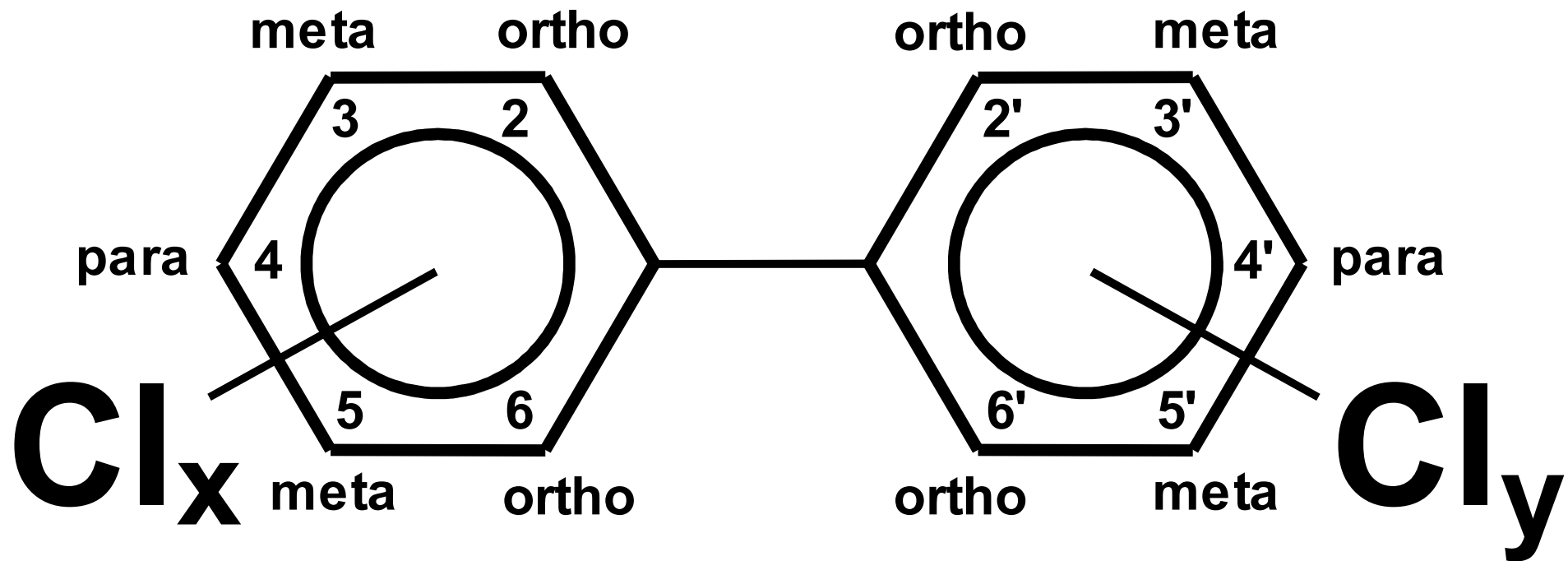
5:00 – 7:00 min

Polychlórované dibenzo-*p*-dioxíny a dibenzofurány



2,3,7,8-TCDD

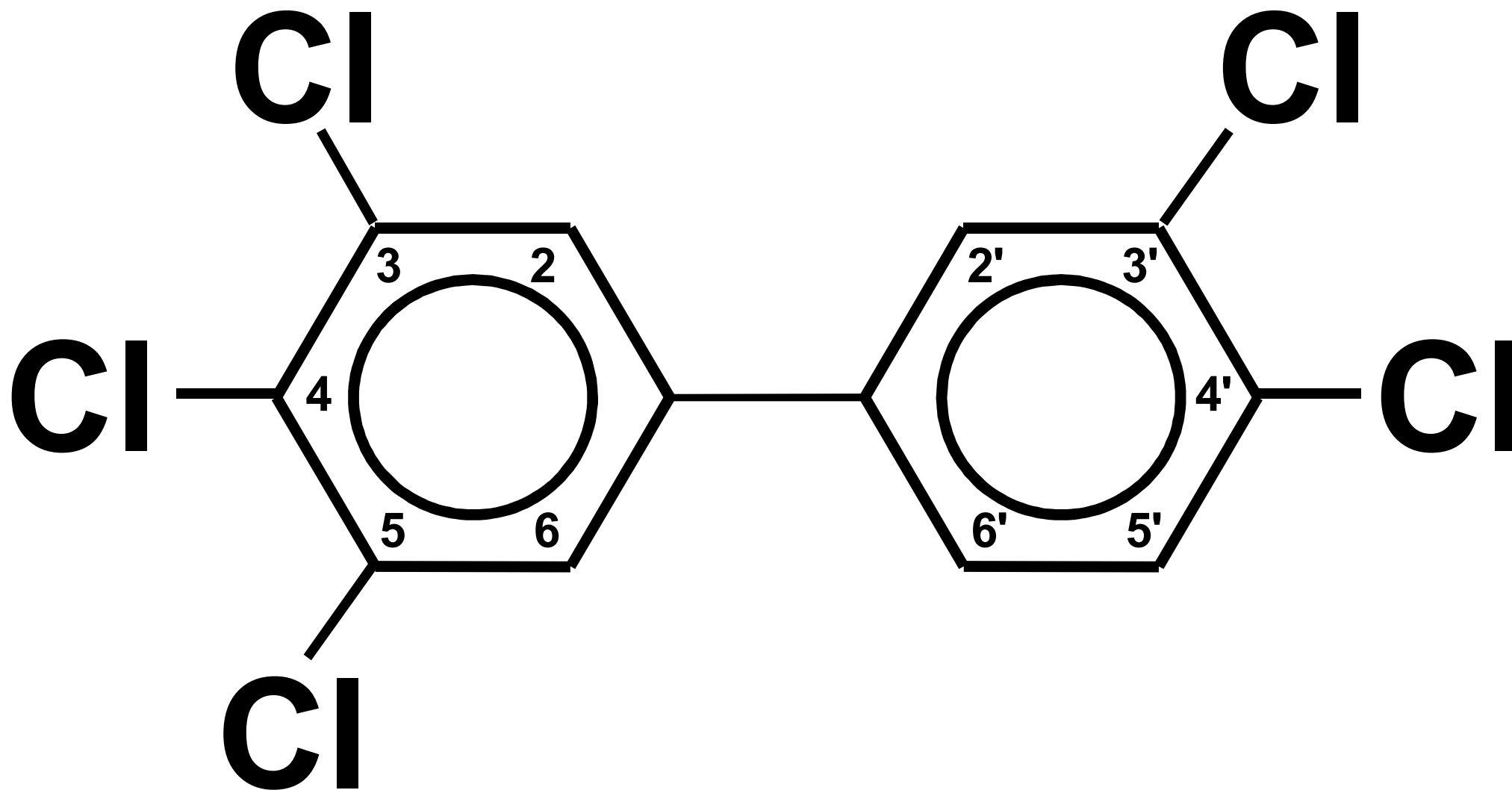
Zovšeobecnený vzorec PCB



$x = 1$ až 5 $y = 0$ až 5

3,3',4,4',5-pentachlórbifenyl (PCB-126)

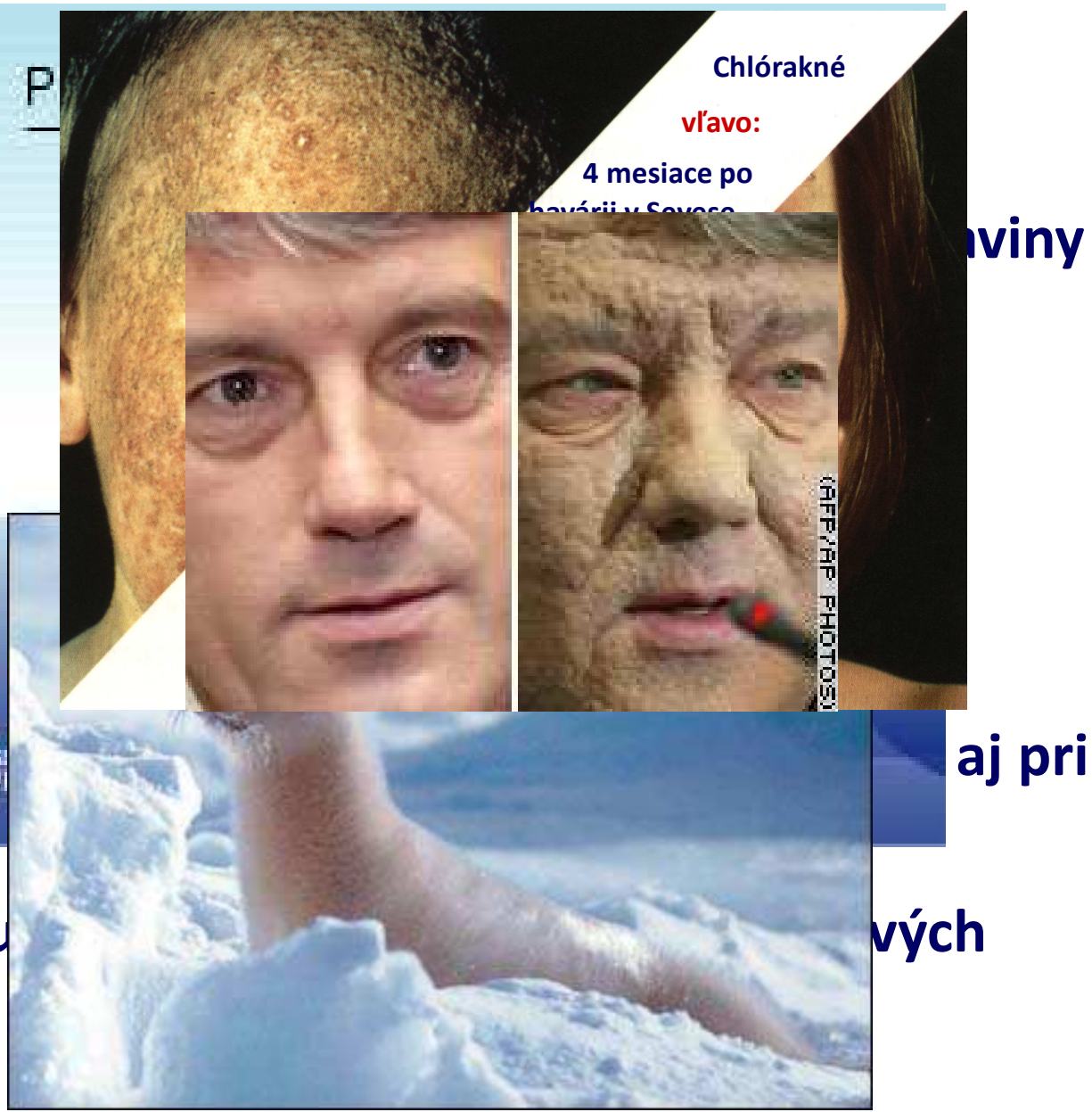
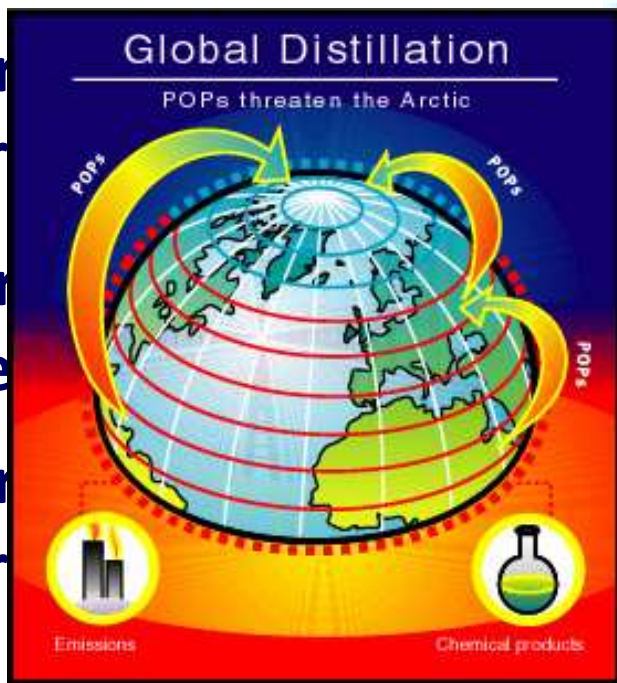
(kongenér s najvyššou dioxínovou toxicitou)



Čo sú to perziste

- Organické látky kontaminujú životné organizmy; Prenikajú do veľmi vzdialených oblastí.

- Organické látky kontaminujú životné organizmy; Prenikajú do veľmi vzdialených oblastí.
- Organické látky kontaminujú životné organizmy; Prenikajú do veľmi vzdialených oblastí.
- Organické látky kontaminujú životné organizmy; Prenikajú do veľmi vzdialených oblastí.



Čo je dioxínová toxicita?

- Látky s dioxínovou toxicitou majú spoločnú vlastnosť, že sa viažu na vnútrobunkový aryl-hydrokarbónový receptor (AhR) a aktivujú ho.

- Tento komplex sa pohybuje smerom k bunkovému jadru a viaže sa na špecifickú sekvenciu DNA, tzv. dioxínový odozvoový element (DRE).

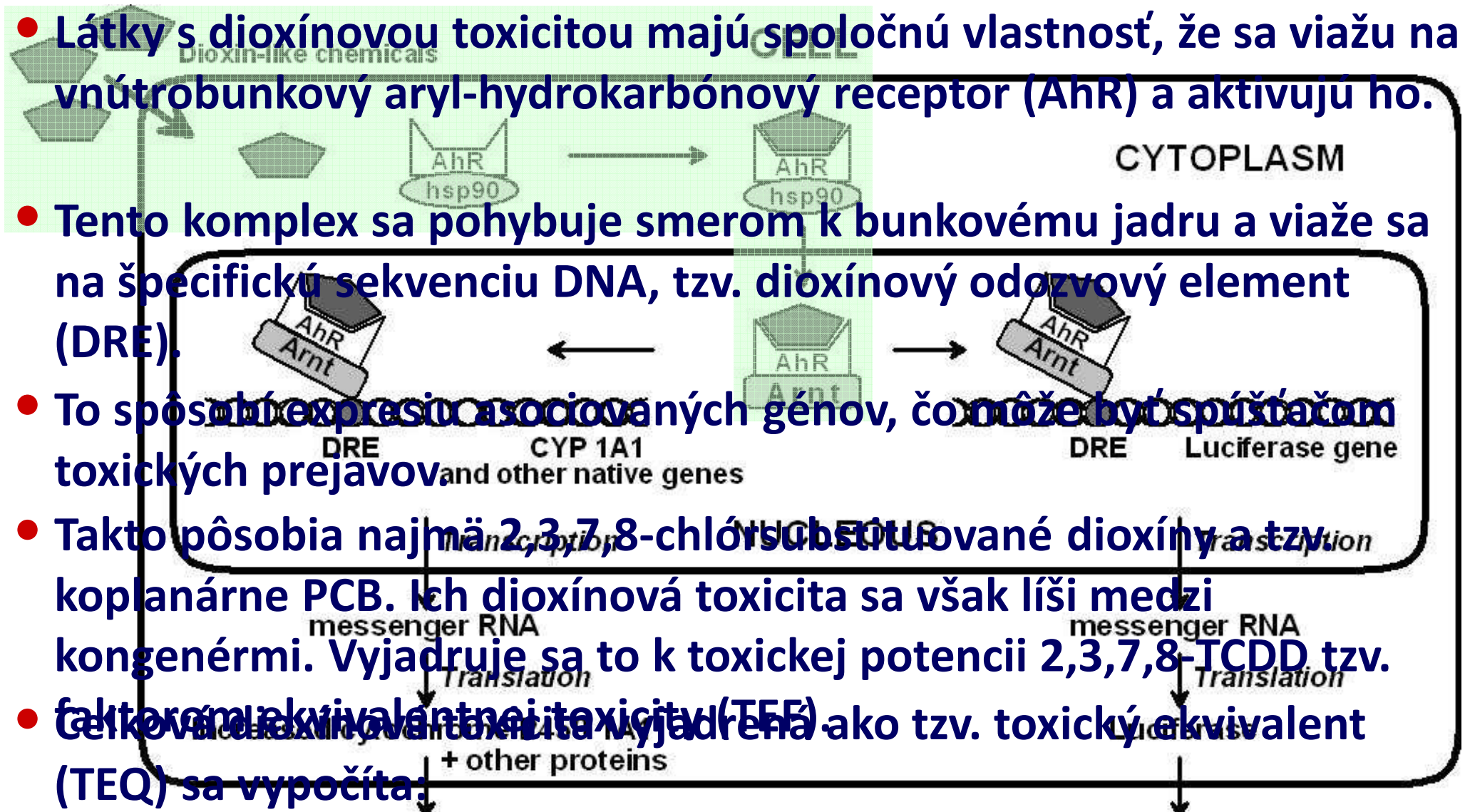
- To spôsobí expresiu asociovaných génov, čo môže byť spúšťačom toxických prejavov

- Takto pôsobia najmä 2,3,7,8-chlórsubstituované dioxíny a tzv. koplanárne PCB. Ich dioxínová toxicita sa však líši medzi kongenérmi. Vyjadruje sa to k toxickej potencii 2,3,7,8-TCDD tzv.

- faktorom ekvivalentnej toxicity (TEF) ako tzv. toxický ekvivalent (TEQ) sa vypočíta:

$$TEQ = \sum_{i=1}^7 [PCDD_i] \times TEF_i + \sum_{i=1}^{10} [PCDF_i] \times TEF_i + \sum_{i=1}^{12} [PCB_i] \times TEF_i$$

Mode of action: native cell BDS' CALUX® cell



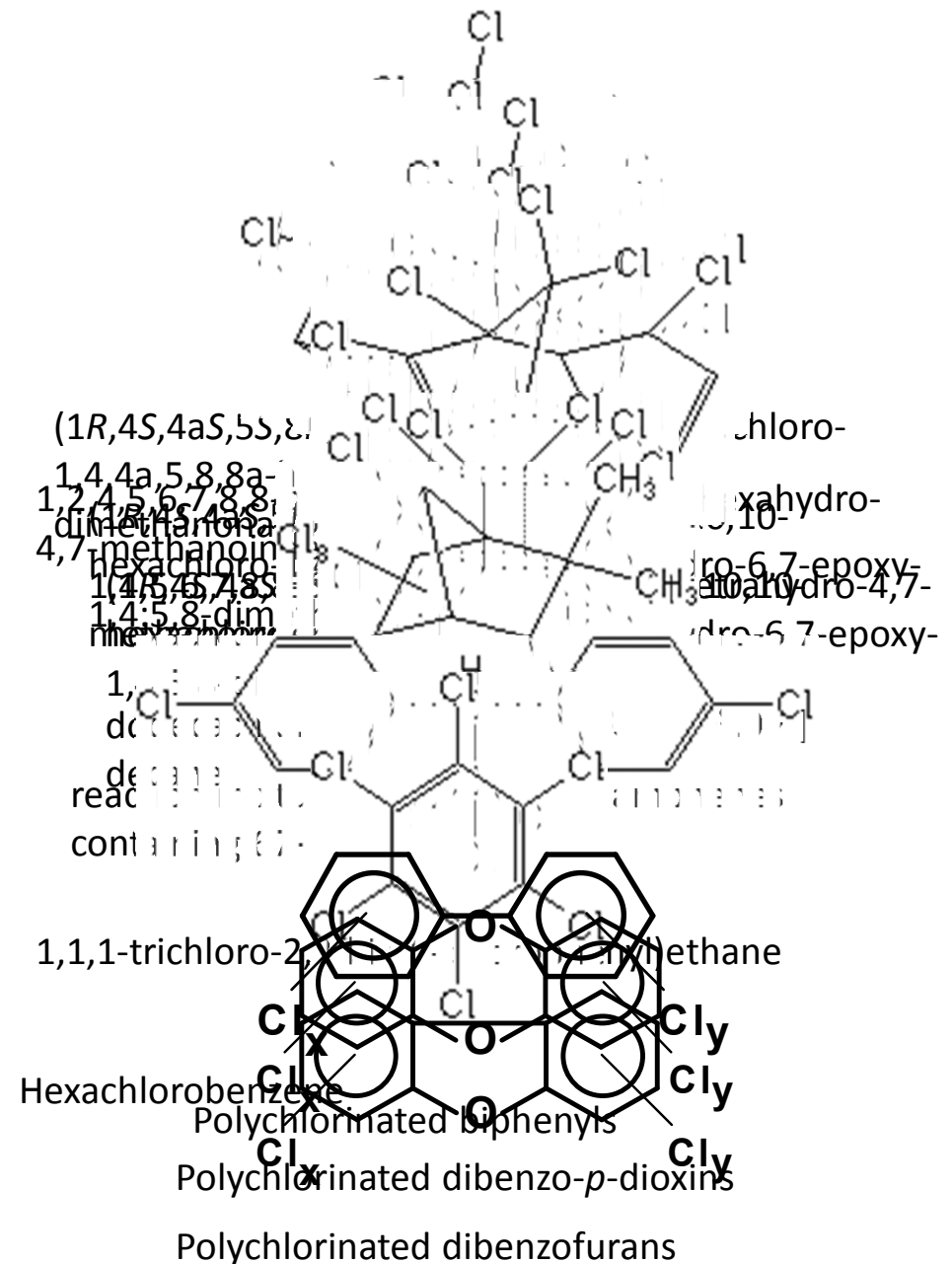
Štokholmský dohovor o POPs

(do konca r. 2017 k dohovoru pristúpilo 181 štátov a ratifikovalo 152 štátov)

- **Cieľom dohovoru je chrániť ľudské zdravie a životné prostredie pred perzistentnými organickými polutantmi s konečným cieľom ich úplnej eliminácie.**
- **Obvyklým spôsobom ako hodnotiť účinnosť dohovoru je sledovať (monitorovať koncentrácie POPs uvedených v dohovore vo vybraných maticiach.**

Pôvodných 12 POPs zahrnutých v ŠD:

1. Aldrin
2. Chlórdan
3. Dieldrin
4. Endrin
5. Heptachlór
6. Mirex
7. Toxafén
8. DDT
9. HCB
10. PCBs
11. Dioxíny
12. Furány



Ďalšie POPs doplnené do Štokholmského dohovoru:

13. α -Hexachlórcyklohexán (HCH)
14. β -HCH
15. Chlórdekon
16. Hexabrómbifenyyl
17. Hexabrómcyklododekán (HBCD)
18. Hexabrómdifenyléter a heptaBDE (komerčný oktaBDE)
19. Hexachlórbutadién
20. Lindan (γ -HCH)
21. Pentachlórbenzén
22. Pentachlórfenol, jeho soli a estery
23. Perfluóroktánsulfónová kyselina (PFOA), jej soli a perfluóroktán-sulfonylfluorid (PFOS-F)
24. Polychlórované naftalény
25. Chlórované parafíny s krátkym reťazcom
26. Technický endosulfan a príbuzné izoméry
27. Tetrabrómdifenyléter a pentaBDE (komerčný pentaBDE)

Transport polutantov v prostredí

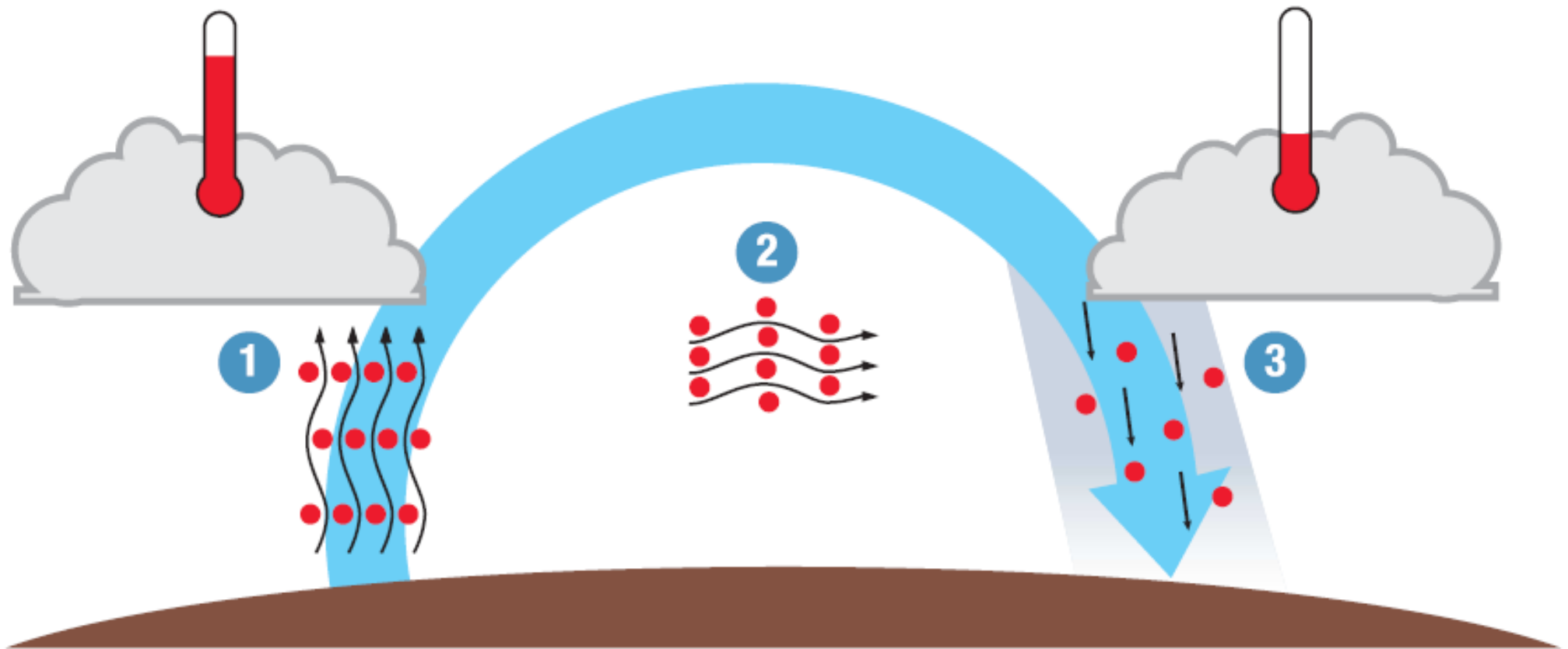
Zdroje znečistenia - bodové
- rozptýlené

Polutanty sú často veľmi toxické a nepodliehajú rýchlej degradácii
(sú perzistentné)

Dochádza k ich transportu a v závislosti na rozdeľovacom
koeficiente n-oktanol/voda (K_{ow}) k:

- **Biokoncentracii** – k príjmu a zadržaniu látky v organizme výlučne pobytom vodného živočícha vo vode (dýchaním, príp. prestupom cez kožu) a suchozemského živočícha dýchaním vzduchu
- **Bioobohacovaniu** – k zvyšovaniu koncentrácie látky príjmom potravy (predátory majú vyšší obsah polutantov než ich obeť)
- **Bioakumulácii** – k príjmu látky všetkými možnými spôsobmi, t.j. dýchaním, prestupom cez pokožku a konzumáciou potravy

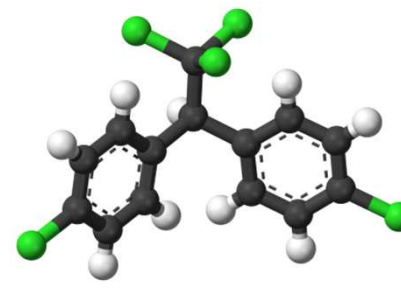
Prenos POPs-ov ovzduším



•••• POPs

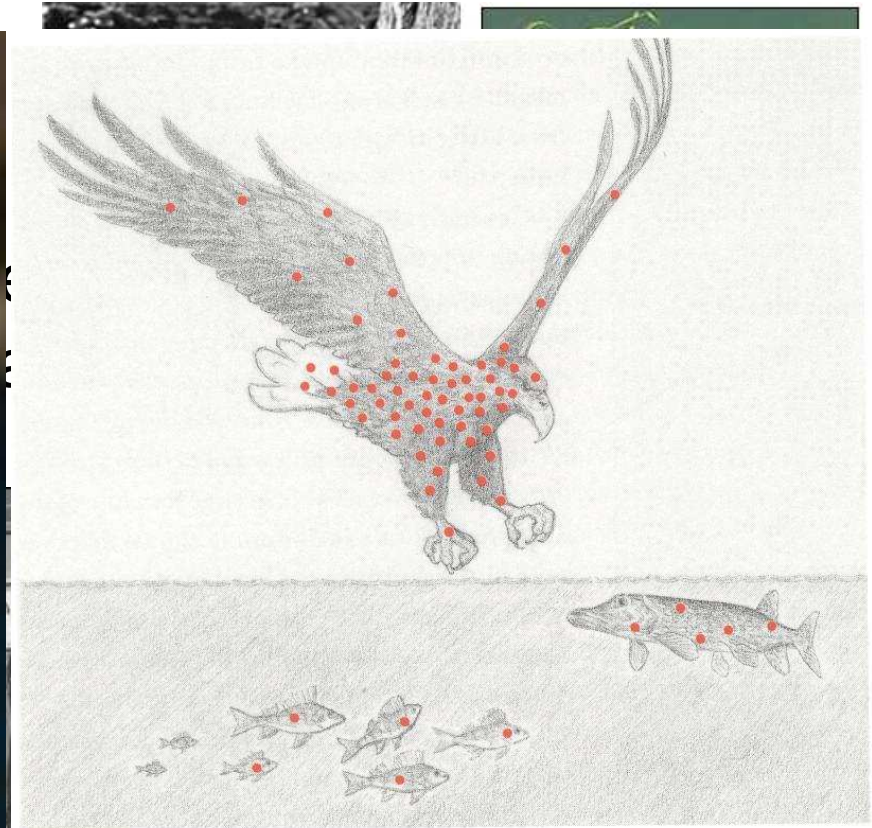
- 1 V teplých oblastiach sa POPs-y odparia
- 2 Odparené POPs-y sa prenášajú veternými prúdmi do chladnejších oblasti zemegule, napr. Arktídy
- 3 Nízka teplota spôsobí kondenzáciu POPs-ov a ich vypadávanie z ovzdušia na zemský povrch

138 rokov DDT



1,1,1-trichlór-2,2-
-bis(4-chlórphenyl)etán

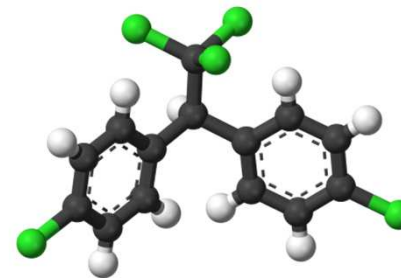
1874 Otmar Zeidler publikuje metódu chemickej syntézy DDT.



1967 Orol bielochvostý je vyhlásený za zranený vyhynutím v dôsledku otravy s DDT



138 rokov DDT



1,1,1-trichlór-2,2-
-bis(4-chlórphenyl)etán

1970. roky Zákaz používania DDT v mnohých štátoch, vrátane Československa.

2004 Štokholmský dohovor o POPs zakazuje výrobu a použitie DDT, okrem prípadov, keď je nevyhnutné chrániť zdravie ľudí pred chorobami prenášanými hmyzom (napr. malária komármi).

<https://www.youtube.com/watch?v=lpbc-6lvMQI>

<https://www.youtube.com/watch?v=gtcXXbuR244>

<https://www.youtube.com/watch?v=-UiCSvQvVys>

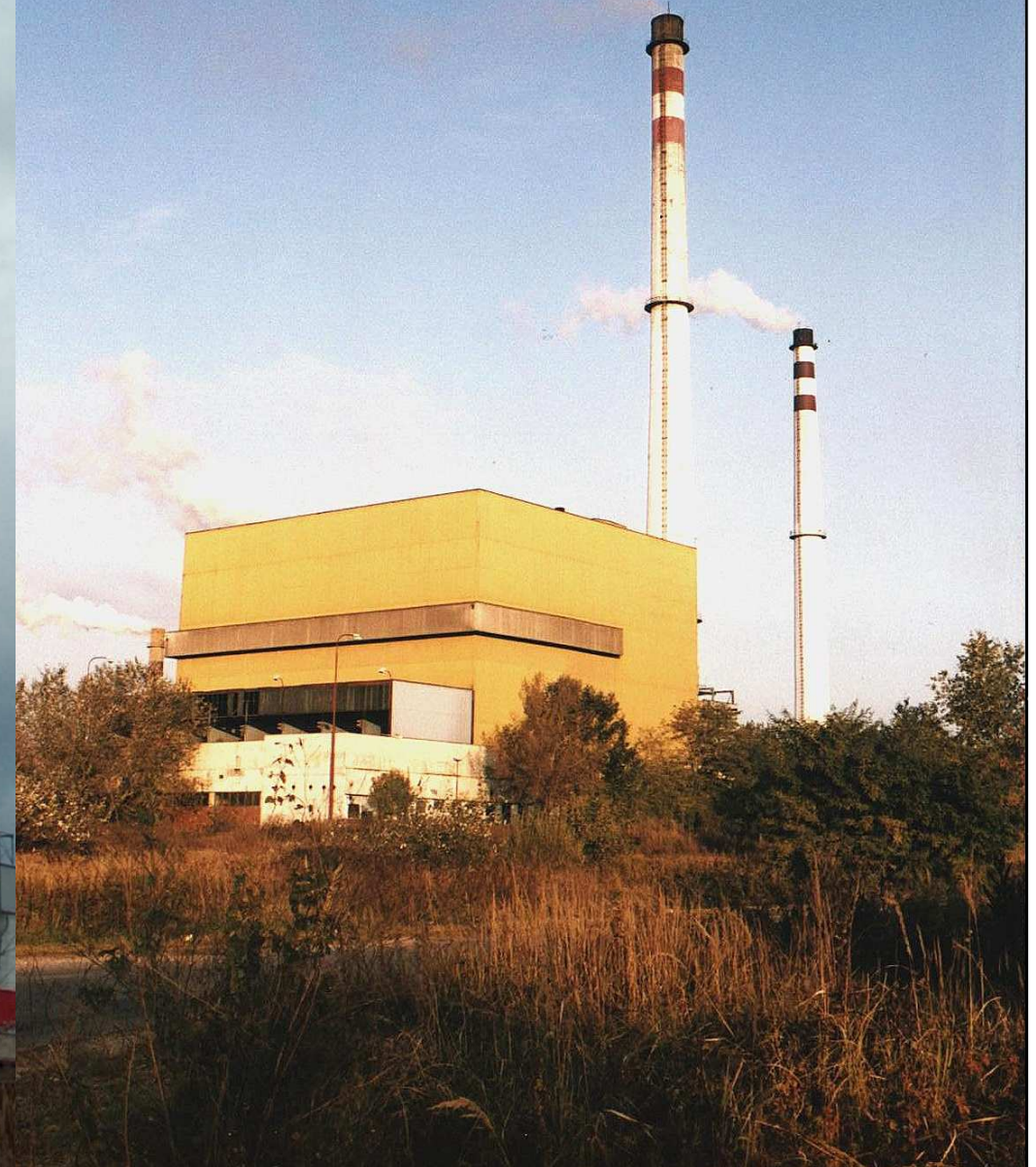
Spaľovňa tuhého komunálneho odpadu

Bratislava

po rekonštrukcii v 2004



Bratislava



Výroba železa a ocele v Košiciach



Spaľovanie záhradného a domového odpadu (zdroj PCDD/F a ďalších POPs)



Spaľovanie záhradného odpadu



Vypaľovanie trávnych porastov



**Elektrické
transformátory
(v minulosti plnené
PCB)**



Transformátor



VYSOKÉ NAPĚTÍ
ŽIVOTU NEBEZPEČNO!



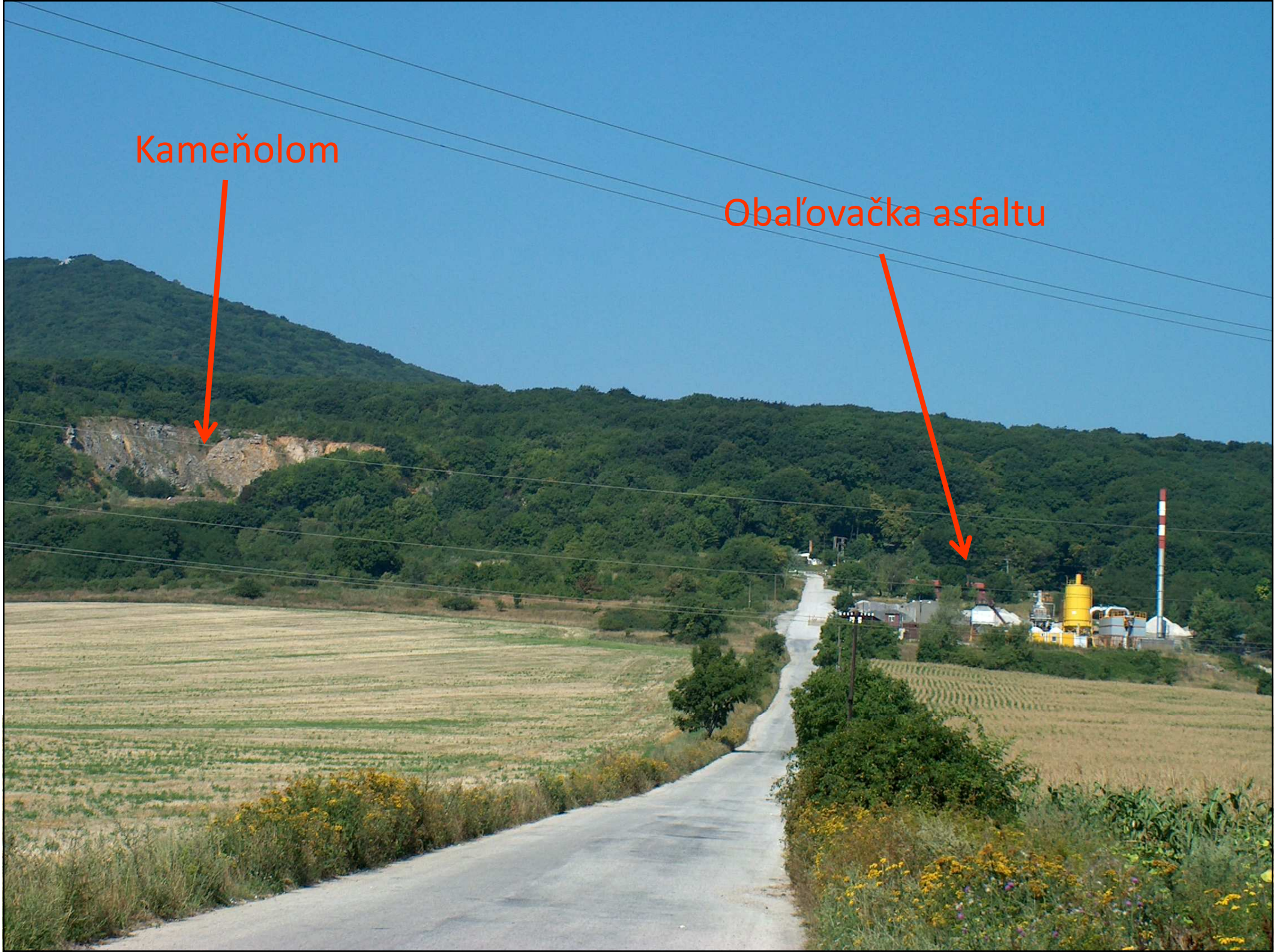
Silový kondenzátor
plnený PCB (náplň 5,2 kg Deloru 103)

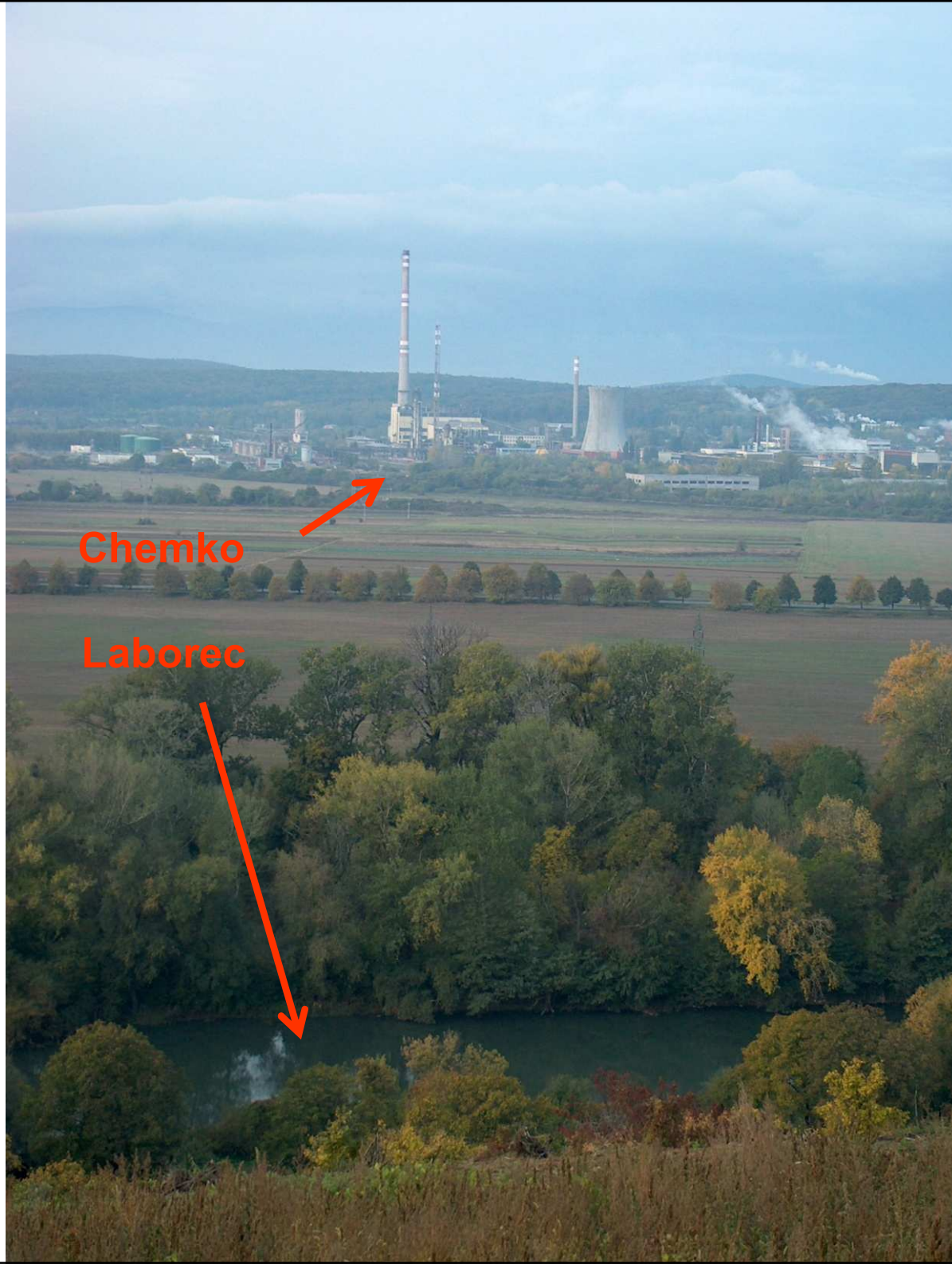


Kameňolom



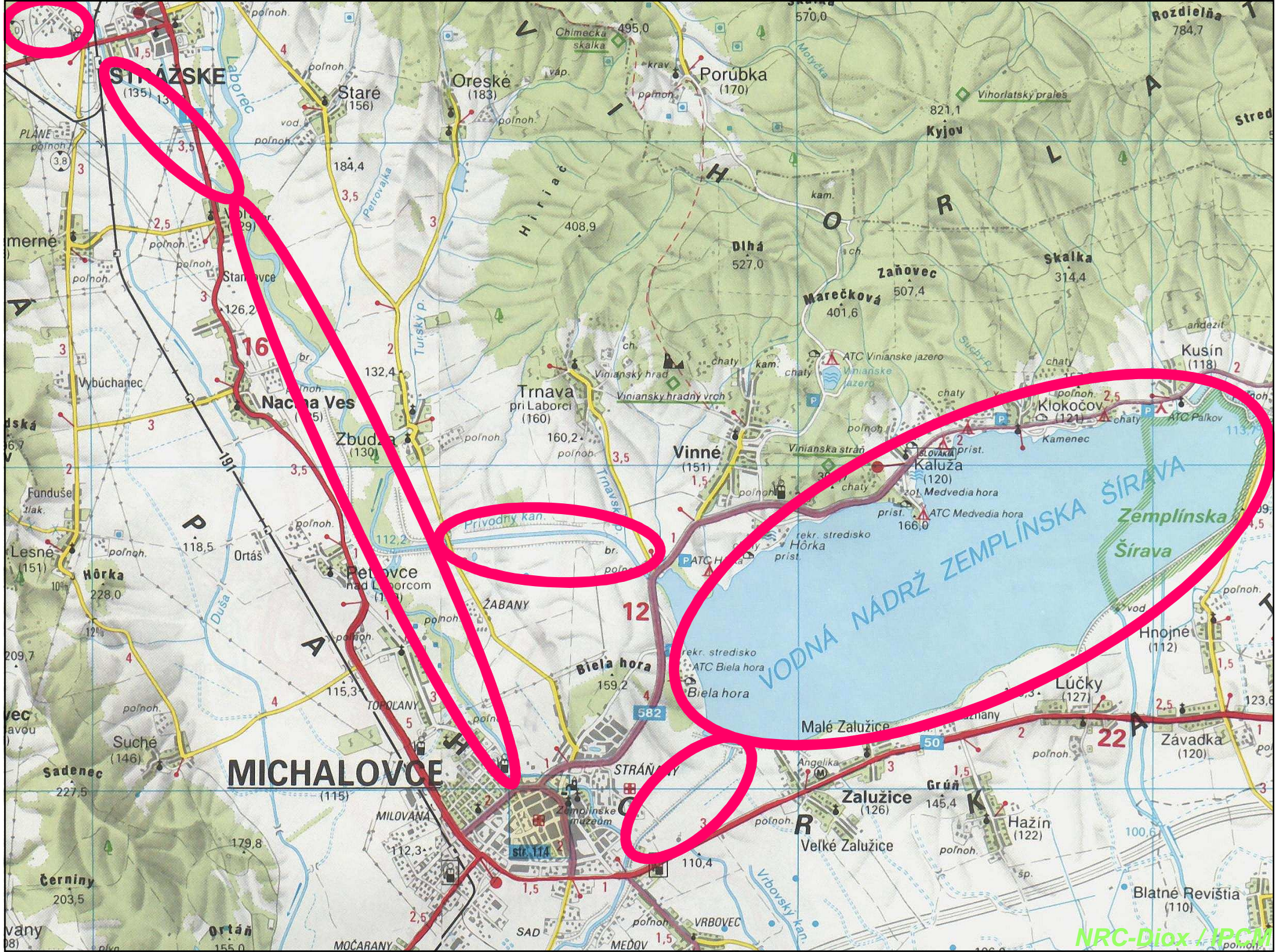
Obaľovačka asfaltu





Chemko

Laborec



Kroky kontroly chemického znečištění životního prostředí

- **definice problému**
- **monitorování s cílem určit rozsah problému**
- **nalezení optimálního postupu pro kontrolu znečištění**
- **vyhodnocení stavu a prognóza vývoje kontaminace**
- **odhad expozice a posouzení rizik pro člověka**
- **návrh opatření**
- **vytvoření legislativy pro účinnou kontrolu**
- **monitorování pro zjištění účinnosti opatření**

Specifické problémy environmentální analýzy

- **široký rozsah koncentrací i vlastností analytů**
- **monitorování na hladinách blízkých mezi detekce (stopové a ultrastopové koncentrace analytů, riziko chyb)**
- **riziko sekundární kontaminace**
- **nehomogenita vzorků**
- **nutnost aplikace složitých metod pro izolaci analytů z matrice**
- **omezená stabilita analytů a matric**
- **cena instrumentace, čistých chemikálií, standardů**

Obecné schéma analytického postupu

- **odběr vzorku**
 - konzervace
 - transport
 - skladování
- **příprava vzorku**
 - extrakce
 - přečištění, odstranění interferentů
 - frakcionace
 - zakoncentrování
 - derivatizace
- **analytické stanovení**
- **interpretace dat**

Monitoring

- **Dlouhodobé pravidelné sledování přesně určených ukazatelů, důsledně definovaných v prostoru a čase, v bodech, tvořících síť reprezentující daný region.**
- **Jeho cílem je sledování určitého jevu či parametru v přesně definovaných časových a prostorových podmínkách.**
- **Skládá se z pozorování a měření, z hodnocení existujícího stavu a prognózy do budoucnosti.**

Odběr vzorků

- **předchází výběr**
 - sledovaných látek
 - lokalit
 - frekvence, počtu vzorků
 - metod
- **důraz na kvalitu**
 - reprezentativnost
 - velikost
 - stabilitu
- **optimální poměr mezi cenou a hodnotou dat**

Zásady odběru vzorků

- **Kvalitní dokumentace (číslo, jméno vzorku, lokalita, datum, osoba, místní pozorování a měření, metody).**
- **Zachování požadované kvality (inertní kontejner, rychlý transport a analýza, zmražení vzorků).**

Odběry ovzduší

- **volné ovzduší** – **plynné látky** (napr. SO_x , NO_x , CO_x)
 - **těkavé látky** (např. freóny, benzén, CCl_4)
 - **semitěkavé látky** (napr. PAH, PCB, PCDD/F)
 - **pevné částice** (PM_{10} , $\text{PM}_{2,5}$, PM_1)
- **ovzduší v místnostech**
- **pracovní ovzduší**
- **emise**
- **imise**

Techniky odběru ovzduší

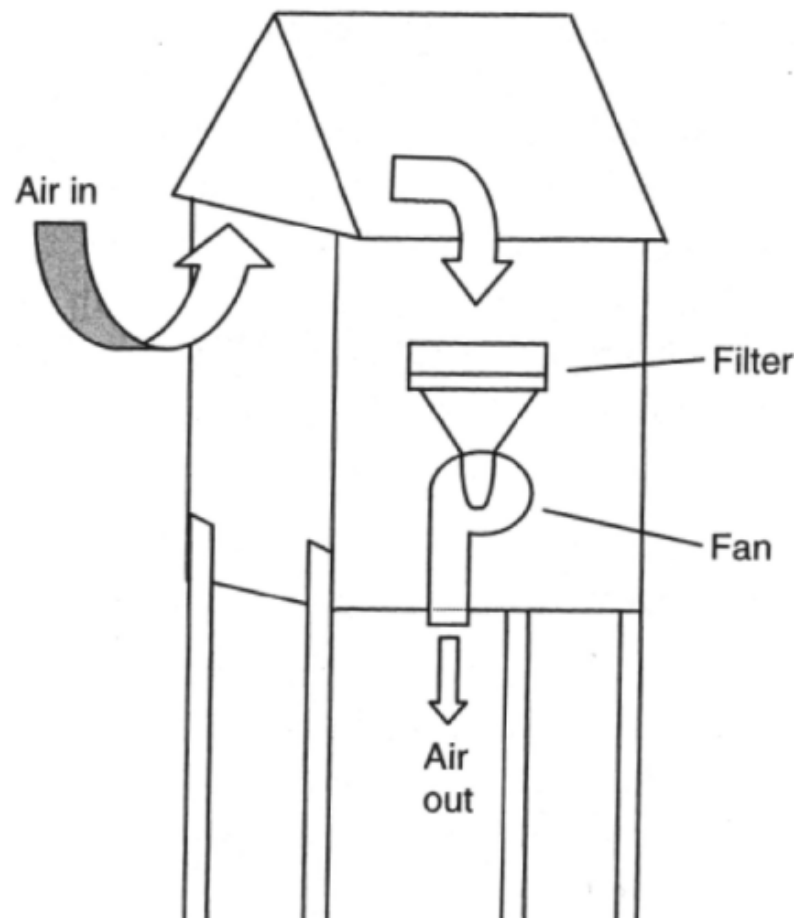
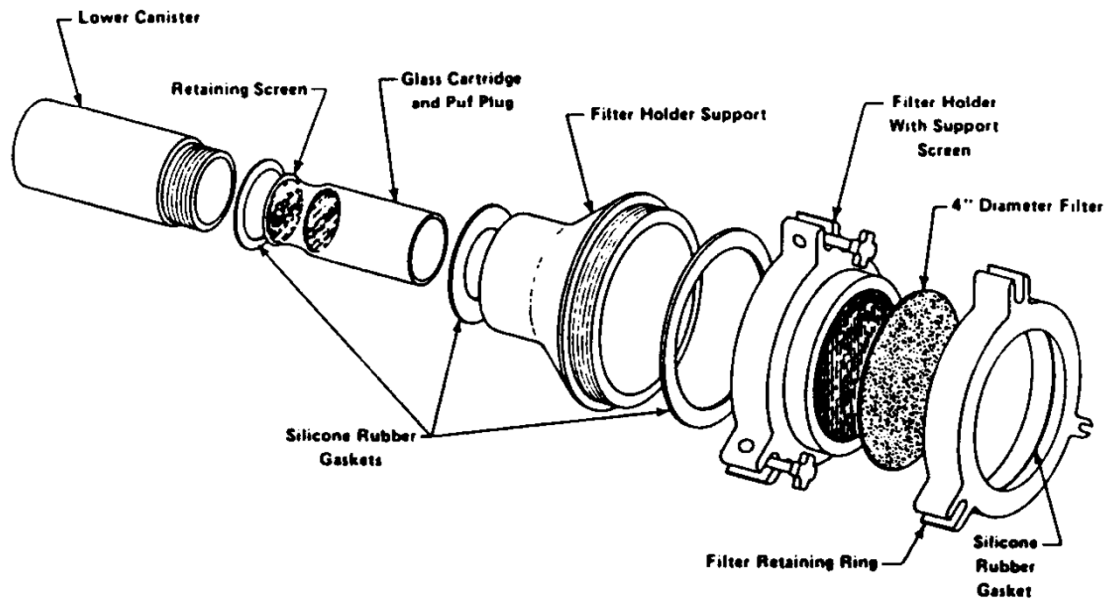
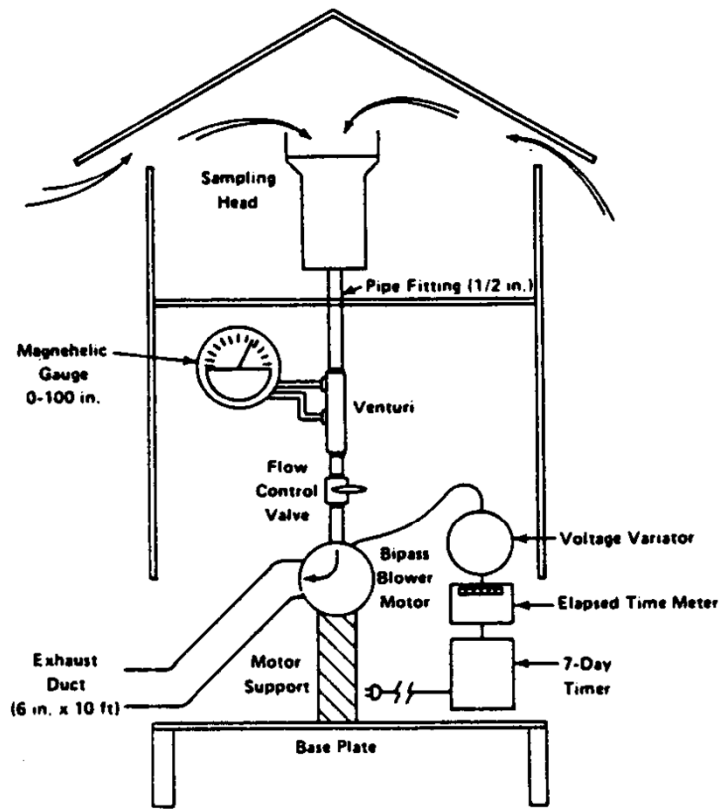
- záchyt plynů na sorbentech (detekční trubičky s aktivním uhlím, silikagelem, polymery, denudery - nezachycují aerosol)



Techniky odběru ovzduší

- **vzorkování pevných částic (vysokoobjemové vzorkovače, odběrové filtry křemenné a polyuretanové, vzorkování inhalovatelné frakce $< 10 \mu\text{m}$ (PM_{10}), resp. respirabilní frakce $< 2,5 \mu\text{m}$ ($\text{PM}_{2,5}$) a $< 1 \mu\text{m}$ (PM_1) - kaskádový a cyklónový impaktor, univerzální vzorkovač (VAPS)**

Vysokoobjemový vzorkovač pre POPs-y vo forme tuhých častíc a v plynnej fáze







Odber ovzdušia v obci pri U.S. Steel

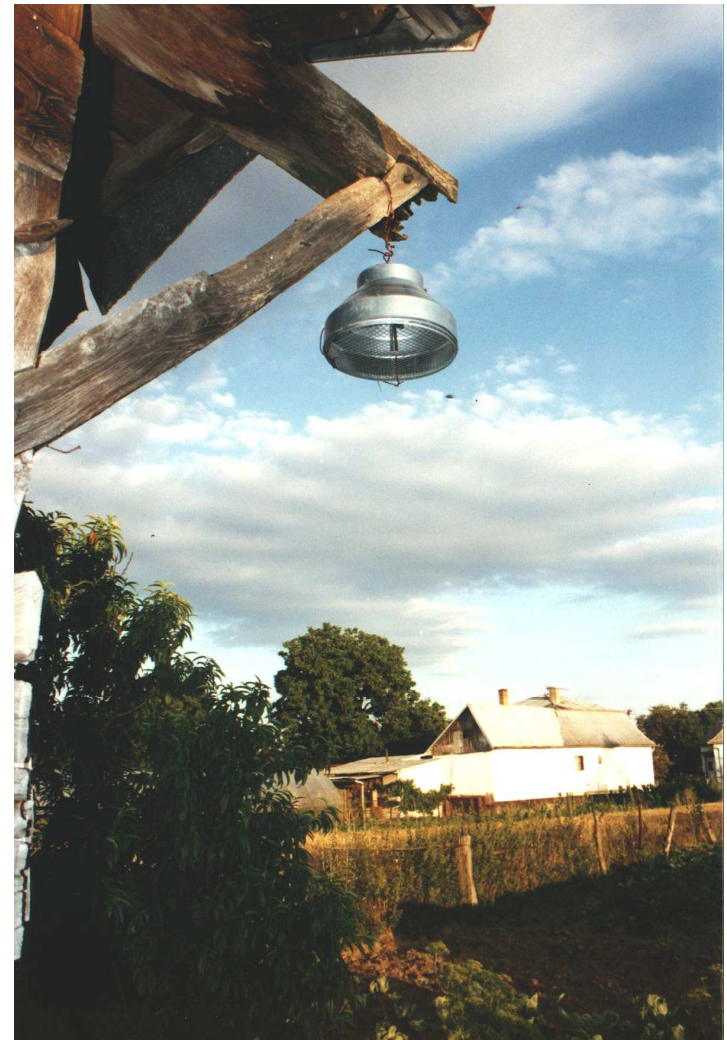
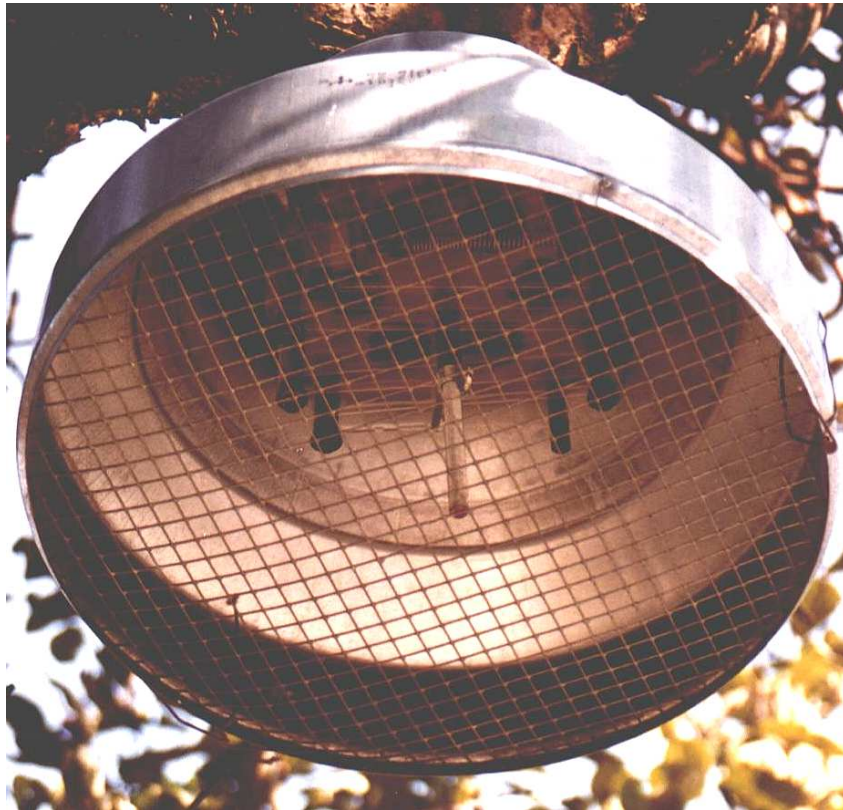
Meranie atmosferického tlaku, teploty vzduchu a smeru a rýchlosti vetra

Hi-Vol vzorkovač
GPS-1



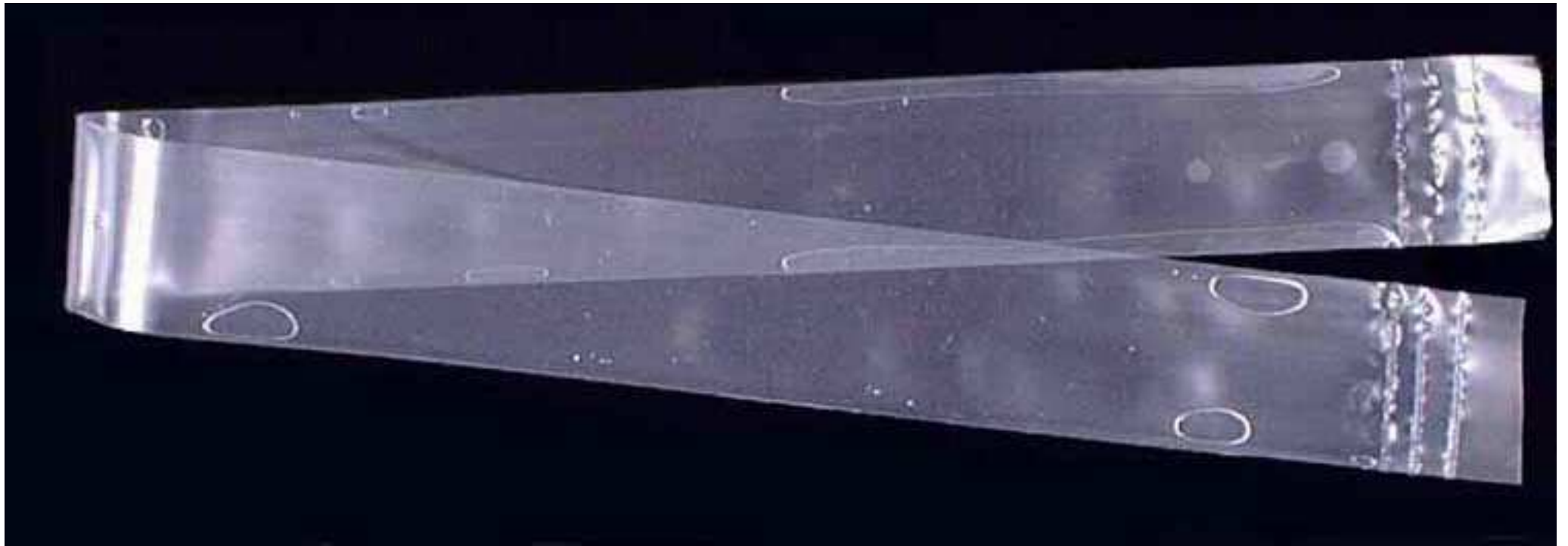
Techniky odběru ovzduší

- pasivní vzorkovače (náplň PUF, XAD živice, semipermeabilní membrána, extrakční disk EMPORE)

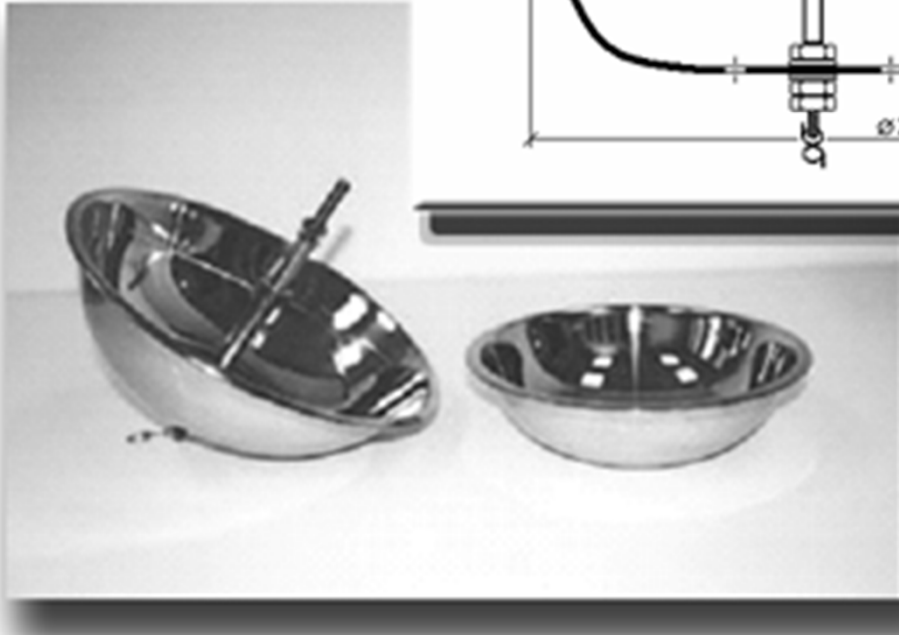
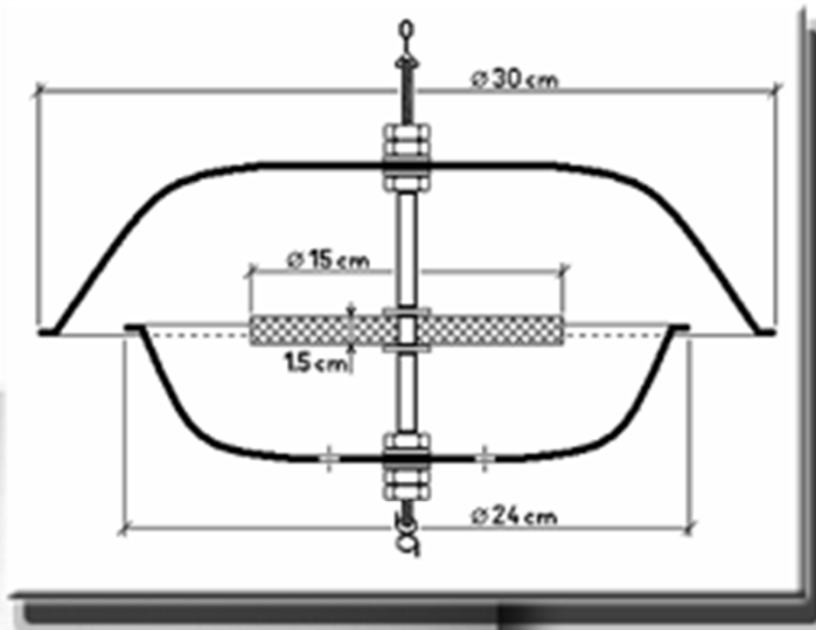


Semipermeabilná membrána

(vyrobená z polyetylénu o nízkej hustote, hrúbky 75 – 90 μm
obvykle tvar vrecúška o dĺžke 91 cm a šírke 2,5 cm
plneného 1 ml trioleínu)



Pasívne vzorkovače s polyuretánovou penou pre POPs-y



Atmosférická depozice

- mokrá (přenášena na zem srážkami, převládá v čistých oblastech)
- suchá (sedimentací velkých částic atmosférického prachu a vlivem znečišťujících plynů, převládá ve městech)

Odběr atmosférické depozice

- mokrá (odběr pouze srážek do automatických jímačů)
- suchá (funkce koncentrace složky v ovzduší a rychlosti depozice, sběrné nádoby)
- součet mokré a suché atmosférické depozice (sběrné nádoby, nálevky)

Vzorkování vod

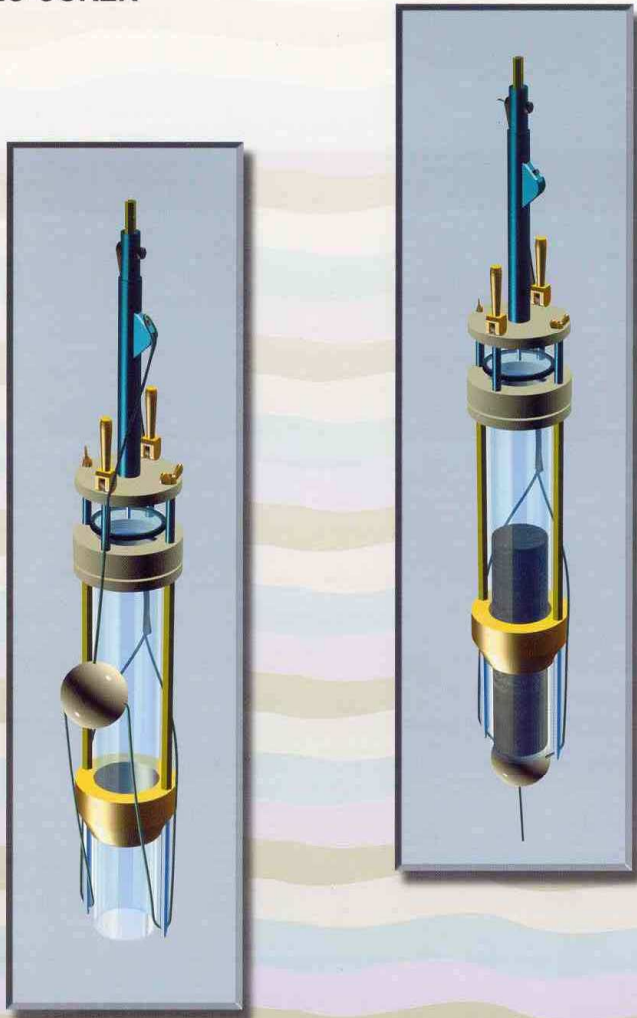
- **srážkové** – sběrné nádoby, nálevky
– pasivní jímače vody z ovzduší
- **povrchové** – skleněné vzorkovnice
- **podpovrchové** – skleněné vzorkovnice plněné čerpadlem

Vzorky vod jsou nestabilní, vytěkávají, precipitují, fotochemicky se rozkládají, mikrobiálně degradují, snadno se kontaminují.

Je třeba analyzovat co nejrychleji, konzervovat nebo sorbovat (přenos analytů na tuhý sorbent).

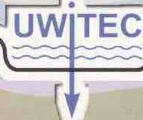
Vzorkovanie sedimentu

UWITEC CORER



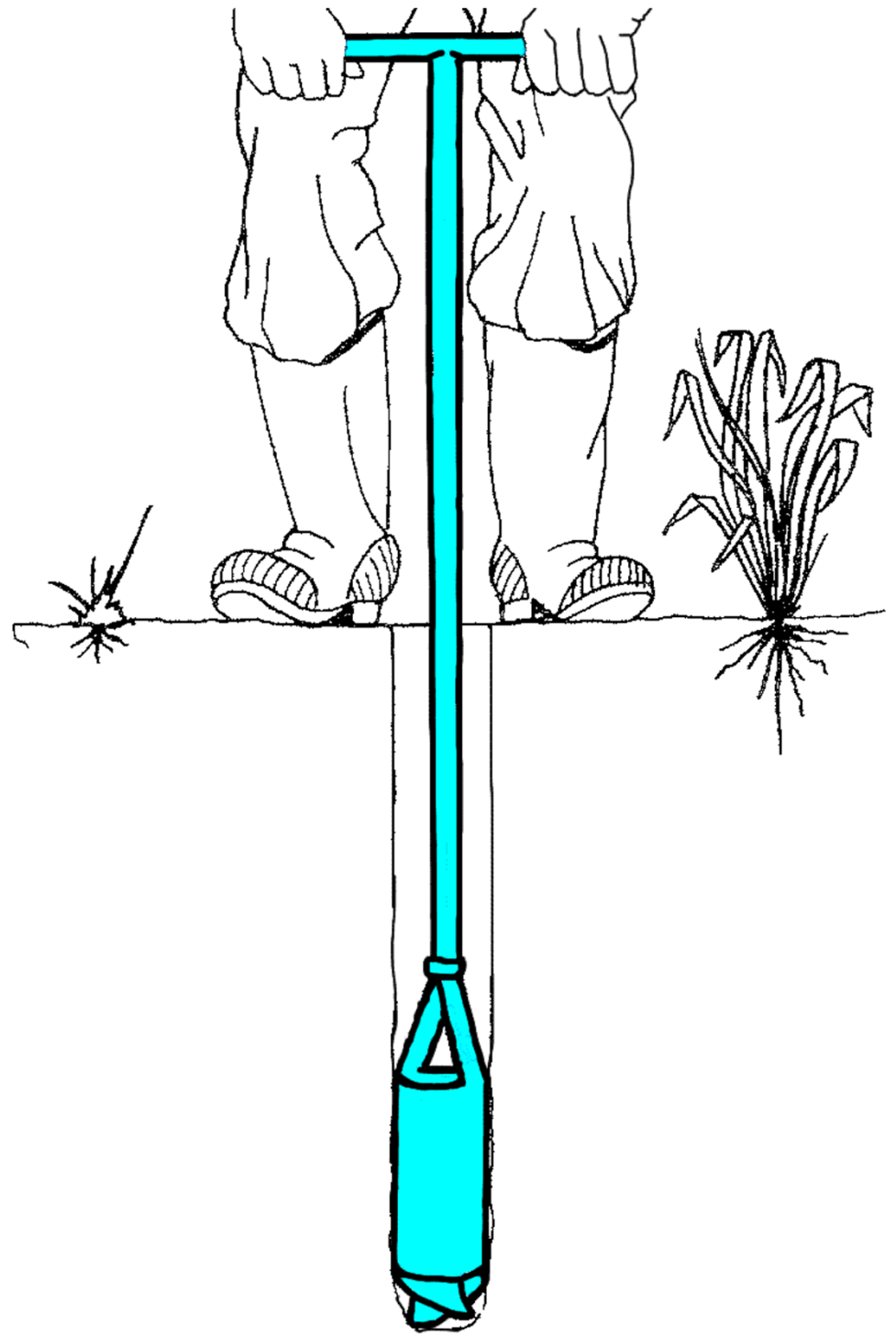
Umwelt und Wissenschaftstechnik

A-5310 Mondsee, Moosbachweg 10, Tel.: +43-6232-3946, Fax: 3946-30
E-Mail: uwitec@netway.at, Home Page: <http://www.uwitec.at>



Odběry vzorků půdy a tuhých odpadů

- **nejtěžší matrice na vzorkování**
- **heterogenní materiál, omezená migrace látek**
- **vliv biologické aktivity, srážek, hnojení**
- **používají se rýče, vrtáky, trubkové vzorkovače**
- **nejprve orientační vzorkování, údaje o heterogenitě**
- **pak odebíráme několik vzorků, které promícháme**
- **obvykle vzorkujeme do hloubky 15 – 20 cm (pokud se nezabýváme profilem)**

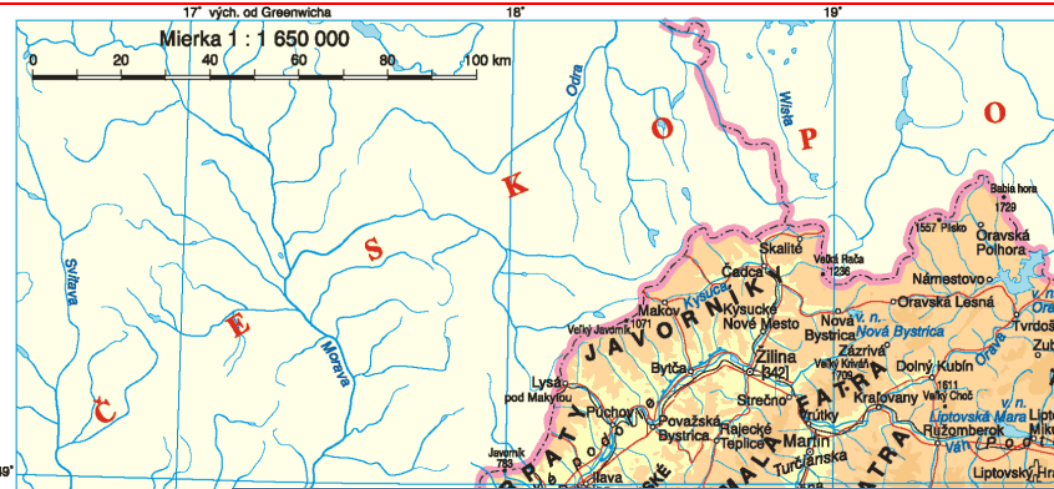








Sampling sites selecte



**Kovohuty
Krompachy**



Čo je ľudský biomonitoring (HBM)? (1)

- HBM je hodnotenie ľudskej expozície chemikáliám prítomným v ovzduší, vode, pôde, prachu, potravinách a/alebo ďalším environmentálnym médiám cestou merania týchto chemikálií a ich metabolitov prítomných v ľudských vzorkách ako sú krv, mlieko, moč, vlasy, sliny, stolica, tkanivá. Výsledok týchto meraní sa obvykle nazýva „zaťaženie organizmu“.
- HBM je nástroj, ktorý pomáha k lepšiemu pochopeniu ľudskej expozície environmentálnym chemikáliám, tak prírodným ako aj vyrobeným človekom.
- Ak sa HBM vykonáva na reprezentatívnej vzorke populácie, napr. detí alebo dospelých v určitej oblasti, HBM sa môže použiť na dokumentovanie či takáto podskupina bola exponovaná určitým chemikáliám a v akom rozsahu.

Čo je ľudský biomonitoring (HBM)? (2)

- HBM je vedecká technika na hodnotenie ľudskej expozície environmentálnym polutantom a ich účinkov založená na vzorkovaní a analýze jednotlivých tkanív a tekutín. Kým krv, moč, materské mlieko a vydýchnutý vzduch sa analyzujú najčastejšie, je možné sledovať aj vlasy, nechty, tuk, kosti a ďalšie tkanivá.
- HBM umožňuje zistiť, či environmentálne polutanty, ktoré prenikli do ľudského organizmu zanechali markery odzrkadľujúce túto expozíciu. Takýto marker môže byť samotný polutant alebo jeho rozkladný/metabolický produkt ale môže to tiež byť nejaká zmena v organizme spôsobená interakciou polutantu alebo jeho degradačných produktov, ako sú zmeny v hladinách určitých enzýmov alebo ďalších proteínov, čo môže viesť k zmenám normálnych telesných procesov.

HBM je využitelný na:

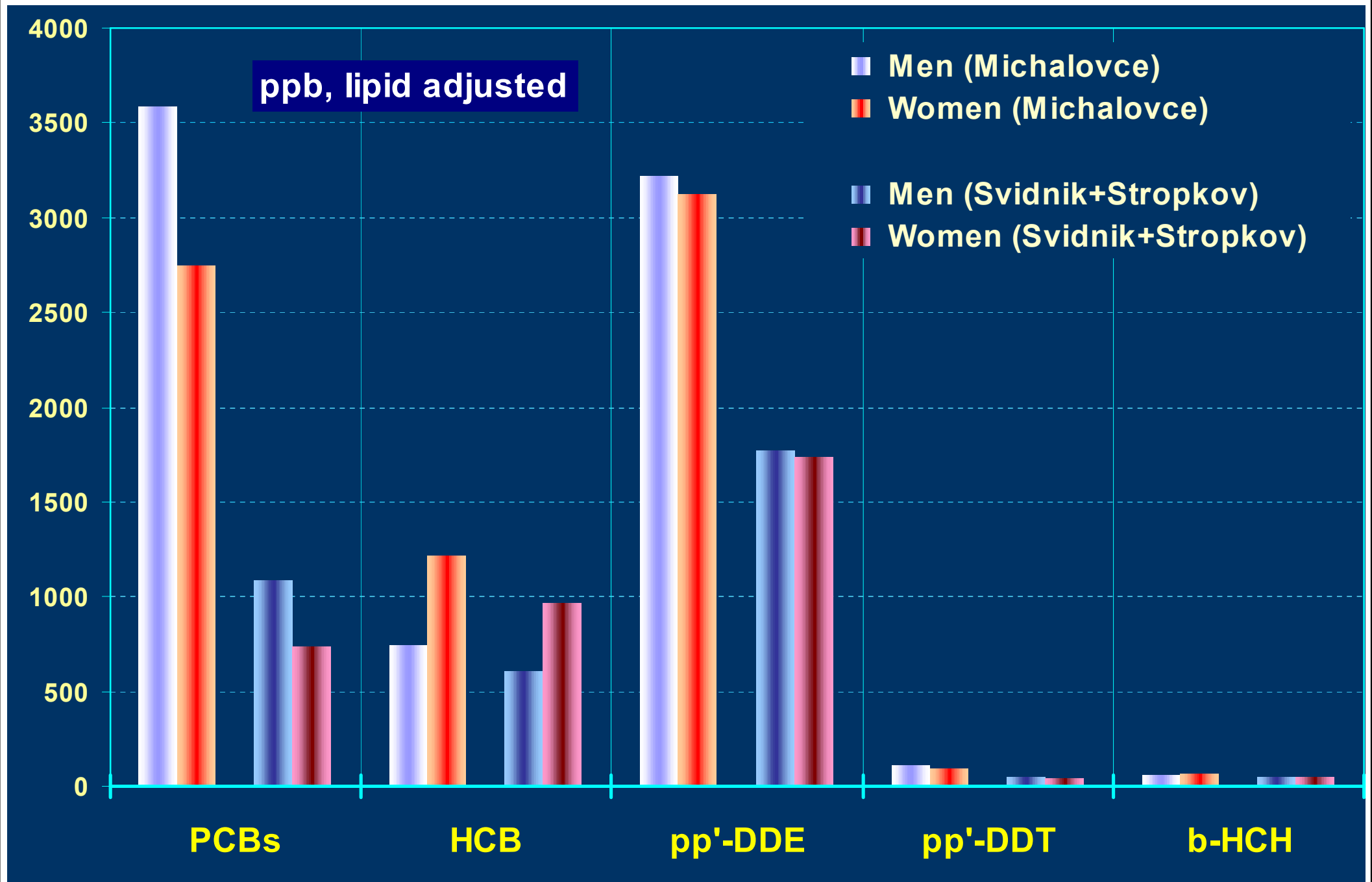
- posilnenie regulačných opatrení poskytnutím aktuálnych údajov o chemikáliách dostávajúcich sa do ľudskej populácie a v akej miere.
- zdokonalenie hodnotenia expozície.
- určenie východiskových hladín alebo referenčných rozsahov.
- napomáhanie právu ľudí vedieť aké chemikálie sa nachádzajú v ich telách.
- určenie priorít na riešenie environmentálnych problémov.

Niektoré faktory ovplyvňujúce HBM (1)

- **Tukovosť a zloženie materského mlieka sa dramaticky mení počas prvých týždňov po pôrode, čo tiež vedie ku kolísaniu hladín POPs. Aby sa potlačili tieto kolísania, odber vzoriek by sa mal realizovať v určitom čase, napr. 3 – 8 týždňov po pôrode a po dojčení, pretože obsah tuku je iný na začiatku dojčenia a iný na jeho konci.**
- **Ak sa odoberie iba málo vzoriek s úzkej skupiny populácie, môže to viesť k falošným predpokladom, že výsledky sú platné pre celú populáciu, napr. tak pre mužov ako aj ženy alebo pre rôzne vekové skupiny.**

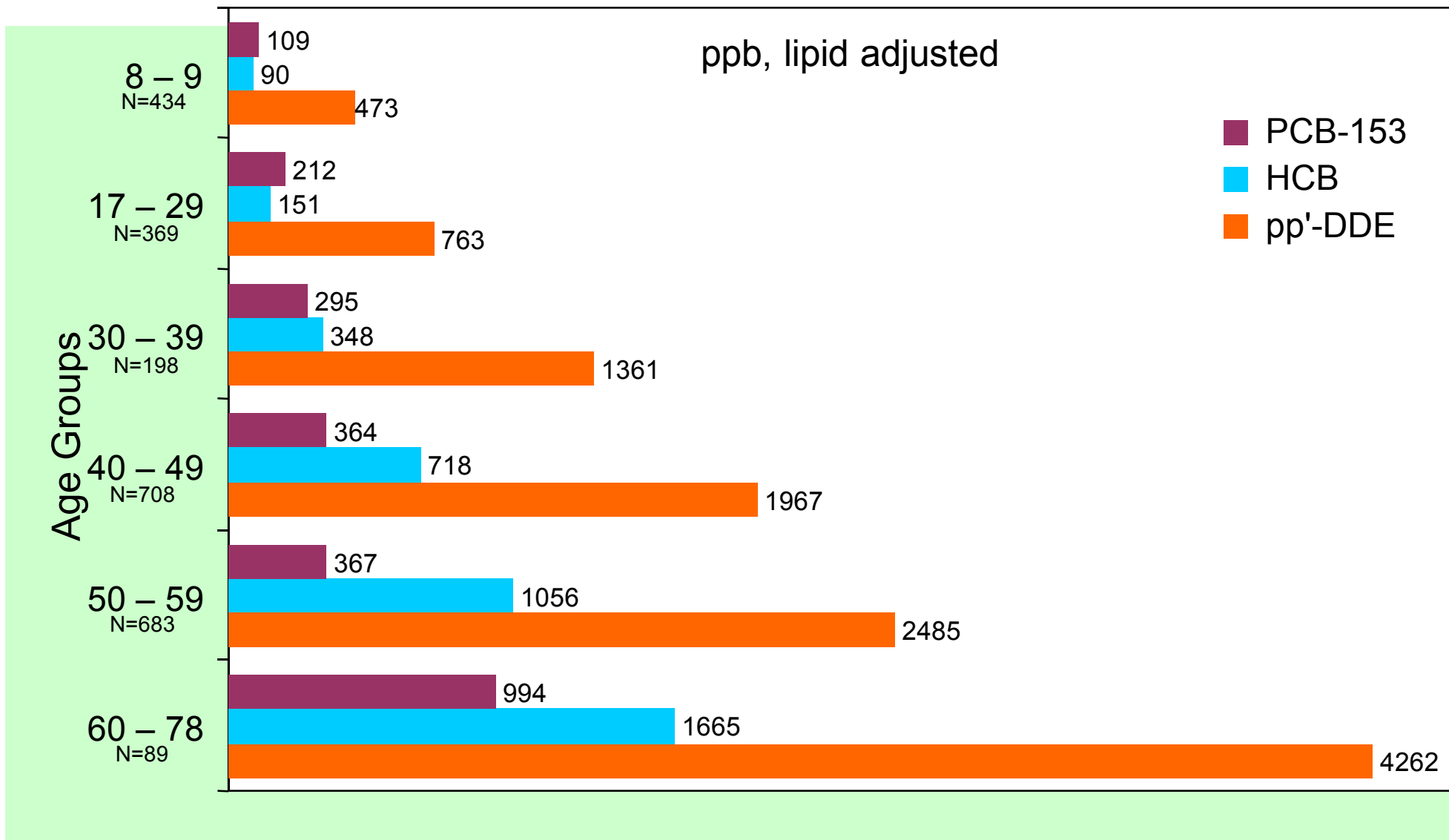
Porovnanie hladín niektorých POPs v ženách a mužoch

- Projekt PCBRISK (r. 2001) -



Mediánové hladiny PCB-153, HCB a p,p'-DDE v krvnom sére v rôznych vekových skupinách

(vzorky odobraté v r. 2001 v rámci projektu PCBRISK)



Niektoré faktory ovplyvňujúce HBM (2)

- Verí sa, že presnosť chemických analýz vplýva iba málo na celkový rozptyl výsledkov v nejakom monitorovacom programe, keďže sa predpokladá, že rozptyl vo vzorkách je oveľa väčší než laboratórna presnosť.
- To je pravda, ak tieto vzorky analyzuje to isté akreditované laboratórium. Avšak, ak vzorky analyzujú rôzne laboratória, najmä z rôznou analytickou kvalitou, môže to potlačiť alebo dokonca znemožniť hodnotenie zmeny hladín, napr. POPs v počas rokov kedy sa monitoring vykonáva.
- To isté môže platiť, ak laboratórium zmenilo metodológiu. Napr. ak vyriešilo separáciu analytu od rušiaceho kongenéru, čo spôsobilo pokles stanovených hladín tohto kongenéru.
- Rovnako, ak sa vylepší (zníži) medza stanovenia (LOQ), čo spôsobí, že sa stanovia analyty, ktoré sa predtým udávali ako nekvantifikované, môže to viesť k podobným problémom v závislosti ako sa pracovalo s výsledkami $< \text{LOQ}$.

Odber vzoriek materského mlieka a krvi

- Materské mlieko sa odoberá podľa WHO protokolu.
- Krv od matky sa odoberá podľa AMAP protokolu.
- V každom štáte sa musí odobrať najmenej 50 vzoriek. Štáty, ktoré majú viac než 50 mil. obyvateľov, by mali na každý milión na 50 miliónov odobrať najmenej 1 vzorku navyše.

- Výberové kritériá pre matky:

- ✓ Matka je prvorodička
- ✓ Vek matky pod 30 rokov
- ✓ Tak matka aj dieťa musia byť zdravé; tehotenstvo bez problémov
- ✓ Matka dojčí iba jedno dieťa (nie dvojčatá).
- ✓ Matka býva oblasti bez prerušenia najmenej 10 rokov.
- ✓ Matky, ktoré mohli byť vystavené vysokej expozícii POP (polycyclic aromatic hydrocarbons), organochlórové chemikálie sú vylúčené z monitoringu, skresľovať výsledky.



Odber vzoriek

- Vzorkovanie sa vykonáva medzi 3. až 8. týždňom po pôrode.
- Odoberie sa najmenej 50 ml mlieka ručným vytláčaním po dojčení alebo, kým dieťa pije z druhého prsníka, a tak využiť „let-down“ reflex. Môže sa tiež použiť vyčistená odsávačka mlieka. Matka môže odoberať mlieko doma. Dostane podrobné inštrukcie na odber, uskladnenie a transport vzorky a čistú sklenenú nádobu na vzorku s uzáverom.
- Vzorka by sa mala odobrať priamo do dodanej sklenenej nádoby. Ak ju matka odoberá doma, uskladní sa v mrazničke až do odoslania do laboratória. V chladničke pri 4 °C sa môže uskladňovať max. 3 dni. Ak nie je k dispozícii chladnička, pridá sa tabletky $K_2Cr_2O_7$ na chemickú sterilizáciu mlieka.



Method 1613

Tetra- through Octa-Chlorinated Dioxins and Furans by Isotope
Dilution HRGC/HRMS

October 1994

U.S. Environmental Protection Agency
Office of Water
Engineering and Analysis Division (4303)
401 M Street S.W.
Washington, D.C. 20460

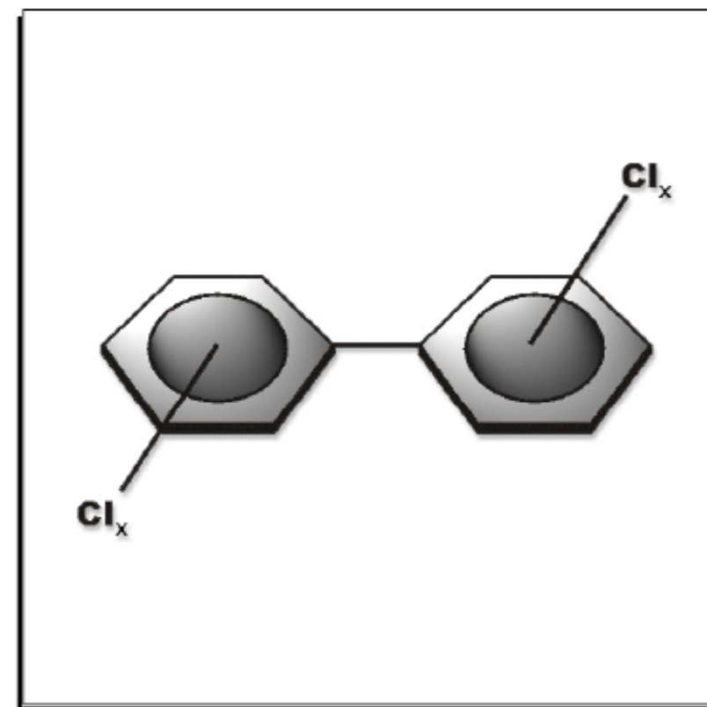
United States
Environmental Protection
Agency

Office of Water
(4303)

EPA No. EPA-821-R-00-002
December 1999



**Method 1668, Revision A: Chlorinated
Biphenyl Congeners in Water, Soil,
Sediment, and Tissue by HRGC/HRMS**



Úprava vzorků půdy před extrakcí

- sušení volně na vzduchu nebo lyofilizací
- přeosítí přes síto s oky 2 mm (odstranění hrubého písku); (jíl je $< 2 \mu\text{m}$)
- mletí nebo rozetření v misce
- subvzorkování pro zachování homogenity
- uchovávání v uzavřených prachovnicích
- chránit před světlem a teplem

Drvenie, mletie, homogenizácia a preosievavanie vzoriek



Čelust'ový drvič



Rotačný mlyn



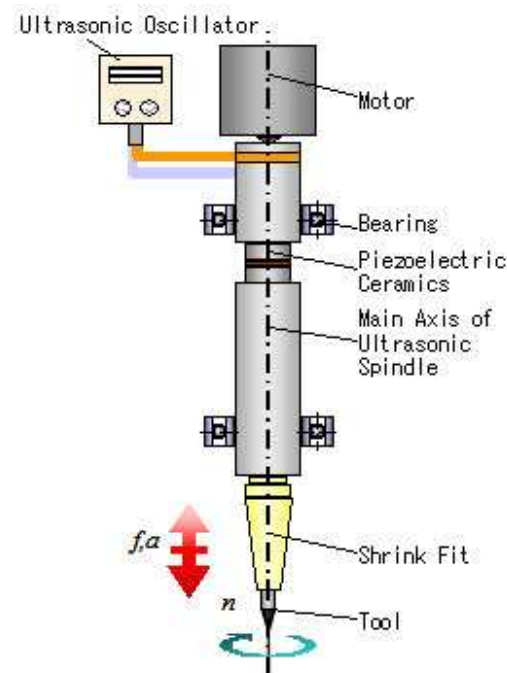
Sekací mlyn



Nožový mixér



Mažiarový mlyn



Ultrazvukový homogenizátor



Laboratorné sitá



Guľový mlyn



Diskový mlyn

Odběry sedimentů a odpadních kalů

- **vzorky s vysokým obsahem vody, nehomogenní, vyžadují zvláštní úpravu**
- **odebírání se několik vzorků a promíchání se**
- **podle hloubky odběru se dá usuzovat na stáří kontaminace**
- **používají se drapákové vzorkovače a bagry pro vzorkování bez vertikální struktury**
- **tyčové vzorkovače pro vzorkování profilu**

Úprava vzorků sedimentů před extrakcí

- odstranění kamenů a vody (dekantací)
- sušení volně na vzduchu nebo lyofilizací
- rozemletí a separace frakce vhodné zrnitosti (< 63 μm)
- subvzorkování pro zachování homogenity
- uchovávání v uzavřených prachovnicích
- chránit před světlem a teplem
- pro odstranění síry se přidává prášková měď

Odběr biotických vzorků

- **Flóra** - sběr, trhání nadzemních částí aspoň 3 cm nad zemí
- **Fauna** - pasti, sítě, lov, vyhrabávání

Vzorky jsou nestabilní, biologicky aktivní, s časem mění své složení. Chráníme je před vyšší teplotou a světlem, skladujeme ve vzduchotěsně uzavřených kontejnerech, zpracujeme co nejdříve.

Úprava biotických vzorku před extrakcí

- **Rostlinné vzorky**
 - rozetřeme v třecí misce nebo rozmixujeme
 - vysušíme (nejlépe lyofilizací)

- **Živočišné vzorky**
 - pokrájíme na malé kousky
 - rozmixujeme, homogenizujeme
 - vysušíme, např. s bezvodým Na_2SO_4 nebo lyofilizujeme

Příprava vzorků ovzduší

- filtry z odběrových zařízení jsou extrahovány horkým organickým rozpouštědlem (Soxhlet, Randall, Twisselman) pomocí ultrazvukové, mikrovlnné, superkritické, zrychlené tlakové extrakce
- čištění vzorků zahrnuje odstranění interferujících látek, které se extrahují spolu s analyty (např. působením H_2SO_4 , alkalického hydroxidu, pomocí gelové permeační chromatografie)
- frakcionace jednotlivých analytů sloupcovou kapalinovou chromatografií (silikagel, modifikovaný silikagel, florisil, aktivní uhlí)
- zakoncentrování

Příprava vzorků vod

- **Při vysoké koncentraci a čistotě je možná přímá analýza**
- **Extrakce**
 - **plynem (statický head space)**
 - **plynem se zkoncentrováním na sorbent (dynamický head space, purge and trap)**
 - **nemísitelnou kapalinou (LLE) v dělicí nálevce, např. hexanem**
 - **extrakcí na tuhou fázi (SPE, SPME) – klíčový je výběr extrakčního sorbentu a elučního rozpouštědla**
- **Čištění a frakcionace**
 - **jeli potřeba tak podobně jak při zpracování půd nebo sedimentů**

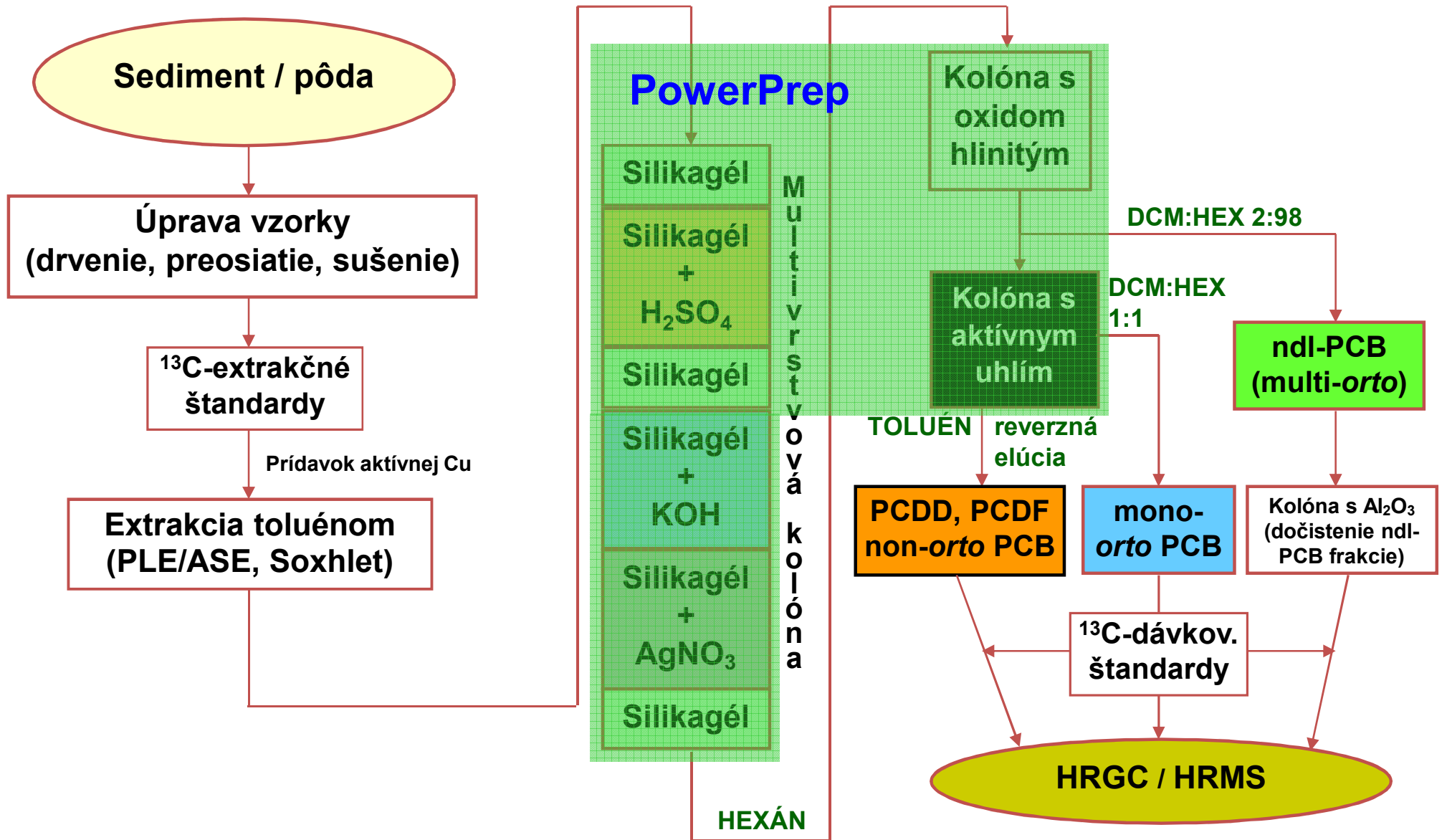
Příprava vzorků půd a sedimentů

- **extrakce horkým organickým rozpouštědlem (Soxhlet, Randall, Twisselman), pomocí zrychlené tlakové, ultrazvukové, mikrovlnné, nebo superkritické extrakce**
- **u sedimentů je nezbytné odstranění síry, např. aktivovanou práškovou mědí**
- **čištění vzorků od interferujících látek (např. na koloně plněné silikagelem modifikovaným kyselinou sírovou, alkalickým hydroxidem, AgNO_3)**
- **frakcionace analytů sloupcovou kapalinovou chromatografií (oxid hlinitý, florisil, aktivní uhlí)**
- **zakoncentrování**

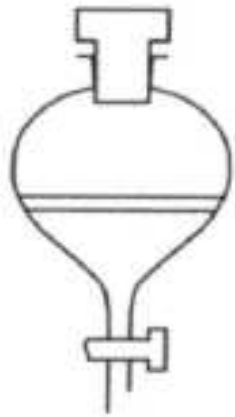
Příprava biotických vzorků

- **extrakce horkým organickým rozpouštědlem (Soxhlet, Randall, Twisselman), pomocí zrychlené tlakové, ultrazvukové, mikrovlnné, superkritické extrakce, SPE**
- **odstranění vysokomolekulárních látek (lipidů) pomocí gelové permeační chromatografie, dialýzou nebo kyselinou sírovou**
- **čištění vzorků (např. na koloně plněné silikagelem modifikovaným kyselinou sírovou, alkalickým hydroxidem)**
- **frakcionace analytů sloupcovou kapalinovou chromatografií (oxid hlinitý, florisil, aktivní uhlí)**
- **zakoncentrování**

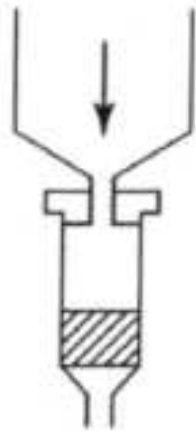
Schéma analýzy PCDD, PCDF, dl- a ndl-PCB v sedimente/pôde



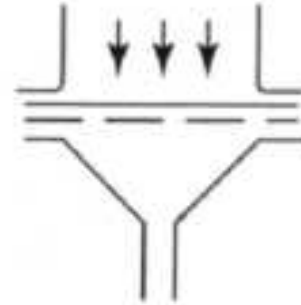
Niektoré extrakčné metódy



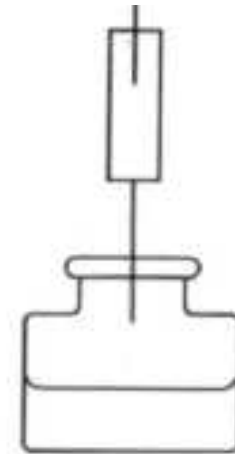
**Kvapalina-kvapalina
(LLE)**



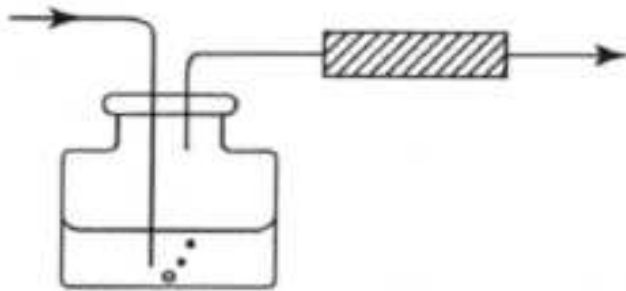
**Tuhou fázou
na kolónke
(SPE)**



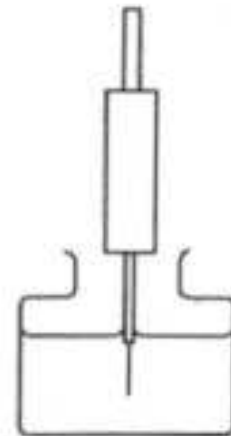
**Tuhou fázou
na disku
(SPE)**



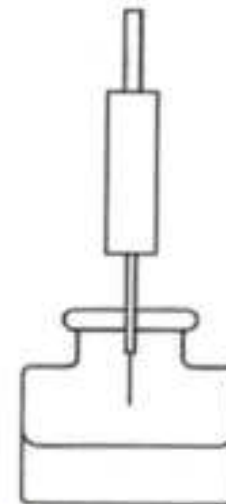
Head-space



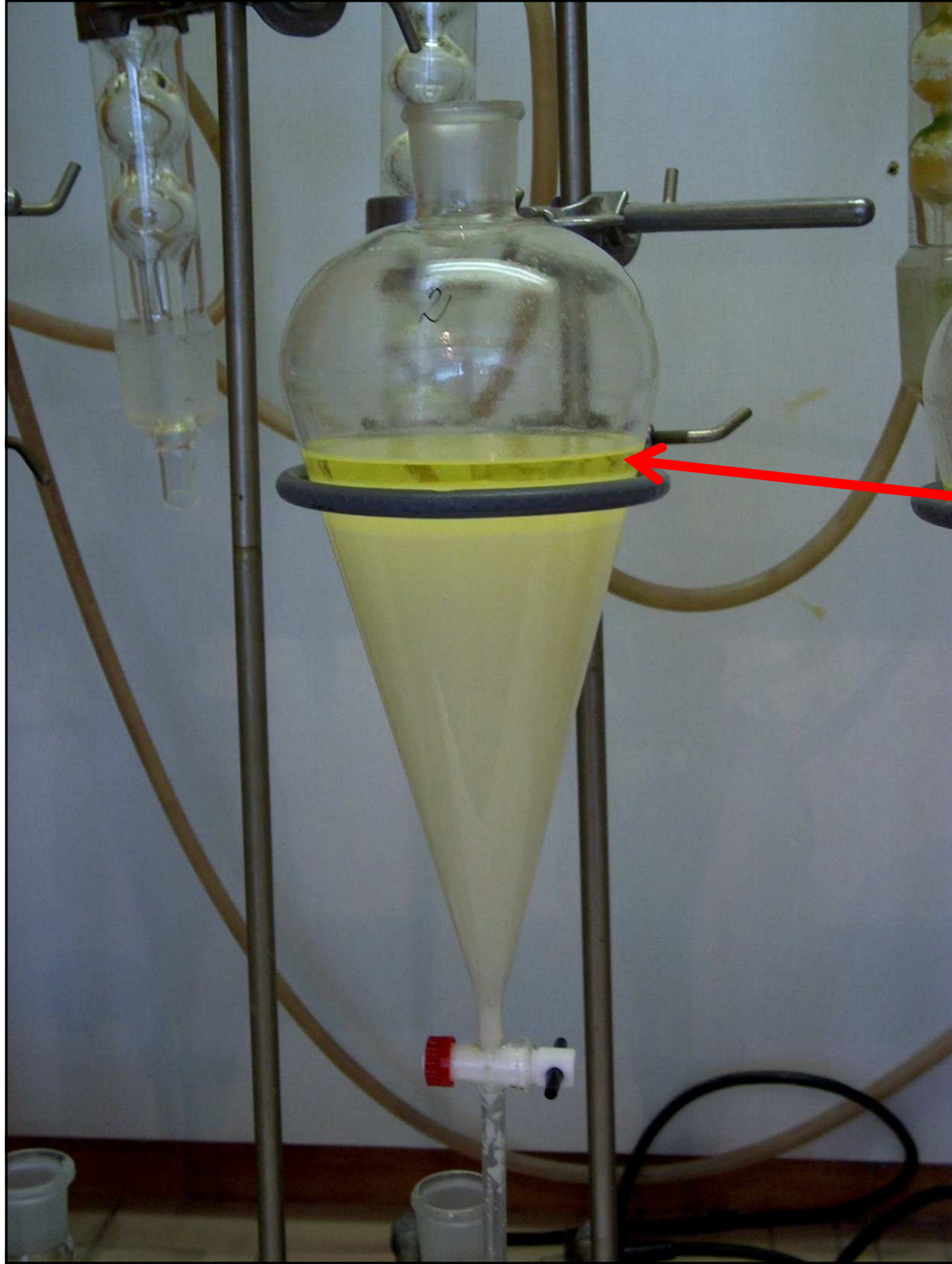
Purge & Trap



**Mikroextrakcia
na tuhej fáze - priama**



**Mikroextrakcia
na tuhej fáze - headspace**

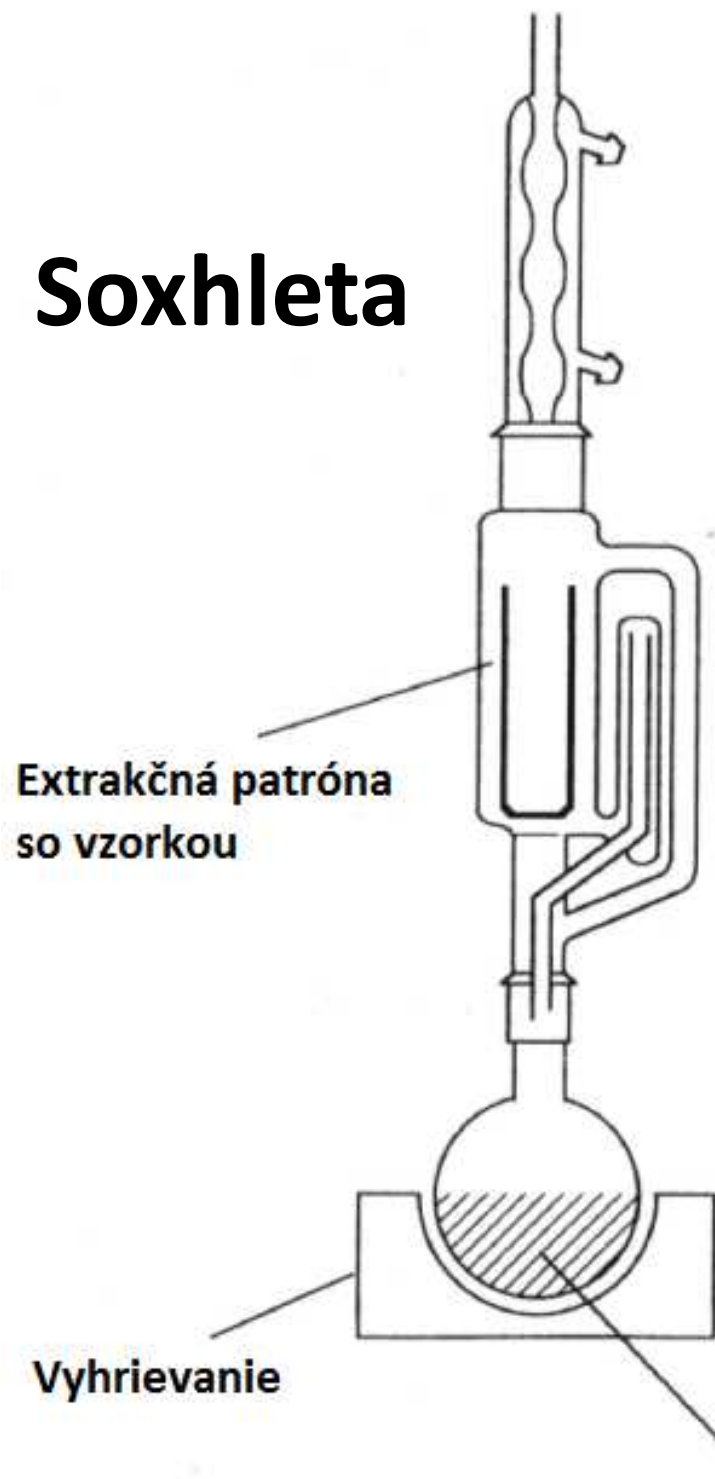


Extrakcia typu kvapalina – kvapalina (LLE) mlieka

- Vrchná fáza organického rozpúšťadla (hexán-dietyléter) obsahuje mliečny tuk a v ňom rozpustené látky, napr. PCB, dioxíny, pesticídy

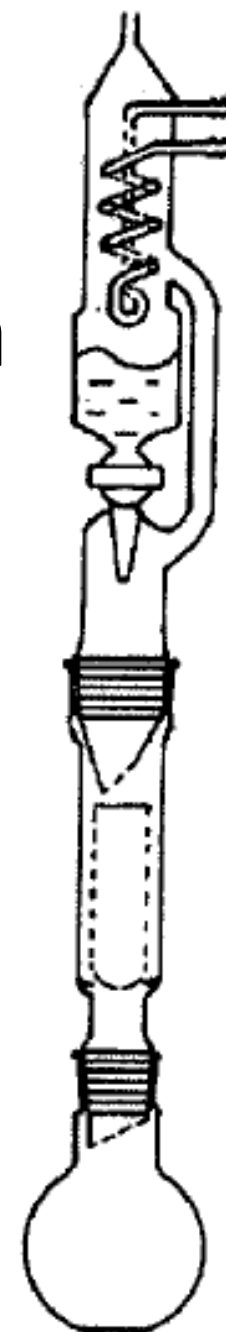
Extrakčný prístroj podľa

Soxhleta



Twisselmana

(opakovaná extrakcia horúcim
rozpúšťadlom)





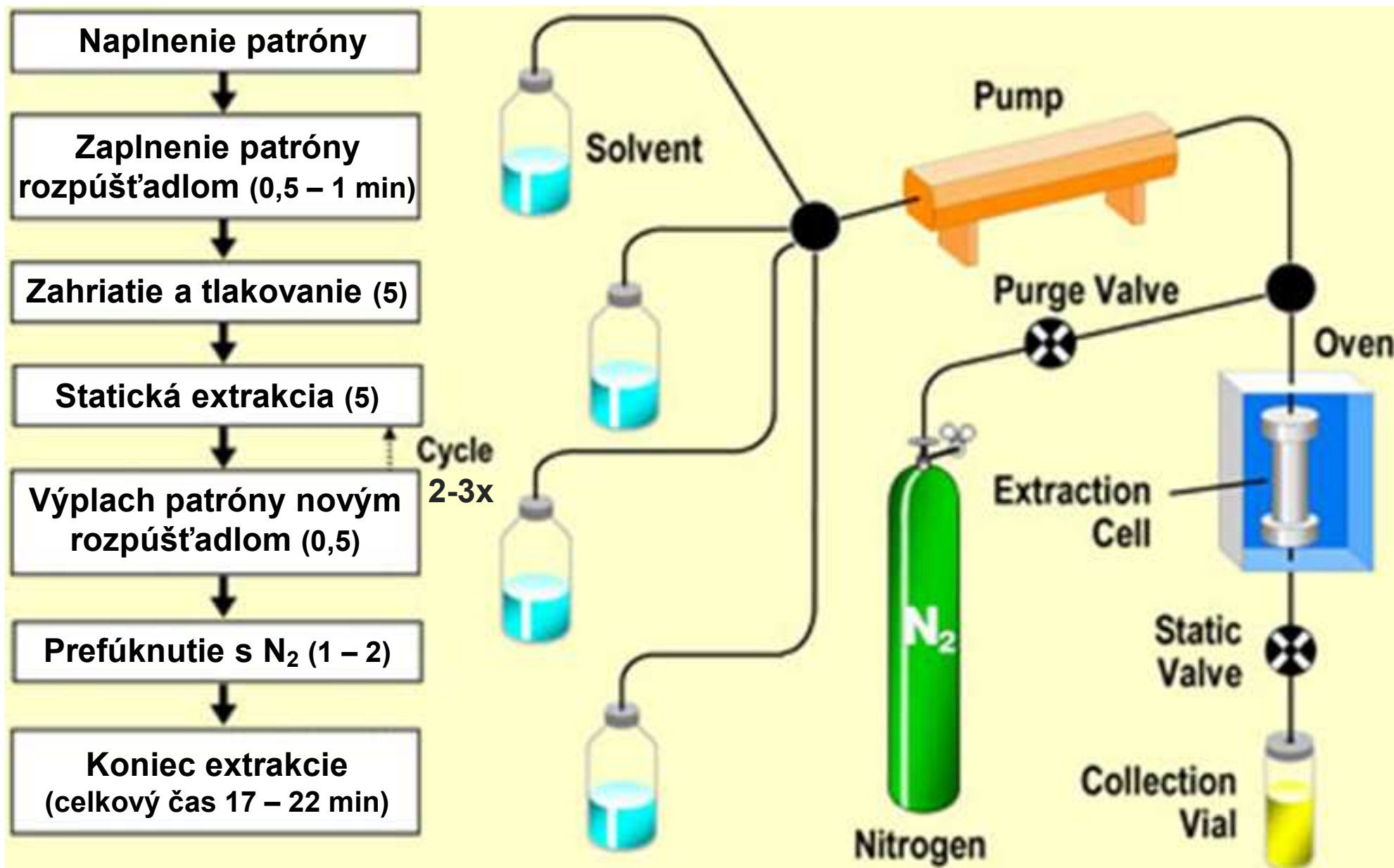
Extrakčný prístroj na zrýchlenú extrakciu podľa Soxhleta

(extrakcia prebieha niekoľkonásobne
rýchlejšie než klasická extrakcia podľa
Soxhleta, pretože extrakčné patróny sú
vyhrievané)

Extraktor na zrýchlenú kvapalinovú extrakciu od fy Dionex (ASE 300)



Schéma zrýchlenej tlakovej extrakcie (Dionex ASE 300)



Príklad zrýchlenej extrakcie zo sedimentu



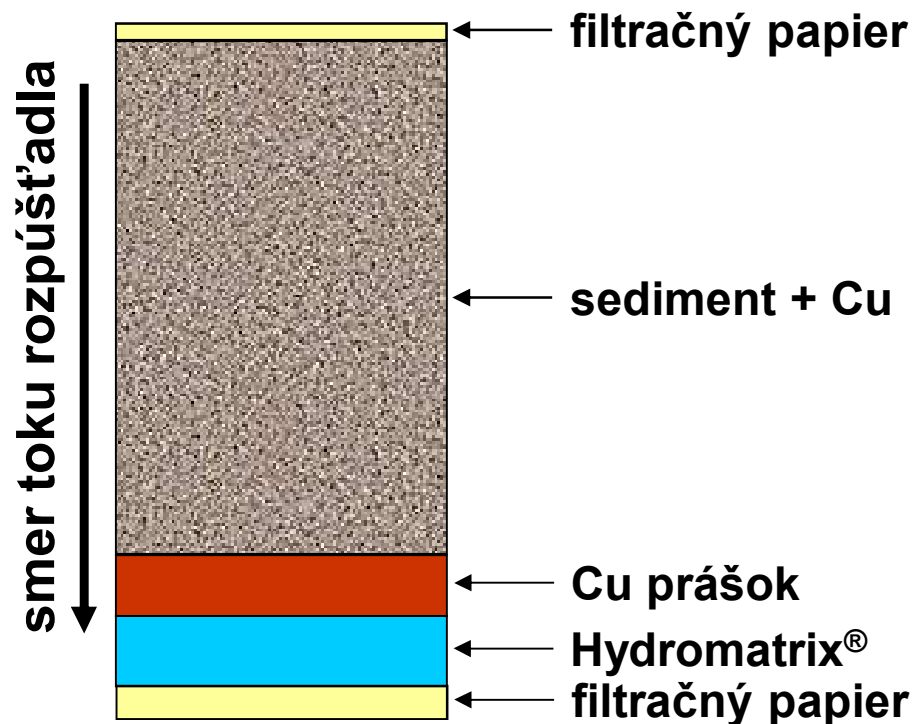
Úprava vzorky
vysušeného sedimentu:

- preosiata cez 63 μm ,
príp. 0,2 mm sito
- dosušená
premiešaním s
Hydromatrixom
- premiešaná s
medeným práškom na
odstránenie síry



Hydromatrix[®] :

- prečistená
a preosiata
rozsievková
zemina (kremelina)
 - má vynikajúce
sušiacie vlastnosti
- 1 diel Hydromatrixu
= 6 dielov bezv.
 Na_2SO_4



Extrakčná cela:

- 100 ml
- 34 ml
- 10 ml

Extraktor na tlakovú kvapalinovú extrakciu (PLE) od fy FMS



Extraktor na tlakovú rozpúšťadlovú extrakciu (PSE) od fy Büchi (SpeedExtractor E-914)



Izolácia PCB a ďalších POPs z krvného séra na tuhej fáze (C₁₈-SPE)



H_2SO_4 /silikagélová kolóna používaná na počiatočné čistenie extraktov





**Kolóna plnená
aktívnym uhlím na
frakcionáciu
indikátorových PCB (1.
fr.), dioxínom
podobných PCB (2. fr.)
a PCDD/F (3. frakcia)**

← Silanizovaná sklená vata

← 0.5 g Celite 545

← 1 g AX-21 aktívne uhlie
na Celite 545 (1:19)

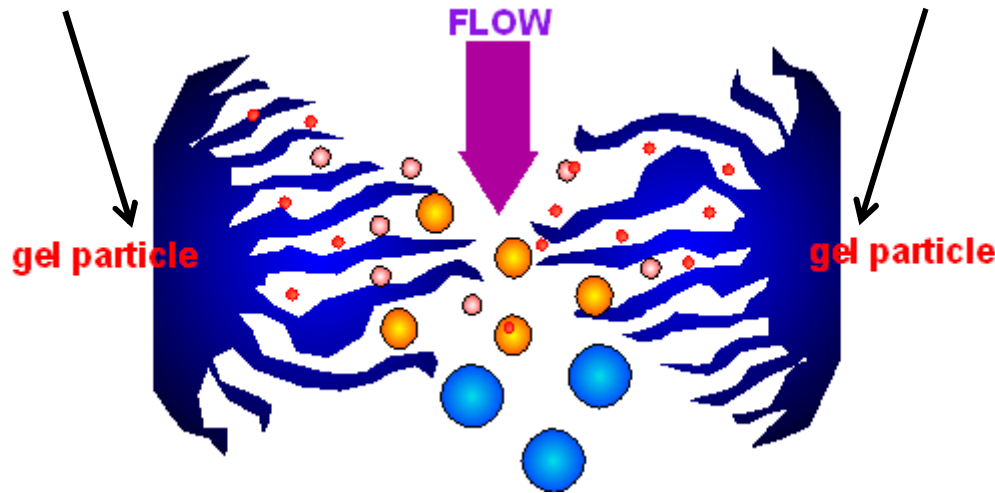
← 0.5 g Celite 545

← Silanizovaná sklená vata

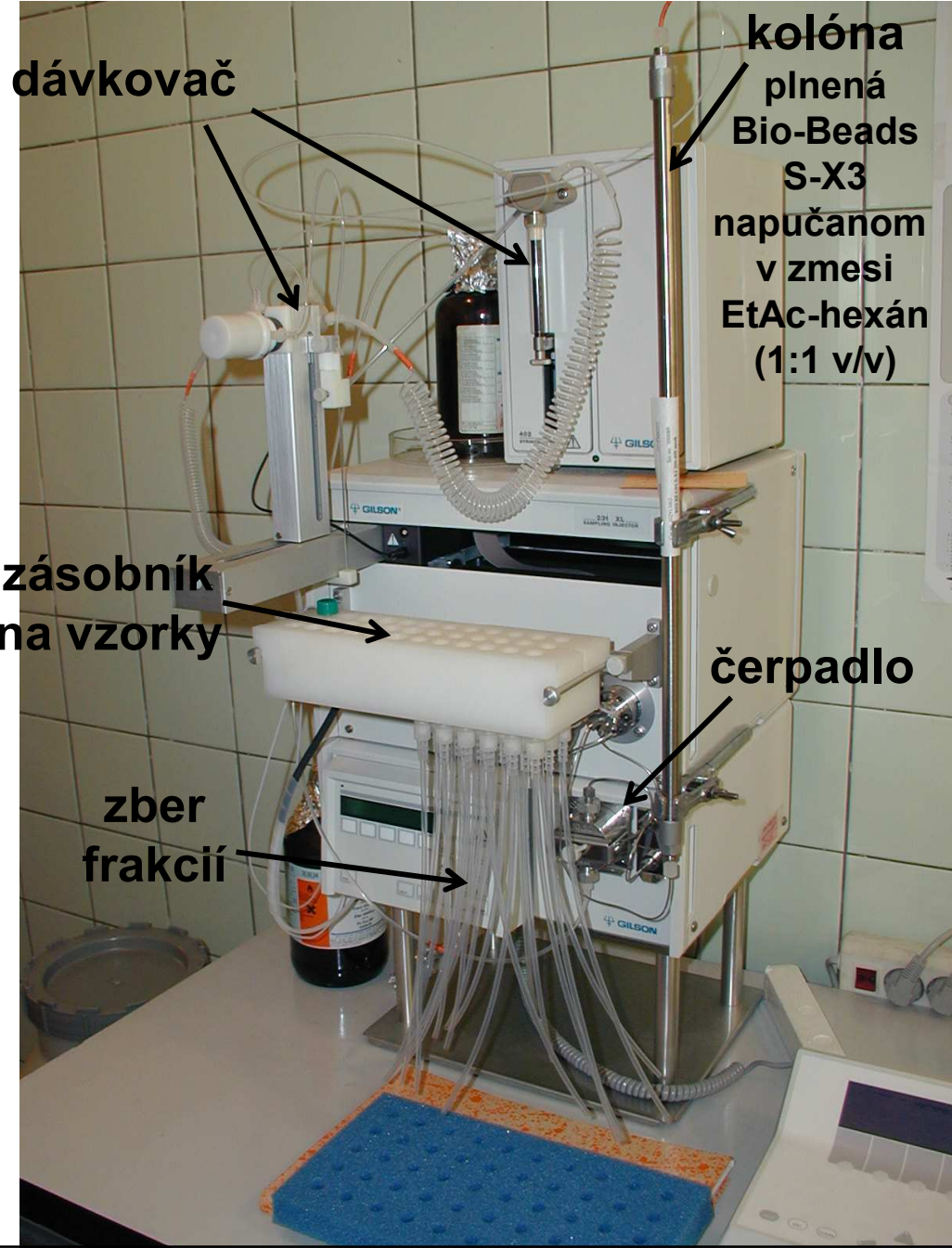
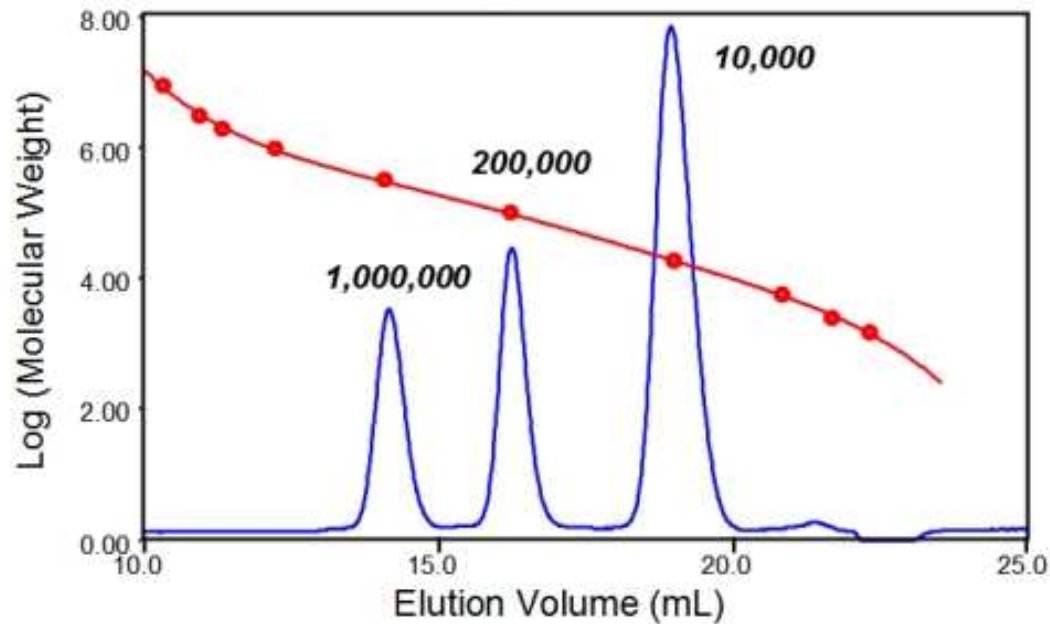
Gélová permeačná chromatografia (GLC)

(patrí do skupiny size exclusion chromatography)

Polystyrénový polymér zosieťovaný prídavkom divinylbenzénu – množstvo DVB určuje veľkosť pórov



Molecular Weight vs. Retention Volume



Automatizovaný systém spracovania vzoriek Power-Prep™ (konfigurácia pre 2 vzorky)

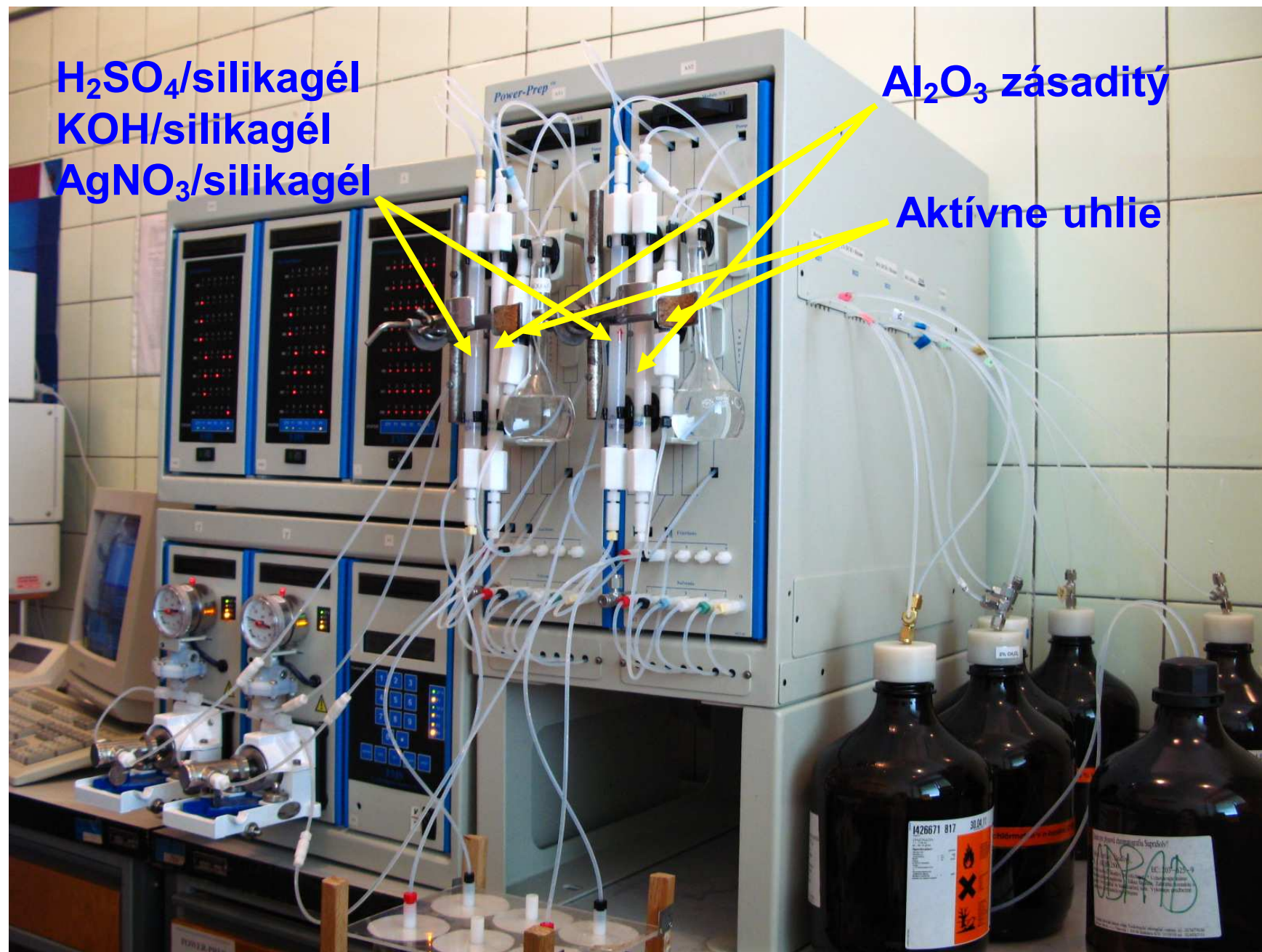
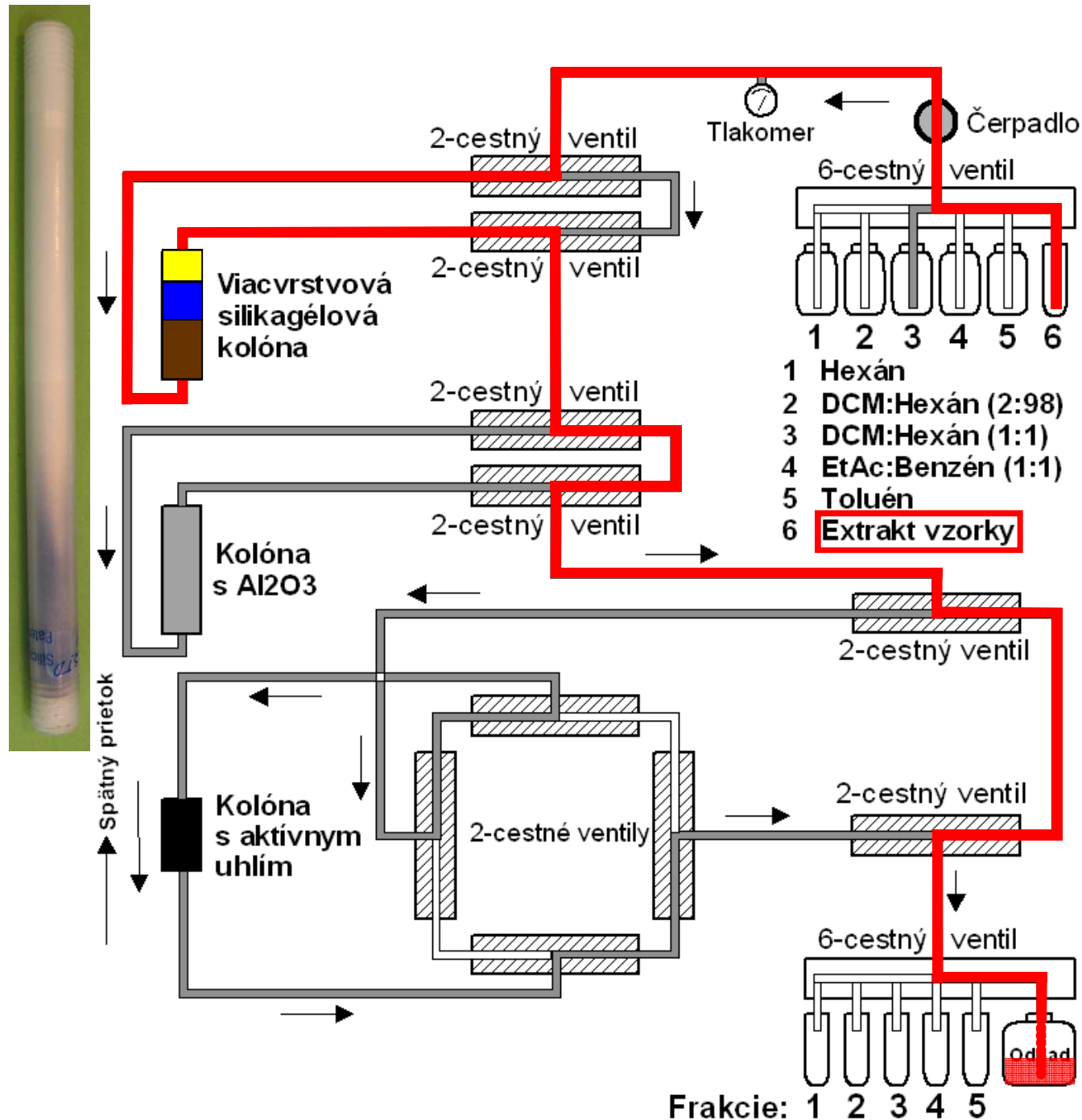
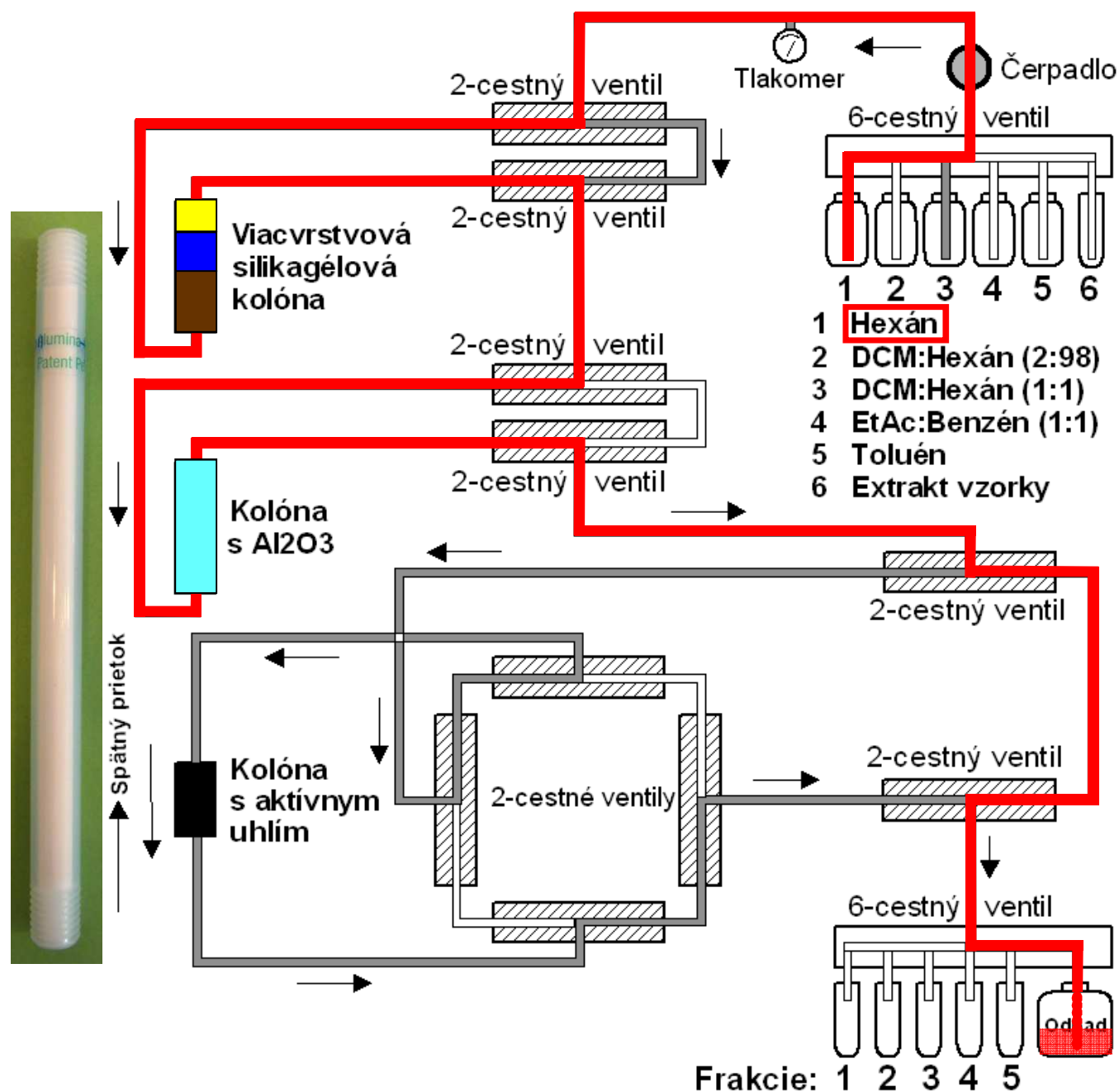


Schéma automatizovaného zariadenia na čistenie vzoriek (Power-Prep)



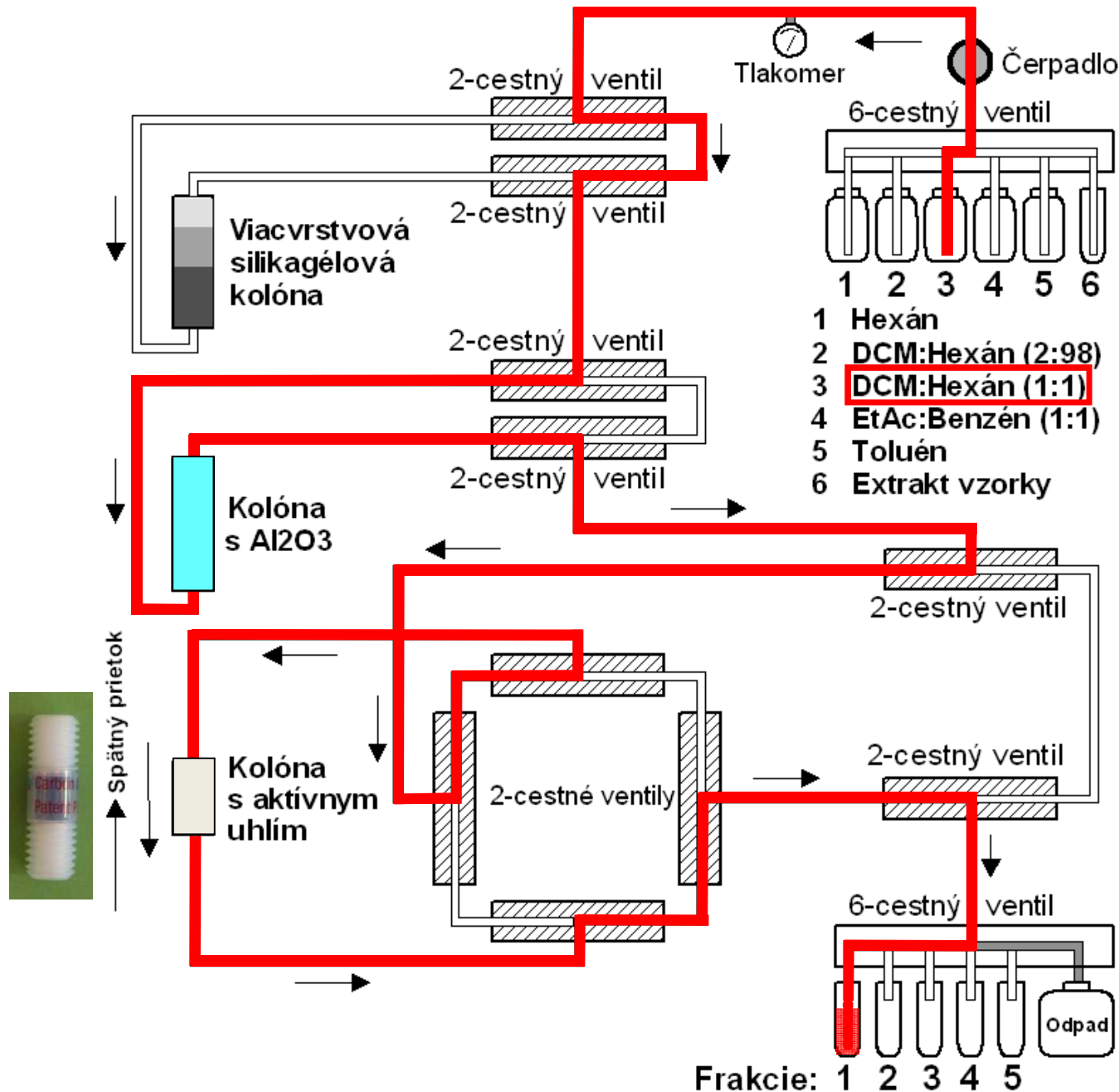
Krok nanosenia extraktu vzorky na viacvrstvovú silikagelovú kolónu

Schéma automatizovaného zariadenia na čistenie vzoriek (Power-Prep)



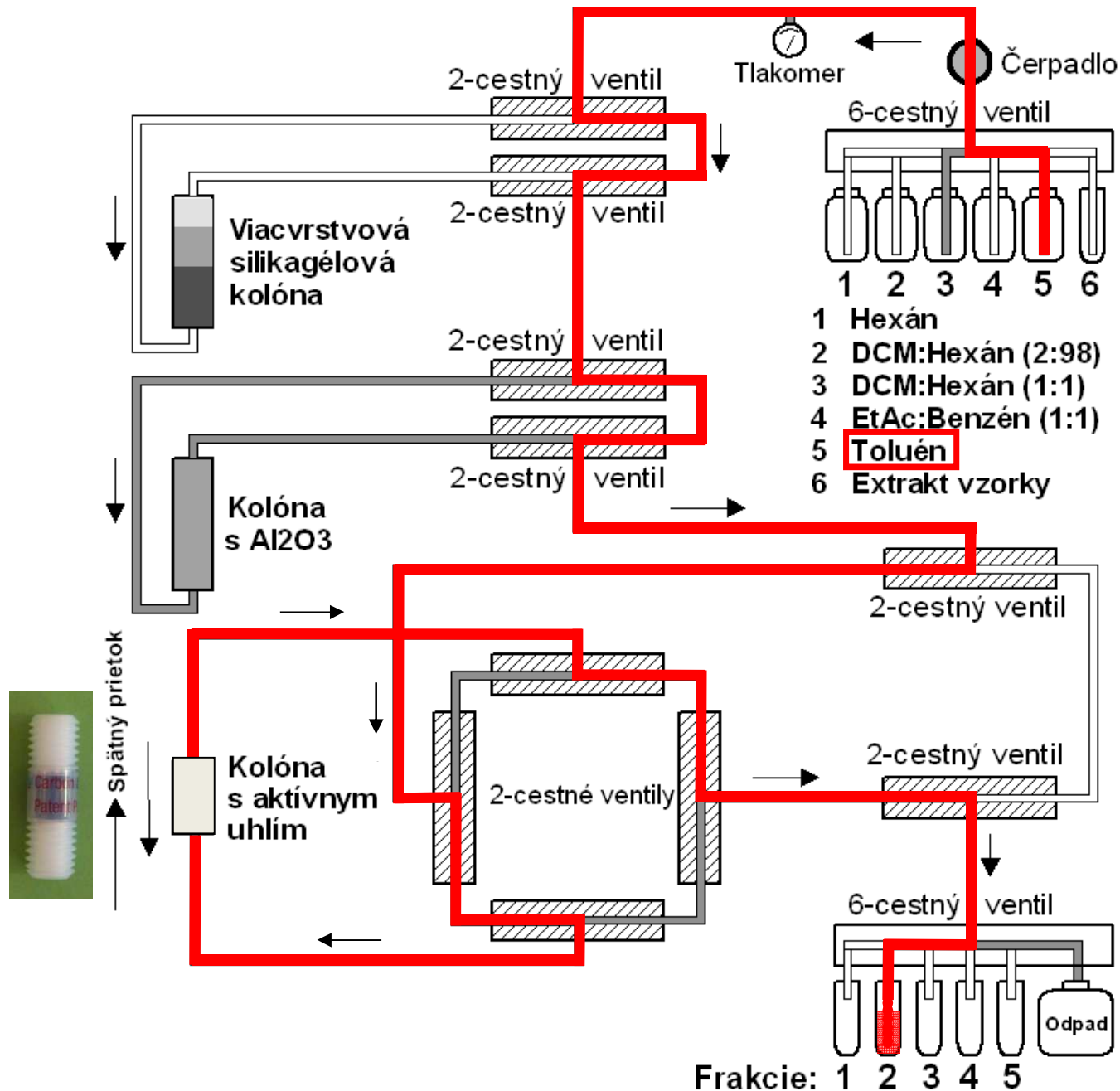
Krok čistenia na viacvrstvovej silikagelovej kolóne a adsorpcii analytov na kolóne s Al₂O₃

Schéma automatizovaného zariadenia na čistenie vzoriek (Power-Prep)



Krok elúcie analytov z kolóny s Al₂O₃ a adsorpcii planárnych zlúčenín na kolóne s aktívnym uhlím; Zachytávanie frakcie obsahujúcej PCB (okrem planárnych non-orto kongenérov)

Schéma automatizovaného zariadenia na čistenie vzoriek (Power-Prep)



**Krok elúcie
planárnych non-
orto PCB a
PCDD/PCDF z
kolóny s aktívnym
uhlím**

Koncentrátor TurboVap LV na odľúkanie rozpúšťadla z extraktov



Rezíduá extraktu z červenej papriky na stenách odparovacej skúmavky po odparení rozpúšťadla

Koncentrátor na odfúkavanie rozpúšťadiel z eluátov vzoriek



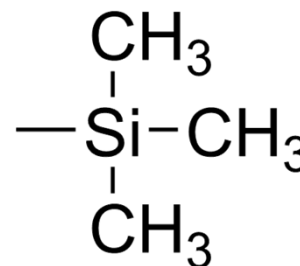
Derivatizácia analytov

Je to proces, ktorým sa pôvodná zlúčenina mení na zlúčeninu s vlastnosťami vhodnejšími na stanovenie.

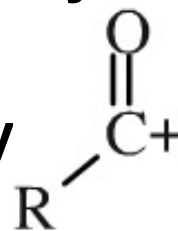
V prípade, že sa na analýzu používa plynová chromatografia tak dôvodom na derivatizáciu je nízka prchavosť analytu, tepelná nestabilita, sorpcia v injektore, nekvalitná separácia v kolóne, nízka odozva v detektore.

Ak sa používa GC, základné typy derivatizácie sú:

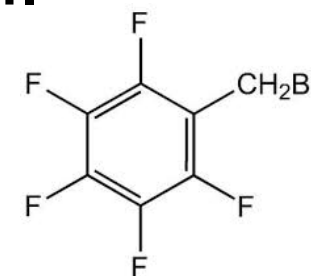
- Silanizácia – reakcia aktívneho vodíka so zlúčeninami s tri- alebo dimetylsilyl skupinou, napr. trimetylchlórsilánom



- Acylácia – zavedenie acylovej skupiny $\text{R}-\text{C}(=\text{O})^+$ reakciou, napr.



pentafluórbenzylbromidom



- Alkylácia – nahradenie kyslého vodíka s alkylovou (metylovou) skupinou, napr. reakciou s diazometánom ($\text{CH}_2=\text{N}^+=\text{N}^-$)

Kvalitatívna a kvantitatívna analýza organických polutantov vo vzorkách zo životného prostredia

Rozdelenie podľa princípu merania:

- **Bioanalytické metódy (CALUX, ELISA, RIA)**
- **Fyzikálnochemické metódy (GC/MS, GC/ECD, TLC)**

Rozdelenie podľa kvality merania:

- **Skríningové metódy (všetky bioanalytické metódy, TLC, GC/ECD, GC/LRMS)**
- **Konfirmačné metódy (GC/HRMS, GC/MS-MS)**

Kvalitatívna a kvantitatívna analýza organických polutantov vo vzorkách zo životného prostredia (1)

▪ Skrínigové bioanalytické metódy

- Imunotesty – sú založené na vysoko špecifickom viazaní určitých organických zlúčenín (antigénov) na protilátky (antibodies) – princíp „zámok-klúč“.

Príklady imunotestov:

- Rádioimmunoassay (RIA), v ktorom do extraktu vzorky pridá špecifická protilátka s naviazaným rádioaktívnym ligandom. Analyt kompetuje s týmto ligandom. Po separácii, napr. na filtri sa zmeria rádioaktivita filtra. Platí, čím nižšia aktivita, tým vyššia koncentrácia analytu, ktorý vytlačil ligand z protilátky.
- ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), v ktorom sa do extraktu vzorky pridá špecifická protilátka s už naviazaným značeným antigénom imobilizovaná napr. na stenách skúmavky. Analyt, t.j. antigén kompetuje so značeným antigénom. Po krátkej inkubácii sa vzorka s neviazaným analytom vypláchne. Pridá sa chromogénny substrát, ktorý vytvára farebný produkt s enzýmom na značenom antigéne. Intenzita zafarbenia sa meria fotometricky. Platí, čím nižšia intenzita zafarbenia tým vyššia koncentrácia analytu.

Kvalitatívna a kvantitatívna analýza organických polutantov vo vzorkách zo životného prostredia (2)

▪ Skrínigové bioanalytické metódy

• Imunotesty

- Ah-receptor immunoassay, v ktorom sa do extraktu vzorky na špeciálnej platničke pridá reakčná zmes obsahujúca Ah-receptor a nechá sa inkubovať. Zlúčeniny s dioxínovou aktivitou sa naviažu na AhR a komplex sa zachytí na platničke. Zvyšok vzorky sa vypláchne. Pridá sa protilátka, ktorá zafarbí iba AhR s analytom. Platí, čím vyššia intenzita zafarbenia, tým vyššia koncentrácia analytu.



2,3,7,8-tetrachlórdibenzo-*p*-dioxín

škodlivina s doteraz najvyššie známou afinitou k arylhydrokarbónovému receptoru

Kvalitatívna a kvantitatívna analýza organických polutantov vo vzorkách zo životného prostredia (2)

▪ Skrínigové bioanalytické metódy

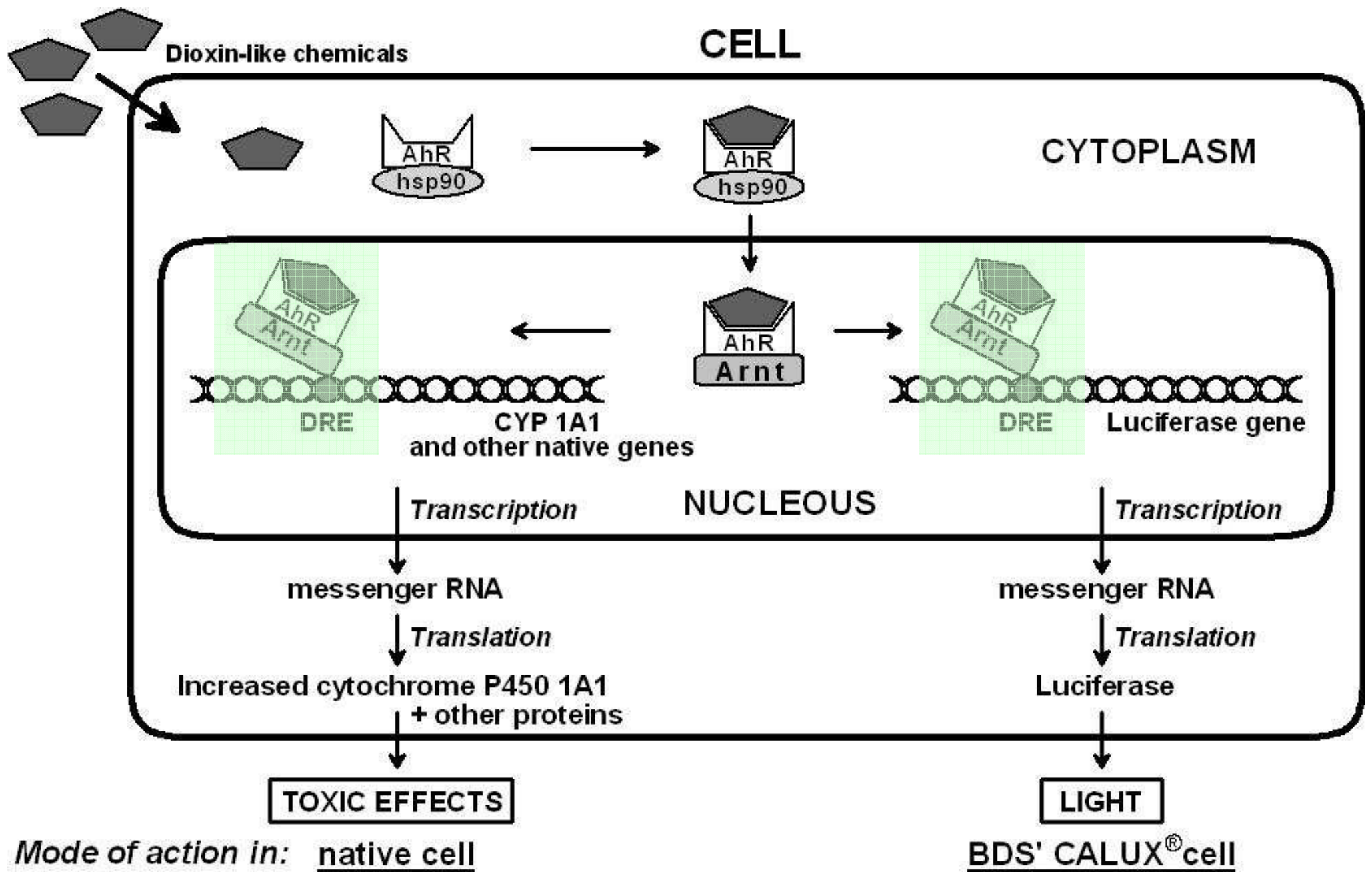
- Biotesty – sú založené na interakcii analytu so živou bunkou

Príklad biotestu pre zlúčeniny s dioxínovou toxicitou:

- DR CALUX (**C**hemical-**A**ctivated **L**Uciferase gene e**X**pression)

Zlúčeniny s dioxínovou toxicitou prenikajú bunečnou membránou a viažu sa na Ah-receptor, ktorý je spojený s proteínom hsp90. Tento komplex sa uvoľní a migruje do bunečného jadra. Viaže sa na AhR jadrový translokátorový proteín (Arnt), ktorý interaguje so špecifickými sekvenciami DNA, tzv. dioxínovými odozvovými elementami (DRE). Tým sa indukuje transkripcia určitých génov. Následne sa produkuje niekoľko proteínov, vč. cytochromu P4501A1. Výsledkom sú viaceré toxické účinky.

Tento princíp sa využíva v komerčne dostupných biotestoch CALUX. Využívajú sa potkanie, myšie alebo ľudské rakovinové pečňové bunky, ktoré sú geneticky modifikované luciferázovým reportérovým génom získaným zo svetlušky. Tieto bunky po expozícii dioxínovým zlúčeninám emitujú svetlo, ktorého intenzita závisí od koncentrácie týchto látok. Meria sa spektrofotometricky (luminometrom).



Kvalitatívna a kvantitatívna analýza organických polutantov vo vzorkách zo životného prostredia (3)

- **Fyzikálno-chemické analytické metódy založené na chromatografickej separácii zmesí zlúčenín v extrakte a následnej detekcii a kvantifikácii niektorým z detektorov, najčastejšie hmotnostnospektrometrickým detektorom.**
- **Na separáciu pri analýze organických látok v environmentálnych vzorkách sa v súčasnosti používajú takmer výhradne separačné metódy založené na vysokoúčinnnej plynovej chromatografii (HRGC) alebo vysokoúčinnnej (vysokotlakej) kvapalinovej chromatografii (HPLC, UHPLC)**
- **Tenkovrstvová a papierová chromatografia – používajú sa na skrínigové stanovenie**

Princíp chromatografie (1)

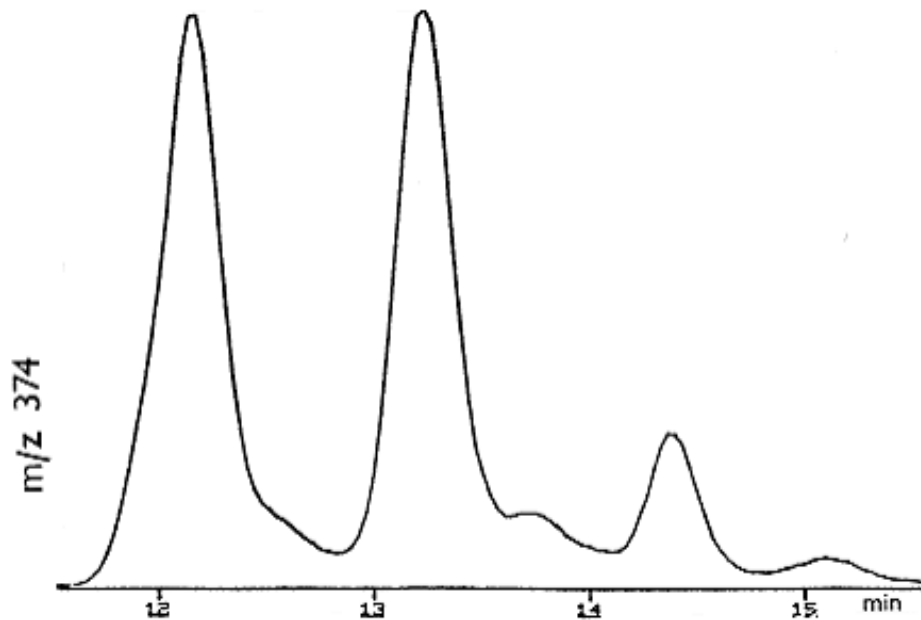
- **Chromatografia je fyzikálna metóda separácie, pri ktorej sa využíva rozdielna afinita zložiek v zmesi k dvom navzájom nemiešateľným fázam.**
- **Aj je táto afinita daná rozdielnym adsorpčným (*adsorpčná chromatografia*) alebo rozdeľovacím koeficientom (*rozdeľovacia chromatografia*) separovaných látok medzi dvoma nemiešateľnými fázami, tj. stacionárnou fázou (adsorbent alebo viskózna kvapalina) a mobilnou fázou (plyn alebo kvapalina).**
- **Ak sa zlúčeniny separujú podľa veľkosti svojich molekúl – gélová chromatografia; ak sa na ionexe vymieňajú katióny alebo anióny – ionexová chromatografia**

Princíp chromatografie (2)

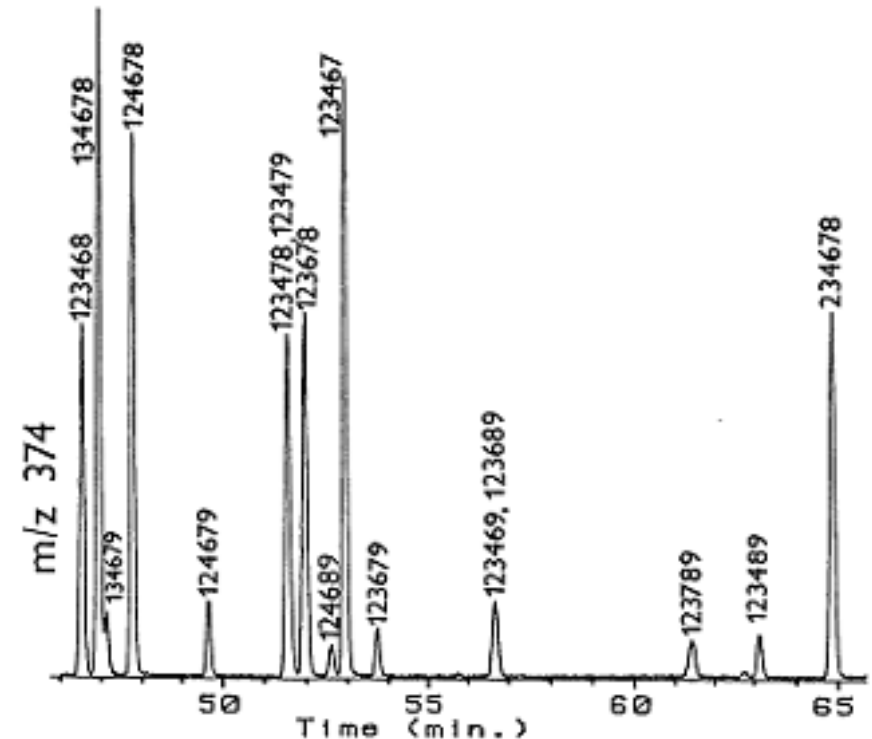
- **Separáčny proces v súčasných HRGC a UPLC/HPLC sa skladá s veľkého množstva (až niekoľko stotisíc) jednotlivých separáčnych rovnováh, čo znamená, že sú tieto typy chromatografie najúčinnnejšie, a preto najpoužívannejšie v separácii zložitých zmesí environmentálnych polutantov.**

HexaCDF
separované:

zastaralou náplňovou kolónou
(3% Dexsil 300 on Supelcoport 100/120,
2.4 m, 2 mm vnútorný Ø)

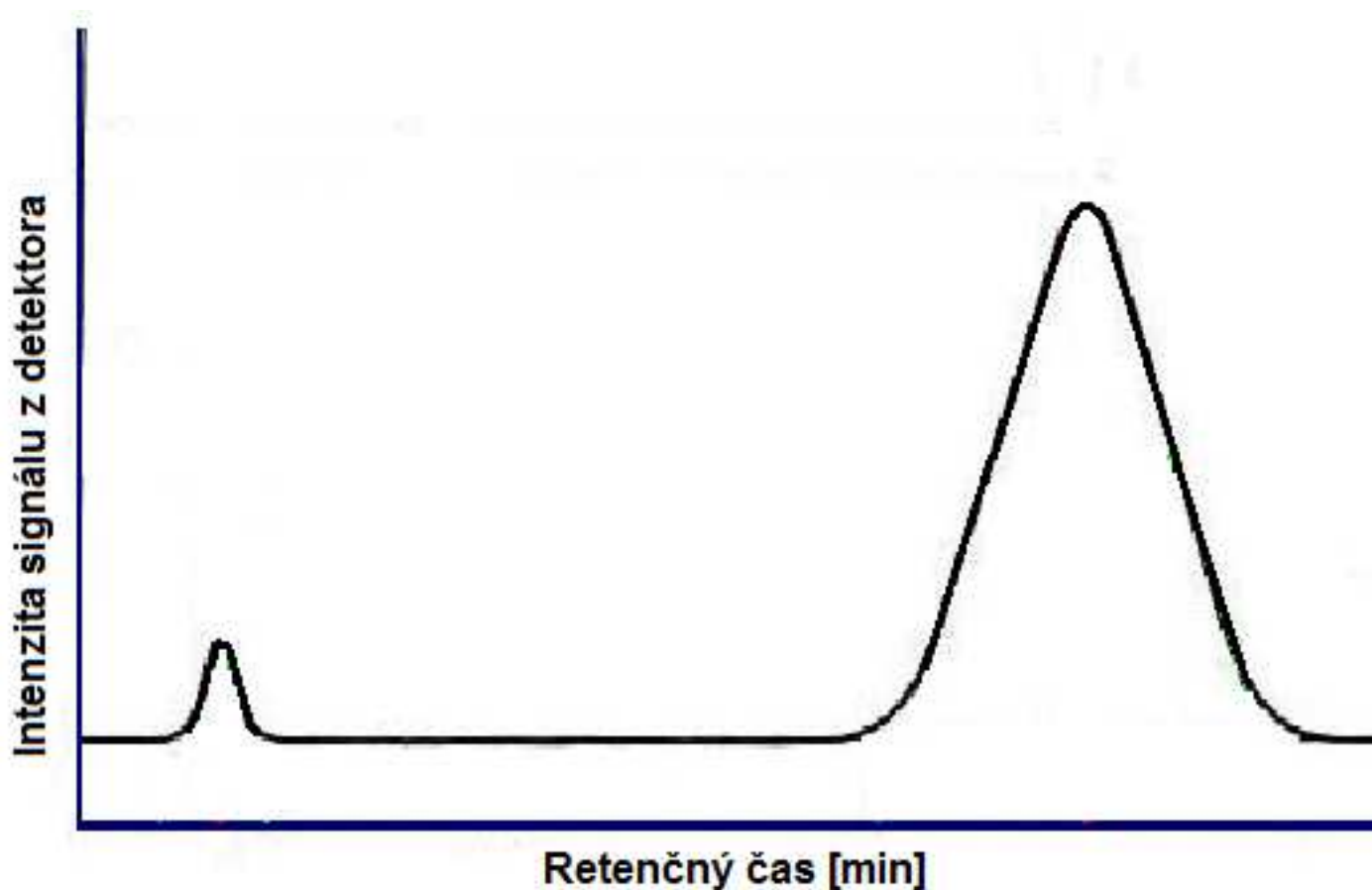


modernou kapilárnou kolónou
(SP-2331, 60 m, 0.25 mm vnútorný Ø)



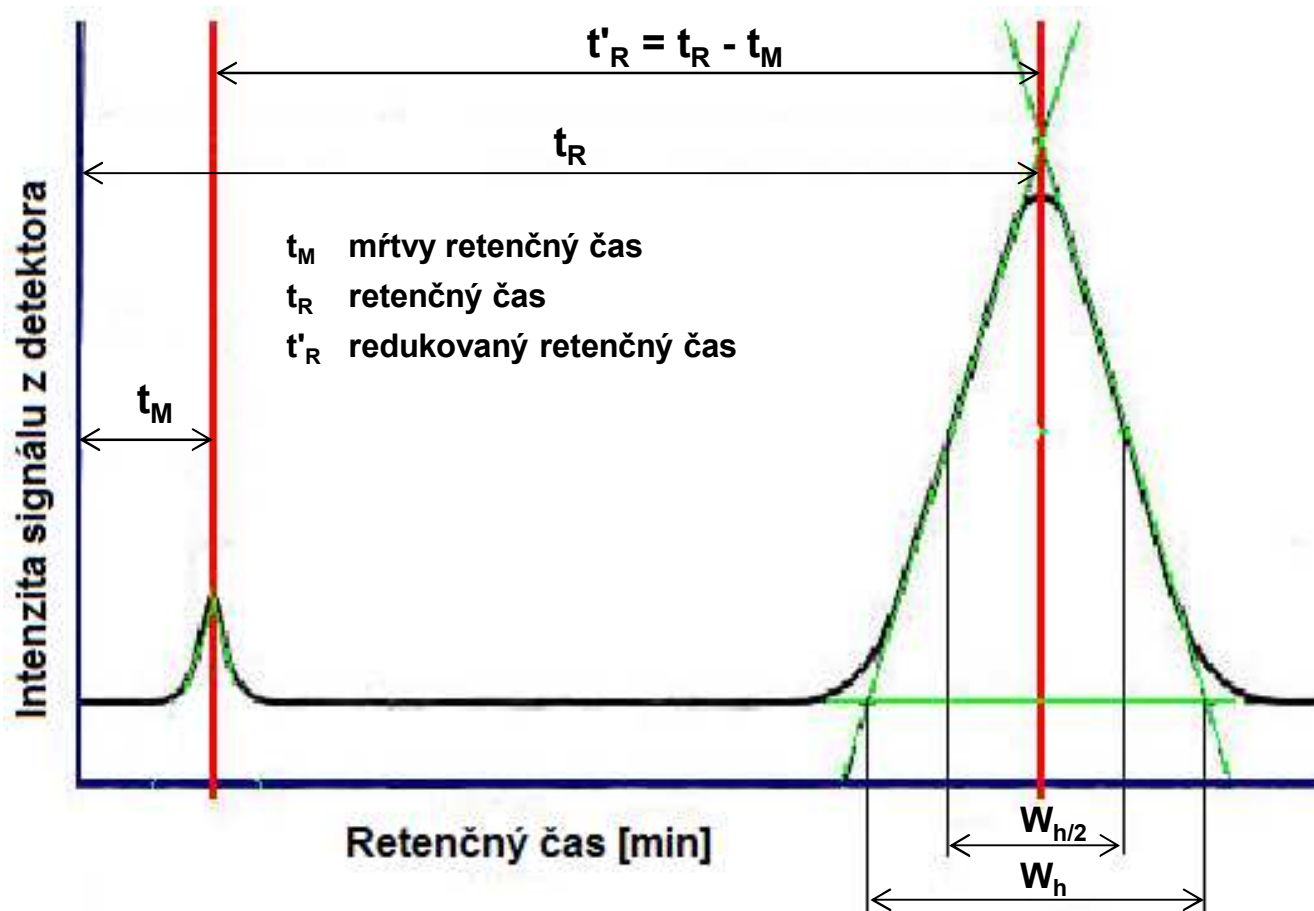
Chromatogram

- Je grafickým výstupom z chromatografu, konkrétne z jeho detektora.
- V prípade najčastejšie používanej plynovej chromatografie a vysokotlakej kvapalinovej chromatografie je to chromatogram skladajúci sa z elučných vln (píkov); Na osi x je retenčný čas a na osi y intenzita nameraná niektorým z detektorov (FID, ECD, MS, DAD, a i.).



Chromatogram (2)

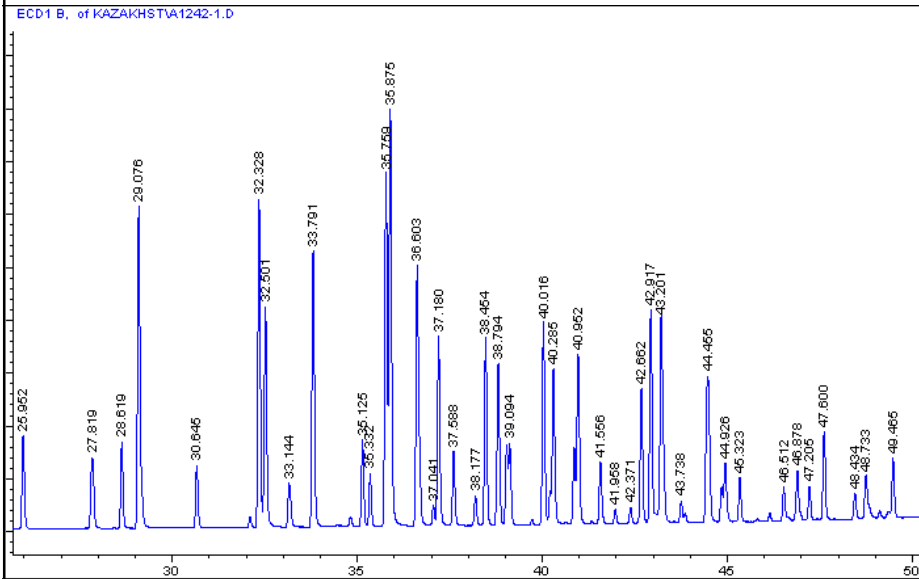
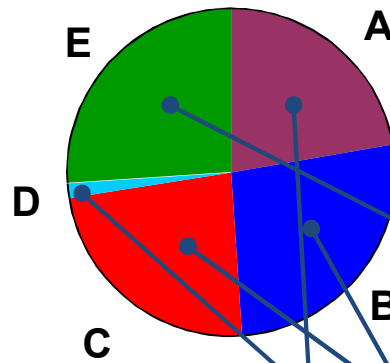
- Retenčný čas je kvalitatívnym údajom slúžiacim na výpočet retenčných indexov (napr. Kovatsovo RI) charakterizujúcim separovanú zlúčeninu. Spolu so šírkou píku sa používajú na výpočet rozlíšenia 2 píkov a počtu pater pre danú kolónu. Ak sa použije hmotnostná spektrometria ďalším údajom pre kvalitatívnu analýzu je hmotnostné spektrum alebo pomer intenzít monitorovaných vybraných iónov zo spektra.



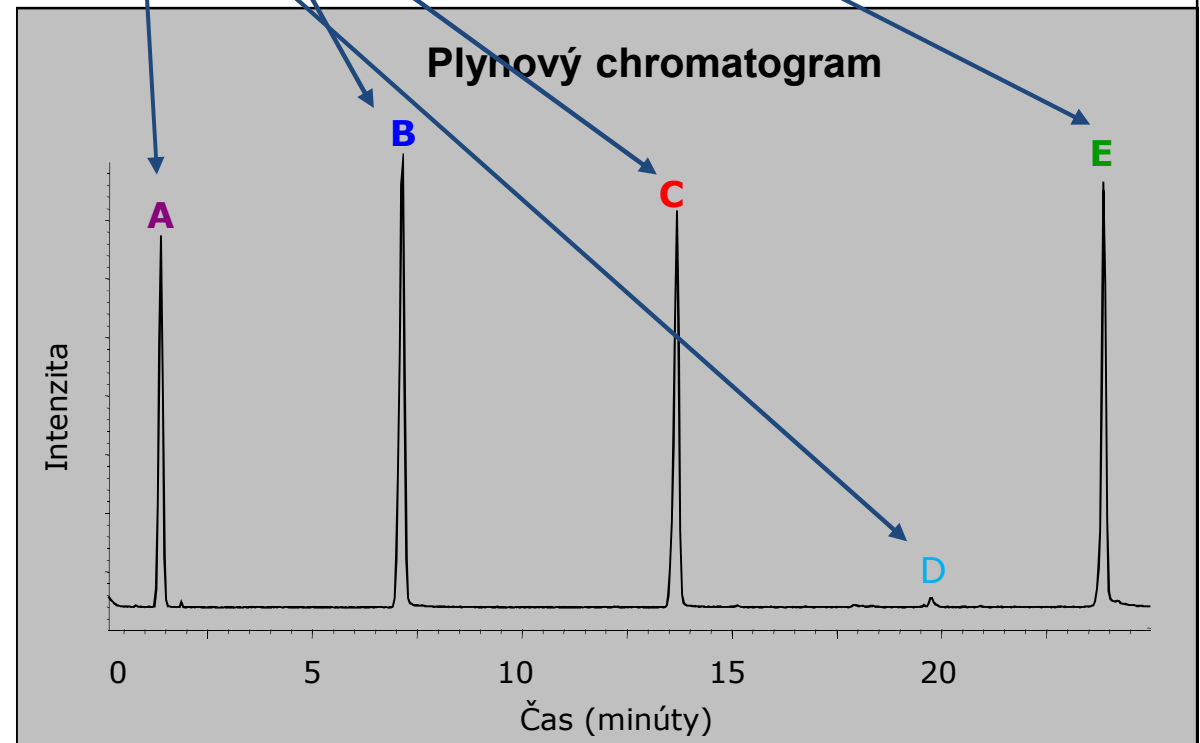
- Kvantitatívnym údajom je plocha píku. Kvantifikácia sa vykonáva porovnaním plochy s údajmi v kalibračnej krivke alebo interným štandardom pridaným do vzorky pred jej spracovaním.

Plynová chromatografia

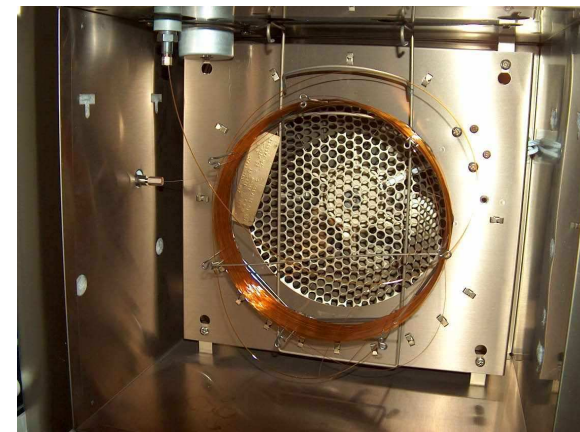
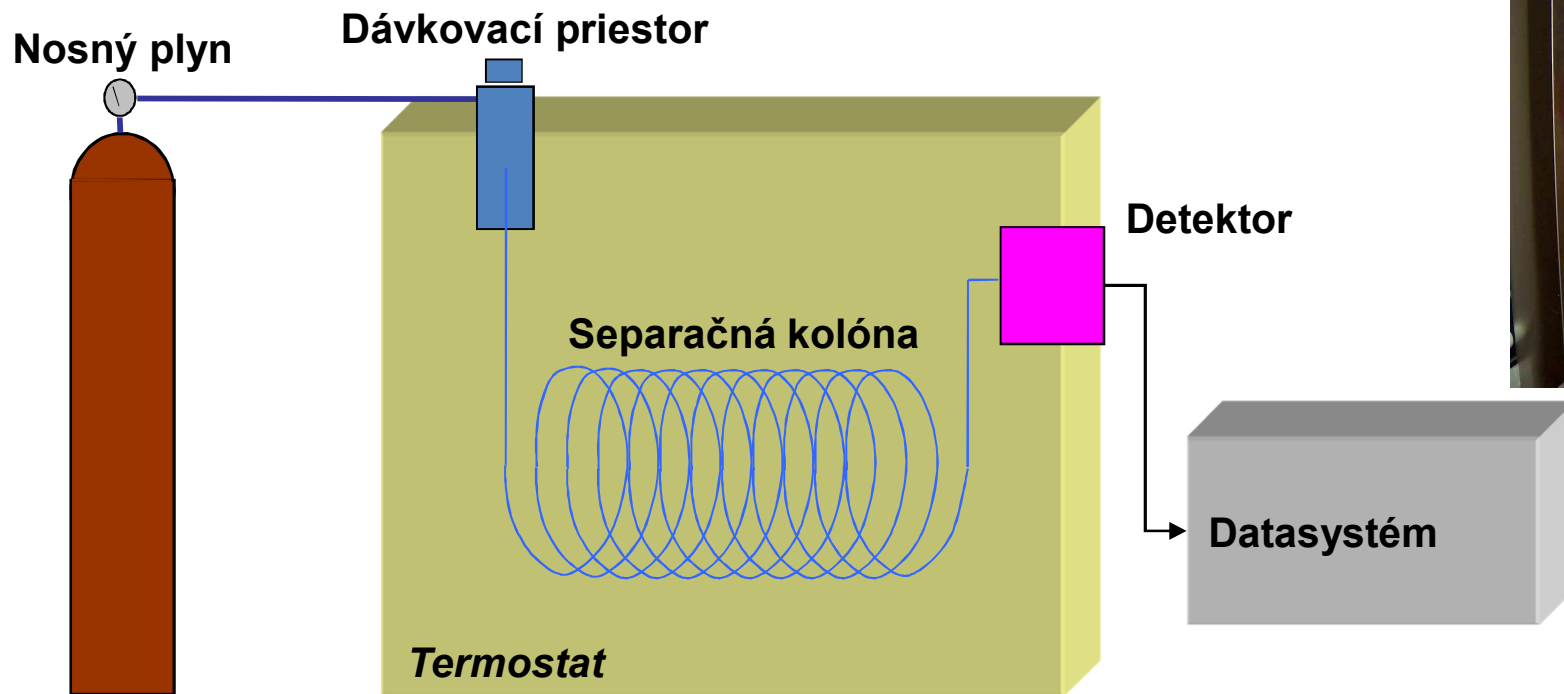
Vzorka:
Zmes organických látok
rozpustených v rozpúšťadle
(vhodná pre látky, ktoré je
možné odpariť bez toho, aby
sa rozložili)



GC separácia PCB produktu Aroclor 1242



Plynový chromatograf



Nosný plyn: He, N₂ alebo H₂; **Prietok:** okolo 1 ml/min
Dávkovací priestor: S delením toku, bez delenia toku, s programovateľnou teplotou, dávkovanie veľkých objemov, a ďalšie.

Separačná kolóna: V súčasnosti takmer výhradne kapilárna kolóna, tj. tenká kapilára s kremenného skla s vnút. priemerom okolo 0,25 mm a dĺžky 30 až 60 m.

GC detektor: Hmotnostnospektrometrický detektor (MSD), detektor elektrónového záchytu (ECD), plameňovo-ionizačný detektor (FID), FID s alkalickým kovom (NP-FID), tepelno-vodivostný detektor (TCD). MS je najselektívnejší ale FID a TCD patria medzi najmenej selektívne, tzv. univerzálne detektory. ECD je selektívnejší ako FID ale menej selektívny ako MS.

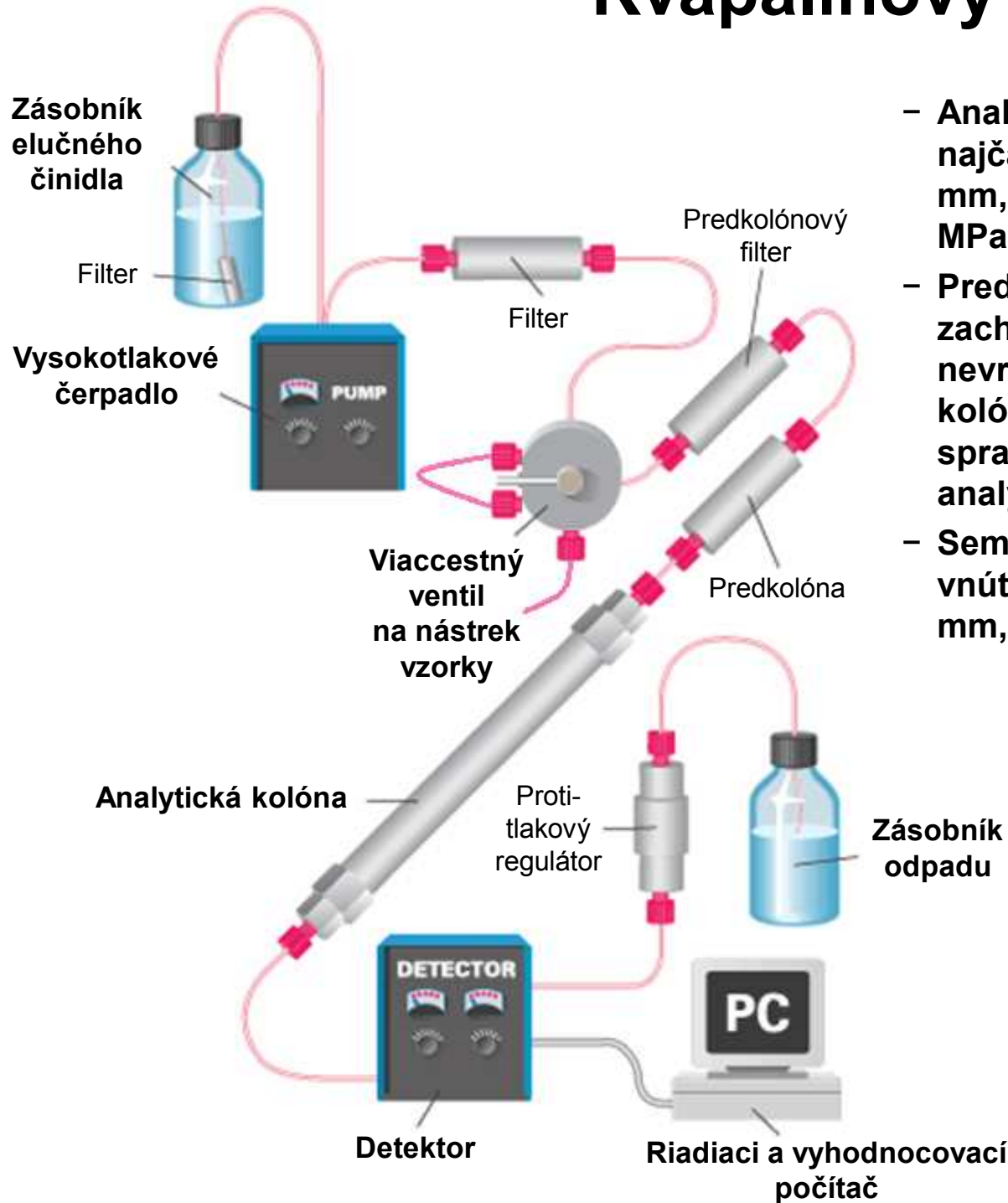


Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

(ultravysokoúčinná, vysokotlaková)

- **Vhodná pre separáciu organických látok, napr. biologicky aktívnych látok, liečiv, vitamínov, drog, bielkovín, metabolických produktov, stereoizomérov, zmesí polárnych látok. Nenahraditeľná na stanovenie tepelne labilných látok (nie je možné použiť GC).**
- **Mobilnou fázou je kvapalina, často zmes kvapalín (napr. voda, metanol, acetonitril, rôzne pufre). Využíva sa gradientová elúcia, t.j. plynulá zmena koncentrácie zložiek v mobilnej fáze.**
- **Stacionárnou fázou je sorbent, napr. chemicky modifikovaný silikagél, oxid hlinitý, rôzne polyméry, aktívne uhlie; Veľkosť častíc už od 1,7 μm .**
- **Detektory: Hmotnostnospektrometrické (LRMS, MS-MS, TOF), optické (absorpčný UV/visible, fotometrický, fluorescenčný, refraktometrický, odparovací detektor rozptylu svetla), elektrochemické (coulometrický, ampérometrický), vodivostný; MS detektor je najselektívnejší.**

Kvapalinový chromatograf



- Analytická kolóna má vnútorný priemer najčastejšie 2,1, 3,0 a 4,6 mm, dĺžku 20 až 250 mm, je umiestnená v termostate, tlak: až 120 MPa
- Predkolóna chráni analytickú kolónu tým, že zachytáva častice, zlúčeniny viažuce sa nevratne na stacionárnu fázu analytickej kolóny, nasycuje mobilnú fázu sorbentom. Je spravidla plnené rovnakým sorbentom ako analytická kolóna. Dĺžka do 30 mm.
- Semipreparatívna a preparatívna kolóna má vnútorný priemer 20 až 50 mm, dĺžku 20 až 250 mm, veľkosť častíc 5 až 10 μm .



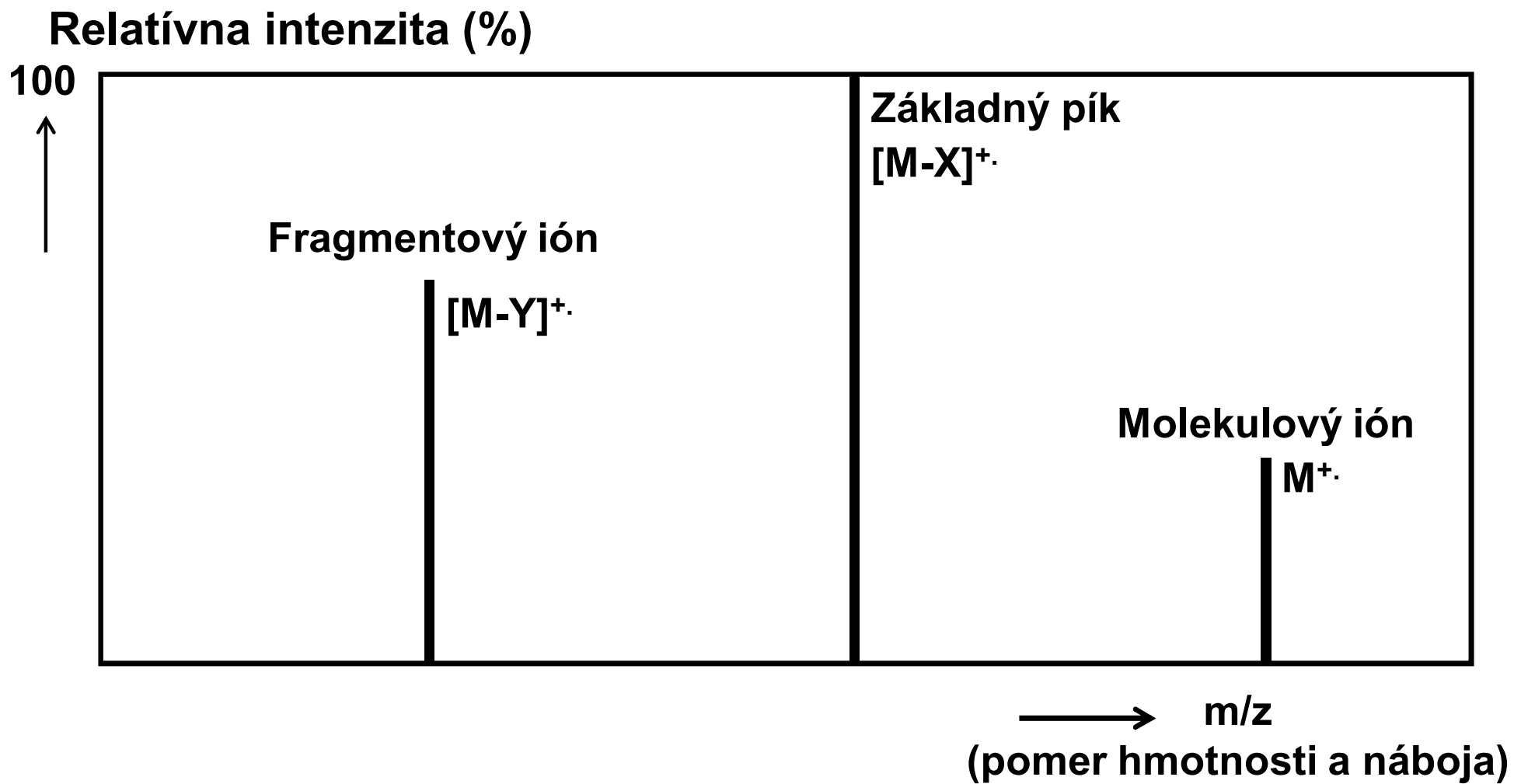
**Kvapalinový chromatograf
v spojení s hmotnostným
spektrometrom**



Hmotnostná spektrometria (MS)

- Používa sa na identifikáciu tak jednoduchších ako aj zložitých organických zlúčenín počínajúc prchavými zlúčeninami a končiac peptidmi pomocou nameraných hmotnostných spektier.
- V posledných 30 rokoch sa masovo využíva ako selektívny detektor v plynovej a kvapalinovej chromatografii v oblasti environmentálnej analýzy, analýzy liečiv, drog, doping, metabolických a degradačných produktov, toxických a esenciálnych prvkov.
- MS je deštruktívny detektor (ako FID), t.zn., zlúčeniny sa počas detekcie chemicky menia. Medzi nedeštruktívne detektory patria, napr. TCD, UV/VIS detektor, refraktometrický detektor. V praxi to znamená, že za nedeštruktívnym detektorom môže byť umiestnený iný detektor.
- MS patrí medzi vysokocitlivé a selektívne detektory.
- MS sa najčastejšie používa v režime nízkeho rozlíšenia (LRMS) využívajúc separáciu iónov napr. kvadrupólovým analyzátorom. Vysokej selektivity a citlivosti sa dosahuje ak sa odseparovaný vybratý ión z 1. stupňa spektrometra znova ionizuje a separuje – tento typ MS sa nazýva tandemová MS (MS-MS).
- Medzi najselektívnejší a najcitlivejší MS detektor patrí vysokorozlišovací hmotnostný spektrometer využívajúci separáciu iónov magnetom a fokusáciu elektrickým poľom. Kvantifikateľnú odozvu poskytuje už niekoľko fg (10^{-15} g) v GC píku.
- Najmä pri identifikačných analýzach nachádza uplatnenie preletový MS (Time-Of-Flight MS) a elektrostatické MS (Orbitrap, cyklotrónový rezonančný MS).

Hmotnostné spektrum

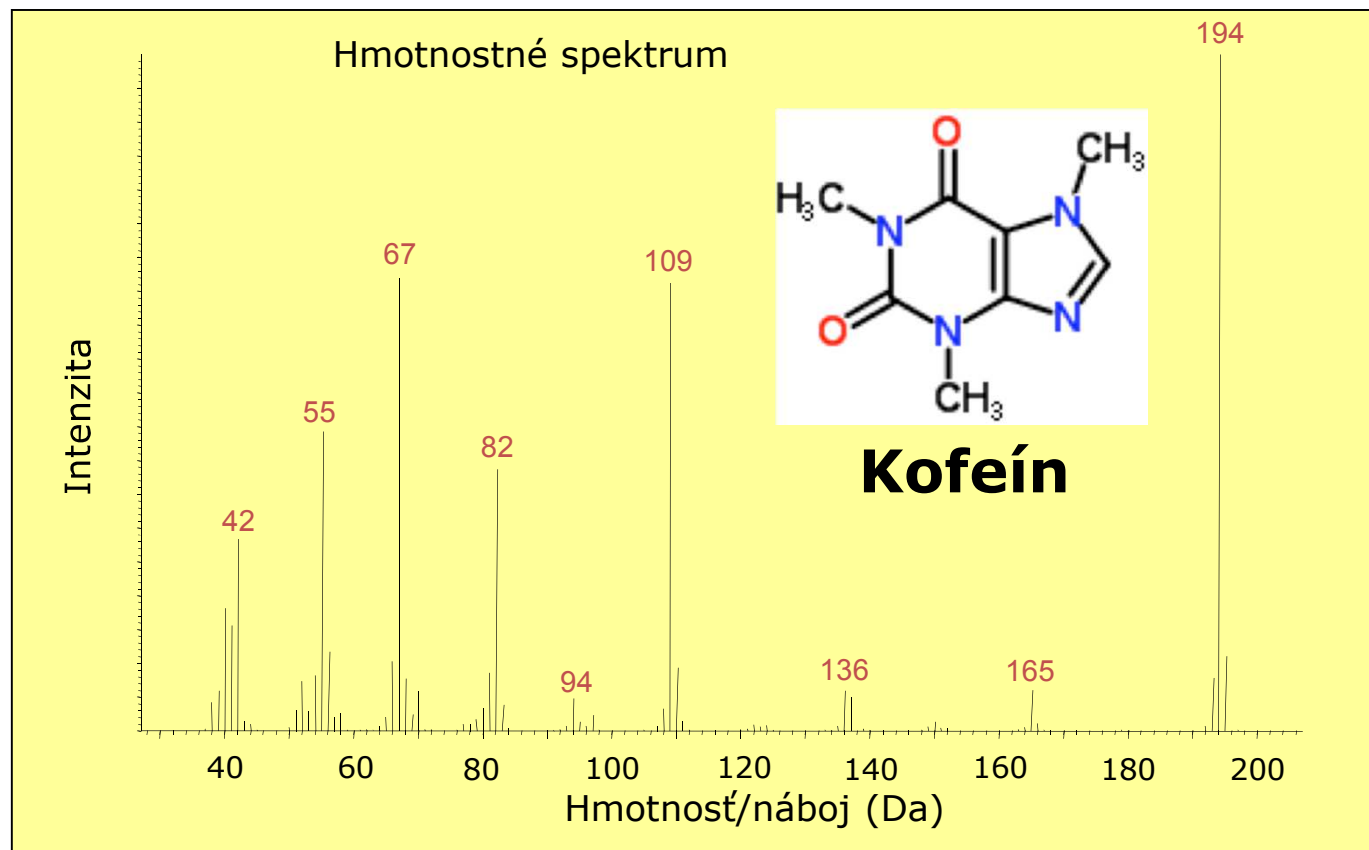


Hmotnostná spektrometria

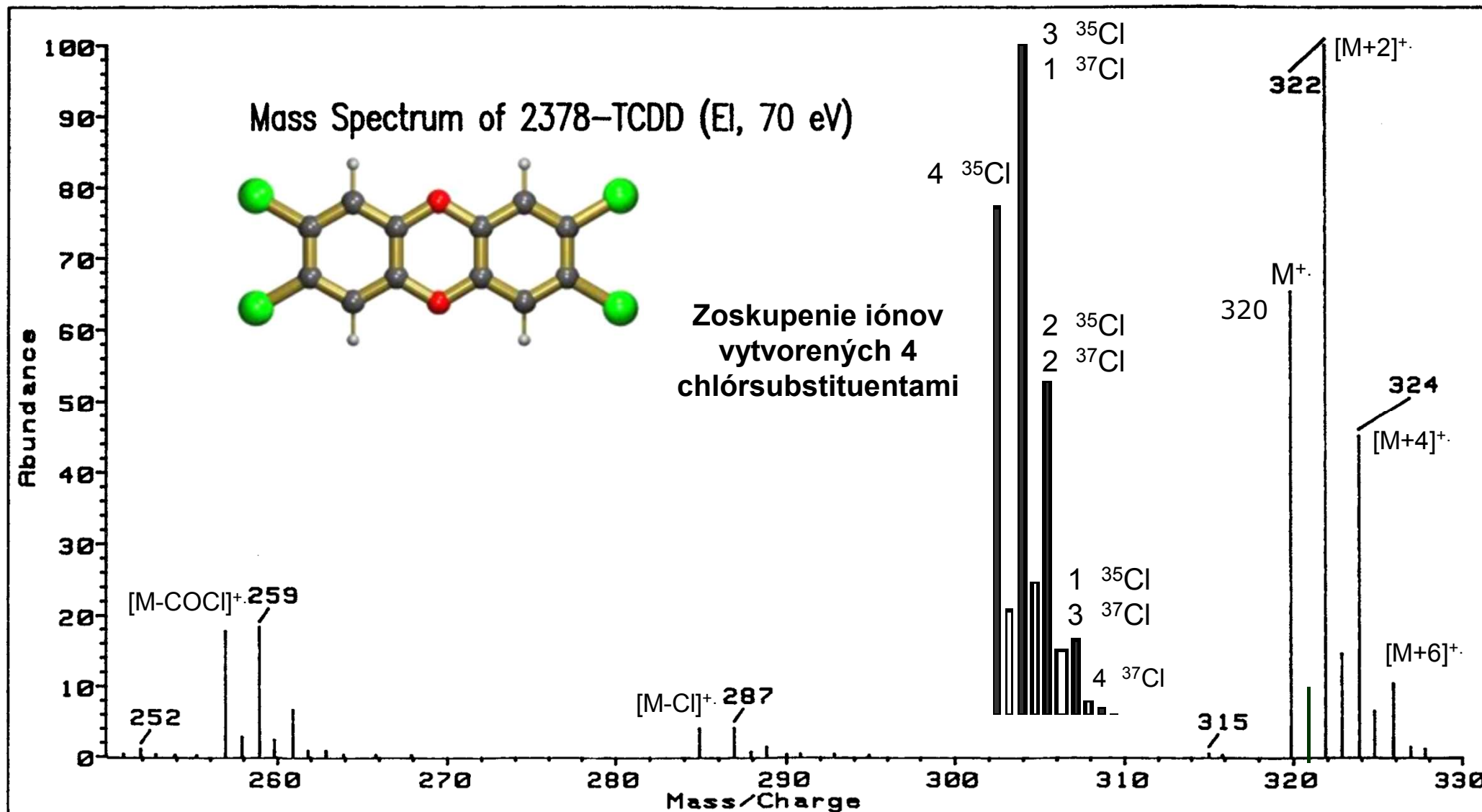
Neznáma látka



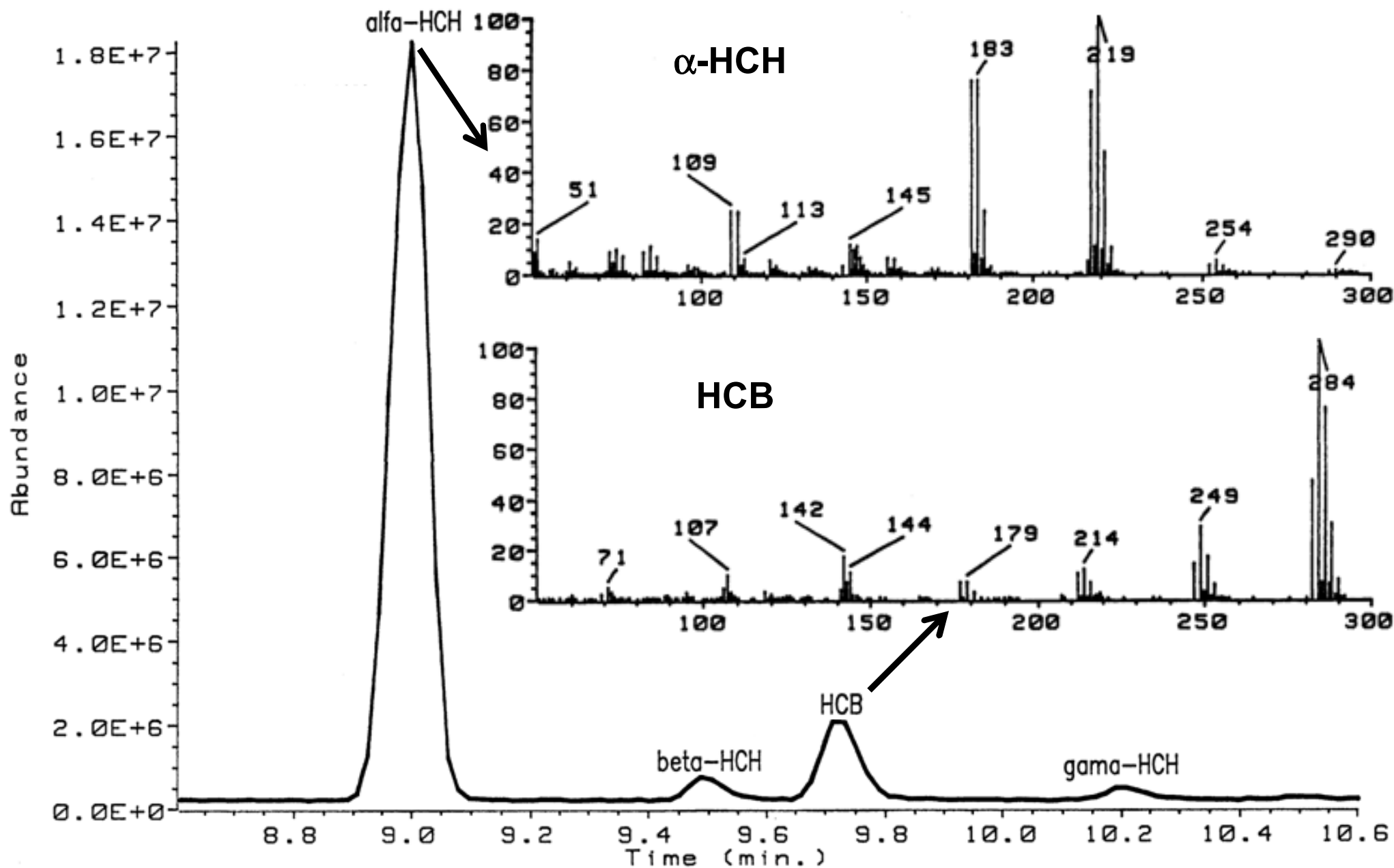
Hmotnostný
spektrometer



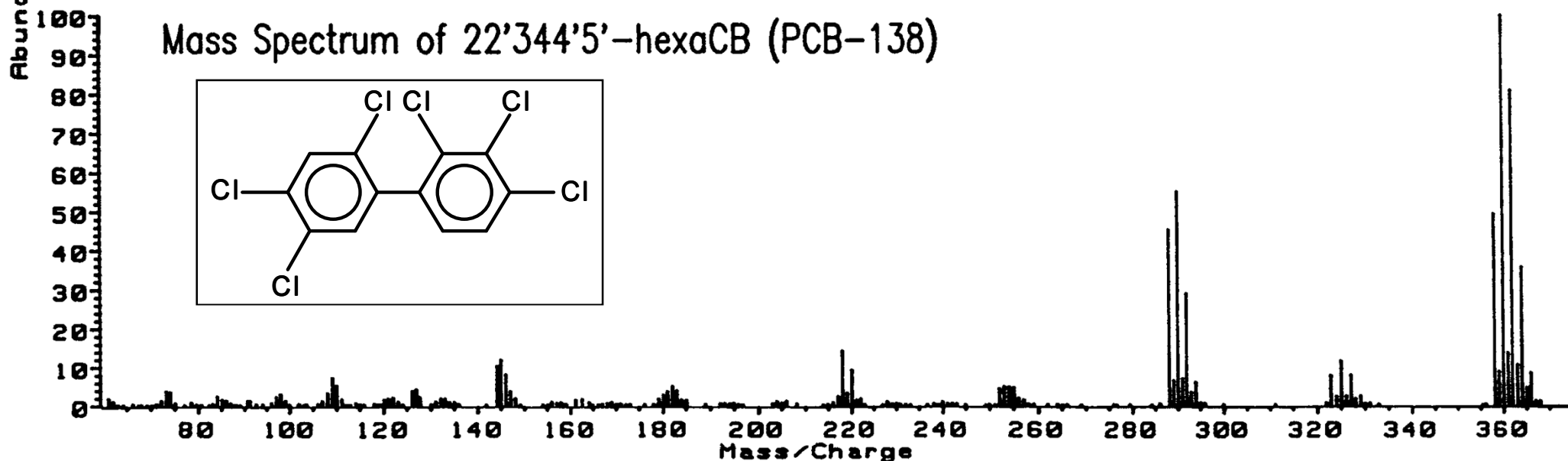
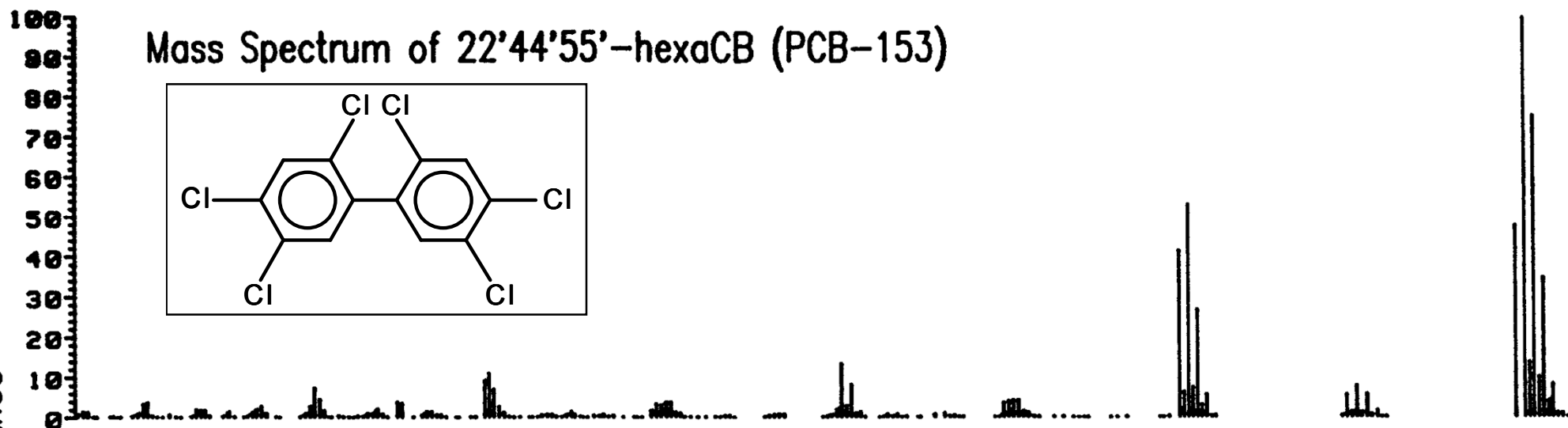
Horný segment hmotnostného spektra 2378-TCDD



Identifikácia zlúčenín v GC/MS zázname pôdneho extraktu pomocou hmotnostných spektier



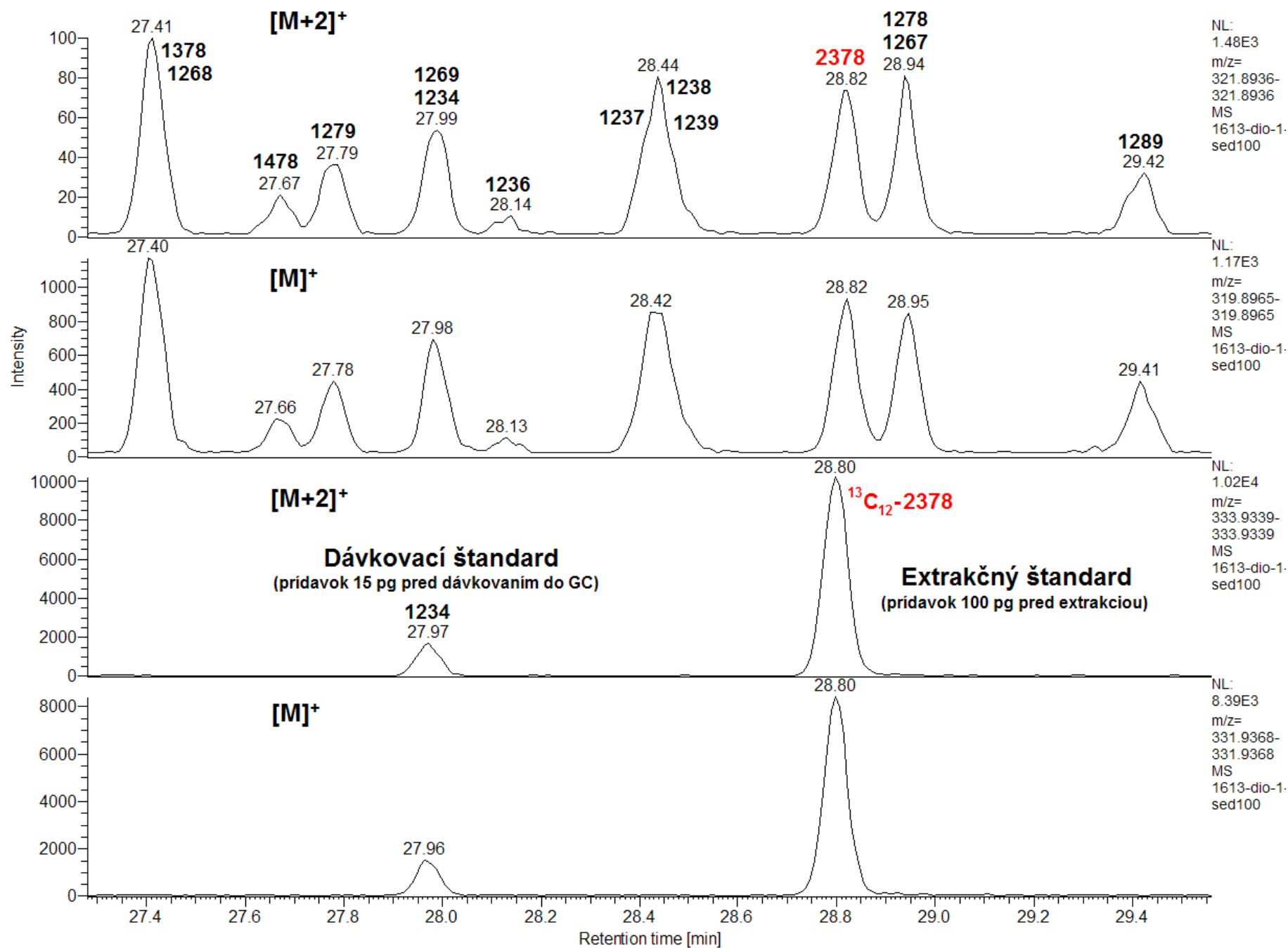
Porovnanie hmotnostných spektier izomérov hexachlórbifenylov



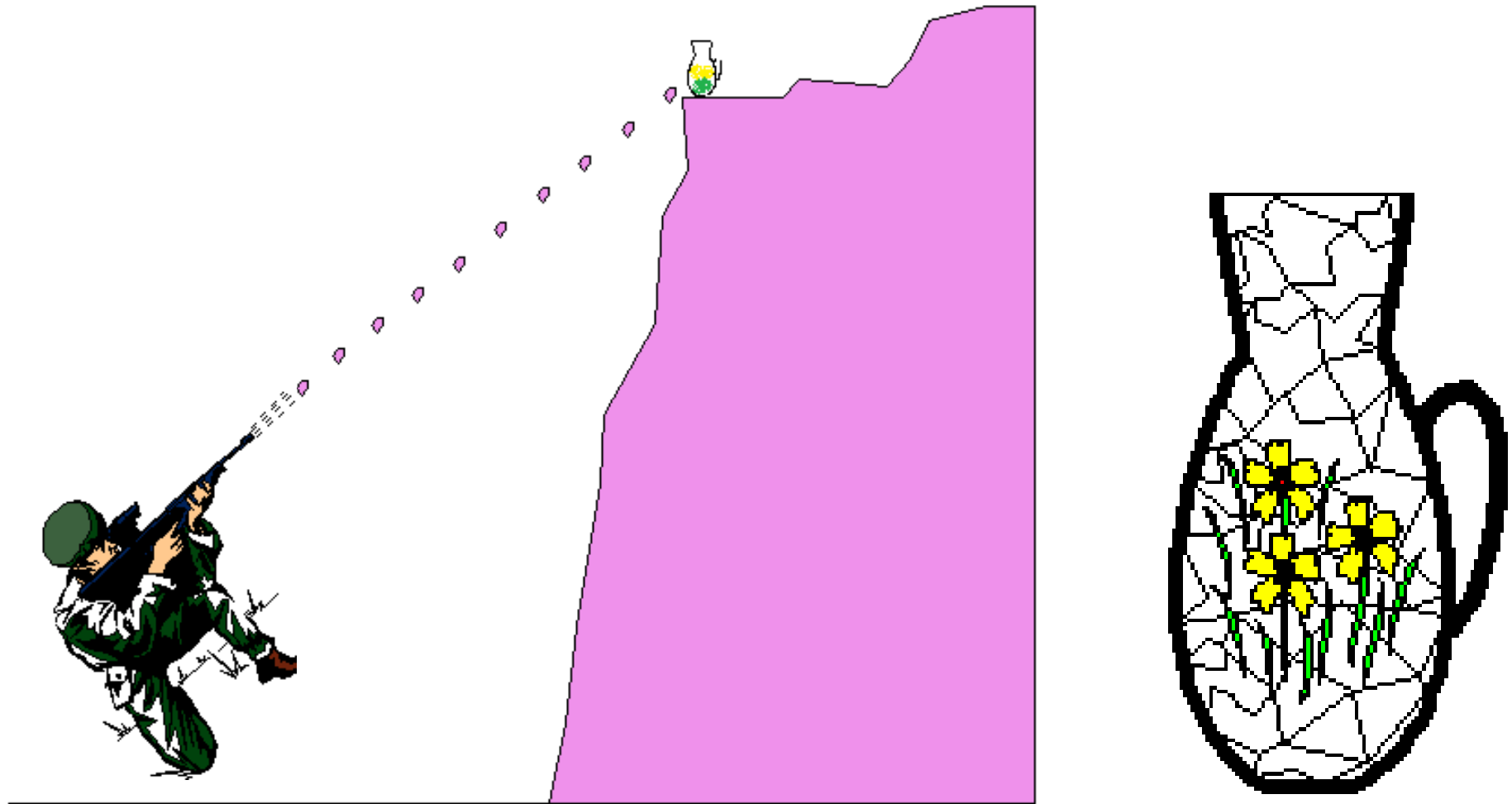
Izoméry: Chemické zlúčeniny, ktoré majú rovnaký sumárny vzorec, ale rozdielny štruktúrny vzorec.

Kongenéry: Chemické zlúčeniny, patria do skupiny látok so spoločnými znakmi. Napr. 2,3,7,8-TCDD je jedným z 210 kongenérovcv PCDD/PCDF.

Analýza 2,3,7,8-tetrachlórdibenzo-*p*-dioxínu vo vzorke sedimentu pomocou GC/HRMS v režime vybraných iónov (SIM, MID) metódou izotopovej zried'ovacej analýzy



Princíp hmotnostnej spektrometrie



- Na vzdialenej skale je váza, na ktorej je niečo namaľované, ale nedá za rozoznať, čo to je – paralela s neznámou zlúčeninou vo vzorke
- Pozorovateľ má iba pušku; Úlomky z vázy zasiahnutej projektilom sa rozsypú po okolí – paralela s bombardovaním molekuly elektrónmi v iónovom zdroji hmotnostného spektrometra
- Úlomky sa poskladajú, a tak sa zistí, čo bolo na váze namaľované – paralela s hmotnostným spektrom a jeho vyhodnotením

Hmotnostný spektrometer

- Všetky MS systémy sa skladajú z týchto častí:

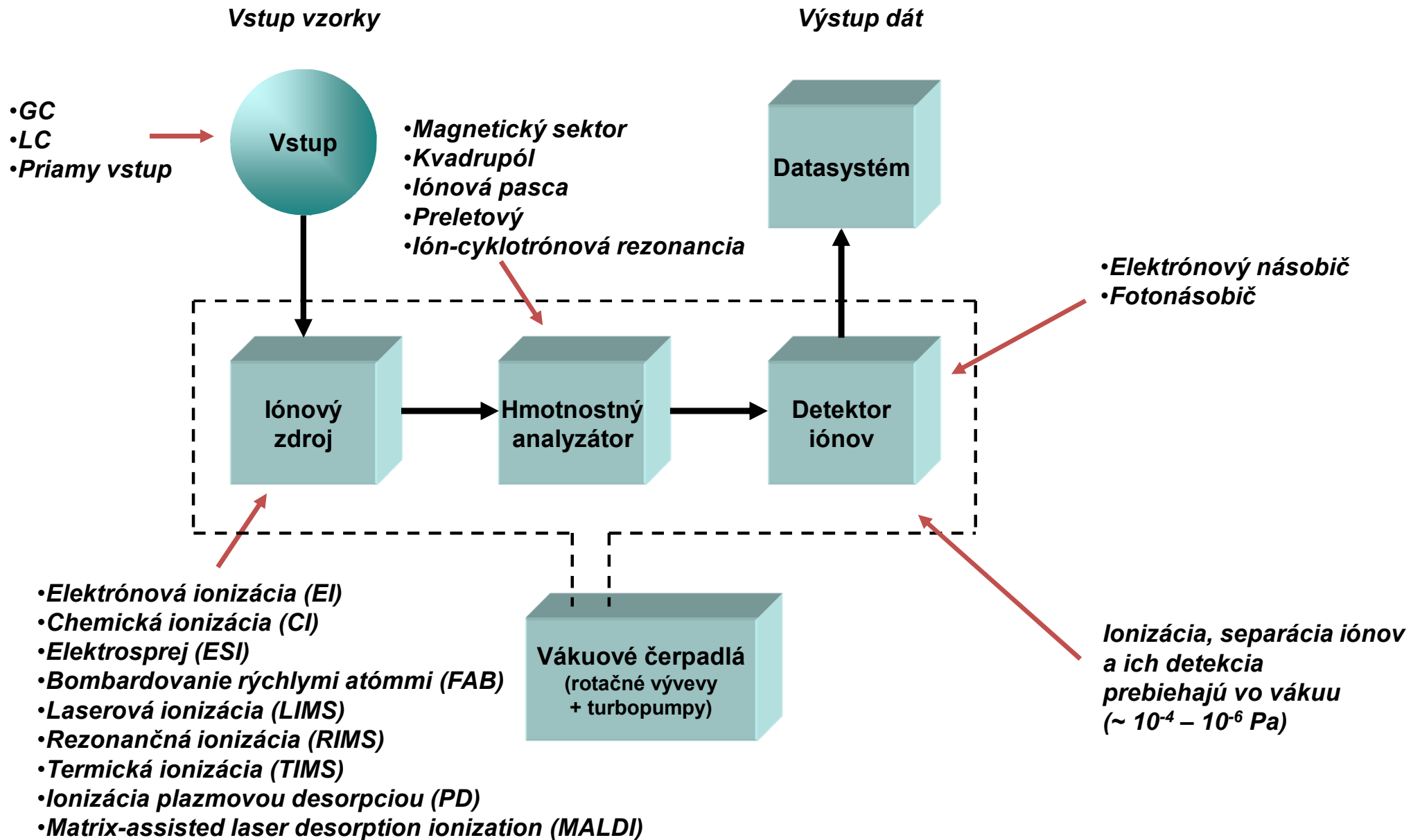
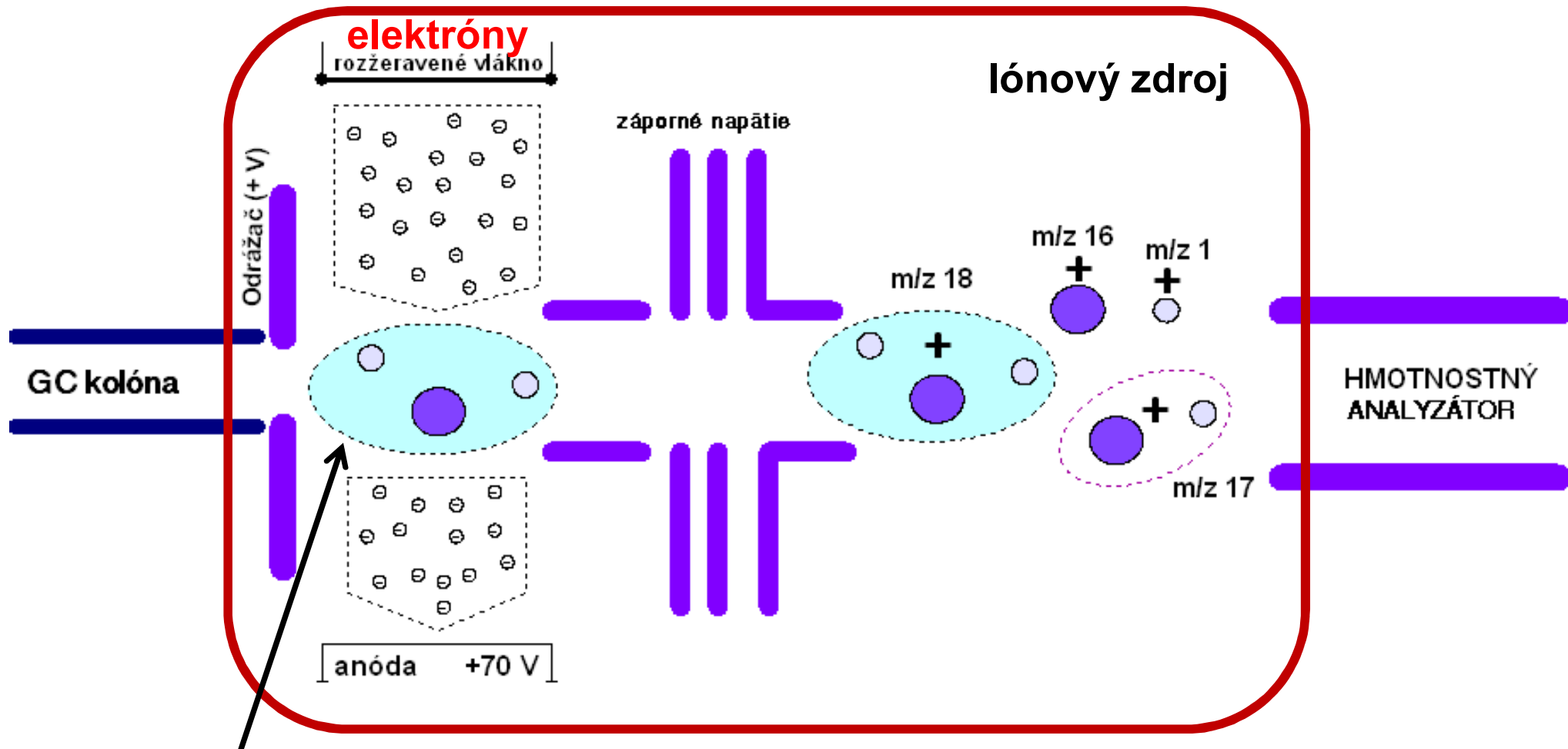


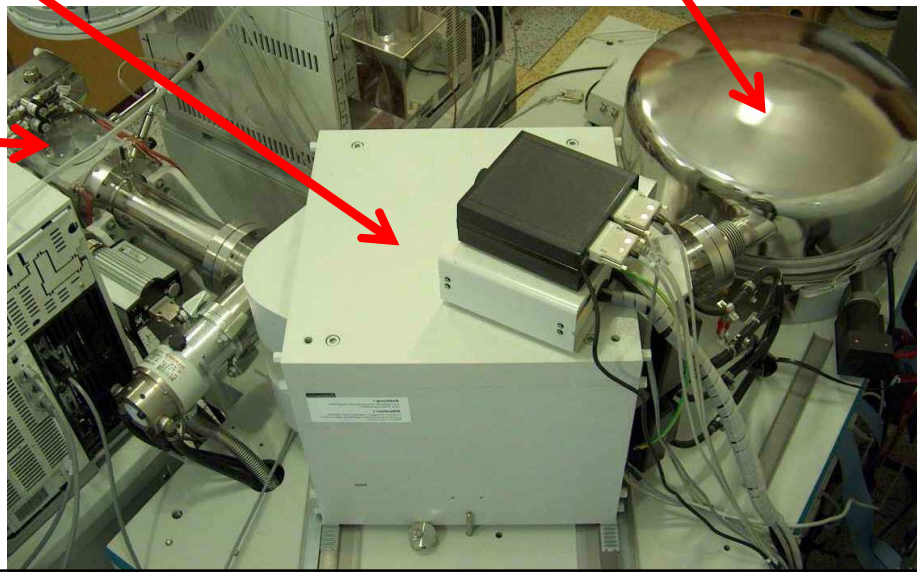
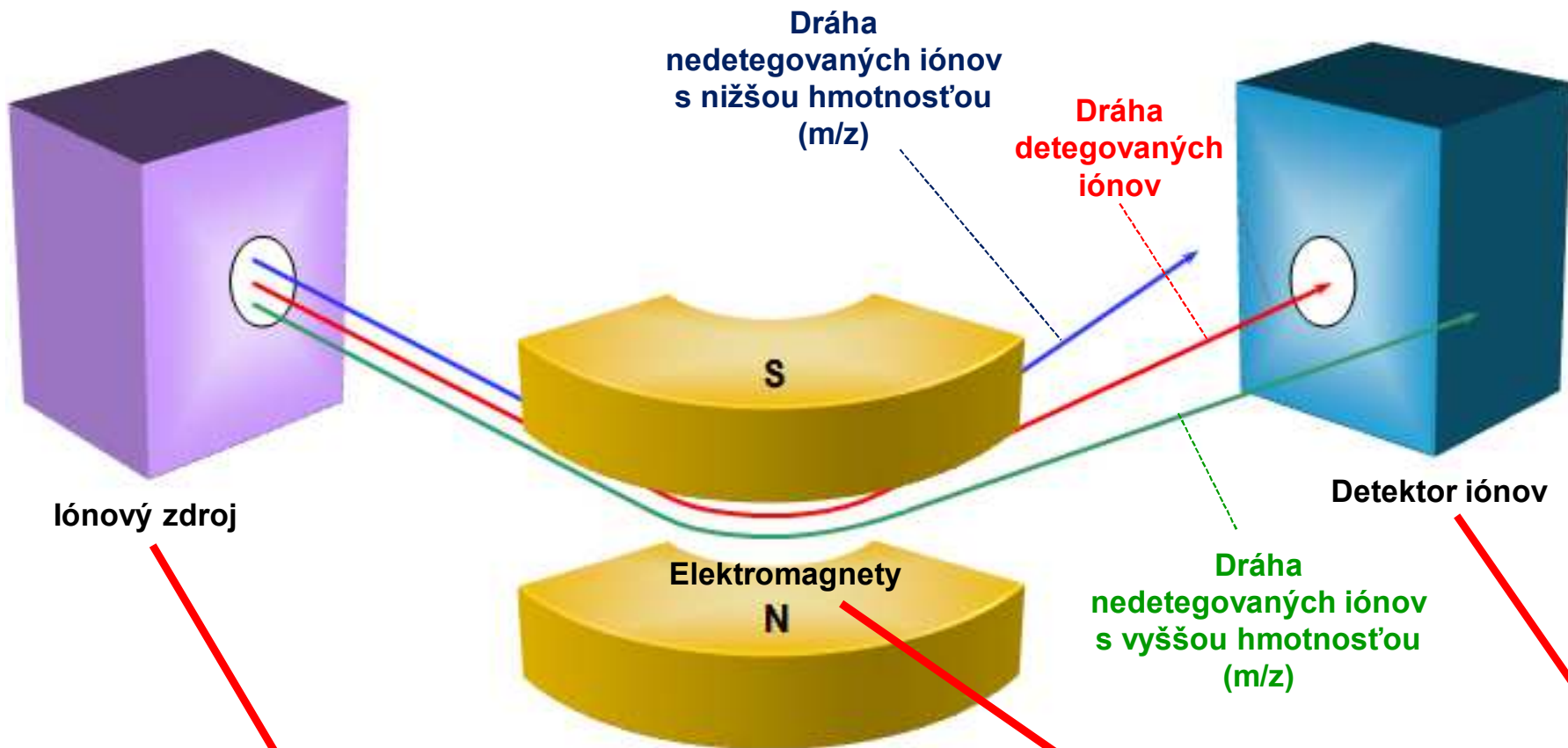
Schéma elektrónovej ionizácie



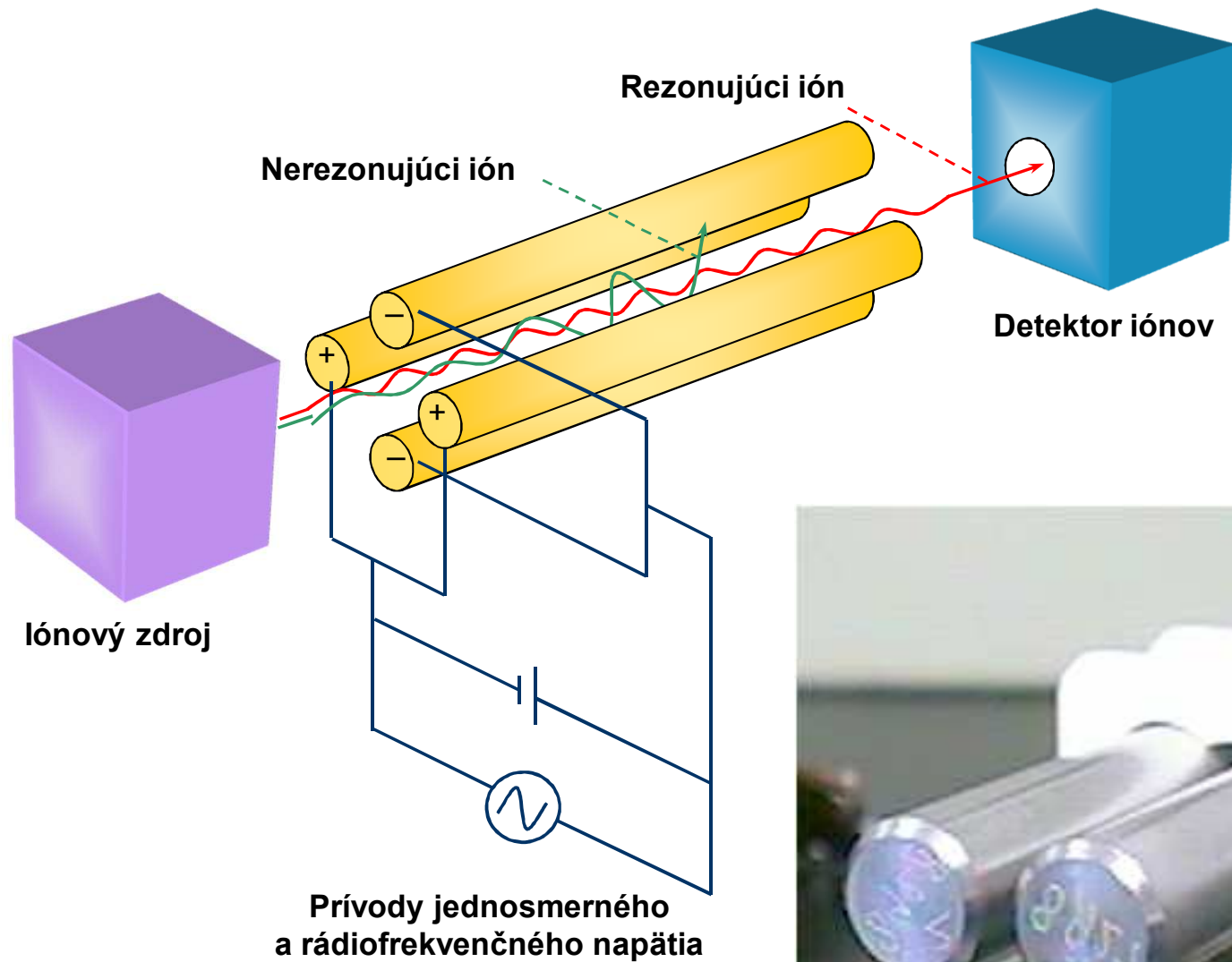
Molekuly, napr. vody



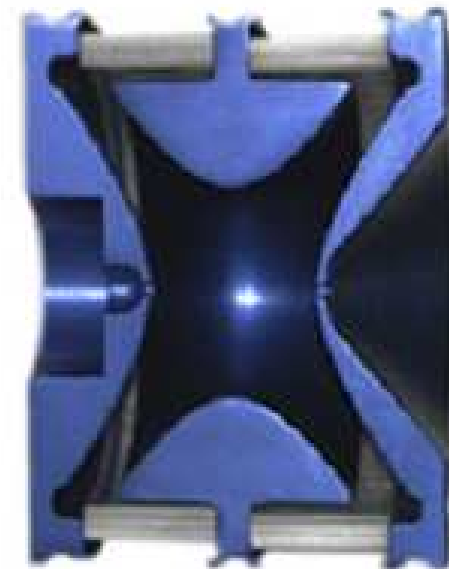
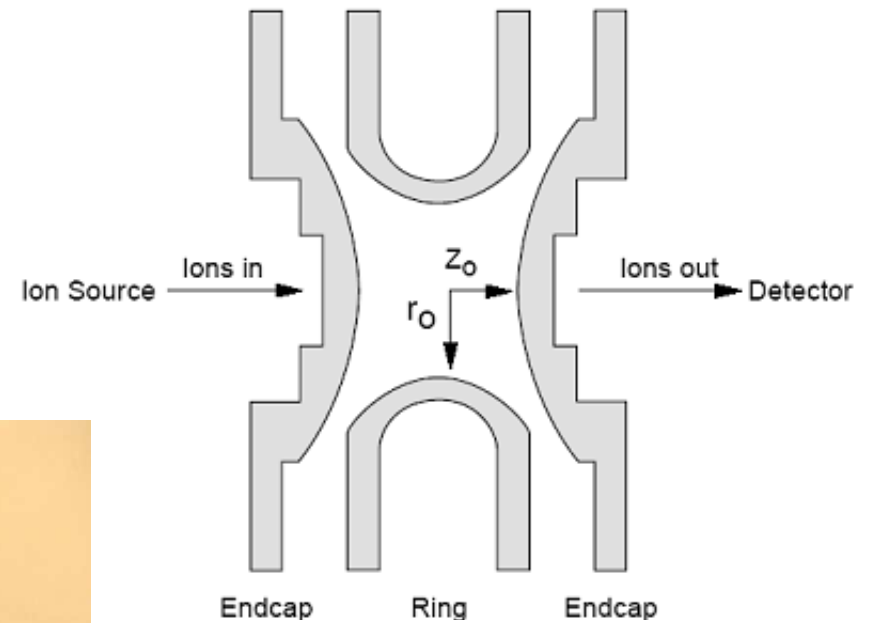
Magnetický sektorový hmotnostný analyzátor



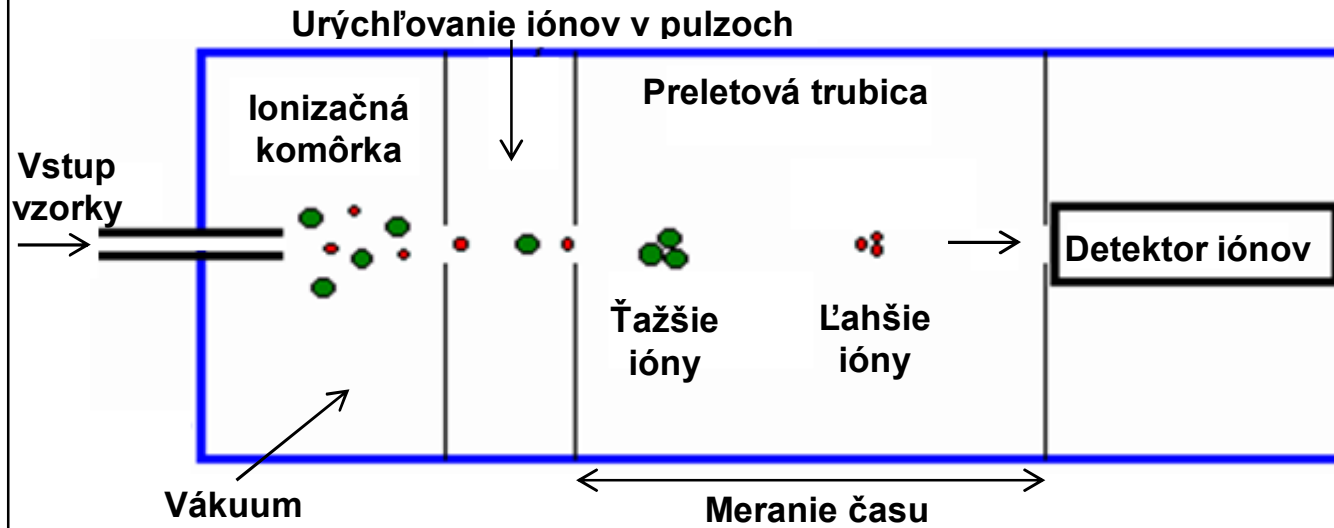
Kvadrupólový hmotnostný analyzátor



Hmotnostný spektrometer s iónovou pascou



Preletový hmotnostný spektrometer (TOFMS)

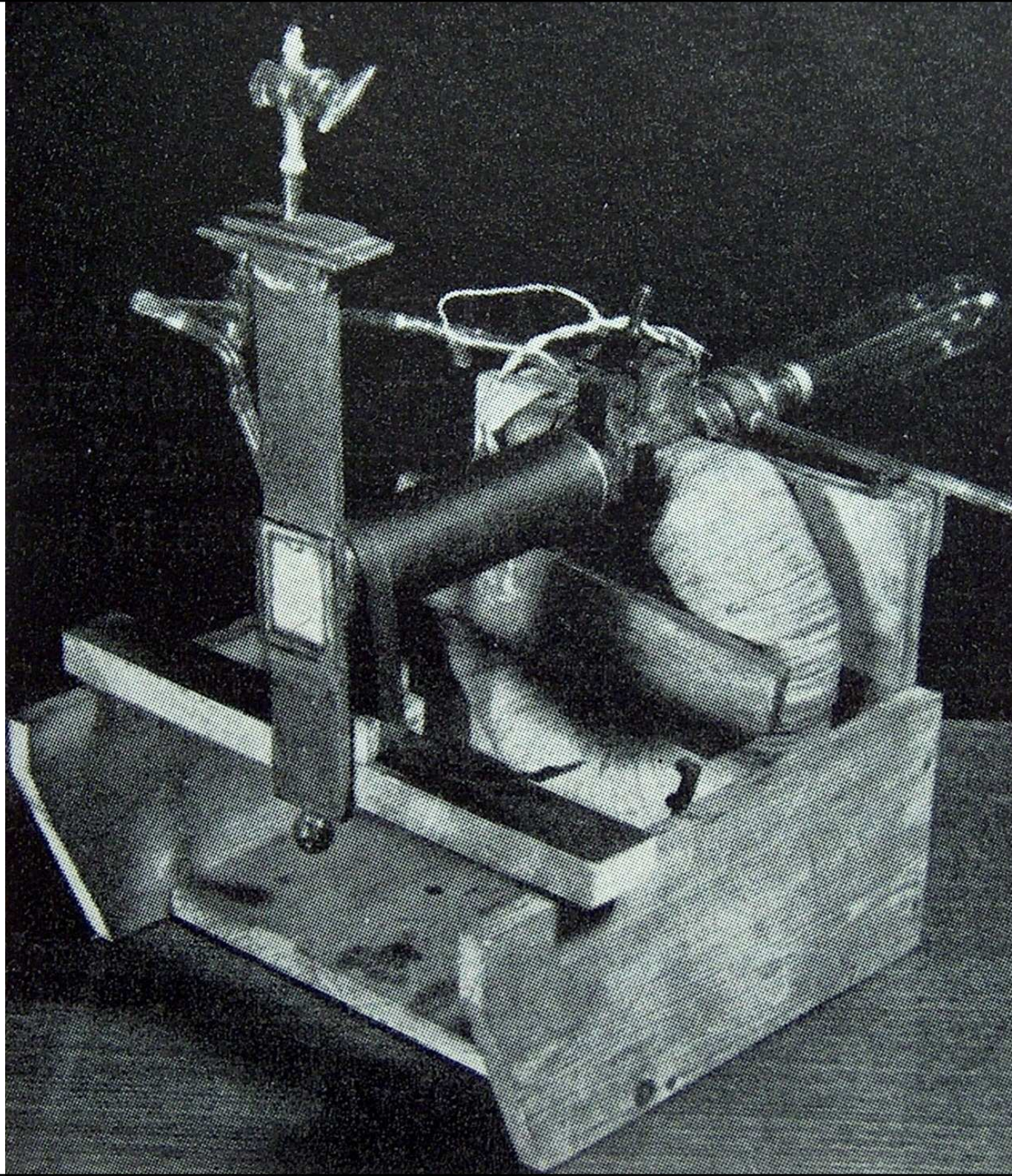


Lineárny TOFMS

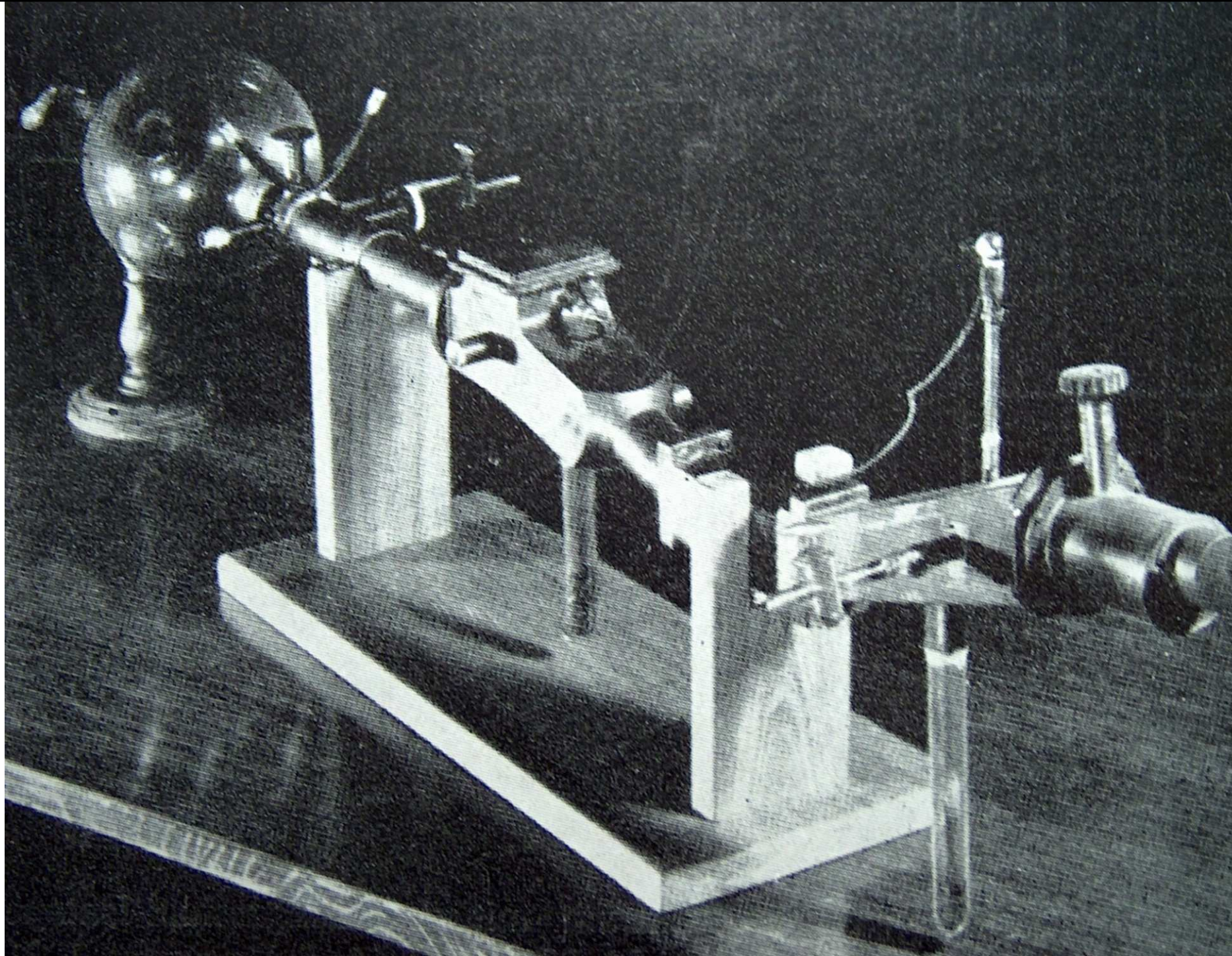


Reflektrónový TOFMS

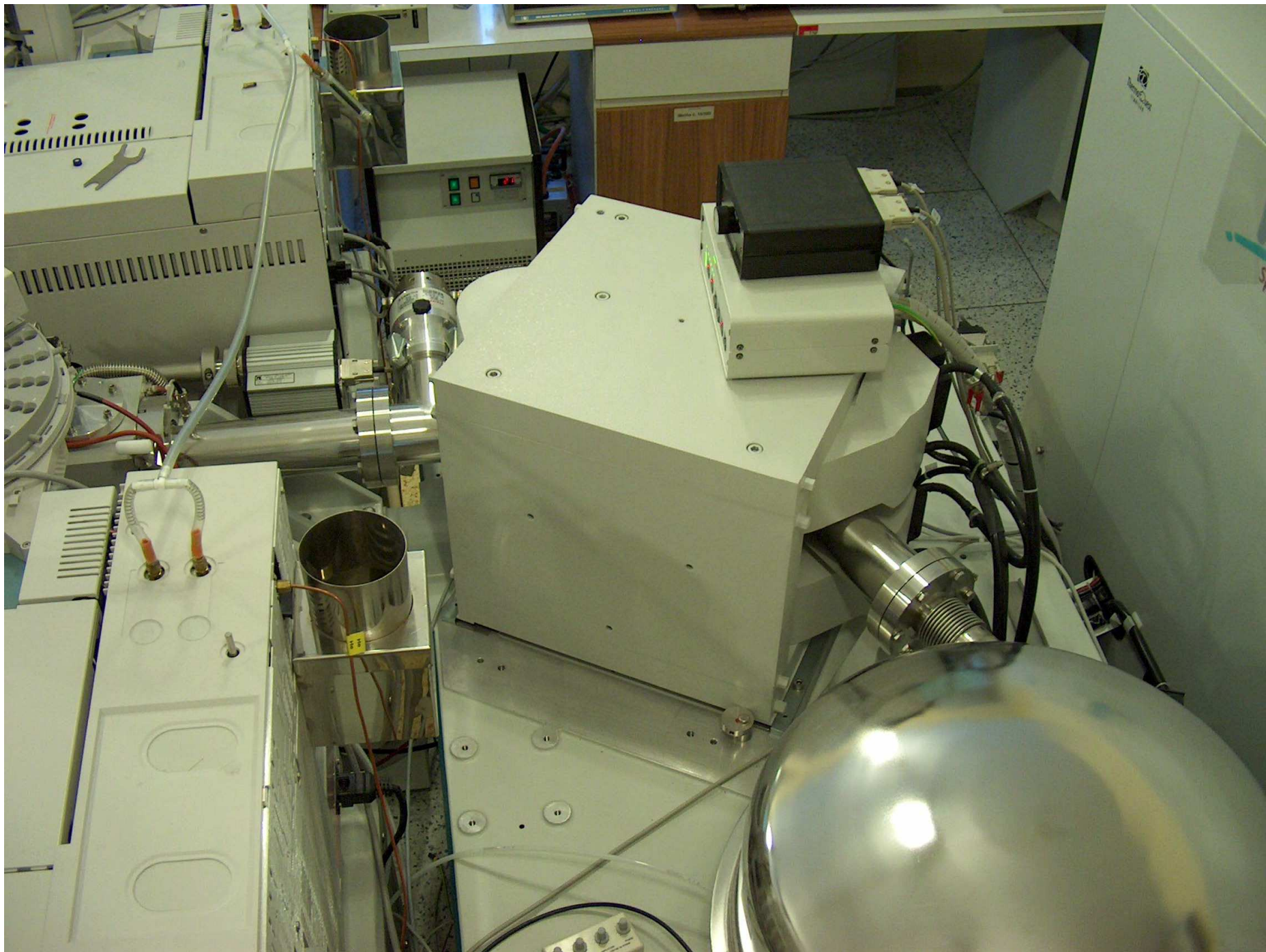




**Fotografia
parabolického
hmotnostného
spektrografu
podľa
Thompsona
z r. 1910**



Hmotnostný spektrograf podľa Astona z r. 1919/20



Vysokorozlišovací hmotnostný spektrometer z r. 2000

Sektorový vysokorozlišovací hmotnostný spektrometer (HRMS) s dvomi plynovými chromatografmi



Tandemový hmotnostný spektrometer (MS-MS) s vysokoúčinným kvapalinovým chromatografom



Tandemové hmotnostné spektrometre (MS-MS) s plynovými chromatografmi



Hmotnostný spektrometer s indukčne viazanou plazmou (ICP-MS) na analýzu kovov a polokovov



Základy správnej laboratórnej praxe (GLP, QA/QC)

- **Výsledky analýz môžu mať značné spoločenské a ekonomické dôsledky, môžu ovplyvňovať závažné rozhodnutia.**
- **Môžu vznikat' pochybnosti o vierohodnosti údajov.**
- **Laboratórium musí vedieť spätne preukázať, ako bola vzorka analyzovaná, prípadne odobratá.**
- **Laboratórium musí v pravidelných intervaloch overovať kvalitu vykonávaných analýz, a to analýzou slepých vzoriek (blank samples), certifikovaných referenčných materiálov (CRM) alebo aspoň referenčných materiálov (RM), zúčastňovaním sa v testoch spôsobilosti (proficiency tests, interlaboratory studies, round robin tests).**
- **Analytické laboratórium by malo byť akreditované ako skúšobné laboratórium podľa normy ČSN ISO/IEC 17025. To ho bude zaväzovať na vedenie potrebnej laboratórnej dokumentácie, validovanie analytických metód, overovanie kvality svojich výsledkov, správnu manipuláciu so vzorkami a odpadom z analýz, zvyšovanie kvalifikácie personálu, atď. Akreditované laboratórium sa musí v pravidelných intervaloch podrobiť interným a externým auditom.**

Výsledky testu způsobilosti pro stanovení PCDD/F, dioxínům podobných PCB a indikátorových PCB ve vepřové klobáse a sádle

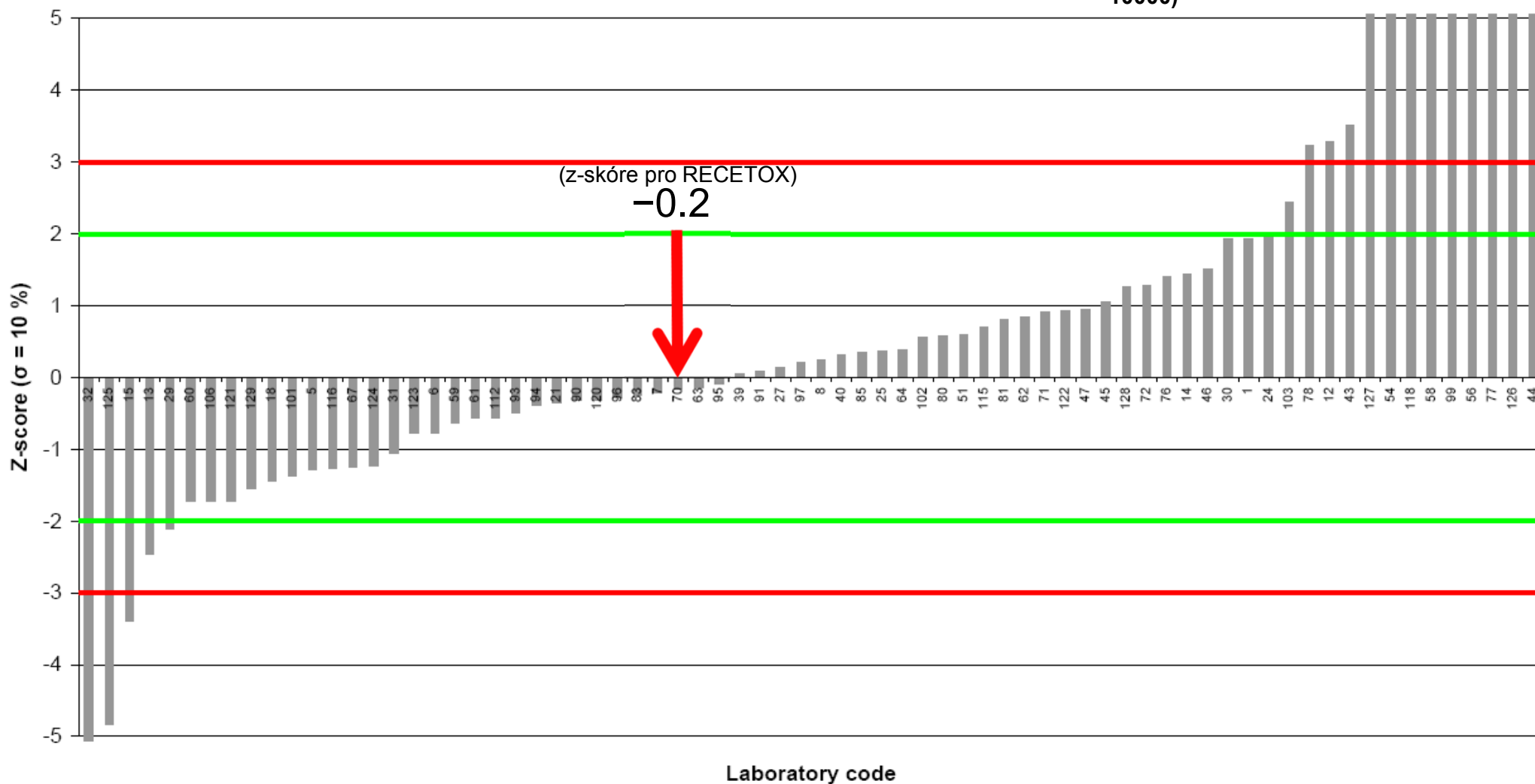
(organizované Referenční laboratoří EU pro dioxiny a PCB v potravinách a krmivech v r. 2012)

Pork sausage (1201-PLA)
WHO-PCDD/F-PCB-TEQ upper bound (reported)

Consensus value: 1.42 pg/g fat

RECETOX value: 1.40 pg/g fat

- Maso vysušeno s bezvodým Na₂SO₄
- Soxhletova extrakce n-hexanem
- K tuku přidáné ¹³C₁₂-Iznačené kongenery
- Čištění s H₂SO₄/na silikagelu, KOH na silikagelu, aktivním uhlí
- GC separace na 60m koloně DB5-MS
- Kvantifikace pomocí HRMS (rozlišení 10000)

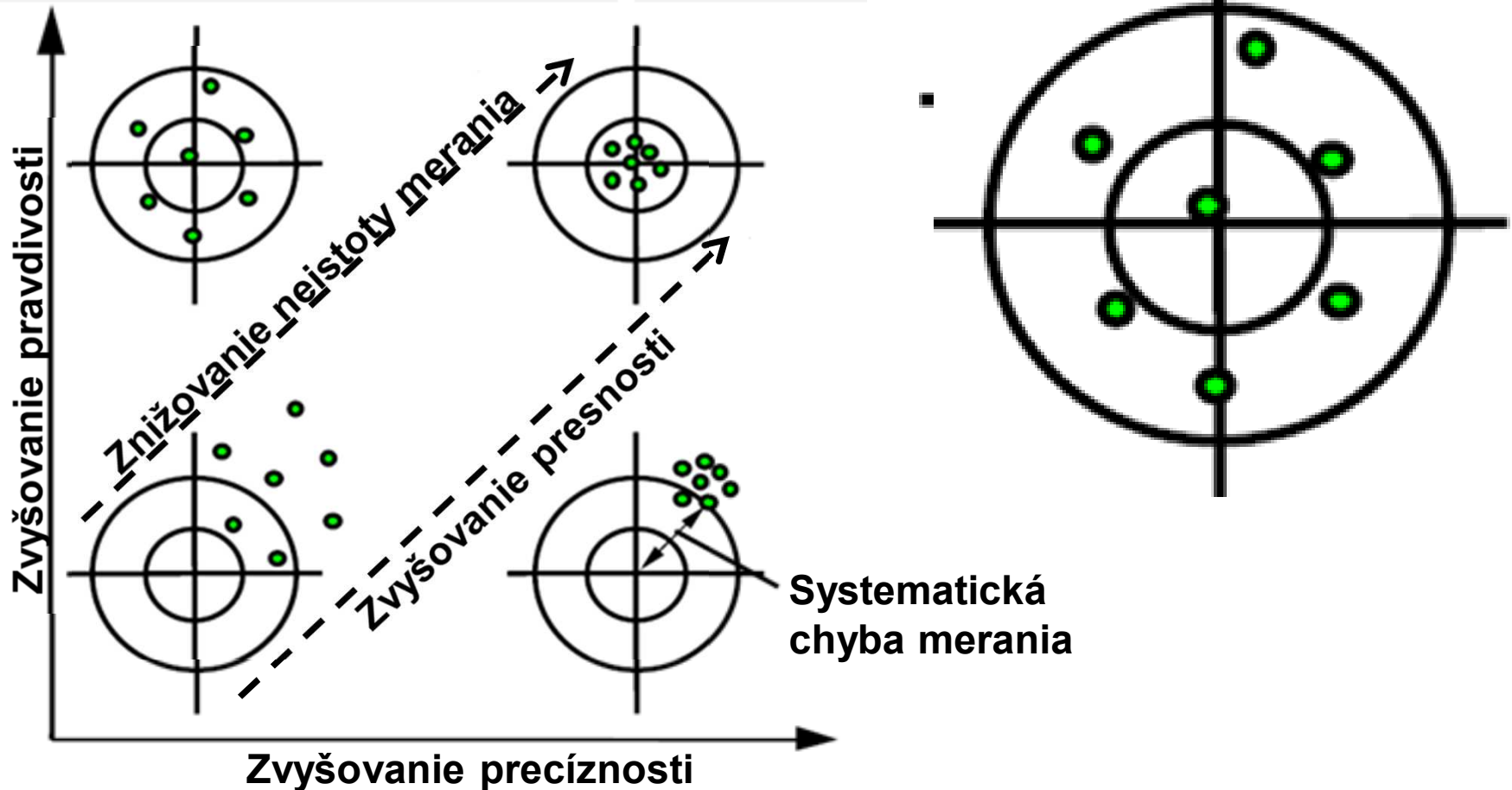


Pojmy popisující nejistotný přístup k měření v analytické chemii

Preciznost: Těsnost shody mezi naměřenými koncentracemi získanými opakovanými měřeními na stejném vzorku
(precision)

Pravdivost: Těsnost shody mezi aritmetickým průměrem nekonečného počtu opakovaně naměřených koncentrací a referenční hodnotou
(trueness)

Přesnost: Těsnost shody mezi naměřenou koncentrací a skutečnou koncentrací
(accuracy)



Príklad realizácie systému kvality v analytickom laboratóriu využívajúcom plynovú chromatografiu

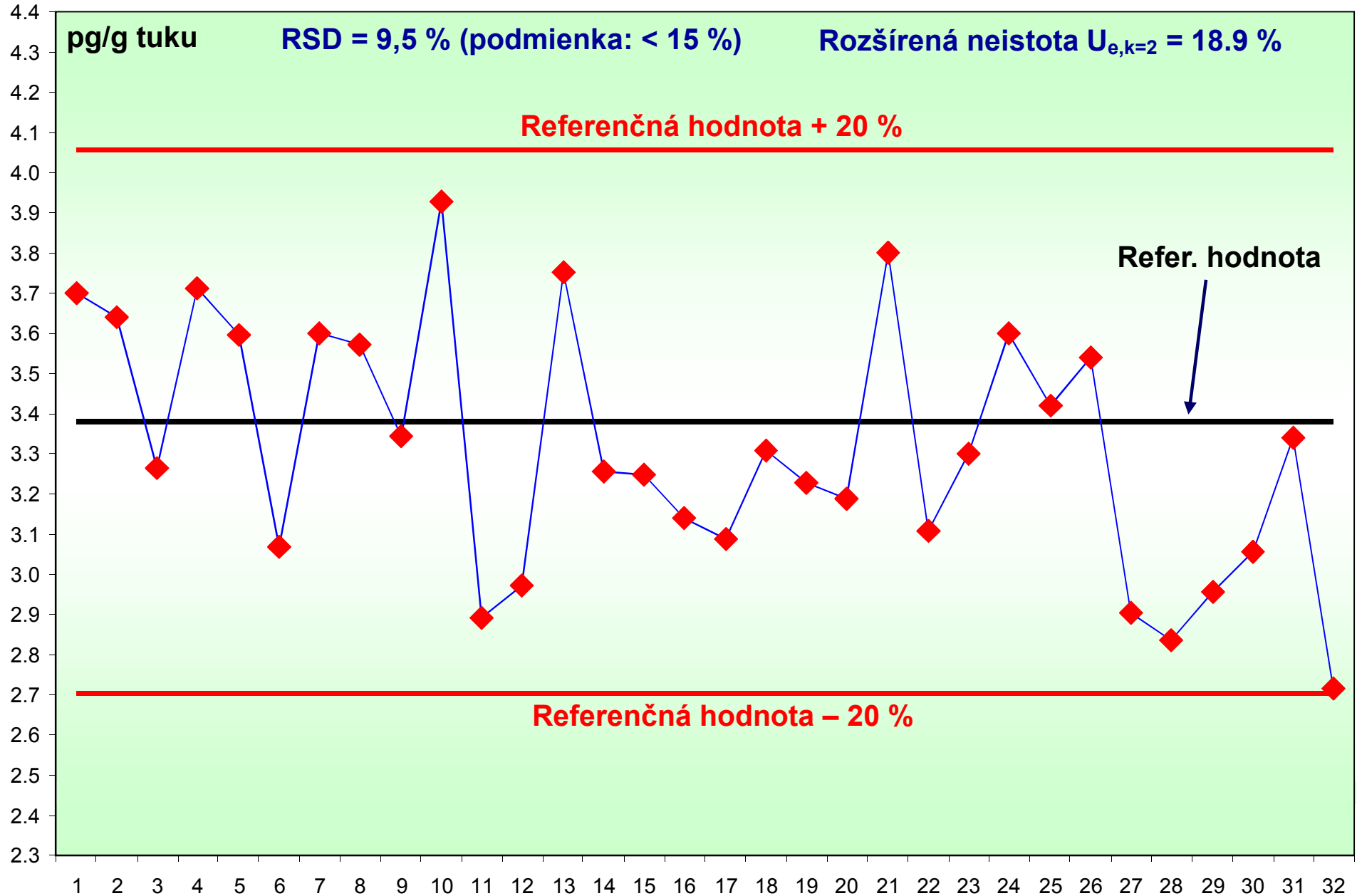
- **Údržba meracích zariadení sa vykonáva podľa plánu údržby.**
- **Dokumentácia týkajúca sa analýzy sa archivuje (napr. 5 rokov) – protokoly z odberov a spracovania vzoriek, GC/MS záznamy kalibračných roztokov, blankov, RM a vzoriek, parametre GC/MS meraní.**
- **Kalibračné krivky sa tvoria najmenej z 5 koncentračných úrovní v lineárnej oblasti detektora.**
- **Stabilita kalibračnej krivky sa kontroluje denne kalibračným štandardom so strednou koncentráciou.**
- **V sade nie viac než 10 vzoriek sa analyzuje aj vzorka na slepý pokus (SP) a vzorka referenčného materiálu.**
- **Koncentrácia analytu v blanku nesmie prekročiť hodnotu predpísanú v štandardnom operačnom postupe (SOP) alebo v norme (oficiálnej metóde) – spravidla je to $< 1/10$.**
- **Výsledky meraní najčastejšie CRM alebo RM sa vnášajú do (Shewhartovho) regulačného diagramu; Musia spĺňať požiadavky dané metódou, t.j. precíznosť (napr. relatívna smerodajná odchýlka $< 15\%$) a pravdivosť (napr. v intervale $\pm 20\%$ od referenčnej hodnoty)**

Shewhartove regulačné diagramy a kvalita analytických meraní

- Snahou je udržať merací proces v štatisticky zvládnutom stave, aby sa zabezpečila požadovaná zhoda výsledkov
- Konkrétne pri stanovení PCDD/PCDF a dioxínom podobných PCB v potravinách a krmivách sa za účelom úradnej kontroly podľa nariadení (ES) č. 1883/2006 a č. 152/2009 požaduje, aby v koncentračnej oblasti maximálnych limitov bola relatívna chyba merania, ktorá vyjadruje pravdivosť merania $\leq 20 \%$ a relatívna smerodajná odchýlka (RSD), ktorá vyjadruje precíznosť merania $< 15 \%$.
- Regulačný diagram obsahuje centrálnu priamku (CL) rovnobežnú s osou x ; Hodnota y predstavuje referenčnú hodnotu, napr. priemer meraní, koncentráciu v RM, atď.
- Hranice reg. diagramu môžu predstavovať priamky vzdialené od CL o hodnotu $3s$ na každú stranu (je pravdepodobné, že 99,7 % hodnôt sa bude nachádzať medzi dolnou [LCL] a hornou [URL] reg. medzou); Je vhodné zakresliť aj tzv. výstražné medze pri hodnote $\pm 2s$ (~ 68 % hodnôt v intervale)
- Pre analytické stanovenia má vedenie reg. diagramov prínos v tom, že manažér kvality dostáva rýchlu informáciu o stave kvality meraní

Regulačný diagram precíznosti stanovenia $TEQ_{PCDD/PCDF}$ v referenčnom materiáli

(slniečnicový olej s prídavkom 17-ich štandardov) za obdobie 2001–2009



Definice některých pojmů v analytické chemii

Analyt (Analyte)

Konkrétní sloučenina, prvek, ion, funkční skupina, nebo jejich kombinace ve vzorku, jehož přítomnost nebo množství je určováno metodami analytické chemie

Vzorek (Sample)

Část materiálu vybraná z jeho většího množství

Vzorkování

(Sampling)

Činnosti související s přípravou a zpracováním plánu vzorkování, s vlastním odběrem vzorku a dalším nakládáním se vzorkem a činnosti související se zpracováním příslušné dokumentace

Plán vzorkování

(Sampling plan)

Předem stanovený postup pro výběr, odběr, úpravu na místě, dopravu a přípravu dílčích vzorků nebo vzorků, které budou odebrány ze základního souboru jako vzorek

Bod odběru

(Sampling point)

Pozice, ze které je vzorek odebrán, definovaná jednoznačně a nezaměnitelně prostorovými a časovými souřadnicemi

Protokol o odběru vzorku

(Sampling protocol)

Dokument obsahující všechny potřebné informace o místě, způsobu provedení odběru vzorku a jeho dalším zpracování

Mez detekce

(Limit of detection, LOD)

Naměřená hodnota analytu, který je přítomen ve vzorku s pravděpodobností β , přičemž pravděpodobnost jeho nepřítomnosti je α

Mez stanovitelnosti

(Limit of quantification, LOQ)

Nejnižší množství analytu ve vzorku, které jsme schopni stanovit jako exaktní hodnotu se stanovenou nejistotou

Nejistota měření

(Measurement uncertainty)

Při výpočtu nejistoty se může vycházet ze statistické analýzy série opakovaných měření např. CRM (nejistota typu A) a/nebo příspěvku deklarovaných nebo odhadnutých nejistot z jednotlivých složek analýzy (nejistota typu B)

Vytěžnost (Recovery)

Podíl stanoveného množství analytu nebo jeho ekvivalentu ve vzorku po jeho zpracování (extrakce, čištění) k množství této látky přidané ke vzorku před jeho zpracováním

Štandardný operačný postup v analytickom laboratóriu

- **SOP je súbor písomných inštrukcií, ktoré popisujú rutinnú alebo opakujúcu sa činnosť v analytickom laboratóriu.**
- **Účelom SOP je, aby sa činnosti vykonávali správne a vždy rovnakým spôsobom. SOP sú neoddeliteľnou súčasťou systému kvality v analytickom laboratóriu.**
- **Technický SOP stručným a jasným spôsobom zrozumiteľným pre pracovníka so znalosťami práce v laboratóriu popisuje ako realizovať určitý analytický postup. SOP môže popisovať kompletný analytický postup, t.j. od úpravy vzorky pred extrakciou, extrakciu, čistenie, frakcionáciu, zakoncentrovanie, separáciu pomocou GC, detekciu pomocou MS, vyhodnotenie GC/MS záznamov a výpočet koncentrácií analytov. Pre každý z uvedených krokov však môže existovať samostatný SOP a na výkon analýzy sa potom použije súbor vybraných SOP.**
- **Technický SOP môže obsahovať tieto časti: (a) Názov, (b) účel a oblasť použitia, (c) zhrnutie metódy, (d) rušenie analýzy, (e) bezpečnostné opatrenia, (f) zariadenia a materiál, (g) chemikálie, (f) odber vzoriek, manipulácia a uskladnenie, (g) kontrola kvality (SP, RM), (h) postup spracovania vzorky, (i) postup stanovenia, napr. GC/MS.**