

## Názov: Stanovenie polyaromatických uhl'ovodíkov v povrchovej vode metódou GC-MS

### Návod na prácu

#### Zadanie:

1. Pripravte a vyhodnoťte roztokovú kalibračnú krivku polyaromatických uhl'ovodíkov (PAU) v rozsahu koncentrácií 0,1 – 10 µg/l.
2. Pripravte 1 ml extraktu PAU v n-hexáne extrakciou 1 l vzorky vody metódou extrakcie kvapalina-kvapalina (LLE).
3. Analyzujte pripravený extrakt metódou plynovej chromatografie s hmotnostnou spektrometriou (GC-MS) a vyhodnoťte obsah PAU vo vzorke pomocou metódy kalibračnej krivky.

#### Teória

Polyaromatické uhl'ovodíky sú zlúčeniny zložené z dvoch a viac aromatických jadier. Vznikajú predovšetkým počas nedokonalého spaľovania organického materiálu. Vybrané PAU sa sledujú vo vzorkách životného prostredia. Významnými zdrojmi znečistenia polyaromatickými uhl'ovodíkmi sú chemické podniky, elektrárne, spaľovne, petrochemický priemysel a iné. Ich zvýšená koncentrácia v životnom prostredí má negatívny vplyv na živé organizmy, negatívny účinok na človeka sa môže prejaviť vznikom nádorových ochorení.

Plynová chromatografia je separačná metóda založená na rozličnej interakcii analyzovaných zlúčenín so stacionárnou fázou v kapilárnej kolóne. Mobilnou fázou v GC je nosný plyn, zvyčajne hélium, vodík alebo dusík. Nadávkované zlúčeniny sú v dávkovači splynené účinkom vysokej teploty, preto je táto metóda vhodná na analýzu prchavých až stredne prchavých zlúčenín (s teplotou varu zvyčajne do 400 °C). Jedným z detektorov, ktorý sa používa v kombinácii s GC je hmotnostný spektrometer (MS), v ktorom sa separované zlúčeniny ionizujú, pričom vznikajú fragmenty charakterizované pomerom ich hmotnosti a náboja  $m/z$ . Fragmenty sú rozlíšené a separované v hmotnostnom analyzátore. Závislosťou relatívnej početnosti od pomeru  $m/z$  získavame pre každú zlúčeninu hmotnostné spektrum, ktoré je možné porovnať s knižnicou hmotnostných spektier, čo výrazne prispieva k možnosti identifikácie analyzovaných zlúčenín.

**Pomôcky:** plynový chromatograf s PTV dávkovačom, hmotnostný spektrometer s kvadrupólovým analyzátorom, aparátúra na filtráciu (laboratórny stojan, železný kruh, filtračný lievnik, kadička, sklenená tyčinka, filtračný papier), odmerná banka (1000 ml),

Názov: Digitalizácia chemických experimentov pre zlepšenie kvality a  
projektu: podporu výučby chémie na stredných školách  
Akronym: ChemIQSoc  
Číslo projektu: 2021-1-SK01-KA220-VET-000027995



oddeľovací lievik (1000 ml), automatické pipety so špičkami, mikrostriekačka, kadičky, delená pipeta (25 ml), balónik na pipetovanie, orbitálna trepačka, srdcová banka (100 ml), rotačná vákuová odparka (rotavap), sklenená Pasteurová pipeta, sklenené vialky (1 ml) so skrutkami so septom

**Chemikálie:** referenčný materiál 16 PAU, *n*-hexán s čistotou pre GC-MS, síran sodný bezvodý, vzorka povrchovej vody (aspoň 1 l)

## Postup

### *Príprava roztokovej kalibračnej krivky*

1. Riedením zásobného roztoku referenčného materiálu pripravte 5 kalibračných roztokov po 1 ml s koncentraciami 0,1; 0,5; 1; 5 a 10 µg/l. Roztoky zriedte do *n*-hexánu.
2. Analyzujte jednotlivé kalibračné roztoky metódou GC-MS. Pre získanie plôch píkov ich vo vyhodnocovacom softvéri integrujte rovnakým spôsobom pre kvantifikačný ión.
3. V tabuľkovom editore vytvorte graf závislosti plochy analytu od jeho koncentrácie a zostrojte kalibračnú krivku preložením bodov lineárnou trendovou spojnicou. Zo získaných hodnôt smernice a úseku neskôr vypočítate koncentráciu analytov v reálnej vzorke.

### *LLE extrakcia vzorky*

1. Pomocou jednoduchej filtračnej aparatúry prefiltrujte dostatočný objem vzorky (aspoň 1 l) od možných nečistôt. Ak vo vzorke nie sú prítomné voľným okom viditeľné tuhé nečistoty tento krok možno vynechať.
2. Na extrakciu pripravte do odmernej banky presne 1 l prefiltrovanej vzorky. Tento objem vzorky pomocou lievika opatrne prelejte do pripraveného oddeľovacieho lievika.
3. Pomocou delenej pipety a pipetovacieho balónika ku vzorke do oddeľovacieho lievika pridajte 15 ml extrakčného rozpúšťadla – *n*-hexánu. Rovnakým objemom hexánu premyte aj odmernú banku, v ktorej sa nachádzala vzorka – premiešajte a tiež prelejte do oddeľovacieho lievika. Na hladine vzorky vody pribudne tenká organická vrstva hexánu.
4. Oddeľovací lievik vložte do orbitálnej trepačky a zapnite trepanie na stredných otáčkach (obsah lievika sa má jemne pretrepávať) na dobu 30 minút.
5. Následne oddeľovací lievik vráťte na laboratórny stojan, počkajte pokým sa ustáli organická a vodná vrstva a pomocou otočného kohúta vypustíte vodnú vrstvu vzorky. Vrstvu extrakčného rozpúšťadla zachyťte do pripravenej kadičky.
6. Vypustený objem vzorky opäť nalejte do oddeľovacieho lievika a kroky č. 6 až 8 zopakujte ešte dvakrát. Podiely extrakčného činidla spoločne zbierajte do jednej kadičky.
7. Do kadičky s extraktom pridajte 3 kopcovité lyžice bezvodého síranu sodného a nechajte usadiť na dno kadičky. Extrakt prelejte do srdcovej banky a pomocou pipety kadičku so síranom premyte *n*-hexánom (2 x po 5 ml) a tiež pridajte do srdcovej banky.

### Odparenie a spracovanie extraktu

1. Na zakoncentrovanie extraktu je potrebné organické rozpúšťadlo odpariť pomocou rotačnej vákuovej odparky. Spustíte rotavap zapnutím vyhrievania vodného kúpeľa na 40 °C, spustíte prívod vody do chladiča a zapnete vákuovú pumpu.
2. Po pripojení banky na rotavap nastavte tlak na 300 mbar, nastavením výšky ramena ponorte banku do vodného kúpeľa a zapnite otáčanie.
3. Po odparení asi 2/3 hexánu vyprázdnite obsah banky na zachytávanie skondenzovaného rozpúšťadla do nádoby na zber nechlórovaného organického odpadu.
4. Extrakt odparujte približne do objemu menšieho ako 0,5 ml.
5. Po ukončení odparovania rezíduum zo srdcovej banky preneste sklenenou Pasteurovou pipetou do 1 ml vialky, srdcovú banku premyte malým množstvom *n*-hexánu a opäť preneste do vialky.
6. Objem konečného extraktu doplňte do 1 ml *n*-hexánom a takto pripravený extrakt analyzujte GC-MS metódou podľa inštrukcií vyučujúceho. Výsledné píky integrujte obdobným spôsobom ako pri spracovaní kalibračných roztokov a metódou kalibračnej krivky vyhodnoťte obsah PAU vo vzorke. Prepočet výťažností extrakcie je možné zanedbať.

### Nakladanie s chemickými látkami

Chemikália	Forma	H-vety	P-vety
<i>n</i> -Hexán	Kvapalina	H225, H304, H315, H336, H361f, H373, H411	P202, P210, P273, P301 + P310, P303 + P361 + P353, P331, P403 + P233
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Tuhá	---	---
RM 16 PAU	Roztok štandardov	H225, H302 + H312 + H332, H319, H412	P210, P273, P280, P301 + P312, P303 + P361 + P353, P304 + P340 + P312

### Zdroje rizík a vyhodnotenie závažnosti rizika

*n*-Hexán je veľmi horľavá kvapalina, dráždi kožu, môže byť smrteľný po požití a vniknutí do dýchacích ciest. Je podozrivý z poškodzovania plodnosti. Je toxický pre vodné organizmy, z dlhodobými účinkami. Žiaci pracujú len s nevyhnutným objemom *n*-hexánu, pričom používajú osobné ochranné prostriedky. Potrebné množstvo *n*-hexánu do kadičky naleje odborný pracovník. Prijateľné riziko.

Referenčný materiál polyaromatických uhlíkov je najčastejšie rozpustený v horľavom organickom rozpúšťadle. Je zdraviu škodlivý pri styku s kožou, po požití alebo vdýchnutí.

**Názov projektu:** Digitalizácia chemických experimentov pre zlepšenie kvality a podporu výučby chémie na stredných školách  
**Akronym:** ChemIQSoc  
**Číslo projektu:** 2021-1-SK01-KA220-VET-000027995



Spôsobuje vážne podráždenie očí. Je toxický pre vodné organizmy, z dlhodobými účinkami. Žiaci pracujú s vopred zriedeným zásobným roztokom a minimálnym objemom. Prijateľné riziko.

### **Spôsob nakladania s odpadmi**

Zvyšky roztokov vylejte do nádoby určenej na zber nechlórovaného organického odpadu. Tuhý zvyšok síranu sodného zlikvidujte vysypaním do koša.

### **Opatrenia k obmedzeniu rizika**

Vyhňte sa priamej expozícii, používajte ochranné prostriedky. Nevystavujte sa dlhodobej alebo opakovanej expozícii. V prípade nehody alebo ak sa necítite dobre, okamžite informujte vyučujúceho. Dodržiavajte zásady bezpečnej práce s oddeľovacím lievikom. Nepracujte pri zdrojoch otvoreného ohňa. Po práci alebo pri prerušení práce si umyte ruky teplou vodou a mydlom. *n*-Hexán a RM PAU 16 alebo ich obaly sa musia likvidovať ako nebezpečný odpad.

## Pracovný list

### Experimentálne údaje

1. Koľko  $\mu\text{l}$  je potrebné odpipetovať zo zásobného roztoku PAU s koncentráciou 100 ppb na prípravu 1 ml roztokov s koncentráciou 0,1; 0,5; 1; 5 a 10 ppb?

	0,1 ppb [ $\mu\text{l}$ ]	0,5 ppb [ $\mu\text{l}$ ]	1 ppb [ $\mu\text{l}$ ]	5 ppb [ $\mu\text{l}$ ]	10 ppb [ $\mu\text{l}$ ]
Objem zásobného roztoku PAU s koncentráciou 10 $\mu\text{g/ml}$					

2. Z analýzy štandardov zaznamenajte elučné časy jednotlivých 16 PAU.

Názov	$t_R$ [min]	Názov	$t_R$ [min]
Naftalén		Benzo[a]antracén	
Acenaftylén		Chryzén	
Acenaftén		Benzo[b]fluorantén	
Fluorén		Benzo[k]fluorantén	
Fenantrén		Benzo[a]pyrén	
Antracén		Indeno[1,2,3-cd]pyrén	
Fluorantén		Dibenz[a,h]antracén	
Pyrén		Benzo[g,h,i]perylén	

3. Zaznamenajte tri najhlavnejšie hmotnostné fragmenty pre 16 PAU.

Názov	$t_R$ [min]	m/z (1)	m/z (2)	m/z (3)
Naftalén				
Acenaftylén				
Acenaftén				
Fluorén				
Fenantrén				
Antracén				
Fluorantén				
Pyrén				
Benzo[a]antracén				
Chryzén				
Benzo[b]fluorantén				
Benzo[k]fluorantén				
Benzo[a]pyrén				
Indeno[1,2,3-cd]pyrén				
Dibenz[a,h]antracén				
Benzo[g,h,i]perylén				

## Výpočty

1. Do excelovskej tabuľky zaznamenajte hodnoty elučných časov jednotlivých štandardov PAU, plochy a výšky píkov nameraných pre jednotlivé štandardné roztoky pri najintenzívnejších hmotnostných fragmentoch.

roztok	0,1 ppb	0,5 ppb	1 ppb	5 ppb	10 ppb
Elučný čas [min]					
Plocha píku					
Výška píku					

2. Do excelovskej tabuľky zaznamenajte hodnoty elučných časov jednotlivých štandardov PAU, plochy a výšky píkov nameraných pre vzorku pri najintenzívnejších hmotnostných fragmentoch.

Názov	Elučný čas [min]	Plocha píku	Výška píku
Naftalén			
Acenaftylén			
Acenaftén			
Fluorén			
Fenantrén			
Antracén			
Fluorantén			
Pyrén			
Benzo[a]antracén			
Chryzén			
Benzo[b]fluorantén			
Benzo[k]fluorantén			
Benzo[a]pyrén			
Indeno[1,2,3-cd]pyrén			
Dibenz[a,h]antracén			
Benzo[g,h,i]perylén			

3. Do kalibračného grafu vyneste závislosti  $A$  (plocha píku) od  $c$  (koncentrácie štandardu). Vyhodnoťte ho metódou najmenších štvorcov a zapíšte rovnicu kalibračnej krivky a koeficient korelácie pre jednotlivé PAU

4. Pomocou plochy píkov zistených pre jednotlivé PAU vo vzorke odčítajte ich koncentráciu.
5. Vypočítajte množstvo PAU vo vzorke a vyjadrite obsah jednotlivých PAU na 1 liter vzorky.

Názov	Koncentrácia [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Koncentrácia [ $\text{mg/l}$ ]
Naftalén		
Acenaftylén		
Acenaftén		
Fluorén		
Fenantrén		
Antracén		
Fluorantén		
Pyrén		
Benzo[a]antracén		
Chryzén		
Benzo[b]fluorantén		
Benzo[k]fluorantén		
Benzo[a]pyrén		
Indeno[1,2,3-cd]pyrén		
Dibenz[a,h]antracén		
Benzo[g,h,i]perylén		

### Otázky

1. Zdôvodnite prečo sa ustálila hladina hexánu nad hladinou vzorky vody a nie naopak. Ako by sa ustálili hladiny zmesi dichlórmétán-voda a zmesi metanol-voda?
2. Diskutujte dôvod pridávania bezvodého síranu sodného k extraktu.
3. Opíšte, ako zmena koncentrácie zlúčenín vo vzorke ovplyvňuje elučný čas a plochu pík.
4. Aký typ stacionárnej a mobilnej fázy a používa pri GC-MS stanovení PAU.

**Názov projektu:** Digitalizácia chemických experimentov pre zlepšenie kvality a podporu výučby chémie na stredných školách  
**Akronym:** ChemIQSoc  
**Číslo projektu:** 2021-1-SK01-KA220-VET-000027995



5. Uved'te chyby a ich zdroje pri stanovení PAU. Navrhните možné riešenia.

6. Popíšte z akých častí/modulov sa skladá GC zariadenie.

7. Zadefinujte a popíšte kroky extrakcie kvapalina-kvapalina.

### **Záver**

Zhrňte stručne cieľ experimentu, hlavné výsledky a porovnajte ich s očakávanými hodnotami.



**Názov projektu:** Digitalizácia chemických experimentov pre zlepšenie kvality a podporu výučby chémie na stredných školách  
**Akronym:** ChemIQSoc  
**Číslo projektu:** 2021-1-SK01-KA220-VET-000027995



### **Vyhlásenie o vylúčení zodpovednosti**

Financované Európskou úniou. Vyjadrené názory a postoje sú názormi a vyhláseniami autora(-ov) a nemusia nevyhnutne odrážať názory a stanoviská Európskej únie alebo Slovenskej akademickej asociácie pre medzinárodnú spoluprácu, Národnej agentúry programu Erasmus+ pre vzdelávanie a odbornú prípravu. Európska únia ani organizácia udeľujúca grant za ne nepreberajú žiadnu zodpovednosť.