

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu	Vydání	3
	40260.1 – Stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků metodou HPLC	Revize	1

STANOVENÍ POLYCYKlickÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ METODOU HPLC

1 Účel a rozsah

Postup se používá pro stanovení šestnácti základních polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH), uvedených v seznamu americké agentury pro ochranu životního prostředí EPA. Postup lze použít i pro stanovení dalších polycyklických aromatických uhlovodíků.

2 Princip

Polycyklické aromatické uhlovodíky v rostlinách se stanoví po extrakci acetonem, zakoncentrování a přečištění metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi s gradientovým průběhem eluce a s fluorescenční nebo spektrofotometrickou detekcí v UV oblasti.

3 Chemikálie

Používají se chemikálie analytické čistoty, pokud není uvedeno jinak.

- 1 Acetonitril (ACN), pro HPLC.
- 2 Acetonitril, 50% roztok.
Příprava: Acetonitril (1) se ředí s vodou (11) v poměru (1 : 1) (v/v).
- 3 Acetonitril, 20% roztok.
Příprava: Acetonitril (1) se ředí s vodou (11) v poměru (1 : 4) (v/v).
- 4 Aceton, pro HPLC.
- 5 2-propanol, pro HPLC.
- 6 Methanol (MeOH), pro HPLC.
- 7 Methanol, 50% roztok.
Příprava: Methanol (6) se ředí s vodou (11) v poměru (1 : 1) (v/v).
- 8 Tetrahydrofuran (THF), pro HPLC.
- 9 Standard 16 EPA PAH, koncentrace jednotlivých PAH $c(\text{PAH}) = 100 \text{ } \mu\text{g/ml}$, (např. PAH MIX v acetonitrilu, Absolute Standards).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu	Vydání	3
	40260.1 – Stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků metodou HPLC	Revize	1

10 Pracovní standard, koncentrace jednotlivých PAH $c(\text{PAH}) = 0,5 \mu\text{g/ml}$.

Příprava: Do 50ml odměrné baňky se pipetuje 0,25 ml standardu (9). Doplní se THF (8) po značku a na 2 min se vloží do ultrazvukové lázně.

11 Voda (deionizovaná, demineralizovaná nebo destilovaná).

4 Přístroje a pomůcky

- 1 Kapalinový chromatograf s fluorescenčním a UV detektorem.
- 2 Vakuové zařízení pro extrakci na pevné fázi.
- 3 Horizontální nebo vertikální třepačka.
- 4 Ultrazvuková lázeň.
- 5 Rotační vakuová odparka.
- 6 Centrifuga.
- 7 SPE kolonky C8, 500 mg/3 ml.
- 8 Nástříkové filtry, např. 13 mm syringe filter PTFE 0,45 μm .

5 Postup

5.1 Extrakce a příprava vzorku

a) Naváží se 10 g čerstvého rostlinného materiálu, který se vysuší lyofilizací podle postupu 60092.1 Úprava vzorků lyofilizací. Lyofilizovaný vzorek se převede do 250ml kónické šroubovací baňky, napipetuje se 50 ml acetonu (4) a baňka se uzavře. Obsah baňky se extrahuje 30 min na třepačce (3).

b) Pokud není k dispozici lyofilizátor, naváží se 10 g čerstvého rostlinného materiálu, převede se do 250ml kónické šroubovací baňky, napipetuje se 50 ml acetonu (4) a baňka se uzavře. Obsah baňky se extrahuje 30 min na třepačce (3).

Extrakt se převede do 25ml zkumavky a 15 min se odstředí při asi 1500 ot/min. Z odstředěného extraktu se odpipetuje 10 ml do 50ml odměrné baňky, přidá se 2,5 ml 2-propanolu (5). Baňka se doplní po značku vodou (11), promíchá se a sonifikuje přibližně 1 min. Takto připravený extrakt se přečistí přes SPE kolonku C8, která se předem kondicionuje postupně 1 $\times$ 2,5 ml methanolu (6), 1 $\times$ 2,5 ml methanolu (7) a 2 $\times$ 2,5 ml vody (11). Na SPE kolonku C8 se vnáší celý objem odměrné baňky (50 ml). Polární látky projdou SPE kolonkou a nepolární látky se zachytí na sorbentu. Extrahovaná část vzorku na sorbentu se promyje 2,5 ml methanolu (7). Eluce PAH se provede 3 ml tetrahydrofuranu (8) a eluát se jímá do 10ml kalibrované zkumavky. Získaný eluát se sonifikuje asi 1 min a pak se naředí acetonitrilem (3) v poměru (1 : 1) (v/v). Po naředění se vzorek opět sonifikuje. Takto připravený eluát se nadávkuje na chromatografickou kolonu přes PTFE nástříkový filtr (8).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu	Vydání	3
	40260.1 – Stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků metodou HPLC	Revize	1

Pokud se nepodaří připravený extrakt vzorku přechistit na SPE kolonce C8 a kolonka se zahltí (např. chlorofylem, silicemi), pak se 10 ml odstředěného acetonového extraktu odpaří k suchu při 30 °C na rotační vakuové odparce (5). Odparek se rozpustí v tetrahydrofuranu (8) a naředí acetonitrilem (3) v poměru (1 : 1) (v/v), sonifikuje přibližně 1 min a dávkuje na chromatografickou kolonu. V tomto případě však může dojít k částečné ztrátě nízkomolekulárních PAHs (naphtalen, acenaphten a fluoren).

Poznámky

1 *Lyofilizace při přípravě vzorků významně usnadní přečištění extraktu na SPE kolonce.*

5.2 Kalibrace

Do sady 10ml odměrných baněk se pipetuje (0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 2,0; 4,0; 8,0) ml pracovního roztoku standardu (10), doplní se tetrahydrofuranem (8) po značku, promíchá a vloží se na několik min do ultrazvukové lázně. Tyto kalibrační roztoky se dále ředí acetonitrilem (3) z důvodu snížení mobility tetrahydrofuranu. Naředěné standardy se 2 min sonifikují. Tyto kalibrační roztoky odpovídají koncentracím (0,0025; 0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2) µg/ml. Na kolonu se nastříkuje 40 µl kalibračního roztoku a z ploch píků se sestrojí kalibrační křivka s využitím software přístroje.

5.3 Chromatografické stanovení

Kalibrační roztoky i extrakty vzorků se měří např. za podmínek uvedených v tabulkách 1, 2 a 3.

Tabulka 1. Příklad podmínek chromatografického stanovení.

Kolona	Waters PAH C18, 5 µm, (4,6 × 250) mm
Mobilní fáze	A – acetonitril (2)
	B – acetonitril (1)
Průtok	1,5 ml/min.
Teplota kolony	25 °C
Objem nástřiku	40 µl
Detekce	Fluorescenční, UV při 230 nm
Doba analýzy	35 min.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu	Vydání	3
	40260.1 – Stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků metodou HPLC	Revize	1

Tabulka 2. Časový průběh gradientu.

Čas (min)	A (%)	B (%)
0	100	0
6	100	0
20	10	90
21	0	100
27	0	100
28	100	0
35	100	0

Tabulka 3. Excitační a emisní vlnové délky a retenční časy jednotlivých PAH pro fluorescenční detektor.

PAH	Excitační λ (nm)	Emisní λ (nm)	Retenční čas (min)
Naphtalene (NAP)	240	326	7,9
Acenaphthene (ANA)	240	326	11,7
Fluorene (FLU)	240	326	12,4
Phenanthrene (PHE)	246	368	13,0
Anthracene (ANT)	246	368	14,9
Fluoranthene (FLT)	286	466	16,0
Pyrene (PYR)	232	396	16,8
Benzo(a)anthracene (BaA)	264	384	19,8
Chrysene (CHR)	264	384	20,7
Benzo(b)fluoranthene (BbF)	248	432	22,5
Benzo(k)fluoranthene (BkF)	254	400	23,6
Benzo(a)pyrene (BaP)	254	400	24,4
Dibenzo(a,h)anthracene (DBA)	292	410	26,1
Benzo(g,h,i) perylene (BPE)	292	410	26,6
Indeno(1,2,3-c,d)pyrene (IPY)	230	500	28,0

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – analýza rostlinného materiálu	Vydání	3
	40260.1 – Stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků metodou HPLC	Revize	1

Poznámky

- 2 Údaje v tabulce 2 a 3 platí pro chromatografickou kolonu uvedenou v tabulce 1.
- 3 Acenaphthylene (ANY) se stanovuje UV detekcí při 230 nm a retenčním čase 9,6 min.

6 Výpočet a vyjádření výsledků

Obsah PAH (X) vyjádřený v µg/kg se vypočítá podle vztahu

$$X = 2 \times 1000 \times (c \times V \times EV) / (m \times AP)$$

- c koncentrace PAH odečtená z kalibrační křivky v µg/ml,
- V objem extrakčního činidla v ml,
- EV objem elučního činidla v ml,
- AP alikvotní podíl odpipetovaný z extraktu v ml,
- m hmotnost zkušební vzorku v g,
- 2 koeficient ředění.

7 Literatura

- 1 Koostra P.R., Straub M.H.C., Stil G.H., van der Velde E.G., Hesselink W., Land C.C.J.: Solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil samples. Journal of Chromatography A, 697 (1995) 123-129.
- 2 J.L.Beltrán, R.Ferrer, J.Guiteras: J.L.Chrom.&Rel.Technol, 19 (3), Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by HPLC with spectrofluorimetric detection and wavelength programming. 477–488 (1996).
- 3 Mäkelä M., Pyy L.: Effect of temperature on retention time reproducibility of polycyclic aromatic hydrocarbons. Journal of Chromatography A, 699 (1995) 49-57.