	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	1
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd II	Vydání	4
		30660.1 Stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) metodou HPLC	Revize

STANOVENÍ POLYCYKlickÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ (PAH) METODOU HPLC

1. Rozsah použití

Postup je vhodný pro stanovení 16 základních polyaromatických uhlovodíků, uvedených v seznamu US EPA. Stanovení je určeno pro půdy, kaly, sedimenty a příbuzné materiály o obsahu jednotlivých stanovovaných složek nad 5 µg/kg.

2. Princip


Polyaromatické uhlovodíky v půdách se stanoví po extrakci acetonem, zakoncentrování a přečištění metodou HPLC na reverzní fázi s gradientovým průběhem eluce a s fluorescenční nebo spektrofotometrickou detekcí v UV oblasti.

Poznámky

- V silně kontaminovaných půdách je vhodné použít méně polární extrakční činidlo (toluen). Na druhé straně aceton je vhodnější pro půdy, kde jsou PAH vázány na jílovou frakci.*

3. Přístroje a pomůcky

- Kapalinový chromatograf s možností použití gradientové eluce a s fluorescenčním a UV detektorem.
- Vakuové zařízení pro extrakci na pevné fázi – manifold.
- SPE kolonky C8, 500 mg/3 ml.
- Horizontální třepačka s úchytkami pro upevnění Erlenmeyerových baněk 100 ml.
- Ultrazvuková lázeň.
- Odstředivka (nejméně 9000 ot/min).
- Nástříkové filtry, např. 13 mm LUT syringe filter PTFE 0,45 µm.
- Rotační vakuová odparka.
- Přístroj pro zrychlenou extrakci rozpouštědlem, např. ASE 100, Dionex s příslušnou extrakční ocelovou celou o objemu 10 ml.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	2
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd II	Vydání	4
		30660.1 Stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) metodou HPLC	Revize


4. Chemikálie

1. Acetonitril (ACN), čistota pro HPLC.
2. 50% acetonitril, (ACN : H₂O) = (1 : 1), (V/V).
Příprava: 500 ml acetonitrilu (1) se smíchá s 500 ml vody a promíchá.
3. 20% acetonitril, (ACN : H₂O) = (20 : 80), (V/V).
Příprava: 20 ml acetonitrilu (1) se smíchá s 80 ml vody a promíchá.
4. Aceton, čistota pro HPLC.
5. 2-propanol, čistota pro HPLC.
6. Methanol (MeOH), čistota pro HPLC.
7. 50% methanol, (MeOH : H₂O) = (1 : 1), (V/V).
Příprava: 50 ml methanolu (6) se smíchá s 50 ml vody a promíchá.
8. Tetrahydrofuran (THF), čistota pro HPLC.
9. Standard 16 PAH, koncentrace jednotlivých PAH c = 100 µg/ml, (např. PAH MIX v acetonitrilu, (Absolute Standards)).
10. Pracovní standard, 50 × ředěný zásobní roztok.
Příprava: Do 25ml odměrné baňky se pipetuje 0,5 ml standardu (9). Doplní se ACN (1) po značku a na 2 min se vloží do ultrazvukové lázně. Výsledná koncentrace jednotlivých PAH je 2 µg/ml.
11. Inertní materiál, např. Spe-ed Matrix, výrobce Applied Separations.
12. Propandiol, čistota p.a.
13. 20% propandiol v 2-propanolu.
Příprava: 20 ml propandiolu (13) se smíchá s 80 ml 2-propanolu (5) a promíchá.

5. Pracovní postup

Půdy


Pro stanovení se používá půda upravená postupem 30010.1, 30012.1 nebo 30013.1. Sušit se musí ve stínu, aby se zamezilo ztrátám PAH vlivem slunečního záření. Pokud není vzorek dostatečně homogenní, může se dále pomlet na achátovém mlýnku a prosát přes 1mm síto. Podle očekávaného obsahu PAH se do uzavíratelné 100ml Erlenmeyerovy baňky naváží (1-10) g půdy, napipetuje se 30 ml acetonu (4) a baňka se uzavře. Obsah se extrahuje 30 min na

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	3
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd II	Vydání	4
		30660.1 Stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) metodou HPLC	Revize

horizontální třepačce (120 kyvů/min). Obsah baňky se nechá ustát, převede se do 25ml skleněné zkumavky, která se uzavře a následně odstředí. Do 50ml odměrné baňky se pipetuje 10 ml odstředěného extraktu, přidá se 2,5 ml 2-propanolu (5) a baňka se doplní po značku vodou. Baňka se uzavře a obsah se 2 min sonifikuje. Takto připravený extrakt se přečistí přes kolonku SPE C8, která se předem kondicionuje postupně 1 × 2,5 ml methanolu (6), 1 × 2,5 ml 50% methanolu (7) a 2 × 2,5 ml vody. Na SPE C8 kolonku 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 × 2,5 ml vody. PAH se eluují 3 ml tetrahydrofuranu (8) a eluát se jímá do 10ml kalibrované skleněné zkumavky. Získaný eluát se cca 1 min sonifikuje a pak se naředí acetonitrem (3). Po naředění se vzorek opět sonifikuje asi 2 min. Eluát se nastříkne na kolonu přes PTFE nástřikový filtr.

Kaly

K extrakci PAH z kalů se používá extrakční proces za zvýšené teploty a tlaku s využitím např. zařízení ASE 100 firmy Dionex. Jako rozpouštědlo se používá aceton (4), obdobně jako při extrakci půd. Naváží se 1 g vzorku kalu, promíchá se s inertním materiálem (11) a vnese se do extrakční ocelové cely. Tato cela se vloží do přístroje ASE 100, nastaví se podmínky extrakčního procesu – teplota 100 °C a 2 extrakční cykly. Po skončení extrakce se objem získaného acetonového extraktu kvantitativně převede do 25ml odměrné baňky a doplní se acetonem (4) po značku. Acetonový extrakt se přečistí přes SPE kolonku C8. Do 50 ml odměrné baňky se pipetuje 10 ml acetonového extraktu, přidá se 2,5 ml 2-propanolu (5) a baňka se doplní po značku vodou. Baňka se uzavře a obsah se opět 2 min sonifikuje. Takto připravený extrakt se přečistí přes kolonku SPE C8, která se předem kondicionuje postupně 1 × 2,5 ml methanolu (6), 1 × 2,5 ml 50% methanolu (7) a 2 × 2,5 ml vody. Na SPE C8 kolonku 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 × 2,5 ml vody. PAH se eluují 3 ml tetrahydrofuranu (8) a eluát se jímá do 10ml kalibrované skleněné zkumavky. Získaný eluát se cca 1 min sonifikuje a pak se naředí acetonitrem (3). Po naředění se vzorek opět sonifikuje asi 2 min. Eluát se nastříkne na kolonu přes PTFE nástřikový filtr. V případě, že acetonový extrakt neprojde přes SPE kolonku, pipetuje se 10 ml extraktu do odpařovací baňky s přídatkem 0,5 ml propandiolu (13), odpaří se k suchu na rotační vakuové odparce. Odparek se rozpustí v 3 ml THF (8).

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	4
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd II	Vydání	4
		30660.1 Stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) metodou HPLC	Revize

Chromatografické stanovení


Příklady podmínek měření kalibračních roztoků i extraktů vzorků uvádějí tabulky 1, 2 a 3.

Tabulka 1. Příklad podmínek chromatografického stanovení.

Kolona	Waters PAH C 18, 5 μ m, 4,6 mm \times 250 mm
Mobilní fáze	A - 50% acetonitril (2) B - acetonitril (1)
Průtok	1,7 ml/min
Teplota kolony	28 °C
Objem nástřiku	20 μ l
Detekce	Fluorescenční, acenaftylen – UV detekce při 228 nm (nebo 254 nm), <i>pozn. 2</i>
Doba analýzy	35 min.

Tabulka 2. Časový průběh gradientu.

Čas (min)	A (%) (50% acetonitril)	B (%) (acetonitril)
0	100	0
3	100	0
11	10	90
12	0	100
18	0	100
20	100	0
26	100	0


	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	5
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd II	Vydání	4
		30660.1 Stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) metodou HPLC	Revize

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

PAH Název/zkratka	Excitační vlnová délka (nm)	Emisní vlnová délka (nm)	Retenční čas (min.)
Naftalen/NAP	240	326	7,1
Acenaftylen/ANY (<i>pozn. 3</i>)	–	–	7,8
Acenaften/ANA	240	326	8,9
Fluoren/FLU	240	326	9,2
Fenantren/PHE	246	368	9,8
Antracen/ANT	246	368	10,6
Fluoranten/FLT	286	466	11,1
Pyren/PYR	232	396	11,6
Benzo(a)antracen/BaA	264	384	13,2
Chrysen/CHR	264	384	13,7
Benzo(b)fluoranten/BbF	248	432	14,7
Benzo(k)fluoranten/BkF	254	400	15,4
Benzo(a)pyren/BaP	254	400	16,1
Dibenzo(a,h)antracen/DBA	292	410	17,3
Benzo(g,h,i) perylen/BPE	292	410	18,0
Indeno(1,2,3-c,d)pyren/IPY	230	500	19,1

Kalibrace

Do sady 10ml odměrných baněk se pipetuje (0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 5,0) 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 20% acetonitrilem (3) v poměru objemů (1 : 1). Naředěné standardy se 2 min sonifikují. Tyto kalibrační roztoky odpovídají koncentraci (0,02; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5) µg/ml. Na chromatografickou kolonu se nastříkuje 20 µl každého kalibračního standardního roztoku ve dvou opakováních. Z průměrných hodnot odpovídajících ploch píků se sestrojí kalibrační křivka.

	Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Národní referenční laboratoř	Strana	6
	Jednotné pracovní postupy – Analýza půd II	Vydání	4
		30660.1 Stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) metodou HPLC	Revize

Poznámky

2. *Acenaftýlen (ANY) lze měřit také při vlnové délce 254 nm (doporučeno v metodě US EPA 610).*
3. *Acenaftýlen (ANY) nevykazuje fluorescenci, a proto se stanovuje pomocí UV detekce. Ostatní podmínky stanovení jsou stejné.*
4. *Při překročení rozsahu kalibrační křivky některou ze stanovovaných látek se analýza opakuje s nižší navázkou vzorku nebo se extrakt před měřením naředí.*

6. Výpočet

Obsah jednotlivých PAH se vypočítá podle vztahu

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

- X obsah PAH ($\mu\text{g}/\text{kg}$),
 c koncentrace daného PAH odečtená z kalibrační křivky ($\mu\text{g}/\text{ml}$),
 V objem extrakčního činidla (ml),
 EV objem elučního činidla (ml),
 AP alikvotní podíl odpipetovaný z extraktu (ml),
 m hmotnost zkušební vzorku (g),
 2 koeficient ředění.

Literatura

1. P.R. Koostra, M.H.C. Straub, G.H. Stil, E.G. van der Velde, W. Hesselink, C.C.J. Land: Solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil samples. *Journal of Chromatography A*, 697, 123-129, 1995.
2. J.L. Beltrán, R. Ferrer, J. Guiteras: Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by HPLC with spectrofluorimetric detection and wavelength programming. *J.LIQ. Chrom. & Rel. Technol.*, 19(3), 477-488, 1996.
3. M. Mäkelä, L. Pyy: Effect of temperature on retention time reproducibility and on the use of programmable fluorescence detection of fifteen polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Chromatography A*, 699, 49-57, 1995.
4. ČSN EN 16181 – Půdy, upravený bioodpad a kaly – Stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) plynovou chromatografií (GC) a vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC), 2018