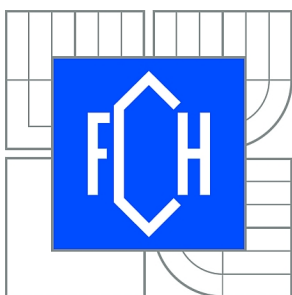




VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY  
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF  
ENVIRONMENTAL PROTECTION

## SYSTÉM JAKOSTI A JEHO APLIKACE V ENVIRONMENTÁLNÍ ANALÝZE

QUALITY SYSTEM MANAGEMENT AND ITS APPLICATION IN ENVIRONMENTAL ANALYSIS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. VLADIMÍR HOLOUBEK

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. MILADA VÁVROVÁ, CSc.

BRNO 2011



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	<b>FCH-DIP0474/2010</b>	Akademický rok: <b>2010/2011</b>
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka):	<b>Bc. Vladimír Holoubek</b>	
Studijní program:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (N2805)	
Studijní obor:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)	
Vedoucí práce	<b>prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.</b>	
Konzultanti:		

### Název diplomové práce:

Systemy jakosti a jeho aplikace v environmentální analýze

### Zadání diplomové práce:

1. Práce je teoretického charakteru
2. Je zaměřená na aplikaci systému jakosti v laboratořích environmentální analýzy
3. Bude vypracována příručka jakosti pro laboratoř environmentální analýzy
4. Součástí příručky budou Standardní operační postupy (SOP) pro vybrané environmentální analýzy
5. SOP budou využity v rámci předmětu Praktikum z environmentální analýzy

### Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2011

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

-----  
Bc. Vladimír Holoubek  
Student(ka)

-----  
prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.  
Vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 15.1.2011

-----  
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## **ABSTRAKT**

Diplomová práce je teoretického charakteru. V první části práce je zpracována příručka jakosti pro fiktivní, malou laboratoř zabývající se environmentální analýzou a odběrem vzorků půdy. Příručka je zpracovaná podle normy ISO 17025. V druhé praktické části jsou vytvořeny Standardní operační postupy pro vybrané environmentální analýzy, které jsou prováděny v rámci předmětu Praktikum z environmentální analýzy. Standardní operační postupy budou prakticky využívány ve školní laboratoři environmentální analýzy.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

ISO normy, příručka jakosti, SOP, environmentální analýza

## **ABSTRACT**

This thesis has a theoretical character. The first part consists of quality manual for a small fictive laboratory concerned with environmental analysis and collection of soil samples. Quality manual is made in accordance with ISO 17025. In second practical part of thesis the Standard operating procedures are designed for specific environmental analysis. These analyses are performed within the frame of subject Practice of Environmental analysis. Standard operating procedures will be virtually used in the university laboratory of environmental analysis.

## **KEY WORDS**

ISO standards, quality manual, SOPs, environmental analysis

HOLOUBEK, V. *Systém jakosti a jeho aplikace v environmentální analýze*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 91 s. Vedoucí diplomové práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc..

## **PROHLÁŠENÍ**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studenta

## **PODĚKOVÁNÍ**

Chtěl bych touto cestou poděkovat prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc. za neocenitelné připomínky a rady při zpracování diplomové práce.

## OBSAH

1	ÚVOD .....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1	Jakost .....	8
2.1.1	Vývoj názorů na jakost.....	8
2.1.2	Japonsko .....	8
2.2	Normy .....	9
2.2.1	ISO 9000 .....	9
2.2.2	ISO/ IEC 17025 .....	10
2.3	Akreditace.....	11
2.4	Příručka kvality.....	11
2.5	Standardní operační postup .....	12
2.6	Význam příručky jakosti pro laboratoř environmentální analýzy .....	12
3	PŘÍRUČKA JAKOSTI .....	14
3.1	System managementu .....	14
3.1.1	Zařazení laboratoře.....	14
3.1.2	Politika jakosti.....	14
3.1.3	Cíle jakosti.....	14
3.1.4	Personální politika.....	15
3.1.5	Řízení dokumentů .....	17
3.1.6	Jednání se zákazníkem .....	18
3.1.7	Řízení neshodných prací .....	19
3.1.8	Řízení záznamů .....	19
3.1.9	Interní audity .....	19
3.1.10	Přezkoumání systému managementu .....	20
3.2	Technické požadavky .....	21
3.2.1	Seznam stanovení.....	21
3.2.2	Prostory a podmínky prostředí .....	21
3.2.3	Pracovní postupy .....	21
3.2.4	Zařízení.....	22
3.2.5	Vzorkování .....	23
3.2.6	Zjišťování kvality výsledků zkoušek .....	24
3.2.7	Uvádění výsledků.....	24

4	STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUPY .....	26
4.1	Analýza reziduí léčiv pomocí LC/MS .....	26
4.1.1	Cíl .....	26
4.1.2	Příprava vzorku – Extrakce pevnou fází ( <i>Solid Phase Extraction, SPE</i> ).....	26
4.1.3	Vlastní analýza reziduí léčiv technikou (LC/MS).....	29
4.2	Musk sloučeniny pomocí SPME, GC/MS .....	34
4.2.1	Cíl .....	34
4.2.2	Příprava vzorku – Mikroextrakce pevnou fází ( <i>Solid Phase MicroExtraction, SPME</i> )	34
4.2.3	Vlastní analýza analýza musk sloučenin technikou GC/MS.....	37
4.3	Stanovení obsahu PAHs v půdním extraktu pomocí HPLC .....	40
4.3.1	Cíl .....	41
4.3.2	Zpracování vzorků půdy pro analýzu organických kontaminantů .....	41
4.3.3	Vlastní stanovení PAH technikou HPLC/UV-VIS, FLD .....	46
4.4	Stanovení těžkých kovů v půdě metodou AAS .....	51
4.4.1	Cíl .....	52
4.4.2	Zpracování vzorků půdy pro analýzu anorganických kontaminantů .....	52
4.4.3	Stanovení prvků atomovou absorpční spektrometrií s elektrotermickou atomizací .....	54
4.5	Stanovení obsahu PCB ve vzorku tuku pomocí GC/ECD.....	58
4.5.1	Cíl .....	59
4.5.2	Vlastní stanovení obsahu PCB v tuku technikou GC/ECD.....	59
4.6	Stanovení rtuti ve vzorku půdy přístrojem AMA 254 .....	64
4.6.1	Rtuť .....	64
4.6.2	Vlastní stanovení rtuti pomocí AMA 254 .....	65
4.7	Stanovení nesteroidních protizánětlivých látek ve vodách pomocí CZE .....	69
4.7.1	Cíl .....	69
4.7.2	Vlastní stanovení nesteroidních léčiv .....	70
4.8	Odběr vzorků půdy .....	75
4.8.1	Odběr vzorků půdy teoretické laboratoře .....	75
4.8.2	Odběr vzorků půdy studenty vysokoškolské laboratoře .....	77
5	ZÁVĚR.....	79
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....	80
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....	82
8	SEZNAM PŘÍLOH .....	84

# 1 ÚVOD

Příručka jakosti je základní dokument laboratoře, který souhrnně podává informaci o způsobu a procesech zajišťování systému managementu jakosti v příslušné organizaci, v našem případě v laboratoři pro environmentální analýzu. Popisuje politiku a strategii organizace v oblasti jakosti, a to jak ve vztahu k zákazníkům, tak také ve vztahu k vlastním zaměstnancům a partnerům laboratoře. Řídí se normou ČSN EN ISO 9001:2009. Dokumentuje pravidla, podle kterých jsou řízeny činnosti organizace, tj. postupy a procesy, případně se na tato dokumentovaná pravidla odkazuje. Kromě toho vymezuje povinnosti, odpovědnosti a pravomoci vedoucích pracovníků a dalších zaměstnanců, jejichž činnost ovlivňuje kvalitu procesů uskutečňovaných v laboratoři. Rovněž je určena k prezentaci organizace a slouží jako základní informace pro zákazníky, kteří se chtějí seznámit se zásadami platnými při zabezpečování systému jakosti a s metodami, které jsou v laboratoři používány. Systém managementu jakosti byl zpracován tak, aby bylo možné efektivně a kvalitně plnit požadavky zákazníků. Současně je nezbytné tento systém jakosti neustále zlepšovat. Přezkoumání obsahu je prováděno formou interních a externích auditů podle předem plánovaného kalendáře, minimálně však 1x ročně.

První část této diplomové práce představuje stručný, teoretický úvod k následujícím kapitolám; jsou v ní představeny veškeré důležité pojmy spojené s jakostí, tj. zejména ISO normy, systém akreditace, příručka jakosti a standardní operační postup.

Ve druhé části je zpracována příručka jakosti pro malou, začínající, fiktivní laboratoř environmentální analýz. Při zpracování příručky se vychází především z normy pro zkušební a kalibrační laboratoře ISO 17025. Osnova příručky jakosti proto kopíruje osnovu normy. Příručka jakosti je rozdělena na dvě části, první část je věnována řízení laboratoře, definuje politiku a cíle jakosti, upravuje vnitřní a vnější vztahy laboratoře. Druhou část tvoří technické požadavky na laboratoř.

V poslední části jsou zpracovány standardní operační postupy pro environmentální analýzy, které se reálně provádí v rámci předmětu Praktikum z environmentální analýzy. Standardní operační postupy by tedy měli být využity ve školní laboratoři environmentální analýzy.

## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Jakost

Stručně a zjednodušeně řečeno: Jakost je schopnost produktu (výrobku, procesu, organizace nebo služby) uspokojit zákaznickovy potřeby. Pojem jakostní výrobek nebo jakostní služba neznámá dokonalý výrobek ani bezvadnou službu. Jakost lze definovat různě. Při řízení jakosti se obvykle řídíme souborem mezinárodních norem ISO 9000. V souboru norem ISO 9000 se využívá definice podle ISO 8402 „Management jakosti a zabezpečení jakosti – Slovník“ [4].

Obecná slovní definice jakosti by proto byla obtížná a nikdy by dokonale necharakterizovala pojmy jakost nebo kvalita. V normě 8402 je jakost vysvětlena prostřednictvím slovníku:

Entita – je to, co lze individuálně popsat a vzít v úvahu, např. činnost, proces, výrobek, organizace, systém nebo osoba, případně jakákoliv jejich kombinace.

Jakost – celkový souhrn znaků entity, které ovlivňují schopnost uspokojovat stanovené a předpokládané potřeby [4].

#### 2.1.1 Vývoj názorů na jakost

Požadavky na jakost jsou známé již ze starověku, ve středověku byly pevně stanovené normy pro míry a váhy a jejich nedodržení se krutým způsobem trestalo.

Nejjednodušším charakterizováním jakosti výrobku nebo služby je shoda s platnými normami pro uvažovaný výrobek nebo službu. Chápání jakosti lze rozšířit o srovnání výrobku, služby s konkurenčními výrobky a službami. Dalším stupněm v chápání jakosti je zákazník, jak zákazník hodnotí výrobek nebo jak je pro něj příjemná poskytovaná služba.

Ve své nejvyspělejší formě pojetí jakosti se hodnotí nejen výrobek, ale zcela všechny činnosti ovlivňující jakost výrobku nebo služby (entity). Je založeno na myšlence, že všechny součásti organizace obsluhují zákazníka, a to zákazníka vnitřního nebo vnějšího. Komplexní řízení jakosti (TQM – *Total Quality Management*) klade důraz nejen na samotné pracovní aktivity, ale i na spokojenost lidí v organizaci, spokojenost zákazníků a neustálé zlepšování jakosti [4]. Uplatňování systému TQM vede v organizaci k lepší efektivitě práce, flexibilitě na trhu, snížení nákladů na odstraňování chyb, lepším službám pro zákazníka.

#### 2.1.2 Japonsko

Japonsko disponuje minimem přírodních zdrojů, proto je jeho ekonomika závislá na japonských výrobcích. Výrobky a jejich kvalita jsou zase neoddělitelně závislé na lidských zdrojích.

V Japonsku se při zlepšování kvality rozšířila metoda KAIZEN. KAIZEN v doslovném překladu znamená „nepřetržité zdokonalování“, tj. Jedná se o soustavné zlepšování jakosti v malých krocích. Metoda KAIZEN vyžaduje pochopení a spoluúčast všech pracovníků podniku.

Hlavní starostí podniku při řízení podniku je spokojenost lidí, kteří jsou s podnikem spojeni. Zaměstnanci musí mít možnost radovat se ze své práce a vést spokojený život. Na druhém místě jsou spotřebitelé. Musí při nákupu výrobků a využívání služeb pociťovat uspokojení a potěšení. Je třeba pamatovat i na prospěch akcionářů. Každá organizace musí mít takový zisk, aby mohla akcionářům vyplácet dividendy. Zisk je prostředkem k trvalému udržení organizace při životě. Pro zvýšení zisku je třeba efektivně řídit náklady. Ke zvýšení efektivity práce zavedli Japonci pravidlo „Pět S pracovního místa“ [4].

- **Seiri** Úprava – na pracovišti je jen to, co je potřebné
- **Seiton** Organizace – na pracovišti má vše své zřetelně označené místo
- **Seiso** Čistota – pracovní místo je udržováno čisté
- **Seiketsu** Standardizace – jasný, jednoduchý a přehledný systém v označení náradí, strojů a popisu práce
- **Shitzuke** Kázeň, výcvik – sebekázeň a kontrolní listy pomáhají udržovat systém pořádku na pracovišti [4].

## 2.2 Normy

### 2.2.1 ISO 9000

Základní mezinárodní norma pro řízení jakosti je ISO 9000. Norma vznikla v roce 1983 jako reakce Mezinárodní organizace pro normalizaci (*International Organization for Standardization, ISO*) na neustále se zvyšující kvalitu japonských výrobků.

Za zmínku stojí to, že na prvním počátku těchto norem stála americká norma pro zabezpečení jakosti výrobků pro armádu MIL – Q9858. Soubor požadavků na zabezpečení jakosti byl koncipován koncem šedesátých let jako součást programu Polaris pro zabezpečení jakosti při výrobě ponorek [4].

Symbolem ISO 9000 se označuje systém promyšlených mezinárodních norem, které popisují jednotný model systému řízení a zabezpečování jakosti. Tento model lze na základě zdravého selského rozumu přizpůsobit potřebám jakékoliv organizace [4].

Splnění standardů řízení organizace podle normy ISO 9000 je hlavním předpokladem k získání certifikace výrobku nebo činnosti. Praktický význam normy pro vnitřní práci v organizaci je stanovení kvality produktu nebo činnosti z hlediska zákazníka, prevence vůči neshodám – chybám ve výrobním procesu nebo vnitřní komunikaci mezi pracovníky. Nástrojem prevence jsou jasně daná pravidla. Soubor ISO vychází z následujících sedmi základních pravidel [4]:

#### 1. Zavedení organizační struktury

- Každý pracovník musí mít jasně stanovené zařazení do struktury, své práva a povinnosti a zodpovědnost, kterou nese.

#### 2. Pracovní postupy

- Popis pracovních postupů jednotlivých činností musí být jednoduchý, pochopitelný a především funkční.

#### 3. Řízení dokumentace

- Důležité dokumenty mají datum vydání, evidenční číslo, rozdělovník a jméno osoby oprávněné provádět revize a opravy.

#### 4. Vedení záznamů

- Pečlivé zaznamenávání umožňuje zpětnou detekci chyby v pracovním postupu

#### 5. Pravidelné kontroly a ověřování

- Pravidelné kontrolování a ověřování může zamezit vzniku chyb

#### 6. Odstranění chyb

- Při vzniku problému se nezaměřujeme jen na jeho okamžité odstavení, ale snažíme se odhalit a odstranit příčinu problému

## 7. Komunikace

- Výměna informací v organizaci mezi pracovními skupinami a pracovníky je základem pro efektivní práci

Méně chyb a nesrovnalostí v pracovním postupu a v celkové organizaci společnosti logicky vede k lepším i levnějším výrobkům a službám. Certifikát ISO 9000 je pro zákazníka zárukou, že výrobek nebo služba bude mít deklarovanou kvalitu a záruku za stanovenou cenu. V komerčních organizacích jsou kvalitnější produkty zárukou spokojenějšího zákazníka a tím celé ekonomické stability společnosti.

V normách souboru ISO 9000 se rozlišuje mezi požadavky na systémy managementu kvality a požadavky na produkty [5].

Požadavky na systémy managementu kvality jsou specifikovány v normě ISO 9001. Požadavky na systémy managementu kvality jsou generické a jsou vhodné pro organizace v jakémkoli odvětví průmyslu nebo hospodářství bez ohledu na kategorii nabízeného produktu. V samotné normě ISO 9001 nejsou požadavky na produkty stanoveny [5].

Požadavky na produkty mohou specifikovat zákazníci nebo organizace, která předvídá požadavky zákazníků, nebo mohou být specifikovány v prepisech. Požadavky na produkty a v některých případech požadavky na související procesy mohou být obsaženy například v technických specifikacích, v normách produktu, v normách procesů, ve smluvních dohodách a v požadavcích prepisů [5].

Zavedení norem řady ISO 9000 může mít i své nevýhody. Organizace usilující o zavedení systému řízení podle ISO 9000 musí počítat s tím, že to je časově a finančně nákladný proces. Zavedení systému řízení může trvat podle velikosti organizace a složitosti činnosti organizace šest měsíců až dva roky. Zásadním způsobem naroste množství dokumentů a administrativa. V neposlední řadě je důležité přesvědčit pracovníky o potřebě a důležitosti zavedení systému řízení.

Nesprávné a nedůsledné zavedení systému řízení kvality má ve výsledku naprosto opačný efekt, sníží se kvalita koncového produktu a naopak se zvýší fluktuace pracovníků.

Pro úspěšné zavedení systému jakosti je ovšem nejdůležitější pochopení a respektování všech nutných změn v organizaci všemi pracovníky bez ohledu na zařazení do struktury.

Mezinárodní norma ISO 9000 v žádném případě neřeší TQM, ale je pro zavedení TQM jedním ze základních předpokladů.

V České republice je platná norma převzatá z evropské legislativy: ČSN EN ISO 9000:2006 Systémy managementu kvality – Základní principy a slovník.

### 2.2.2 ISO/ IEC 17025

Tato mezinárodní norma stanovuje všeobecné požadavky na způsobilost provádět zkoušky a/nebo kalibrace, včetně vzorkování. Norma se týká zkoušení a kalibrací, které jsou prováděny pomocí metod popsanych v normách a normativních dokumentech, a metod vyvinutých laboratořemi [6].

Tato mezinárodní norma je použitelná ve všech laboratořích bez ohledu na počet osob, které v nich pracují, nebo na rozsah zkušebních nebo kalibračních činností. Pokud laboratoř neprovádí jednu nebo více činností popsanych v této mezinárodní normě, např. vzorkování a návrh/vývoj metod, požadavky příslušných ustanovení se nepoužijí [6].

Termín „systém managementu“ používaný v této mezinárodní normě zahrnuje systémy managementu kvality a systémy managementu v oblasti administrativní a technické, kterými

se řídí provoz laboratoře [6]. Norma naopak nezahrnuje požadavky na bezpečnostní opatření v laboratoři.

Norma má podobu obecně psaných požadavků především na administrativní část řízení provozu laboratoře například jednání se zákazníkem a dodavateli, řízení dokumentů, řešení stížností, zlepšování, atd. V technické části jsou zase obecně popsány postupy a požadavky na vlastní práci laboratoře, například prostory a podmínky prostředí, vzorkování, požadavky na pracující osoby, zjišťování kvality výsledků, záznamy ze zkoušek, protokoly ze zkoušek, seznam zařízení a metod, atd.

Laboratoř, která splňuje normu ISO/IEC 17025, splňuje také požadavky na management kvality podle normy ISO 9001. Norma ISO/IEC 17025 je tedy rozšíření normy ISO 9001 o technické požadavky pro zkušební, kalibrační laboratoř.

V České republice je platná norma převzatá z evropské legislativy: ČSN EN ISO/IEC 17025:2006 Posuzování shody – Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří.

### **2.3 Akreditace**

Výsledky analýz chemických laboratoří jsou mnohdy nejdůležitějším podkladem pro závažná rozhodnutí. Může se jednat například o rozhodnutí politická, soudní, environmentální nebo ekonomická.

Tato rozhodnutí mohou ovlivňovat zcela konkrétně například stav životního prostředí, stanovení cílů v kvalitě životního prostředí, produkci velkých i malých firem a podniků. V neposlední řadě ovlivňují významným způsobem také životy mnoha občanů a pracovníků ve firmách, které jsou jakýmkoliv způsobem zainteresované na výsledku analýzy.

Z výše uvedených důvodů je proto nutné, aby výsledky chemických laboratoří byly reprezentativní a co nejlépe vystihovaly skutečný stav zadaného úkolu.

Akreditací zkušební laboratoře se rozumí posouzení shody managementu jakosti laboratoře s kritérii mezinárodní normy ISO/IEC 17025:2005. Akreditace znamená uznání způsobilosti zkušební laboratoře vnitrostátním akreditačním orgánem k provádění zkoušek a/nebo vzorkování vymezených v Osvědčení o Akreditaci [1].

Výsledkem procesu akreditace je Osvědčení o akreditaci. Osvědčení o akreditaci neplatí pro laboratoř obecně, ale jsou v něm specifikována stanovení a metody, které jsou akreditované. Osvědčení o akreditaci je časově omezené, průměrná lhůta je 5 let. Akreditovaná laboratoř je pod neustálou kontrolou, její výsledky jsou také ověřovány a porovnávány s výsledky jiných laboratoří.

V České republice vydává Osvědčení o akreditaci pouze Český institut pro akreditaci, o.p.s. (ČIA). ČIA byl založen Ministerstvem průmyslu a obchodu v roce 1998 a sídlí v Praze.

### **2.4 Příručka kvality**

Příručka jakosti je základním interním dokumentem laboratoře, ve kterém je především popsán management jakosti a je hlavním předpokladem pro zavedení normy ISO/IEC 17025 a následnou akreditaci. Z normy je patrné, že příručka nemá žádnou striktně předepsanou formu ani obsah. Pro každou laboratoř je proto zpracována originální příručka jakosti, která odpovídá přesně potřebám laboratoře a stanoveným cílům kvality v laboratoři.

Hlavní účel příručky jakosti, stejně jako zavedení normy ISO/IEC 17025, představuje vytvoření dokumentu, ve kterém jsou zcela jasně stanovena pravidla pro samotnou hlavní pracovní náplň laboratoře, pro řešení vzniklých chyb a problémů v laboratoři a pro technické

a administrativní zajištění laboratoře. Příručka by měla být v písemné podobě a měla by být kdykoliv a komukoliv z pracovníků v laboratoři k dispozici.

Většina problémů nebo sporů, a to technického, administrativního nebo komunikačního rázu, by měla být v praxi vyřešena prostým nahlédnutím do příručky jakosti. V případě, že příručka neobsahuje odpovídající postup řešení, je nutné jej zavést a příručku aktualizovat. Plán aktualizací je opět pro každou laboratoř stanoven individuálně a je uveden v příručce jakosti. U začínající laboratoře budou aktualizace častější než u zavedeného zařízení. Průměrně se ovšem příručka jakosti aktualizuje jedenkrát za rok.

V chemických laboratořích se příručka jakosti skládá zpravidla ze dvou základních částí. V první části jsou sepsány administrativní, technické a personální požadavky a postupy. První část příručky v podstatě kopíruje osnovu normy ISO/IEC 17025. Druhá část se věnuje konkrétním pracovním postupům jednotlivých analýz, které se nazývají Standardní operační postupy (SOP).

## **2.5 Standardní operační postup**

Ve Standardní operačním postupu (SOP) je nezbytné přesně specifikovat jaký analyt, v jaké matici a s jakou přesností je předmětem analýzy a pro jaké účely budou získané výsledky sloužit. Požadavky na přesnost analýzy (pracovní rozsah) jsou určující faktory pro detailnost a přesnost SOP. Kompletní SOP se vlastně skládá z několika dílčích SOP, například SOP pro odběr vzorku, uchování vzorku, samotnou analýzu, práci s přístrojem, likvidaci odpadu nebo forma protokolu o výsledcích analýzy.

SOP je detailní popis technických požadavků a pracovních kroků pro jednotlivé stanovení. Je důležité vytvořit takový SOP, aby zde popsané postupy byly lehce pochopitelné a srozumitelné pro všechny pracovníky laboratoře. Podle SOP musí být naprosto jasné, který pracovník může činnost vykonávat, kde ji může vykonávat, jakým způsobem má činnost vykonávat, jak pořídit z provedené činnosti záznam a jak práci zkontrolovat.

Všechny pracovní postupy by měli být sjednoceny na požadované úrovni podrobnosti a v postupech by měli být obzvlášť připomenuty činnosti, u kterých je poměrně velké riziko vzniku případných chyb.

## **2.6 Význam příručky jakosti pro laboratoř environmentální analýzy**

Laboratoř, ve které je vyučován předmět Praktikum z environmentální chemie, nebude prozatím usilovat o plnění standardů mezinárodních norem ISO a o certifikát managementu kvality nebo o akreditaci. Vysokoškolská laboratoř nemá žádné zákazníky ani dodavatele v pravém slova smyslu, také administrativa a personální politika jsou v porovnání s klasickými komerčními laboratořemi nulové. Laboratoř slouží prakticky pouze k výuce studentů. Měření prováděná v předmětu Praktikum z environmentální analýzy nejsou nikde veřejně prezentována, pouze na semináři z tohoto předmětu, a proto v žádném případě neslouží jako podklady pro rozhodování.

Pro vypracování příručky jakosti budeme předpokládat, že tato laboratoř, kde je vyučován předmět Praktikum z environmentální analýzy, je začínající malou komerční laboratoří, která bude provádět stejná stanovení, jaká se běžně provádí v rámci jednotlivých praktických úloh. V dlouhodobějších plánech této laboratoře je splnění normy ISO/IEC 17025 a získání akreditace.

Základní důvody, proč se zavádí systém managementu kvality do komerčních laboratořích, jsou stejné i u vysokoškolské laboratoře. Také tato laboratoř usiluje o minimalizování chyb a

neshod, o zlepšení efektivity práce v rámci prováděných analýz a z toho plynoucí kvalitnější výsledky generované s menšími náklady.

Aplikace norem na vysokoškolskou laboratoř má relativně omezený rozsah z výše uvedených důvodů, avšak například sedm základních pravidel v normě ISO 9000 je dokonale použitelných i pro tuto laboratoř. Zavedení a dodržování japonského pravidla pěti S pracovního místa je pro práci ve stísněnějších podmínkách vysokoškolské laboratoře na Fakultě chemické VUT v Brně nezbytné.

## **3 PŘÍRUČKA JAKOSTI**

### **3.1 Systém managementu**

#### **3.1.1 Zařazení laboratoře**

Laboratoř je vedena jako společnost s ručením omezeným.

Název: ENVI ANALÝZY, s.r.o.

Adresa: Palackého 49, BRNO, 612 00

IČO: 87654321

Web: [www.envianalyzy.cz](http://www.envianalyzy.cz)

#### **3.1.2 Politika jakosti**

Management jakosti je zaveden v souladu s normou ISO/IEC 17025. Management laboratoře se zavazuje, že administrativní, personální a technický provoz laboratoře je řízen podle pravidel stanovených v příručce jakosti. Jednání se zákazníkem se bude řídit přesně podle smluvních podmínek ujednaných se zákazníkem. V případě problémů a neshod se zákazníkem se laboratoř pokusí v maximální možné míře akceptovat požadavky k maximální spokojenosti zákazníka. Vedení se zavazuje k neustálému zvyšování kvality práce v laboratoři, zlepšování pracovních podmínek, obnově technického vybavení, k zefektivňování pracovních postupů. Všichni pracovníci budou pravidelně zlepšovat své odborné znalosti a zvyšovat svoji kvalifikaci. Veškeré činnosti celé laboratoře i jednotlivých pracovníků povedou ke kvalitnějším výsledkům prováděných analýz, spokojenějšímu zákazníkovi a k dobrým ekonomickým výsledkům samotné laboratoře. Technická práce laboratoře se řídí SOP, které jsou připraveny k akreditaci.

#### **3.1.3 Cíle jakosti**

- Získání Osvědčení o akreditaci
- Kontrola laboratorních přístrojů a ostatního vybavení
- Zavedení a aplikace přehledného systému záznamů a dokumentace
- Zavedení a aplikace japonského pravidla „pěti S“ pro pracovní místo
- Omezení chybných analýz – zvýšení efektivity práce, snížení spotřeby standardů, rozpouštědel a ostatních činidel

### 3.1.4 Personální politika

#### 3.1.4.1 Vedoucí laboratoře

Požadavky na vedoucího laboratoře:

- VŠ vzdělání v oboru
- Min. 5 let praxe na obdobné manažerské pozici v oboru
- Řidičský průkaz skupiny B
- Znalost práce na PC a znalost AJ
- Výborné komunikační schopnosti, znalost cizího jazyka výhodou

Náplň práce vedoucího laboratoře:

- Jednání se zákazníkem
- Manažer kvality
- Interní auditor
- Řídící a administrativní práce nesouvisející s technickou praxí
- Pokladník
- Zaškolení nových pracovníků

Odpovědnost:

- Jednání se zákazníkem
- Provoz a ekonomické ukazatele celé laboratoře
- Správnost výsledků všech analýz
- Dodržování managementu kvality a SOP

#### 3.1.4.2 Zástupce vedoucího laboratoře

Požadavky na zástupce vedoucího laboratoře:

- VŠ vzdělání v oboru
- Min. 5 let praxe v oboru
- Řidičský průkaz skupiny B
- Znalost práce na PC
- Znalost AJ podmínkou, ostatní jazyky výhodou
- Dobré komunikační schopnosti a zkušenosti s vedením menší pracovní skupiny

Náplň práce zástupce vedoucího laboratoře:

- Jednání se zákazníkem v nepřítomnosti vedoucího laboratoře
- Řízení a administrativa záznamů a dokumentů spojených s technickou praxí
- Finální vyhotovení protokolu o provedené analýze
- Organizace práce v laboratoři
- Zaškolení nových pracovníků
- Zásobování laboratoře

Odpovědnost:

- Záznamy a dokumenty související s technickou praxí
- Efektivita práce
- Funkčnost všech laboratorních přístrojů
- Sklad chemikálií a laboratorního vybavení
- Správnost protokolu

### 3.1.4.3 Odborný laboratorní technik

Požadavky na laboratorního technika:

- VŠ nebo SŠ v oboru
- Znalost práce na PC

Náplň práce odborného laboratorního technika:

- Odběr vzorku
- Příprava vzorku
- Vlastní analýza
- Záznam o průběhu a výsledcích analýzy
- Úklid

Odpovědnost:

- Správnost výsledků jím prováděných analýz
- Za přístroj, na kterém momentálně pracuje
- Čistota, pořádek na pracovním místě, kde momentálně pracuje
- Správnost záznamů z analýzy
- Funkčnost, čistota a pořádek v úseku laboratoře, který je mu svěřen do péče

V laboratoři je v rámci již zmíněného předmětu prováděno sedm stanovení a odběr vzorků půdy. Předpokládají se tři pracovní místa na pozici odborného technika, jeden zástupce vedoucího laboratoře a vedoucí laboratoře. V případě nepřítomnosti vedoucího laboratoře přebírá jeho práci zástupce vedoucího a naopak. Pokud není přítomen nikdo z vedení laboratoře, přebírá jejich práci služebně nejzkušenější technik, avšak může se jednat jen o činnost, která je nezbytně nutná pro zajištění chodu laboratoře, například objednávka spotřebního materiálu.

Každý technik po prostudování dokumentace a odborném zaškolení provádí všechny analýzy včetně odběru vzorků půdy. Každý technik má odpovědnost za přístrojové vybavení, čistotu a pořádek na svém pracovním místě, na kterém momentálně pracuje. Dále je odpovědný za správnost výsledků provedené analýzy, ale pouze interně. Za výsledky provedené analýzy uvedené v protokolu, který je předán zákazníkovi, je odpovědná celá laboratoř, v čele s jejím managementem.

Mezi dva zkušené techniky se rovnoměrně rozdělí laboratorní přístroje a zařízení. Technik je odpovědný za správné fungování svěřených laboratorních přístrojů, provádí veškerou údržbu přístroje dle dokumentace k přístroji a stará se o čistotu a pořádek kolem přístroje. Služebně nejméně zkušený technik odpovídá za místnost určenou pro přípravu vzorků, sklady chemikálií a vzorků a ostatní laboratorní vybavení. Technici vždy pořizují ze své týdenní činnosti na svěřeném úseku záznam, který předají zástupci vedoucího laboratoře, který je celkově odpovědný za technické vybavení laboratoře. Pracovník dostává písemné pověření ke správě úseku laboratoře od vedoucího laboratoře, vedením laboratoře je vystaven předávací protokol, dále pracovník podepisuje dodatek k pracovní smlouvě o odpovědnosti za svěřené zařízení.

V případě, že se na svěřeném úseku vyskytnou jakékoliv nesrovnalosti, které by mohly ovlivnit provoz laboratoře anebo výsledky analýz a technik není schopen zjištěné nedostatky sám odstranit, je povinen to neprodleně oznámit vedení laboratoře.

V případě zanedbání pracovních povinností, nesprávného pracovního postupu nebo zanedbané správy svěřeného úseku může dojít k poškození laboratorního vybavení nebo

k chybným výsledkům analýzy. Náhrada škody se bude řešit s odpovědným pracovníkem dle podmínek pracovní smlouvy a zákoníku práce.

Za čistotu a pořádek místností, které přímo nesouvisí s technickou praxí laboratoře, zodpovídá každý pracovník vždy jeden týden, protože v laboratoři není zaměstnán speciální pracovník na běžný úklid.

Při odběru vzorků půdy nese pověřený pracovník odpovědnost za čistotu odběrového vybavení před vzorkováním, správný odběr reprezentativního vzorku a po vzorkování dekontaminaci náčiní a jeho uložení na určené místo. Technik dostává písemné pověření od zástupce vedoucího nebo vedoucího laboratoře.

### **3.1.5 Řízení dokumentů**

#### **3.1.5.1 Seznam dokumentů**

Interní řídicí dokumenty zahrnuté v managementu jakosti:

- Příručka jakosti
- Standardní operační postupy
- Provozní řád laboratoře
- Bezpečnostní předpisy
- Písemná nařízení vedoucího laboratoře
- Provozní záznamy laboratoře
- Časový plán interních auditů
- Výsledky interních auditů

Externí technické dokumenty:

- Osvědčení a akreditaci
- Osvědčení o kontrole přístrojů
- Návodů a příručky k laboratorním přístrojům
- Závazné normy

Každý dokument je zřetelně označen názvem, identifikačním číslem, datem zpracování, jménem zpracovatele. Se všemi interními dokumenty musí souhlasit všichni pracovníci laboratoře. Originály všech dokumentů jsou k dispozici v kanceláři zástupce vedoucího laboratoře v elektronické i písemné podobě. Kopie dokumentů jsou vždy k dispozici v místě použití dokumentu pro rychlé vyhledání informací. Všechny dokumenty jsou volně přístupné všem pracovníkům laboratoře.

Dokumenty související s administrativní, ekonomickou a obchodní činností laboratoře jsou ve správě vedoucího laboratoře a nejsou volně přístupné ostatním pracovníkům laboratoře.

#### **3.1.5.2 Změny dokumentů**

Protože se jedná o novou začínající laboratoř, budou interní dokumenty v prvním roce činnosti podrobeny přezkoumání a aktualizaci každé tři měsíce, především příručka jakosti a standardní operační postupy. V dalších letech praxe se předpokládá revize interních dokumentů minimálně jedenkrát za rok.

Každý pracovník má právo změnit jakýkoliv dokument, ovšem po předchozí konzultaci s vedením laboratoře, které změnou musí souhlasit.

Aktualizace musí být v dokumentu uvedena jasně a přehledně, a to formou poznámky v textu nebo formou přílohy k dokumentu s datem změny a podpisem zástupce vedoucího laboratoře. Aktualizovaná pasáž v textu musí být jasně zvýrazněna podtržením.

V případě přechodu na novou verzi dokumentu (minimálně jedenkrát za rok) jsou zastaralé dokumenty určené k archivaci zřetelně označeny jako zastaralé s datem ukončení jejich platnosti. Ostatní dokumenty jsou skartovány.

### **3.1.6 Jednání se zákazníkem**

Objednávku služeb laboratoře zákazník učiní podpisem smlouvy o dílo. Ve smlouvě o dílo je přesně specifikována objednaná služba například specifikovaný analyt a matrice, požadavky na analýzu, dále metoda analýzy a dokumentace k analýze. Pokud zákazník trvá na metodě stanovení, která není v laboratoři standardně prováděna, musí to být ve smlouvě řádně specifikováno. Smlouva musí být oboustranně přijatelná a vždy musí existovat v tištěné podobě. V případě, že zákazník změní své požadavky v průběhu analýzy, musí být sepsána nová smlouva o dílo. V laboratoři se vykonávají pouze ty postupy, pro které má tato laboratoř odpovídající přístrojové vybavení a pokud jsou její pracovníci odborně schopní příslušnou analýzu provést.

Vedoucí laboratoře nebo zástupce vedoucího laboratoře vedou záznamy o jednáních se zákazníkem. Vedoucí laboratoře je povinen informovat zákazníka o průběhu analýzy.

V případě výskytu problému, který by vedl k nesplnění smlouvy ze strany laboratoře, je vedoucí laboratoře povinen informovat zákazníka ihned.

Pokud bude laboratoř nucena využít pro objednanou analýzu služeb subdodavatele, a není to uvedeno ve smlouvě, musí o tom být zákazník písemně informován.

Subdodavatelská laboratoř musí splňovat minimálně stejné standardy jako původní pověřená laboratoř. Smlouvu o dílo v subdodavatelské laboratoři uzavírá původní laboratoř a subdodavatelská laboratoř.

Práce laboratoře na všech úrovních by měla vést k maximální spokojenosti zákazníka.

Přezkoumání poptávky, nabídky a smlouvy se má provádět praktickým a účinným způsobem, přičemž se mají vzít v úvahu finanční, právní, a časová hlediska. V případě interních zákazníků může být přezkoumávání poptávek, nabídek a smluv prováděno zjednodušeně [6].

Zákazníci ocení udržování dobré komunikace, poradenství a návody v technických záležitostech, odborná stanoviska a interpretace na základě dosažených výsledků. Po celou dobu prací, zvláště jedná-li se o rozsáhlý úkol, má být udržována komunikace se zákazníkem. Laboratoř má informovat zákazníka o jakémkoliv zpoždění nebo o závažnějších odchylkách v provádění zkoušek nebo kalibrací [6].

#### **3.1.6.1 Stížnosti**

Stížnosti, a to jak ústní tak také písemné, vyřizuje vedoucí laboratoře; v jeho nepřítomnosti pak zástupce vedoucího laboratoře. Všechny stížnosti jsou evidovány. Při řešení stížnosti se postupuje stejně jako při řešení neshodných prací.

### **3.1.7 Řízení neshodných prací**

Za neshodnou práci se považuje jakákoliv práce nebo výsledky, které jsou v rozporu s managementem kvality laboratoře nebo požadavkem zákazníka.

Obecný postup řešení chyby:

1. Identifikace chyby a stanovení závažnosti
2. Podle závažnosti návrh opatření na, co možná nejrychlejší, odstranění chyby
3. Identifikace příčiny vzniku chyby
4. Návrh na odstranění příčiny vzniku chyby
5. Úplné odstranění příčiny vzniku chyby nebo alespoň maximální eliminace rizika opakování
6. Aktualizace interních dokumentů

Řešení chyb a neshod s managementem kvality je v kompetenci managementu a odpovídá za ni vedoucí laboratoře. Všichni ostatní pracovníci jsou ovšem povinni mu vycházet v maximální možné míře vstříc a tím se podílet na neustálém zlepšování kvality laboratoře.

Identifikace neshodné práce nebo problémů spojených se systémem managementu nebo s činnostmi v oblasti zkoušení a/nebo kalibrace se mohou vyskytnout na různých místech v rámci systému managementu a technických činností. Mezi příklady patří stížnosti zákazníků, řízení kvality, kalibrace přístrojů, kontrola spotřebního materiálu, pozorování osob pracujících v laboratoři nebo dohled nad nimi, kontrola protokolů o zkouškách a kalibračních listů/certifikátů, přezkoumání systému managementu a interní nebo externí audity [6].

### **3.1.8 Řízení záznamů**

Všechny technické záznamy v elektronické i písemné podobě musí být skladovány tak, aby po dobu nutnou k jejich uchování nemohlo dojít k jejich znehodnocení nebo zneužití. Pevný disk s elektronickým archivem nesmí být v počítači, který je připojen k internetu.

Technické záznamy jsou souhrnem údajů a informací, které vyplynou z provádění zkoušek a/nebo kalibrací a které indikují, zda je dosaženo specifických parametrů kvality nebo procesu. Mohou zahrnovat formuláře smlouvy, pracovní listy, pracovní knížky, kontrolní listy, pracovní poznámky, regulační diagramy, externí a interní protokoly o zkouškách a kalibračních, certifikáty, poznámky zákazníka, písemnosti a informace ze zpětné vazby [6].

### **3.1.9 Interní audity**

Vedoucí laboratoře jako interní auditor pravidelně provádí kontrolu všech činností a dokumentů v laboratoři, které podléhají systému managementu jakosti, zda jejich kvalita stále odpovídá zavedeným standardům. Účelem kontroly je kromě, ověření kvalitativních standardů, také vyloučení stereotypu, který by mohl ohrozit kvalitu práce.

Provádění interních auditů se řídí časovým plánem, který je zpracován v samostatném dokumentu. Každá činnost nebo dokument musí být zkontrolován minimálně jedenkrát za 12 měsíců. Z interního auditu je vždy pořizován záznam s datem provedení auditu a podpisem auditora. V případě nalezení chyb v managementu kvality, musí být chyby neprodleně odstraněny a přijaty opatření k odstranění vzniku jejich příčiny.

Pokud je důvodné podezření, že by dodatečně zjištěné chyby ovlivnily výsledky analýz objednaných zákazníkem, musí být zákazník neprodleně informován.

### **3.1.10 Přezkoumání systému managementu**

Vedení laboratoře (vedoucí laboratoře a zástupce vedoucího) musí minimálně jedenkrát za 12 měsíců přezkoumat systém managementu a to na základě následujících dokumentů:

- Výsledky interních auditů
- Výsledky externích auditů
- Výsledky mezilaboratorního porovnání
- Zpětná vazba od zákazníka
- Stížnosti
- Ekonomické výsledky laboratoře
- Zlepšovací návrhy pracovníků
- Množství zjištěných chyb v managementu jakosti
- Nové normy a předpisy pro stanovení

Výsledkem přezkoumání managementu kvality jsou změny v interních dokumentech, především v příručce kvality, které povedou ke zlepšení jakostní úrovně laboratoře.

Aktualizaci příručky jakosti i jiných dokumentů musí jednohlasně schválit management laboratoře. Vzhledem k počtu pracovníků v laboratoři je velmi vhodné, aby se přezkoumávání systému managementu kvality a schvalování změn v dokumentech účastnili všichni pracovníci laboratoře. Právo rozhodovat a s konečnou platností schválit má ovšem pouze management.

Součástí přezkoumávání managementu kvality je také vyhodnocení splnění cílů kvality a stanovení nových cílů kvality na následující období.

Z procesu přezkoumávání managementu kvality je pořízen písemný záznam s jasně definovanými závěry a navrhovanými změnami v systému managementu kvality a dokumentech s datem vypracování a podpisy všech zúčastněných pracovníků.

## **3.2 Technické požadavky**

### **3.2.1 Seznam stanovení**

1. Analýza reziduí léčiv pomocí LC/MS
2. Musk sloučeniny pomocí SPME, GC/MS
3. Stanovení obsahu PAHs v půdním extraktu pomocí HPLC
4. Stanovení těžkých kovů metodou AAS
5. Stanovení obsahu PCB ve vzorku tuku pomocí GC/ECD
6. Stanovení rtuti ve vzorku půdy přístrojem AMA 254
7. Stanovení nesteroidních protizánětlivých látek ve vodách pomocí CZE
8. Odběr vzorků půdy

### **3.2.2 Prostory a podmínky prostředí**

Laboratoř je fyzicky rozdělena na tři provozy:

1. Vstupní hala, kancelář vedoucího laboratoře, sociální zázemí pro zákazníky
2. Šatna a sociální zázemí pro personál, sklad chemikálií, přípravná vzorků, sklad vzorků, kancelář zástupce vedoucího laboratoře
3. Technické místnosti s laboratorními přístroji pro vlastní analýzu

Do místností s laboratorními přístroji je vstup možný pouze z přípravné vzorků v přezůvkách a převlečení. Do přípravné vzorků lze vstoupit přes šatnu personálu nebo přes kancelář zástupce vedoucího laboratoře.

Prostředí, ve kterém jsou prováděny analýzy, splňuje všechny požadavky na správnost a neovlivnění výsledků vlivem nevhodného pracovního prostředí. Technické místnosti jsou klimatizované a je zde hlídána prašnost a vlhkost. Pracovní prostředí je organizováno v duchu japonského pravidla pěti S pracovního místa.

Na pracovním místě jsou pouze nástroje a pomůcky nezbytně potřebné k provádění práce. Všechny nástroje a pomůcky jsou zřetelně popsány a mají své pevně stanovené a označené místo. Pracovní místa jsou udržována v čistotě a pořádku.

Všechny důležité elektrické přístroje mají záložní zdroj elektrické energie. Ve všech prostorách laboratoře je instalováno bezpečnostní a protipožární zařízení.

### **3.2.3 Pracovní postupy**

Laboratoř používá pro své zkušební činnosti vhodné a ověřené pracovní postupy. Pracovní postupy jsou popsány ve standardních operačních postupech, které jsou součástí příručky jakosti. Standardní operační postup je zpracován pro každé stanovení a odběr vzorků půdy zvlášť.

Každý nový pracovník nejdříve podrobně prostuduje dokumentaci ke všem laboratorním přístrojům a pracovní postupy k jednotlivým analýzám, pak je teprve zaškolen zkušeným pracovníkem. Po prostudování dokumentů a zaškolení se stává pracovník oprávněnou osobou k práci na laboratorních přístrojích. Oprávnění obdrží písemně od vedoucího laboratoře.

Mezinárodní, regionální nebo národní normy, normativní dokumenty nebo jiné uznávané specifikace, které obsahují dostatečné a přesné informace o tom, jak provádět zkoušky a/nebo kalibrace, není nutno doplňovat nebo přepisovat jako vnitřní postupy, pokud jsou tyto normy,

normativní dokumenty nebo jiné uznávané specifikace napsány tak, že mohou být osobami pracujícími v laboratoři použity v podobě, jak byly publikovány [6].

### 3.2.4 Zařízení

Laboratoř disponuje veškerým laboratorním zařízením, které je nutné pro správné provádění výše uvedených stanovení a odběru vzorků půdy. Všechna zařízení dosahují potřebných požadavků a specifikací uvedených v normách pro příslušná stanovení. Na každém zařízení, které vyžaduje kalibraci, je na viditelném místě umístěn štítek s datem poslední kalibrace a s datem následující kalibrace.

Každé zařízení je před uvedením do provozu i během provozu pravidelně kontrolováno a kalibrováno podle plánu údržby technikem odpovědným za svěřené zařízení nebo externím servisním technikem, vyžaduje-li to povaha servisního zásahu. Jako součást zařízení se bere v úvahu i použitý software. Všechna zařízení jsou obsluhována pouze oprávněnými osobami.

Ke každému zařízení je vedena zvláštní složka, která obsahuje:

- Originální dokumentaci k zařízení
- Originální software k zařízení
- Plán velké údržby a kalibrace zařízení
- Protokoly o údržbě a kalibraci zařízení
- Záznamy o poškození, špatné funkci a provedených opravách
- Informace o umístění zařízení a jména odpovědných osob za zařízení.

Za tuto složku je odpovědný zástupce vedoucího laboratoře a proto je k dispozici v jeho kanceláři.

V blízkosti přístroje jsou na vhodném místě umístěny kopie návodu k přístroji a deník přístroje. Za deník přístroje je odpovědný technik, který odpovídá za celý přístroj. V deníku je v úvodu popsán plán a postup základní údržby a kalibrace přístroje. Dále je v deníku přehledně zaznamenáno datum měření, analyt a matrice, metoda měření, jméno technika, provedená údržba a případné problémy.

Zařízení, které nepracuje správně nebo dokonce poskytuje chybné výsledky, musí být zřetelně označeno a okamžitě vyřazeno z provozu. Pro opětovné zařazení přístroje po provedené opravě musí být jeho správná funkčnost ověřena zkouškou. Při zjišťování chyby v zařízení se postupuje stejně jako při řízení neshodných prací.

#### 3.2.4.1 Seznam zařízení

- Rotační vakuová odparka - Büchi
- Plynový chromatograf – Hewlett-Packard 6890N series 2.
- Přístroj k přípravě demineralizované vody – Mili-Q Academic firmy Milipore
- SPE extraktor – BAKER model SPE-12G s vakuovou pumpou Barmany, Co., USA,
- Přístroj EVATERM pro sušení dusíkem Labicom ČR
- Kapalinový chromatograf – Agilent 1100 Series
- Analytické váhy
- Extraktor – One-PSE
- Mikrovlnná pec – Multi wave 3000
- Ultrazvuková lázeň
- Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series
- Rotační vakuová odparka - RVO 200, INGOS

- Atomový absorpční spektrometr s elektrotermickou atomizací ZEE nit 60, Analytik Jena, SRN
- Advanced Mercury analyse AMA 254
- SPME vlákno - 65 $\mu$ m PDMS/DVB (Supelco, USA)
- Plynový chromatograf - HP 6890N (Agilent, USA)
- Hmotnostní spektrometr – MSD 5973N, EI, kvadrupól (Agilent, USA)
- Kapilární zónová elektroforéza Agilent CE (Agilent Technologies)

### 3.2.5 Vzorkování

Vybavení laboratoře na vzorkování, přepravu a skladování vzorků půdy odpovídá požadavkům normy i zákazníka.

Laboratoř se zabývá pouze vzorkováním půd. Plán vzorkování a pracovní postup vypracovává pověřený pracovník přesně podle přání zákazníka. Pokud je vypracováním plánu vzorkování pověřen technik, musí dát vypracovaný plán, před předložením zákazníkovi, nejprve ke schválení zástupci vedoucího laboratoře, případně vedoucímu.

Obecný postup vzorkování je uveden ve standardním operačním postupu vzorkování půd, který je součástí příručky jakosti. Požadavky na odběr vzorků půdy a přesný pracovní postup odběru vzorků půdy se vždy modifikují přesně podle přání zákazníka.

Požadavky zákazníka na vzorkování a laboratoři navrhnutý plán vzorkování jsou součástí smlouvy o dílo podepsané se zákazníkem. Laboratoři navrhnutý plán vzorkování půd musí být před podpisem smlouvy nejdříve prodiskutován se zákazníkem a zákazník musí s návrhem písemně souhlasit. Přesný plán vzorkování je pak uveden v protokolu o odběru vzorků.

Návrh plánu vzorkování pro zákazníka obsahuje:

- Přesně definované požadavky zákazníka
- Počet vzorků
- Vzorkovací schéma
- Vzorkovací nástroje
- Vlastní pracovní postup vzorkování
- Uchování vzorku – vzorkovnice
- Přeprava vzorku
- Skladování vzorku
- Úprava vzorků prováděná v laboratoři, je-li to přání zákazníka.

Během odběru vzorků pořizuje pověřený pracovník písemný záznam, který je součástí protokolu o odběru vzorků. V průběhu vzorkování věnuje odběrový pracovník zvýšenou pozornost správnému označení všech vzorků, uchování a přepravě. Dále musí svědomitě zaznamenávat všechny odchylky od schváleného plánu vzorkování a ostatní nesrovnalosti, které se vyskytly v průběhu práce.

Vzorkování je stanovený postup, při kterém je část látky, materiálu nebo výrobku odebrána, aby poskytla reprezentativní vzorek celku pro potřebu zkoušení nebo kalibrace. Vzorkování smí být také požadováno příslušnou specifikací, podle které má být látka, materiál nebo

vzorek zkoušen nebo kalibrován. V určitých případech (např. při soudních analýzách) nemusí být vzorek reprezentativní, ale je dán dostupností hodnocené matrice [6].

Postup vzorkování má popisovat volbu typu vzorkování, plán vzorkování, odběr a přípravu vzorku k analýze, a to za účelem získání požadovaných informací [6].

### **3.2.6 Zjišťování kvality výsledků zkoušek**

Laboratoř má postupy pro zjištění kvality výsledků a zkoušek, za které je odpovědný manažer kvality – vedoucí laboratoře. Ověřování kvality výsledků se děje náhodně, ovšem vždy minimálně jedenkrát za 6 měsíců. Při sebemenších pochybnostech o kvalitě výsledků z jakýchkoliv důvodů je ověřování kvality prováděno častěji podle potřeby.

Možnosti zjišťování kvality:

- Interní audit
- Mezilaboratorní porovnání výsledků
- Porovnání metody s jinou metodou
- Opakování zkoušky

Z ověřování kvality výsledků je pořízen písemný záznam. V případě zjištění problému se postupuje jako při řízení neshodných prací.

### **3.2.7 Uvádění výsledků**

Výsledky analýzy jsou prezentovány v souhrnném protokolu, který je předán zákazníkovi v písemné i elektronické podobě. Pokud laboratoř využije služeb subdodavatele, dokládá subdodavatel vlastní protokol, za který je odpovědný. Za správnost kompletního úkolu je ovšem stále odpovědná původně pověřená laboratoř. Pokud povaha práce subdodavatele neumožňuje samostatný protokol a výsledky je nutné zapracovat do protokolu, musí být tyto výsledky jasně označeny jako cizí.

Změny v textu po uzavření protokolu nejsou možné. Změnu lze realizovat pouze přiložením dalšího dokumentu k protokolu (příloha). Příloha musí být označena a splňovat všechny náležitosti protokolu. V případě nutnosti vydání nového protokolu se jedná o zcela nový dokument s novým sériovým číslem. V protokolu musí být jasně napsáno, který protokol nahrazuje. Starý protokol se viditelně označí jako neplatný.

#### **3.2.7.1 Obsah protokolu**

- a) Název protokolu
- b) Název a adresu laboratoře
- c) Název a adresu zákazníka
- d) Jednoznačnou identifikaci protokolu o zkouškách a na každé stránce identifikaci, která zajistí, že stránka je rozlišitelná jako součást protokolu o zkouškách a dále jasnou identifikaci konce protokolu [6]
- e) Přesnou specifikaci požadavků zákazníka
- f) Specifikace analytu a matrice
- g) Datum přijetí vzorku k analýze, datum analýzy
- h) Typ, popis přijímaného vzorku, podmínky při přijetí vzorku
- i) Odkaz na protokol o odběru vzorků, je-li to důležité pro platnost a použití výsledků
- j) Popis použité metody
- k) Výsledky měření
- l) Nejistota měření

- m) Odborný komentář k nejistotě měření
- n) Doplnkové informace k analýze
- o) Odborné komentáře, vyžaduje-li to povaha analýzy nebo zákazník
- p) Kalibrační list zařízení
- q) Jméno a podpis technika provádějícího analýzu
- r) Jméno a podpis vedoucího nebo zástupce vedoucího za správnost celého protokolu.

### **3.2.7.2 Obsah protokolu o odběru vzorků půdy**

- a) Název protokolu
- b) Název a adresu laboratoře
- c) Název a adresu zákazníka
- d) Jednoznačnou identifikaci protokolu o zkouškách a na každé stránce identifikaci, která zajistí, že stránka je rozlišitelná jako součást protokolu o zkouškách a dále jasnou identifikaci konce protokolu [6]
- e) Přesnou specifikaci požadavků zákazníka
- f) Specifikace analytu a matrice
- g) Datum a přesné místo odběru vzorků
- h) Počasí a povětrnostní podmínky
- i) Detailní popis lokality a matrice
- j) Plán vzorkování
- k) Metoda odběru vzorků, vzorkovací náčiní
- l) Množství vzorku, uchování vzorku, vzorkovnice
- m) Popis zpracování vzorku na místě odběru
- n) Přeprava vzorku
- o) Skladování vzorku v laboratoři
- p) Úprava vzorků prováděná v laboratoři
- q) Záznam z odběru vzorku
- s) Odborné komentáře, interpretace výsledků, je-li to důležité pro platnost a použití výsledků
- r) Doplnkové informace
- s) Jméno a podpis technika provádějícího odběr
- t) Jméno a podpis vedoucího nebo zástupce vedoucího za správnost celého protokolu

### **3.2.7.3 Odborná stanoviska a komentáře**

V odborném komentáři pracovníka laboratoře musí být jasně patrné důvody, na základě kterých je komentář vytvořen. V protokolu musí být komentáře viditelně označeny.

## 4 STANDARDNÍ OPERAČNÍ POSTUPY

### 4.1 Analýza reziduí léčiv pomocí LC/MS

Vzestup problému negativního vlivu léčiv na životní prostředí souvisí se zvýšenou spotřebou léčiv a také s dokonalejší analytickou technikou. Léčiva se skládají z aktivní látky a pomocných látek (plniva, pigmenty, vosky, tmelící látky). Rezidua léčiv jsou látky, které stávající čistírny odpadních vod nejsou schopny zcela odstranit. Rezidua léčiv se potom hromadí ve vyčištěné vodě a v čistírenském kalu, odtud pronikají do životního prostředí. Mají negativní vliv na proces čištění odpadní vody, jsou toxické a vzniká rezistence. Nejvíce kontaminované jsou dolní toky řek a delty ve velkých městských aglomeracích. Pitné a podzemní vody jsou kontaminovány pouze náhodně.

Kromě vybrané metody kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem lze rezidua léčiv stanovit také spektrofotometricky, plynovou chromatografií nebo kapilární zónovou elektroforézou. Jak u kapalinové, tak také u plynové chromatografie lze použít také standardní typy detektorů.

#### 4.1.1 Cíl

Kvantitativní analýza léčiv (salicylová kyselina, paracetamol) ve vzorku odpadní vody tandemovou technikou kapalinové chromatografie s hmotnostním spektrometrem jako detektorem.

#### 4.1.2 Příprava vzorku – Extrakce pevnou fází (*Solid Phase Extraction, SPE*)

SPE je dnes jedna z nejvyužívanějších a nejvýkonnějších technik pro rychlou a selektivní přípravu vzorku; proti tradiční soustavě kapalina – kapalina poskytuje lepší selektivitu a úsporu organických rozpouštědel. Její podstatou je zachycení molekul látky na tuhém sorbentu, přes který protéká vzorek. Při extrakci se využívá chemických vlastností molekul, které v důsledku mezimolekulových interakcí ulpívají na sorbentu [13].

Použití:

- Čištění látky
- Zakoncentrování stopových množství látek
- Výměna rozpouštědel (např. z vodné do organické)
- Derivatizace (analyt je zachycován na sorbent, převeden na derivát a eluován) [13]

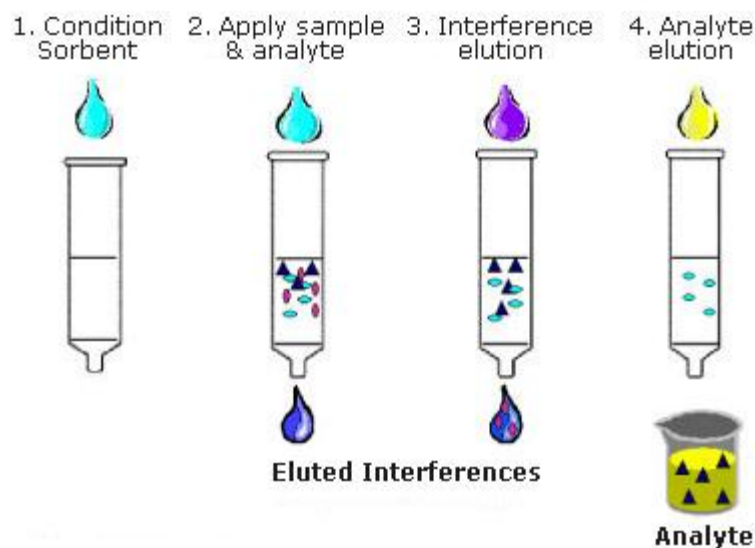
Základem jednoduché techniky SPE jsou krátké, relativně levné extrakční kolony na jedno použití. Může být mnoho provedení kolonek s různými náplněmi sorbentů.

Kapalný vzorek je veden přes SPE kolonku a sloučeniny jsou ze vzorku zachyceny materiálem sorbentu v koloně. Nežádoucí příměsi mohou být z kolony selektivně odstraněny promytím správně zvolenými rozpouštědly. Nakonec mohou být z kolony žadoucí analyty znovuzískány elučním rozpouštědlem v podobě vysoce čistého extraktu. Tento extrakt má často podstatně vyšší koncentraci analytu než měl původní vzorek [13]. Průtok činidel přes

kolonu lze urychlit třemi způsoby tlakem na vstupu do kolony, vakuovou pumpou na výstupu z kolony a centrifugací.

Aplikace:

- Zachycení chlorovaných pesticidů ve vodě
- Zachycení PCB
- Analýza PAH ve vodě



Obr. č 1 Schéma funkce SPE [14]

#### 4.1.2.1 Chemikálie, přístroje a sklo

- Chemikálie
  - Methanol pro HPLC
  - Deionizovaná voda upravená přístrojem Milli-Q Academic firmy Milipore o specifické vodivosti  $0,055\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  při  $24\text{ }^\circ\text{C}$ ,
  - 400ml vzorku vody
- Pomůcky a sklo
  - Vialky
  - Kolonky OASI<sup>®</sup> HLB cartridge, Waters, USA,
  - Mikropipeta
  - Běžné laboratorní vybavení

- Přístroje a zařízení
  - SPE extraktor BAKER model SPE-12G s vakuovou pumpou Barmany, Co., USA,
  - přístroj EVATERM pro sušení dusíkem Labicom ČR,

#### **4.1.2.2 Pracovní postup**

- Aktivace SPE kolonky 5ml MeOH
- Do kolonky se přidají 3ml deionizované vody ( pH bylo upraveno pomocí HCl na hodnotu 2)
- Aplikace 100 ml vzorku vody na kolonku (sorpce)
- Promytí kolony 3 ml deionizované vody
- Eluce vzorku přidáním 5ml MeOH.
- Vialky se vzorkem a rozpouštědlem se odpaří do sucha pod proudem dusíku
- Rozpuštění vzorku ve vialce v 1ml MeOH
- Přenesení vzorku pomocí mikropipety do vialky pro HPLC
- Uložení do ledničky pro pozdější zpracování na HPLC
- Při práci jsou dodržována pravidla správné laboratorní praxe

#### **4.1.2.3 Krizové body**

- Nastavení kohoutku průtoku kolonou
- Konstantní činnost a těsnost vakuového systému
- Pro minimalizaci rizika hrubé chyby se dbá zvýšené opatrnosti především při přípravě roztoků, označení připravených roztoků a zvláště se soustředí na popis a označení připravených vzorků a získaných výsledků

### 4.1.3 Vlastní analýza reziduí léčiv technikou (LC/MS)

#### 4.1.3.1 Kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography, LC)

Teorie ke kapalinové chromatografii je uvedena v SOP pro stanovení PAH v půdním extraktu viz strana 47.

V SOP, který bude předán do praktik, bude také uvedena příslušná teoretická část týkající se LC.

#### 4.1.3.2 Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry, MS)

*Hlavní součásti hmotnostního spektrometru:*

Vstup vzorku → ionizace → hmotnostní analyzátor → detektor → vyhodnocovací zařízení (PC)

Hmotnostní spektrum představuje záznam relativní četnosti iontových druhů, vzniklých procesem ionizace původní částice, v závislosti na poměru jejich hmotnosti a neseného náboje ( $m/z$ ). Hmotnostní spektrometrii lze zařadit mezi metody separační, neboť vedle řízeného postupu vzniku iontů je hlavním procesem jejich separace podle poměru hmotností a náboje ( $m/z$ ). Hmotnostní spektra jsou spektrům optickým podobna pouze svým vzhledem a formálním upořádáním. Základní součásti každého hmotnostního spektrometru jsou iontový zdroj, hmotnostní analyzátor (separátor) a detektor [2].

MS je nejpřesnější metoda při určování hmotností molekul (sumární vzorec), která je vhodná pro anorganické, organické, organokovové, přírodní i syntetické látky a všechny prvky. Pro analýzu stačí i velmi malé množství vzorku. MS dokáže měřit femtomoly  $10^{-15}$  mol až attomoly  $10^{-18}$  mol, lineární rozsah je až 12 řádů.

- *Ionizace*

Neutrální částici vzorku (molekula, atom, radikál) lze vhodnými způsoby dodat dostatečné množství energie, aby došlo ke vzniku iontů. Nejobvyklejším způsobem ionizace, zejména organických molekul, je ionizace svazkem ionizace urychlených elektronů, tzv. *electron impact* (EI) [2].

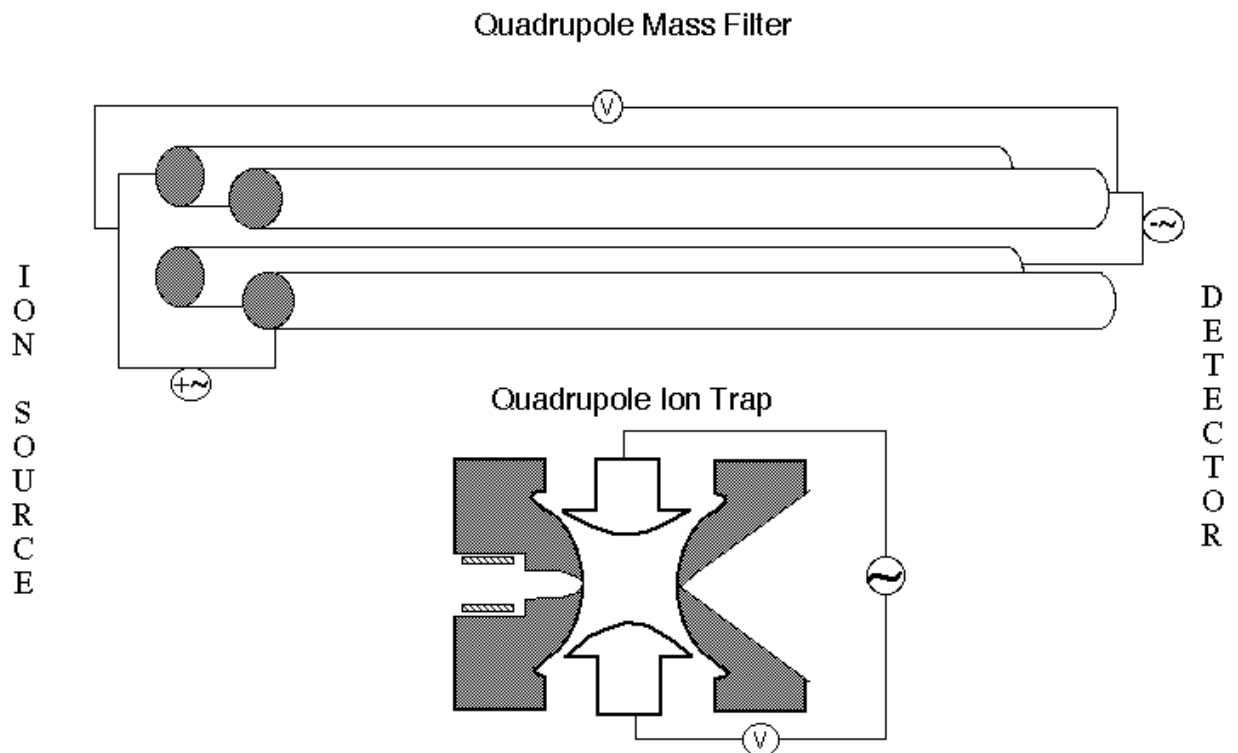
Elektrony emituje žhavé vlákno z kovu (W, Re), následně jsou elektrony urychlovány elektrostatickým polem. Při interakci s molekulami vzorku dochází k vyražení jednoho nebo více elektronů, a z původních molekul vznikají jedno nebo vícenásobně nabitě molekulové ionty. Na molekulové ionty je při interakci přenesena větší část energie z emitovaných elektronů, než je nutné pro vznik nabitých molekulových iontů (ionizační energie). Přebytek energie způsobuje rozštěpení (fragmentaci) molekulového iontu. Rozsah fragmentace je do jisté míry závislý na původní energii ionizujících elektronů.

Protože je poměrně snadné řídit energii ionizujících elektronů intenzitou elektrostatického pole dostatečně reprodukovatelně, reprodukovatelný je i vznik a poměr jednotlivých iontových druhů, tj. hmotnostní spektrum. Tento postup je zdrojem hmotnostních spekter, která jsou při energii elektronového svazku 70eV uspořádána po tzv. normalizaci do databází (knihoven) spekter [2].

EI je proto základní technikou při analýze neznámého vzorku; u ostatních ionizačních technik je spektrum velmi závislé na konkrétních podmínkách, a proto je velmi obtížné srovnávat jednotlivá spektra z různých přístrojů a podmínek.

- Kapalné vzorky
    - Elektrosprej (ESI) – používá se při spojení HPLC a CZE. Podstatou této techniky je ta skutečnost, že po průchodu roztoku (určitého složení) kovovou silně polarizovanou kapilárou dochází ke vzniku mikrokapiček, nesoucích na svém povrchu náboj. Při postupném zmenšování kapiček vlivem odpařování rozpouštědel dojde při určité velikosti ke zvýšení povrchové hustoty náboje nad kritickou mez. V tomto okamžiku způsobí elektrostatické odpuzování desintegraci kapky na množství dalších menších, na něž se rozprostře původní množství neseného náboje. Opakování tohoto procesu dojde posléze ke vzniku iontů samotných analytů [2].
    - Chemická ionizace za atmosférického tlaku
    - Fotoionizace za atmosférického tlaku
  - Plynné vzorky
    - Elektronová ionizace
    - Chemická ionizace
  - Pevné vzorky
    - *Matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI*
  - Prvky
    - Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (*Inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP MS*).
- 
- *Hmotnostní analyzátor*

V hmotnostním analyzátoru dochází k separaci iontů obecně na základě poměru hmotnosti a náboje ( $m/z$ ) v daném iontu a elektrickém, magnetickém poli, které na iont působí. Mohou obecně pracovat ve dvojitým módu – tzv. full scan, snímání hmotnostních spekter periodicky v čase nebo sledování intenzity jednoho nebo několika vhodně zvolených iontových druhů v čase (single ion monitoring SIM, multiple ion detection MID), tj. jako selektivní detektor. První mód je používán především k získávání spekter pro identifikaci analytů, druhý pro sledování změn relativního zastoupení složek s nižšími mezemi detekce a stanovitelnosti v důsledku vyšší selektivity [2].



Obr. č. 2 Kvadrupólový analyzátor a kvadrupólová iontová past [15]

- Kvadrupólový analyzátor (*Quadrupole, Q*)
- Kvadrupolová iontová past (*Quadrupole Ion-Trap analyser, QIT*)
  - Iontová past se skládá ze vstupní a z výstupní elektrody kruhového průřezu a z prstencové středové elektrody a jedná se v podstatě o trojrozměrný kvadrupól. V prostoru mezi elektrodami se shromažďují ionty a je sem zaváděno He pod nízkým tlakem, které tlumí oscilace iontů a napomáhá jejich semknutí. Změnou nastavení veličin napětí na elektrodách jsou ionty zase odváděny k detektoru.
  - Malý, citlivý, rychlý detektor s menším rozlišením
  - Umožňuje strukturní analýzy a fragmentaci iontu
- Další typy hmotnostních analyzátorů
  - Iontová cyklotronová rezonance (*Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance, FT-ICR*)
  - Analyzátor doby letu (*Time Of Flight, TOF-MS*)
  - Magnetický analyzátor
  - Elektrostatický analyzátor.
- *Detektor*

Jako detektory se používají zpravidla elektronové násobiče, Faradayovy cely, magnetické násobiče u TOF.

- *Vakuový systém*

Ionty, vznikající řízeným postupem ionizace, nesmějí měnit neřízeně svou energii, zejména nechtěnými srážkami. Proto je nutné v celém systému nebo v oblasti analyzátoru až k detektoru udržovat tlak na nízkých hodnotách, aby střední volná dráha iontů za daných podmínek významně přesahovala dráhu fyzickou od místa vzniku iontu až k místu jeho detekce. Pro tlaky na úrovni  $10^{-3} - 10^{-5}$  Pa jsou proto využívány turbomolekulární vývěvy, pro tlaky nižší obvykle vývěvy difúzní [2].

#### **4.1.3.3 Chemikálie, přístroje a sklo**

- Chemikálie:
  - Methanol pro HPLC
  - Deionizovaná voda upravená přístrojem Mili-Q Academie firmy Millipore o specifické vodivosti  $0,055 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  při teplotě 24 °C
  - 10 mM amonium acetát
  - *Standardy*: (salicylová kyselina, paracetamol) o koncentraci 0,1 mg/ml
- Přístroje a zařízení:
  - Vialky
  - Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series
  - Hmotnostní spektrometr Agilent Technologies
  - Kolona ZORBAX Eclipse XDB-C18 (2,1 x 150 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ )

#### **4.1.3.4 Nastavení přístrojů**

- Parametry kapalinového chromatografu Agilent 1100 Series:
  - Nástřik: 1  $\mu\text{l}$
  - Průtok: 0,15 ml/min
  - Rozpouštědlo: 40 : 60 (metanol:amonium acetát) – izokratická eluce
  - Teplota kolony: 25 °C
  - Detektory: DAD; MS
- Parametry hmotnostního spektrometru Agilent Technologies:
  - Mode: ultrascan
  - Podmínky ionizace: ESI; tlak 20  $\psi$
  - Průtok  $\text{N}_2$ : 10 l/min
  - Sušící teplota: 350 °C

- Scan iontové pasti: 200 – 250

#### **4.1.3.5 Příprava potřebných roztoků**

Připraví se kalibrační roztoky sledovaných analytů o koncentraci 10, 5, 3 µg/ml.

- Základní vztah:  $c_1 V_1 = c_2 V_2$

Pipetuje se 100, 50 a 30 µl standardu a doplní se rozpouštědlem na 1 ml.

#### **4.1.3.6 Vlastní pracovní postup**

- Změří se kalibrační roztoky a z výsledků se sestaví kalibrační křivky
- Od každého analytu se proměří tři vzorky
- Z naměřených hodnot pro neznámé vzorky se metodou kalibrační křivky vyhodnotí koncentrace analytu ve vodě v jednotkách µg/ml
- Přesný pracovní postup a ovládání přístroje vysvětlí vedoucí praktika
- Při práci jsou dodržována pravidla správné laboratorní praxe.

#### **4.1.3.7 Kritické body**

- Pro minimalizaci rizika hrubé chyby se dbá zvýšené opatrnosti především při přípravě roztoků, označení připravených roztoků a zvláště se soustředí na popis a označení připravených vzorků a získaných výsledků.

#### **4.1.3.8 Prezentace výsledků**

V protokolu bude kromě standardních součástí uvedeno:

- Přehledná tabulka výsledků pro oba analyty
- Grafy kalibračních křivek obou analytů
- Výpočty
  - kalibračních roztoků
  - výsledků z rovnice regresní přímky
- Chromatogramy

## 4.2 Musk sloučeniny pomocí SPME, GC/MS

Musk sloučeniny byly původně získávány jako látky čistě přírodního původu; jsou součástí vonných silic rostlin nebo vonných látek živočišného původu (pižmo). Dnes jsou v drtivé většině vyráběny synteticky, a to ve statisících tun za rok. Přidávají se do parfémů, kosmetiky, detergentů a čisticích prostředků. Do ŽP se dostávají z odpadních vod. Jsou detekovány nejen v půdě, povrchové vodě, rybách, ale také v mateřském mléce.

Nejškodlivější pro ŽP jsou nitro-deriváty musk sloučenin (Musk xylen, Musk keton), velmi používané jsou také polycyklické musk sloučeniny (Galaxolid, Tonalid). V současné době je největším producentem Čína a mnohé nitromusk sloučeniny jsou již v některých zemích zakázány. Polycyklické musk sloučeniny jsou šetrnější k životnímu prostředí, nejvíce používány jsou především v EU. Všechny nitromusk sloučeniny se kumulují v tukové tkáni a jsou koncentrovány především ve vodním prostředí. Makrocyklické a lineární musk sloučeniny jsou nejvíce šetrné, nejméně prozkoumané a očekává se jejich zvýšená produkce.

Musk sloučeniny jsou perzistentní, bioakumulativní (tuková tkáň), semivolatilní sloučeniny. Některé z nich jsou karcinogenní, jiné byly označeny za endokrinní disruptory. V prostředí se metabolizují na látky s odlišnými vlastnostmi. Jsou to karcinogeny 3. třídy, které poškozují játra a jejich amino-metabolity atakují DNA.

### 4.2.1 Cíl

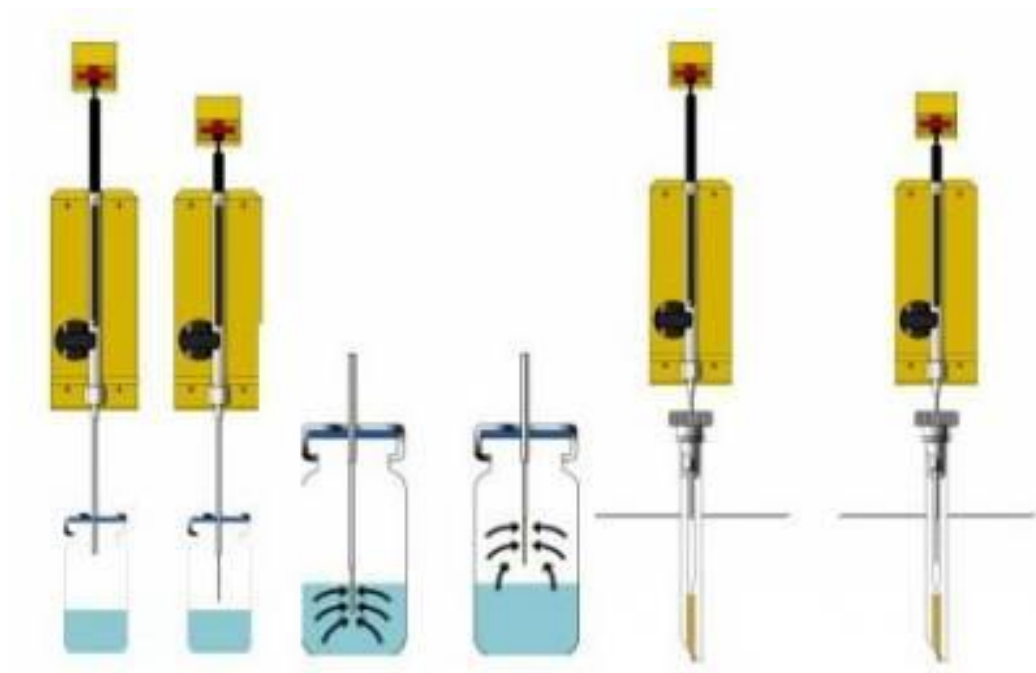
Analýza musk sloučenin (galaxolid, phantolid, musk xylen) ve vodě technikou mikroextrakce pevnou fází s následnou analýzou tandemovou technikou plynové chromatografie s hmotnostním detektorem.

1. Analýza bude provedena s použitím 4 různých SPME vláken (PDMS/DVB, 65  $\mu\text{m}$ ; PDMS, 7  $\mu\text{m}$ ; PDMS 100  $\mu\text{m}$ ; PA 85  $\mu\text{m}$ ). Pro další práci bude vybráno vlákno poskytující nejlepší odezvu na analyzované sloučeniny. Z chromatogramu budou zjištěny retenční časy analytu a budou zjištěna jejich hmotnostní spektra (a určeny kvantifikační ionty) [30].
2. Analýza bude realizována v SPME provedení „head space“ a „přímé ponoření“. Bude porovnána velikost odezvy daných analytu [30].
3. Analýza bude realizována při různých teplotách a expozičních časech. Bude porovnána velikost odezvy daných analytu [30].

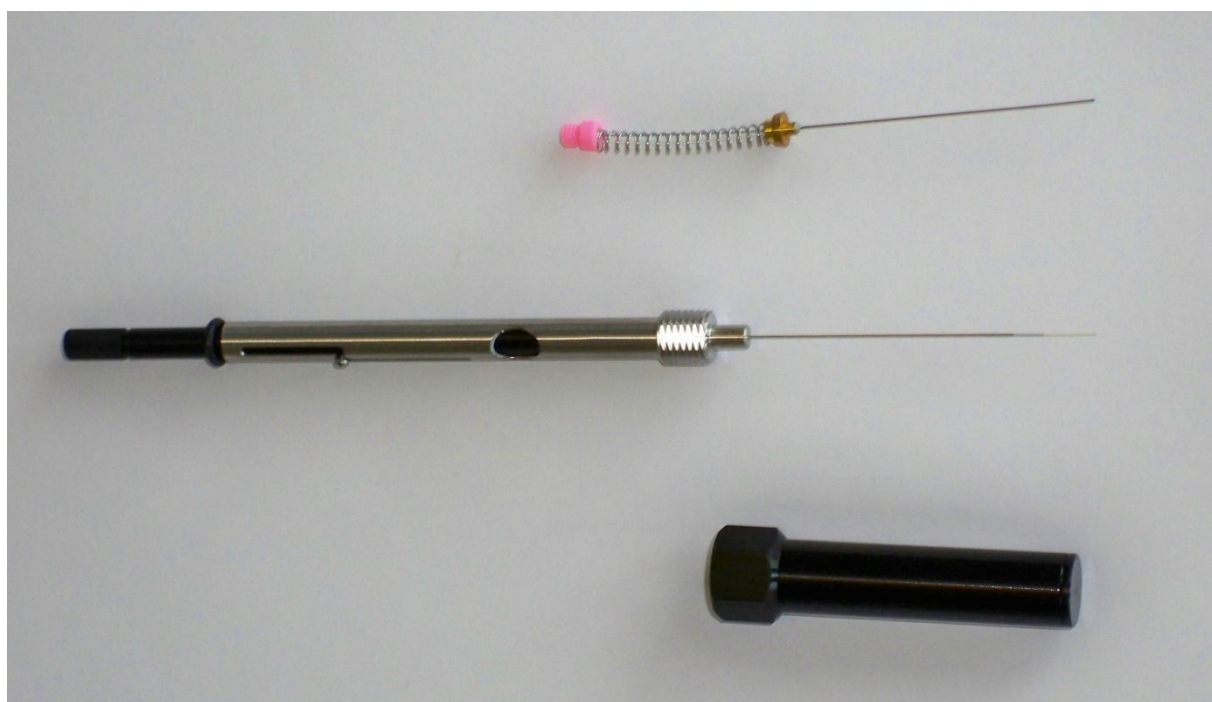
Zadání upřesní vedoucí praktika!

### 4.2.2 Příprava vzorku – Mikroextrakce pevnou fází (Solid Phase MicroExtraction, SPME)

Modifikace techniky SPE, která nevyžaduje složitou instrumentaci a především nepotřebuje rozpouštědlo. Vlákno z taveného křemene pokryté zakotvenou fází je ponořeno do kapalného vzorku nebo umístěno nad kapalný vzorek do prostředí nasyceného těkavými analyty. Po určitou dobu se nechá probíhat sorpce na tuhou fází. Následuje analytický stupeň, kterým je obvykle plynová chromatografie. Vlákno necháme v dávkovacím zařízení termicky desorbovat při teplotách kolem 300 °C a analyty se přímo aplikují do chromatografické kolony, kde se provede separace [13].



*Obr. č. 3 Průběh SPME [16]*



*Obr. č. 4 SPME [11]*

#### 4.2.2.1 *Chemikálie, přístroje a sklo*

- Chemikálie:
  - Aceton
  - Destilovaná voda
  - *Standardy*: Musk xylen (0,1 mg/ml v cyklohexanu), Galaxolid (1 mg/ml v isooctanu), Phantolid (1 mg/ml v izooktanu)
- Pomůcky a sklo:
  - SPME vlákno (modré): 65 μm PDMS-DVB (Supelco, USA)
  - SPME vlákno (zelené): 7 μm PDMS (Supelco, USA)
  - SPME vlákno (červené): 100 μm PDMS (Supelco, USA)
  - SPME vlákno (bílé): 85 μm PA (Supelco, USA)
  - Mikropipeta
  - Běžné laboratorní, analytické vybavení

#### 4.2.2.2 *Příprava potřebných roztoků*

Připraví se kalibrační standard: mix 3 analyzovaných musk sloučenin o koncentraci 1 ng/μl.

- Základní vztah:  $c_1 V_1 = c_2 V_2$

#### 4.2.2.3 *Pracovní postup*

- Do vialky o objemu 22 ml se napipetuje 14 ml destilované vody a přidá se 100 μl připraveného standardu
- Vialka se ponoří do míchané vodní lázně (900 ot/min) s teplotou 80 °C
- Po ustálení rovnováhy teplot (5 min) se vsune přes septum jehla SPME a vysune se vlákno nad hladinu (head space) nebo se ponoří do roztoku
- Po době expozice (30 min) se vlákno zasune zpět, jehla SPME se vyjme a vloží do inletu plynového chromatografu
- Při práci jsou dodržována pravidla správné laboratorní praxe.

#### 4.2.2.4 *Kritické body*

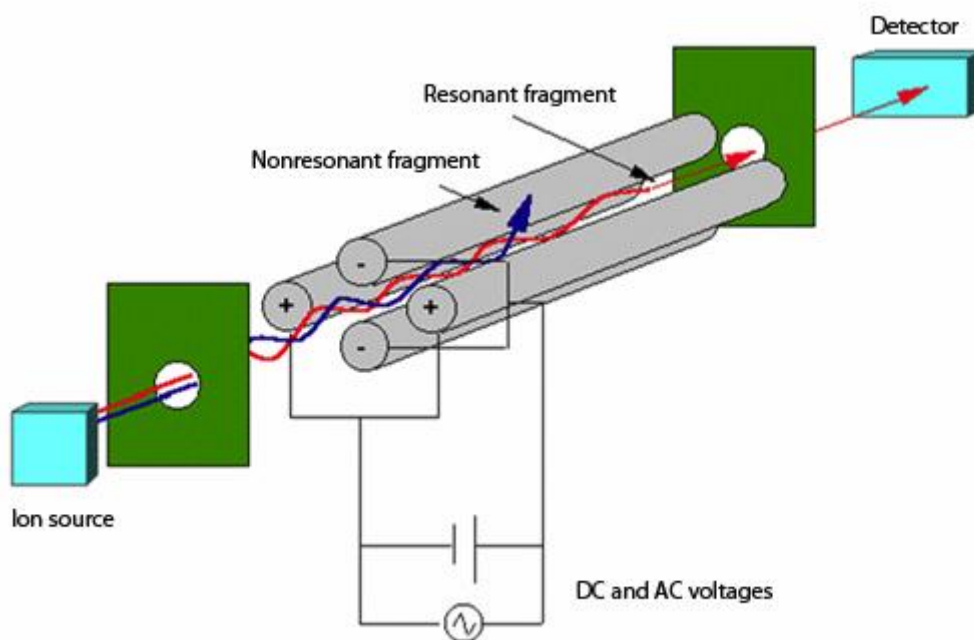
- Pro minimalizaci rizika hrubé chyby se dbá zvýšené opatrnosti především při přípravě roztoků, označení připravených roztoků a zvláště se soustředí na popis a označení připravených vzorků a získaných výsledků.

### 4.2.3 Vlastní analýza analýza musk sloučenin technikou GC/MS

Teorie pro GC je uvedena v SOP pro stanovení PCB v tuku viz. strana 56, teoretická část MS je uvedena v SOP pro stanovení léčiv viz. strana 27.

V SOP, který bude předán do praktik, budou uvedeny příslušné teoretické části týkající se GC a MS.

#### Kvadrupólový analyzátor (*Quadrupole, Q*)



Obr. č. 6 Kvadrupólový analyzátor [17]

- Kvadrupol tvoří čtyři tyčové elektrody, na které je přiváděno stejnosměrné napětí a současně střídavé napětí. Změnou hodnot veličin stejnosměrného napětí, amplitudy a frekvence střídavého napětí se určuje trajektorie iontu s určitou hodnotou  $m/z$ . K detektoru doletí tedy pouze iont, kterému vyhovuje momentální nastavení. Nastavení veličin napětí se ovšem rychle mění a detektor zachycuje celé spektrum iontů a různých  $m/z$ .
- Relativně rychlý, jednoduchý a levný detektor, nepotřebuje vysoké vakuum
- Menší rozsah měřených hmotností a nižší rozlišení
- Je vhodný pro anorganické a lehčí organické sloučeniny, peptidy a proteiny především ve spojení s ESI
- Je vhodný pro GC/MS, HPLC/MS a tandemové uspořádání analyzátorů

#### 4.2.3.1 Chemikálie, přístroje a sklo

- Přístroje a zařízení:
  - GC Hewlett-Packard 6890N (Agilent, USA)
  - *Kolona*: kapilární, stacionární fáze: DB-5MS; rozměry: 20 m, 0,180 mm, 0,18 µm; limit teplot: -60 °C-325 °C (Agilent Technologies, USA)
  - Hmotnostní detektor MSD 5973N (Agilent, USA) [EI, kvadrupól]
- Nosný plyn: He 6.0

#### 4.2.3.2 Nastavení přístrojů

- Nosný plyn: He
- Teplota injektoru: 250 °C
- Režim injektoru: splitless
- Tlak nosného plynu v injektoru (koloně): 116 kPa
- Průtok nosného plynu injektorem: 28,5 ml/min
- Režim kolony: konstantní průtok
- Průtok nosného plynu kolonou: 0,8 ml/min
- Lineární rychlost nosného plynu v koloně: 40 cm/sec
- Doba analýzy: 36 min
- Teplota transferline: 280 °C
- Teplota iontového zdroje: 230 °C
- Teplota kvadrupolu: 150 °C
- Režim analyzátoru: SCAN (m/z: 30-350)
- Solvent delay: 20 min

Tab. č.1

Teplotní rampa		
Rampa	Teplota	Drženo
počátek	50 °C	3 min
15 °C/min	110 °C	0 min
5 °C/min	165 °C	8 min
15 °C/min	285 °C	2 min

#### **4.2.3.3 *Vlastní pracovní postup***

- Konkrétní úkol, obsluhu přístroje, celkový pracovní postup včetně vyhodnocení dat a požadavky na protokol upřesní vedoucí praktika
- Při práci jsou dodržována pravidla správné laboratorní praxe

#### **4.2.3.4 *Kritické body***

- Pro minimalizaci rizika hrubé chyby se dbá zvýšené opatrnosti především při přípravě roztoků, označení připravených roztoků a zvlášť se soustředí na popis a označení připravených vzorků a získaných výsledků

#### **4.2.3.5 *Prezentace výsledků***

V protokolu bude uvedeno kromě standardních součástí uvedeno:

- Přehledná tabulka výsledků
- Výpočty
- Chromatogramy
- Hmotnostní spektra

### 4.3 Stanovení obsahu PAHs v půdním extraktu pomocí HPLC

Polyaromatické uhlovodíky (PAU) jsou jedny z nejzávažnějších kontaminantů životního prostředí. Jsou detekovány ve všech složkách životního prostředí. Jsou řazeny mezi persistentní organické polutanty. Jsou transportovány dálkovým přenosem, mají schopnost bioakumulace a váží se na pevné částice [3].

Emise PAU se pohybuje ve stovkách tisíc tun za rok. Hlavním zdrojem emisí jsou antropogenní spalovací procesy, především spalování fosilních paliv, provoz spalovacích motorů, hliníkární, zpracování ropy a uhlí. Průmyslové emise představují podíl asi devadesát procent. Přírodní emise jsou z vulkanické činnosti a lesních požárů.

Člověk je vystaven negativním vlivům PAU nejenom z vnějšího prostředí, ale také je ohrožen „vlastní“ produkcí. PAU jsou produkovány při smažení, grilování, uzení a také při kouření. PAU mohou působit pro živé organismy jako karcinogeny, mutageny a teratogeny.

PAU vznikají pyrolýzou a následnou pyrosyntézou. Nejdříve se za vysoké teploty rozštěpí organické molekuly na menší méně stabilní fragmenty (pyrolýza), které se pak spojují do stabilních PAU (pyrosyntéza).

V atmosféře podléhají PAU fotochemickým, oxidačním a termickým reakcím. Do ŽP se dále dostávají suchou a mokrou depozicí a dálkovým transportem.

PAU se sorbují na popílek a prachové částice (městské, průmyslové aglomerace). Distribuce PAU do půdy je závislá na depozici tuhých částic z ovzduší, která je zase závislá na meteorologických podmínkách, rozpustnosti ve vodě a sorpčním koeficientu. V půdách se sorbují na půdní částice, zejména zástupci s vyšší molekulovou hmotností. Ve vyhlášce o ochraně zemědělského půdního fondu č. 13/1994 Sb. je limitován pouze obsah antracenu, benzo(a)antracenu, benzo(a)pyrenu, fenantrenu, fluorantenu, chrysenu a naftalenu samostatně a jako suma 1 mg/kg sušiny. Obsah PAU (12 analytů) je také limitován v odpadech používaných pro povrchovou úpravu terénu podle vyhlášky č. 294/2005 Sb. (6 mg/kg sušiny) [3].

Polyaromáty mohou mít dvě až sedm benzenových jader, pro životní prostředí jsou nejvíce nebezpečné aromáty s dvěma a třemi benzenovými jádry, protože mají vysokou akutní toxicitu. Fyzikální a chemické vlastnosti jsou závislé na molekulové hmotnosti. S rostoucí molekulovou hmotností klesá rozpustnost ve vodě a těkavost a naopak roste bod tání a varu nebo lipofilita.

Mezi nejznámější zástupce patří 16 zástupců, které byly určeny U.S. EPA jako prioritní zástupci PAU: naftalen, acenaftýlen, acenaften, fluoren, fenanthren, anthracen, fluoranthen, pyren, benz(a)anthracen, chrysen, benzo(b)fluoranthen, benzo(k)fluoranthen, benzo(a)pyren, dibenzo(a,h)anthracen, indeno(1,2,3-c,d)pyren a benzo(ghi)perylene [35].

- Rozdělení polyaromatických sloučenin podle molekulové hmotnosti:

- Nízkomolekulární

Acetanaftalen, Anthracen, Fenanthren, Fluoren, Acetnaftýlen, Naftalen

- Středněmolekulární  
Fluoranthren, Pyren
- Vysokomolekulární  
benzo(a)anthracen, chrysen, benzo(b)fluoranthren, benzo(k)fluoranthren,  
benzo(a)pyren, dibenz-(a,h)anthracen, benzo(g,h,i)perylene, indeno(c,d)pyren

Kromě níže uvedených možností extrakce půdní matrice lze PAU extrahovat také Soxhletovou extrakcí (časově náročná, velká spotřeba rozpouštědel) nebo extrakcí tekutinou v nadkritickém stavu. Vzorky PAU jsou většinou velmi složité, proto je nutné k jejich analýze použít účinnou separační techniku – nejčastěji kapalinovou nebo plynovou chromatografii. Vhodné detektory pro analýzu PAU plynovou chromatografií jsou plamenoionizační detektor nebo hmotnostní spektrometr.

#### 4.3.1 Cíl

Kvalitativní a kvantitativní analýza polyaromatických uhlovodíků v extraktu půdy metodou vysoko účinné kapalinové chromatografie s fotometrickým a fluorometrickým detektorem.

#### 4.3.2 Zpracování vzorků půdy pro analýzu organických kontaminantů

##### 4.3.2.1 Extrakce ultrazvukem

Ultrazvuk způsobuje stlačování a expanzi molekul média. V kapalinách dochází při expanzi k vytvoření tlaku, který v nich podporuje vznik bublin a dutin. Samotný vznik těchto útvarů není pro vlastní využití ultrazvuku tak významný, protože v nich nedochází k přenosu vlnění, ale důležitý je jejich zánik.

Protože bubliny a dutiny nemůžou účinně absorbovat ultrazvukovou energii, dochází k jejich implozi (rozpadu). Přítomnost pevné látky v kapalině při průchodu ultrazvukových vln způsobuje to, že rozpad bublin je v okolí pevné látky asymetrický, čímž v kapalině vzniká proudění. Tyto proudy jsou velice rychlé a tím, že naráží do pevné látky, umožňují průnik rozpouštědla do vzorku. Rychlost kapaliny, která přichází k povrchu pevné látky, může být až  $400 \text{ km}\cdot\text{h}^{-1}$  a proto je účinek na povrch látky velmi silný.

##### 4.3.2.2 Extrakce podporovaná tlakem

Extrakce podporovaná tlakem (PES) je technika, která kombinuje zvýšenou teplotu a tlak ve spojení s kapalnými rozpouštědly k dosažení rychlé a efektivní extrakce analytu z pevného vzorku.

Při zvýšené teplotě až do  $200 \text{ }^{\circ}\text{C}$  se zvyšuje difúzní rychlost, rozpustnost analytu a prostupnost hmoty, klesá viskozita a povrchové napětí rozpouštědla. Tyto změny zlepšují kontakt analytu s rozpouštědlem a zlepšují extrakci, takže může být dosažena rychleji s použitím menšího množství rozpouštědla.

Vysoký tlak (4 – 20 Mpa) zatlačuje rozpouštědlo do pórů matrice vzorku a také udržuje rozpouštědlo v kapalném stavu.

Při extrakci podporované tlakem se optimalizují tyto parametry: množství a skladba vzorku, typ, objem a průtok rozpouštědla, teplota, tlak a počet cyklů. Optimalizací parametrů se určí

takové hodnoty parametrů, při kterých je extrakce nejúčinnější. Oproti standardní extrakci v Soxhletově extraktoru dochází ke značné úspoře času (cca 20 min místo 4 – 24 hod) i rozpouštědla (cca 30 ml proti 0,5l).

#### 4.3.2.3 Mikrovlnná extrakce s použitím rozpouštědla

Extrakce podporovaná mikrovlnným ohřevem (*Microwave-Assisted Solvent Extraction*, MASE) je technika založená na působení mikrovln, které zahřívají extrakční činidlo (organické rozpouštědlo) obklopující vzorek. Účinnost závisí především na teplotě a povaze extrakčního činidla.

Mikrovlny jsou elektromagnetické vlnění o frekvencích 3 – 300 GHz. Pro MASE je používána frekvence 2450 MHz.

Neionizující mikrovlnné záření absorbují jen molekuly s dielektrickou povahou. Molekuly s vysokou dielektrickou konstantou se snaží orientovat v elektrickém poli, to se ale mění tak rychle, že začnou vibrovat a v důsledku tření (srážky sousedních molekul) se zahřívají.

Mikrovlny absorbují nejčastěji rozpouštědlo a tím vzroste jeho teplota a tlak – účinnější extrakce nebo mohou působit na vzorek (rozpouštědlo se nezahřívá), kde dochází k uvolnění zahřátých analytů ze vzorku přímo do chladného rozpouštědla.

Používají se nádoby vyrobené z teflonu, které neabsorbují mikrovlnné záření.

#### 4.3.2.4 Chemikálie, přístroje a sklo

- Chemikálie:
  - Aceton, n-hexan, acetonitril, dichlormethan
  - *Standardy*: roztoky vnitřních standardů v isoocetanu
    - deuterovaný fenanthren, naftalen, pyren c = 10 µg.ml<sup>-1</sup>
  - Silikagel 60 pro sloupcovou chromatografii (velikost částic 0,063 – 0,2 mm, aktivace při 130°C 4 hod.)
  - Bezvodý síran sodný (žíhaný při 650 °C)
  - Dusík čistota 4.0 nebo vyšší
- Pomůcky a sklo:
  - Patrony do mikrovlnné extrakce a do PSE
  - Kolona na sloupcovou chromatografii (25 cm x 1 cm)
  - Vialky
  - Běžné laboratorní, analytické vybavení

- Přístroje a zařízení:
  - Analytické váhy
  - Ultrazvuková lázeň
  - Rotační vakuová odparka – RVO 200, INGOS, ČR
  - Multi wave 3000, Anton paar – mikrovlnné extrakce
  - One – PSE, Applied Separations – zrychlená extrakce rozpouštědlem.
  - Přístroj na sušení dusíkem – EVATERM

#### 4.3.2.5 Pracovní postupy

Odebraný vzorek, po předchozím zpracování na místě odběru, se suší při laboratorní teplotě. Po vysušení se přesítuje přes síto s velikostí ok 0,6 mm. Pro další experimenty použijeme frakci o velikosti zrn < 0,6 mm. Při práci jsou dodržována pravidla správné laboratorní praxe.

#### Extrakce podporovaná tlakem

- 10 g vzorku půdy se odváží s přesností na 0,01 g a smíchá se se zhruba stejným množstvím hydromatrixu.
- Plnění extrakční patrony o objemu 11 ml:
  1. Na dno patrony se nasype malé množství síranu sodného
  2. Do patrony se přisype cca polovina směsi vzorku s hydromatrixem
  3. Přidá se 10 µl roztoku vnitřního standardu
  4. Přisype se zbytek směsi vzorku a hydromatrixu
  5. Extrakční patrona se doplní hydromatrixem cca 1 cm pod horní okraj
- Patrona se vloží do extraktoru, pod výstup se umístí 30 ml vialka na sběr extraktu a extrahuje se směsí n-hexan:aceton s podmínkami uvedenými níže v tabulce:

Tab. č. 2

<b>Tabulka PES</b>	
Rozpouštědlo	HEX:ACE
Tlak	14 MPa
Teplota	100 °C
Počet cyklů	2
Doba cyklů	5 min
Proplach rozpouštědlem	20 s
Sušení dusíkem	1 min

- Po ukončení extrakce se extrakt z vialky kvantitativně převede do 50 ml baňky a odpaří na rotační vakuové odparce právě do sucha, dosuší se dusíkem a rozpustí se ve 2 ml hexanu. (V případě, že se odparek nerozpustí, je možno ho rozpustit pomocí ultrazvuku)
- Použitá patrona se vyjme z extraktoru a obsah se vysype do odpadní nádoby.

### *Obsluha PES*

Pro správnou funkci přístroje je naprosto nezbytné mimořádně pečlivě udržovat čistotu plošek, na které dosedají těsnění při umístění patrony do přístroje. Použité extrakční činidlo je rovněž vhodné před extrakcí odplynit v ultrazvuku.

- Zapnutí přístroje síťovým vypínačem
- Na displeji se zvolí varianta 3 Test, pomocí testu se nechá přístroj vyhřát na požadovanou teplotu
- Na displeji se zvolí varianta 1, program typu A, zadají se parametry podle tabulky. Zvolí se varianta Run a přístroj vyzve k vložení patrony
- Zkontroluje se čistota dosedacích plošek těsnění, případně se doleští papírovým kapesníkem
- Patrona se vloží do přístroje
- Uzavře se horní kryt lehce na doraz, pak se pootočí zpět o zhruba čtvrt otáčky do polohy naznačené čárkami (víko nesmí být před zahájením extrakce utažené)
- Spustí se program extrakce, průběh lze sledovat na displeji
- Po ukončení extrakce se extraktor nechá 1 až 2 minuty relaxovat (musí se uvolnit zbytkový tlak), pak se teprve otevře víko extraktoru. Víko musí jít povolít velmi lehce, nejde-li lehce, vyčkají se další 1 až 2 minuty a pokus o otevření se opakuje
- Patrona se vytáhne pomocí šroubováku a v žádném případě se nesmí brát do holé ruky, protože je vyhřátá na téměř 100 °C
- Pokud dojde k „vypěnění“ obsahu extrakční patrony do prostoru nad patronu, patrona se nevytahuje (pevné částičky by napadaly dolů do prostoru pod patronu a ohrozily by funkci spodního těsnění), ale horní prostor se dokonale očistí (filtrační papír, štěteček vysavač) a až poté se patrona vytáhne
- Po ukončení extrakcí se přístroj vypne síťovým vypínačem

### **Mikrovlňná extrakce**

- Z pece se vytáhne zásobník na patrony – slouží jako stojan
- Do teflonových bílých patron se nasype odvážený vzorek půdy asi 10 g
- Ke vzorku do patrony se přidá vnitřní standard

- Do třech patron se napipetuje 30 ml směsi n-hexan-aceton 7:3
- Do jedné patrony se napipetuje pouze rozpouštědlo a vloží se teplotní a tlakové čidlo, jehož vršek musí být před použitím vytvarován nástavcem do zvonovitého tvaru
- Patrony se umístí do stojanu. Potom se patrony uzavřou uzávěry, které jsou umístěny ve speciálním držáku, patrony se vloží a zašroubují do běžového bezpečnostního obalu
- Patrona, ve které je pouze rozpouštědlo, se vloží do polohy 1, ostatní se rozmístí do kříže kvůli vyvážení
- Držák se uzavře a přenesení do mikrovlnné trouby
- Zapne se odsávání a spustí se příslušný program
- Po ukončení programu se patrony otevírají v digestoři směrem od obličeje a vršky se oplachují čistým rozpouštědlem do patrony
- Po extrakci je nutné vzorek přefiltrovat
- Do nálevky se umístí acetonová vata a přesype se dvěma lžičkami síranu
- Vzorek se přefiltruje do 50 ml odpařovacích baněk a odpaří se na rotační vakuové odparce, dosuší se dusíkem
- Odparek se rozpustí ve 2 ml hexanu (v případě, že se odparek nerozpustí, je možno jej rozpustit pomocí ultrazvuku)

### **Ultrazvuk**

- Asi 10 g vzorku se odváží s přesností na 0,01 g a přenesení se do baňky o objemu 250 ml
- Do baňky se přidá 20  $\mu$ l vnitřního standardu a 60 ml směsi n-hexan:aceton 7:3
- Baňka se zafixuje, v ultrazvukové lázni a nechá se 20 minut extrahovat
- Po ukončení se vzorek filtruje a filtrát se jímá do 100 ml baněk a odpaří se na rotační vakuové odparce právě do sucha, dosuší se dusíkem
- Odparek se rozpustí v 2 ml hexanu (v případě, že se odparek nerozpustí, je možno jej rozpustit pomocí ultrazvuku)

### **Frakcionace extraktu sloupcovou chromatografií**

- Na dno chromatografické kolony se vloží smotek vaty
- Na vatu v koloně se nasype za mírného poklepávání, 5 g aktivovaného silikagelu (plnění musí být rychlé, aby nedošlo k dezaktivaci silikagelu vzdušnou vlhkostí)
- Na vrch sloupce silikagelu se přidá 1 g bezvodého síranu sodného
- Naplněná kolona se smočí 10 ml hexanu

- Po protečení hexanu na úroveň síranu sodného se nanese na kolonu vzorek – 1 ml rozpuštěného odparku v hexanu
- Po vsáknutí roztoku vzorku do sloupce se zahájí eluce jednotlivých skupin látek podle podmínek uvedených v tabulce

Tab. č. 3

Frakce	Rozpouštědlo	Objem
1	Hexan	10 ml
2	Hexan/DCM 1/1	5 ml
3	Hexan/DCM 1/1	10 ml

- Frakce 3 se sbírá do 50 ml odpařovací baňky a odpaří se na rotační vakuové odparce právě do sucha, dosuší se dusíkem.
- Odparek se rozpustí v 0,5 ml acetonitrilu a přenesení se do 2 ml vialky, obalí se alobalem a uschová se pro další analýzu na HPLC
- Ostatní frakce se vylíjí do odpadní nádoby určené pro organický odpad

#### 4.3.2.6 Kritické body

- Pro minimalizaci rizika hrubé chyby se dbá zvýšené opatrnosti především při přípravě roztoků, označení připravených roztoků a zvláště se soustředí na popis a označení připravených vzorků a získaných výsledků
- Správné naplnění extrakčních patron
- Otevírání patron PES
- Odpařování na odparce (nemělo by se odpařit do sucha)
- Plnění chromatografické kolony
- Nastavení průtoku chromatografickou kolonou

#### 4.3.3 Vlastní stanovení PAH technikou HPLC/UV-VIS, FLD

Kapalinová chromatografie se využívá především k separaci směsí látek, které jsou netěkavé nebo špatně těkavé a termicky labilní (až 85 % všech sloučenin). K separaci využívá různé systémy pevné nebo kapalně stacionární fáze a kapalně mobilní fáze. Na rozdíl od plynové chromatografie hraje mobilní fáze v případě kapalinové chromatografie aktivní roli. Podle mechanismu separace se používají rozpouštědla, resp. směsi rozpouštědel různé polarity, přičemž změna vlastností mobilní fáze je v systému s danou stacionární fází hlavním faktorem ovlivňující retenci jednotlivých složek směsi a tím i jejich vzájemné rozdělení. Vliv teploty se neuplatňuje tak významně jako u plynové chromatografie, i když u složitých směsí látek umožňuje změna teploty separačního systému dosáhnout lepšího rozlišení zón jednotlivých složek [2].

#### 4.3.3.1 Vysoko účinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

*Hlavní součásti kapalinového chromatografu:*

Zásobníky mobilní fáze → směšovací zařízení → čerpadlo → dávkovač → kolona → detektor  
→ vyhodnocovací zařízení (PC)

- *Čerpadlo*

Základním požadavkem na čerpadla kapalně mobilní fáze je dlouhodobá konstantnost průtoku s přesností menší než 2 %, chemická inertnost částí čerpadla přicházející do kontaktu s kapalinou, možnost regulace průtoku v dostatečně velkém rozsahu (0,1 – 10 ml/min), pracovní tlak minimálně 10 Mpa (lépe 20 – 40 Mpa). Podle technického řešení se rozlišují tři skupiny čerpadel: pneumatická čerpadla, bezpulzní čerpadla tzv. lineární dávkovače, pulzní neboli reciproční čerpadla [2].

Nevýhodou pulzních čerpadel je nekonstantní průtok (tlakové rázy) mobilní fáze, proto jsou používána dvojčinná čerpadla, čerpadla s dvěma písty nebo čerpadla zapojená sériově. Lineární dávkovač pracuje na principu injekční stříkačky (válec může mít objem až 500 ml). Výhoda je plynulý tok bez pulzů, na druhé straně je omezený objem rozpouštědla, které se musí často doplňovat. Reciproční čerpadla jsou využívána naopak pro pulzní tok mobilní fáze, který je vhodný pro naprogramovanou změnu složení mobilní fáze.

- *Dávkovací zařízení*

Dávkovací zařízení slouží k vnesení vzorku do toku mobilní fáze ve formě úzkého koncentračního pulzu, tak aby bylo zabezpečeno minimální rozmytí vzorku v dávkovači a ve spojích mezi dávkovačem a chromatografickým ložem. Septové dávkovače, které jsou obdobou dávkovačů používaných v plynové chromatografii, umožňují vnášení vzorků pomocí injekční stříkačky do bezprostřední blízkosti začátku chromatografického lože. Výhodou septových dávkovačů je variabilita objemu vnášeného vzorku, nevýhodou potřeba časté výměny používaného septa a menší přesnost dávkovaného objemu v porovnání s dávkovacími kohouty. Dávkovací kohouty umožňují přesné a reprodukovatelné odměření objemu vzorku vnitřní nebo vnější dávkovací smyčkou. Vzorek se vnáší do blízkosti začátku chromatografického lože vřazením dávkovací smyčky do proudu mobilní fáze otočením kohoutu z polohy plnění do polohy nástřik. Menší objemy vzorků jsou zpravidla dávkovány kohouty s vnitřní smyčkou. Kohouty jsou konstruovány jako čtyř- a šesticestné, často jsou ovládány elektricky, především v případě, že jsou součástí automatických dávkovačů [2].

- *Kolony*

Kapalinová chromatografie má velmi široké použití, proto existuje mnoho typů a podob kolon. Jsou to trubičky s délkou zpravidla 10 až 25 cm, vnitřním průměrem kolem 5 mm a různorodou náplní. Pro většinu analýz jsou vyrobené z nerezové oceli, jinak je možné použít tvrzené sklo nebo plast.

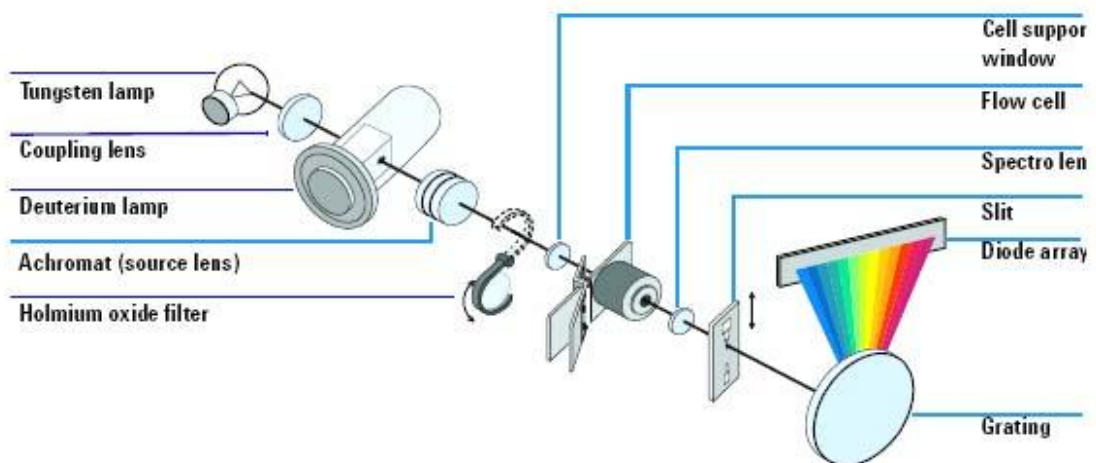
Předkolona je umístěna mezi čerpadlo a dávkovací zařízení nebo mezi dávkovací zařízení a kolonu. Její úkol je chránit hlavní kolonu před nečistotami, a tím prodlužovat její životnost.

- *Detektory*

Hlavní požadovanou vlastností je vysoká selektivita pro analyt a nízká citlivost pro použité rozpouštědlo. Další požadované vlastnosti jsou: okamžitá a lineární odezva, nízký šum, minimální příspěvek k rozšiřování zóny, možnost použití gradientové eluce, minimální vliv změny tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty.

- Fotometrické a spektrofotometrické detektory (UV – VIS)

Pracují v ultrafialové a viditelné části spektra. Jsou konstruovány jako přístroje s jednou pevnou vlnovou délkou, nejčastěji 254 nm. Přístroje filtrové s možností vymezit pomocí spektrálních filtrů vlnové délky např.: 254, 280, 313, 340, 365, 405, 436, 546, nm, přístroje s plynule měnitelnou vlnovou délkou 190 – 400 (600) nm, vybavené mřížkovým monochromátorem a přístroje umožňující volit nejvhodnější pracovní vlnovou délku ze spektra snímaného v průběhu celé analýzy fotodiodovým polem (*diode array detektor, DAD*). DAD umožňují zjistit „čistotu“ separovaných zón a pomáhají významně při identifikaci jednotlivých složek vzorku. Výhodou je vysoká univerzálnost, citlivost, použitelnost v gradientových technikách [2].



Obr. č. 7 DAD detektor[18]

- Fluorimetrický detektor (FLD)

Je jedním z nejcitlivějších detektorů používaných v kapalinové chromatografii. Používá se k detekci látek vykazujících fluorescenci nebo látek, jejichž deriváty fluoreskují. Optické uspořádání je stejně jako u fotometrických detektorů shodné s uspořádáním běžných foto- a fluorimerů [2]. V praxi je v přístroji často kombinován s fotometrickým detektorem.

Kromě výše uvedených hlavních součástí obsahuje moderní kapalinový chromatograf směšovací zařízení a termostat pro nastavení teploty. Směšovací zařízení se používá k namíchání směsí rozpouštědel pro mobilní fázi u gradientové eluce. Analýzy na kapalinovém chromatografu probíhají většinou za laboratorní teploty, ovšem jsou analyty, pro které je zvýšená teplota výhodná.

#### 4.3.3.2 *Chemikálie, přístroje a sklo*

- Chemikálie:
  - Acetonitril, voda
  - *Kalibrační směs PAHs* (obsahuje 16 prioritních polyaromátů podle US EPA, koncentrace 1 ng/μl)
- Přístroje a zařízení:
  - Kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series
  - *kolona*: Eclipse PAH C18 (4,6 × 250 mm; 5 μm)
  - Běžné laboratorní, analytické vybavení

#### 4.3.3.3 *Nastavení přístroje*

- Nástřík vzorku: 10 μl
- Čerpadlo mobilní fáze: dvoupístová čerpadla se sériově řazenými písty
- Průtok: 1,5 ml/min
- Rozpouštědla: A: voda; B: acetonitril
- Kolona: Eclipse PAH C18(4.6x15 mm; 5 μm) + předkolona
- Teplota kolony: 25 °C
- Detektory: DAD; FLD

#### 4.3.3.4 *Vlastní pracovní postup*

- *Kalibrace*

Nastaví se výše uvedené parametry přístroje. Automatický dávkovač provede nástřík kalibrační směsi a provede se analýza kalibrační směsi. Dále se nastříkne směs s vnitřním standardem.

- *Analýza vzorků*

Automatický dávkovač nastříkne připravené vzorky. Kvalitativní výsledky se získají porovnáním s knihovnou UV spekter, pro kvantitativní hodnocení se použije metoda externího standardu.

- Objem nástříku vzorku (většinou 1 – 10 μl) a použité standardy upřesní vedoucí praktika!

- Při práci jsou dodržována pravidla správné laboratorní praxe

#### **4.3.3.5 Krizové body**

- Pro minimalizaci rizika hrubé chyby se dbá zvýšené opatrnosti především při přípravě roztoků, označení připravených roztoků a zvláště se soustředí na popis a označení připravených vzorků a získaných výsledků

#### **4.3.3.6 Prezentace výsledků**

V protokolu bude uvedeno kromě standardních součástí uvedeno:

- Tabulky výsledků pro každou metodu extrakce a typ detektoru
- Přepočet koncentrace výsledků na jednotky mg/kg půdy
- Přepočet PAH
- Souhrnná tabulka výsledků, srovnání extrakčních technik
- Srovnání výsledků s vyhláškou č.13/1994 Sb.
- Chromatogramy

#### 4.4 Stanovení těžkých kovů v půdě metodou AAS

Jedná se o skupinu prvků správně definovanou jako stopové chemické prvky určitých vlastností. Mohou mezi nimi být zastoupeny jak kovy podle specifické hmotnosti opravdu "těžké" (rtuť Hg, měď Cu, olovo Pb), tak také kovy, které tak nazvat nelze (beryllium Be, hliník Al, baryum Ba), dále polokovy (arzen As, selen Se, telur Te, thalium Tl), nebo nekovy (bor B, chlor Cl, síra S) [12]. Těžký kov neznámá automaticky toxický kov. Například Be není těžký kov, ale je toxický, Fe a Mn jsou těžké kovy, ale nejsou toxické. Někdy se tato skupina také nazývá rizikové prvky.

Přirozeným zdrojem je zvětrávání mateřské horniny a rud dotyčných kovů a je většinou převažujícím zdrojem v půdě. V atmosféře pochází většina kovů z antropogenních činností ve formě aerosolu nebo popílku [12].

Zdroje většiny kovů jsou spalování fosilních paliv včetně komunálního odpadu a čistírenských kalů, emise automobilové dopravy, metalurgický průmysl a průmysl využívající sloučeniny těžkých kovů.

Akumulace a geochemické cykly těžkých kovů v půdě závisí rozhodujícím způsobem na hodnotě pH půdy - pokud dojde k okyselení, např. v důsledku kyselých dešťů, těžké kovy se uvolňují a jsou více pohyblivé v půdním roztoku a snáze přijatelné rostlinami, případně vyplavované do spodních vod. Těžké kovy přijaté organismy se z větší části opět vylučují, část z nich ovšem zůstává v organismu natrvalo a usazuje se v některých orgánech, u živočichů zpravidla v kostech, zubech, ledvinách a játrech [12].

Nejtoxičtější kovy jsou: Hg, Cd, Pb, As a organické sloučeniny Sn. Kovy jsou vysoce toxické již od nízkých koncentrací, jsou perzistentní, nedegradabilní, vysoce karcinogenní a mají schopnost bioakumulace.

Nejtoxičtější bývají jednoduché iontové formy kovů a organické sloučeniny kovů, vesměs antropogenního původu, komplexní sloučeniny kovů však jsou méně toxické. Toxické kovy se váží na -SH, -COOH, -NH<sub>2</sub> skupiny biomolekul (bílkovin), mění jejich strukturu, funkci a působí jako enzymatické jedy [10].

Velmi vhodné metody pro stanovení těžkých kovů jsou metody atomové spektrometrie. Metody atomové spektrometrie můžeme rozdělit na metody absorpční, emisní a fluorescenční s tím, že metody absorpční se dělí dále na metody s atomizací plamenem, metody s atomizací elektrotermickou a pro několik prvků je možno použít metodu hybridovou [20]. Kromě metod atomové spektrometrie lze využít také klasické metody voltametrické (polarografie, anodická rozpouštěcí volumetrie). Nevýhodou je použití rtuti, naopak instrumentace je ve srovnání s AAS výrazně levnější.

Většinu kovových prvků lze také stanovit, po reakci s organickými činidly, molekulovou absorpční spektrofotometrií nebo také molekulovou fluorescenční spektrometrií [20].

V případech, kdy se jedná o speciální prvky, byly použity též metody plynové chromatografie (pro organometalické sloučeniny), případně kapalinová chromatografie ve spojení s AAS, hmotnostní spektrometrie a další. Speciální analýza má za úkol stanovit koncentrace všech chemických forem (struktur), ve kterých je prvek ve vzorku přítomen [20].

#### 4.4.1 Cíl

Kvantitativní analýza těžkých kovů ve vzorku půdy technikou atomové absorpční spektrometrie. Analyzovaný kov upřesní vedoucí praktika. SOP je zpracován pro Cd jako příklad.

#### 4.4.2 Zpracování vzorků půdy pro analýzu anorganických kontaminantů

Těžké kovy jsou ve svých matricích ve velmi nízkých koncentracích. Pro instrumentální analýzu kovů je nutné analyt z matrice separovat a zkoncentrovat.

##### 4.4.2.1 Chemikálie, přístroje a sklo

- Chemikálie:
  - Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA)  $c = 0,05 \text{ M}$
  - Kyselina octová  $c = 0,43 \text{ M}$
  - Kyselina dusičná  $c = 2 \text{ M}$
  - Dusičnan sodný  $c = 0,1 \text{ M}$
  - Ultračistá voda
- Pomůcky a sklo:
  - Celulózový filtr 589/5
  - Běžné laboratorní, analytické vybavení
  - PP a PE nádobky
- Přístroje a zařízení:
  - Předvážky
  - Třepačka
  - Analytické váhy
  - Sušárna

##### 4.4.2.2 Příprava potřebných roztoků

Všechny roztoky se ředí do 1 l odměrné baňky.

- Základní vztahy:  $m_{\text{EDTA, CH}_3\text{COOH, NaNO}_2, \text{HNO}_3} = n \cdot M = V \cdot c \cdot M$ ,  $V = \frac{x}{\rho}$ 
  - 0,43 M kys. octová,  $M(\text{CH}_3\text{COOH}) = 60,05 \text{ g/mol}$ ,  $\rho = 1,05 \text{ g/ml}$ ,  $w = 0,99$ ,
  - 0,05 M EDTA,  $M(\text{EDTA}) = 372,24 \text{ g/mol}$
  - 0,1 M dusičnan sodný,  $M(\text{NaNO}_3) = 85 \text{ g/mol}$
  - 1 M kys. dusičná,  $M(\text{HNO}_3) = 63,01 \text{ g/mol}$ ,  $\rho = 1,4 \text{ g/ml}$ ,  $w = 0,65$

#### **4.4.2.3 Pracovní postup**

Vysušená půda se přesítuje přes síta s velikostí ok 2 mm. Použije se frakce < 2 mm.

##### **Stanovení sušiny gravimetricky**

- 1 g vzorku se suší při  $105 \pm 2$  °C po dobu 3 – 4 hodin do konstantní hmotnosti

##### **Loužení v kyselině ethylendiamintetraoctové (EDTA)**

- Vzorek o hmotnosti 5 g se smíchá s 50 cm<sup>3</sup> 0,05 M EDTA (pH =  $7 \pm 0,05$ ).
- Směs se třepe po dobu 1 hodiny při laboratorní teplotě
- Výluh se poté zfiltruje přes 589/5 celulózový a filtrát se jímá do PE nádoby

##### **Loužení kyselinou octovou**

- Vzorek o hmotnosti 5 g se po dobu 16 hodin třepe při laboratorní teplotě s 200 cm<sup>3</sup> 0,43 M kyseliny octové
- Výluh se poté zfiltruje přes 589/5 celulózový filtr a filtrát se jímá do PE nádoby

##### **Loužení s dusičnanem sodným**

- Vzorek o hmotnosti 4 g se po dobu 16 hodin třepe v PP nádobce se 100 cm<sup>3</sup> 0,1 M dusičnanu sodného čistoty pro analýzu
- Vzorek je poté zfiltrován přes 589/5 celulózový filtr a filtrát se jímá do PP nádoby
- Filtrát se poté stabilizuje přidávkem 50 µl koncentrované kyseliny dusičné (suprapure)

##### **Loužení s kyselinou dusičnou**

- Vzorek o hmotnosti 10 g se třepe při laboratorní teplotě po dobu 16 hodin v PE nádobce se 100 cm<sup>3</sup> 2 M kyseliny dusičné čistoty pro analýzu
- Výluh se poté zfiltruje přes 589/5 celulózový filtr a filtrát se jíme do PE nádoby

Při práci jsou dodržována pravidla správné laboratorní praxe.

#### **4.4.2.4 Kritické body**

- Pro minimalizaci rizika hrubé chyby se dbá zvýšené opatrnosti především při přípravě roztoků, označení připravených roztoků a zvláště se soustředí na popis a označení připravených vzorků a získaných výsledků

### 4.4.3 Stanovení prvků atomovou absorpční spektrometrií s elektrotermickou atomizací

Atomová absorpční spektrofotometrie (AAS) je vhodná pro stopovou prvkovou analýzu, umožňuje stanovit až 68 prvků periodické tabulky, zejména všechny kovy a polokovy. Uplatňuje se pro stanovení rizikových prvků v potravinách, v environmentální analýze apod.

Podstatou metody je absorpce vhodného elektromagnetického záření volnými atomy stanovovaného prvku v plynném stavu. Každý atom absorbuje záření o charakteristické vlnové délce (energetická hodnota fotonu). Sleduje se absorbance, která je podle Lambert – Beerova zákona přímo úměrná koncentraci stanovovaného prvku.

#### 4.4.3.1 Atomový absorpční spektrometr

*Hlavní součásti:*

zdroj záření → atomizátor → monochromátor → detektor → vyhodnocovací zařízení (PC)

- *Zdroj primárního záření*

Typy zdrojů záření mohou být výbojka s dutou katodou (katoda je z kovu, který je právě hodnocen), vysokofrekvenční bezelektroodová výbojka, polovodičová laserová výbojka.

- *Atomizátor*

Atomizátor je systém, který převádí stanovované prvky z roztoku vzorku do plynného stavu. V atomizátoru je umístěná grafitová kyveta, do které je dávkován vzorek. Kyveta je umístěna v optické dráze AAS a je elektrotermicky vyhřívána v prostředí inertního plynu (dusík, argon).

Vzorek se dávkuje automaticky pomocí autosampleru, většinou bývá kapalný. Objem dávkované kapaliny se pohybuje v rozmezí 5 – 100  $\mu\text{l}$ .

K dosažení volných atomů analytu v kyvetě je využíván tzv. teplotní program. Po nadávkování vzorku je teplota kyvety zvyšována v několika po sobě navazujících krocích tak, aby došlo k atomizaci:

- Ohřev na teplotu rozpouštědla – vysušení vzorku 5 – 10 °C pod bodem varu rozpouštědla
- Ohřev na teplotu pyrolýzy – odstranění největšího podílu matrice vzorku
- Ohřev na teplotu atomizace – vytvoří se plynný oblak atomů sledovaného analytu v základním energetickém stavu, které pak absorbují primární záření
- Zahřátí nad teplotu atomizace – čištění kyvety
- Ochlazení kyvety na počáteční teplotu – příprava na další měření

- *Monochromátor*

Izoluje příslušnou emisní čáru ze spektra čárového zdroje. Rozsah vlnových délek je (190 – 850 nm), nejčastější zapojení je systém Czerny – Turner.

- *Detektor*

Využívají se především fotonásobiče – fotoelektrické násobiče s křemenným okénkem. Rozsah vlnových délek sledované oblasti spektra je 190 – 900 nm.

- *Interference*

Interference je rušivý vliv při stanovení analytu. Interference matrice vzorku (doprovodné složky obsažené ve vzorku) je dána složitostí vzorku. Interferencí matrice rozumíme efekt rozdílné velikosti signálu, který získáme pro stejnou koncentraci analytu v čistém standardu a za přítomnosti doprovodných složek. Interference mohou způsobovat jak zvýšení, tak snížení signálu (tzv. depresivní interference), které jsou častějším případem. Interference dělíme na spektrální a nespektrální.

Spektrální interference jsou vyvolány zejména neselektivní absorpcí způsobenou molekulami doprovodných složek vzorku. Nespektrální (chemické) interference jsou všechny ostatní vlivy matrice. Nespektrální interference je možno odstranit přidáním vhodného modifikátoru, což je látka, která je schopna ovlivnit průběh termické úpravy nebo vlastní atomizační mechanismus.

#### **4.4.3.2 Chemikálie, přístroje a sklo**

- Chemikálie:
  - *Kalibrační roztok* (certifikovaný kalibrační roztok Cd c = 1,000 ± 0,002 g/l)
  - Ultračistá voda
- Pomůcky a sklo:
  - Nádobky do autosampleru
  - Mikropipety
  - Běžné laboratorní, analytické vybavení
- Přístroje a zařízení:
  - Atomový absorpční spektrometr s elektrotermickou atomizací typ: ZEE nit 60 s Zeemanovou korekcí pozadí, výrobce: Analytik Jena, SRN;

#### **4.4.3.3 Nastavení přístrojů**

- Analyzovaný prvek: Cd
- Šířka štěrby: 0,5 nm
- Proud na lampě: 5 mA
- Vlnová délka: 228,8 nm
- Použitý plyn: Ar, čistota 5.0
- Dávka vzorku: 20 µl

#### 4.4.3.4 Příprava potřebných roztoků

Příprava kalibrační řady kadmia o koncentracích 0,5; 1,0; 1,5; 2,0  $\mu\text{g/l}$  ze zásobního roztoku  $c = 1000 \text{ mg/l}$

Zásobní roztok  $c_z = 1 \text{ g/l} \rightarrow 1 \text{ mg/ml}$

1. mezikoncentrace  $c_1 = 0,01 \text{ mg/l}$  v  $V_1 = 10 \text{ ml}$ ;  $V_z = ? \mu\text{l}$

2. mezikoncentrace  $c_2 = 0,02 \mu\text{g/ml}$  v  $V_2 = 50 \text{ ml}$ ;  $V_1 = ? \mu\text{l}$

1 ppb = 0,001  $\mu\text{g/ml}$  v 1 ml; 0,5 ppb  $\rightarrow c_{0,5} = 0,0005 \mu\text{g/ml}$  v  $V_{0,5} = 1 \text{ ml}$ ;  $V_2 = ? \mu\text{l}$

$$c_z \cdot V_z = c_1 \cdot V_1$$

$$V_z = \frac{c_1 \cdot V_1}{c_z} = \frac{0,01 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot 10 \text{ ml}}{1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}} = 0,1 \text{ ml} \Rightarrow \underline{100 \mu\text{l}}$$

$$c_1 \cdot V_1 = c_2 \cdot V_2$$

$$V_1 = \frac{c_2 \cdot V_2}{c_1} = \frac{0,02 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot 50 \text{ ml}}{10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}} = 0,1 \text{ ml} \Rightarrow \underline{100 \mu\text{l}}$$

$$c_{0,5} \cdot V_{0,5} = c_2 \cdot V_2$$

$$V_2 = \frac{c_{0,5} \cdot V_{0,5}}{c_2} = \frac{0,0005 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot 1 \text{ ml}}{0,02 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}} = 0,025 \text{ ml} \Rightarrow \underline{25 \mu\text{l}}$$

Pro kalibrační křivku se dávkuje pro koncentrace 0,5; 1,0; 1,5; 2,0  $\mu\text{g/l} \rightarrow 25, 50, 75, 100 \mu\text{l}$  roztoku s  $c_2 = 0,02 \mu\text{g/ml}$

#### 4.4.3.5 Pracovní postup

- Nastaví se parametry přístroje, změří se kalibrační řady a sestaví se kalibrační křivky
- Analýza vzorku
- Z naměřených hodnot pro neznámý vzorek se metodou kalibrační křivky vyhodnotí koncentrace analytu v půdě v jednotkách  $\mu\text{g/l}$
- Výsledky v jednotkách  $\mu\text{g/l}$  se přepočítají na jednotky  $\mu\text{g/kg}$  a porovnají se s vyhláškou č. 13/1994
- Přesný pracovní postup a ovládání přístroje vysvětlí vedoucí praktika
- Při práci jsou dodržována pravidla správné laboratorní praxe

#### 4.4.3.6 Kritické body

- Pro minimalizaci rizika hrubé chyby se dbá zvýšené opatrnosti především při přípravě roztoků, označení připravených roztoků a zvláště se soustředí na popis a označení připravených vzorků a získaných výsledků

#### **4.4.3.7 *Prezentace výsledků***

Každá skupina stanovuje pouze jeden kov, ovšem protokol bude zpracován pro tři těžké kovy. Naměřená data si mezi sebou jednotlivé skupiny předají.

V protokolu bude uvedeno kromě standardních součástí uvedeno:

- Grafy a rovnice kalibračních křivek pro všechny tři analyty
- Přehledné tabulky výsledků pro všechny tři analyty a všechny loužící činidla
- Výpočty pro loužící činidla a kalibrační řadu
- Výpočty hodnot výsledků analytů z regresní rovnice, přepočet na jednotky uvedené ve vyhlášce
- Srovnání výsledků s vyhláškou č. 13/1994

#### 4.5 Stanovení obsahu PCB ve vzorku tuku pomocí GC/ECD

PCB jsou perzistentní látky organického původu. Vznikají řízenou chlorací bifenyly při 150 °C v přítomnosti FeCl<sub>3</sub> nebo Fe pilin jako katalyzátoru. Množství chloru v reakční směsi určuje stupeň chlorace.

Teoreticky existuje 209 kongenerů, ale z nich jen 102 bývá výrazněji zastoupeno, běžně se vyskytuje 50 až 70 kongenerů a pouze 7 kongenerů tvoří hlavní komponenty, tj. indikátorové kongenery. Toxikologicky nejnebezpečnější jsou kongenery se 4 až 7 atomy chloru a rovinným uspořádáním molekuly, kterých je 12.

Chemické a fyzikální vlastnosti:

- Nižší jsou bezbarvé až nažloutlé kapaliny, vyšší pevné látky
- Chemicky stálé (vydrží cca 300 °C), netěkavé, nehořlavé (hoří nad 1000 °C), tepelně odolné
- Odolné vůči kyselinám a zásadám
- Vysoký elektrický odpor – dobrý izolant
- Lipofilní, mísitelné s organickými rozpouštědly

Použití:

- Náplně transformátorů a kondenzátorů
- Chladicí oleje
- Brzdové kapaliny
- Změkčovadla plastů
- Přísady do nátěrových hmot, textilu, kaučuku, rtěnek, lepidel a pesticidů

PCB mají nízkou akutní toxicitu, ale jsou vysoce perzistentní a mají velkou schopnost bioakumulace, proto představují dlouhodobá zdravotní rizika. Do lidského organismu se dostávají především konzumací živočišných produktů (tuk, maso, mléko, vejce). Akumulují se v játrech, tukové tkáni i mateřském mléce. Z organismu se velmi špatně vylučují. PCB jsou vysoce karcinogenní a způsobují rakovinu jater. Napadají především játra a slinivku břišní. Dále nepříznivě ovlivňují například imunitní systém, plodnost, oči, mozek a ledviny. Při chronické expozici mají zasažení jedinci problémy s dýchacím a trávicím ústrojím, játry a kůží. Akutní expozice způsobuje poškození kůže, poruchy zraku, sluchu a křeče.

Do ŽP se PCB dostávali především z výroby a aplikací. Dnes se do ŽP šíří především z odpadů obsahujících PCB. Nejohroženější jsou vodní ekosystémy. Masově se začaly používat ve 30. letech 20. století, od 60. let se začíná sledovat přítomnost v potravních řetězcích, v současnosti je zamořena celá planeta. V roce 1984 je zastavena výroba v ČSSR, od roku 2001 reguluje Stockholmská úmluva eliminaci těch nejzávažnějších, toxických kongenerů.

Velmi problematické je zneškodňování PCB odpadů; při spalování pod 1200 °C vznikají polychlorované dibenzodioxiny a dibenzofurany, které jsou výrazně toxičtější než původní látky; používané technologie na jejich degradaci jsou složité a finančně velmi nákladné.

#### 4.5.1 Cíl

Kvalitativní a kvantitativní analýza PCB ve vzorku tuku metodou plynové chromatografie s detektorem elektronového záchytu.

#### 4.5.2 Vlastní stanovení obsahu PCB v tuku technikou GC/ECD

##### 4.5.2.1 Plynová chromatografie (Gas Chromatography, GC)

Plynová chromatografie využívá k dělení směsi látek dynamického systému s plynnou mobilní fází. Složky vzorku se v takovém systému dělí po převedení do plynné fáze. Používá se pro separaci, identifikaci, a stanovení složitějších směsí plynů a těkavých látek a především organických sloučenin s bodem varu menším než 400 °C. Podle převažujícího mechanismu separace se používají dvě základní varianty plynové chromatografie. Adsorpční plynová chromatografie (plyn-pevná stacionární fáze), která je omezeně použitelná pro plyny a některé kapaliny o nízké molekulární hmotnosti a rozdělovací plynová chromatografie, která využívá jako stacionární fázi film netěkavé kapaliny nanesené na povrchu tuhého nosiče, který má minimální adsorpční vlastnosti [2].

V plynové chromatografii se nejčastěji používá eluční technika vnášení vzorku po jednorázovém nástřiku na kolonu. Jednotlivé složky vzorku jsou separovány na základě interakcí se stacionární fází, jsou postupně vymývány (eluovány) inertním nosným plynem. Nosný plyn slouží pouze k transportu složek kolonou, sám neinteraguje se separovanými složkami a stacionární fází (nerozpouští se v ní). Složky vycházející z kolony jsou postupně indikovány detektorem a signál odpovídající jejich obsahu, resp. koncentrací v nosném plynu je samočinně registrován jako funkce času nebo objemu [2].

Separace se provádí při konstantní nebo programované teplotě [2].

#### Plynový chromatograf

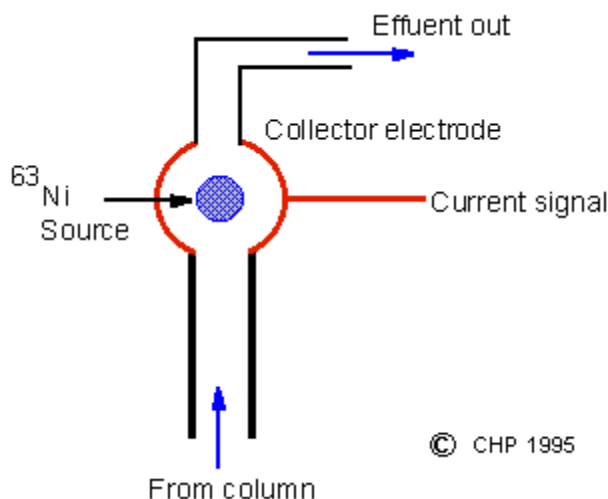
*Hlavní součásti plynového chromatografu:*

Zdroj nosného plynu → regulátor tlaku a průtoku plynu → dávkovač → kolona → detektor → vyhodnocovací zařízení (PC)

- *Zdroj nosného plynu*
  - Tlaková lahev, H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, He, Ar
- *Regulátor tlaku a průtoku plynu*
  - Zajišťuje stálý nebo v čase se měnící průtok a tlak plynu.
- *Dávkovač*

Umožňuje zavedení vzorku do proudu nosného plynu a co nejrychlejší odpaření vzorku.

- Techniky dávkování:
  - Přímo do kolony  
Injekční stříkačka (0,1 – 10 μl vzorku), vytvoří se kapalným filmem přímo na stěně kolony, začátek kolony je vyhříván na nižší teplotu, která se po nástřiku zvedá a vzorek se odpaří.
  - S děličem toku  
Vhodný pro kapilární kolony, používá se u koncentrovaných vzorků (0,1 – 2 μl vzorku).
  - Bez děliče toku  
Pro větší objemy vzorku (0,5 – 5 μl vzorku), které jsou nutné pro stopovou analýzu.
- *Kolona*
  - Náplňové kolony  
ocelová nebo skleněná trubice, průměr 2 – 3 mm, délka 1 – 3 m, náplň sorbenty (silikagely, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, celulóza, molekulová síta) nebo nosiče pokryté kapalnou fází (křemelina)
  - Kapilární kolona  
nosiče stacionární fáze jsou vnitřní stěny kapiláry, vnitřní průměr 0,1 – 0,6 mm, tloušťka filmu stacionární fáze 0,25 – 5 μm, délka 10 – 100 m, vyrábí se z tavného křemene
- *Detektor*
  - Tepelně vodivostní (*Thermal Conductivity Detector*, TCD)  
Univerzální detektor, nosný plyn proudí přes elektricky žhavené vlákno, přítomnost analytu změní teplotu vlákna a tím jeho odpor, používá se při analýzách anorganických plynů a nízkomolekulárních organických látek, menší citlivost.
  - Plamenový ionizační (*Flame Ionization Detector*, FID)  
Molekuly plynu se ionizují mezi dvěma elektrodami, přítomnost analytu prudce zvýší ionizaci a tím elektrický proud, velmi citlivý detektor, kromě anorganických par a plynů detekuje prakticky vše.
  - Detektor elektronového záchytu (*Electron Capture Detector*, ECD)  
Radioaktivní zářič <sup>63</sup>Ni svým zářením β (proud rychlých elektronů) ionizuje molekuly dusíku jako nosného plynu a vyvolává ionizační proud. Uvolňují se pomalé elektrony, které zachycují elektronegativní atomy složek, a tím snižují ionizační proud. Velmi citlivý je tento detektor na halogenované sloučeniny. Citlivý je také na sloučeniny obsahující fosfor, kyslík, síru, olovo, nitrosloučeniny a areny [13].



Obr. č. 8 Detektor elektronového záchytu [32]

- Fotoionizační detektor (*PhotoIonization Detector*, PID)
- Plamenový ionizační detektor s alkalickým kovem
- Bezplamenový detektor s alkalickým kovem
- *Termostat*

Termostat zajišťuje vysokou teplotu dávkovače, kolony, a detektoru, aby byl vzorek udržen v plynném stavu. Pokud se analyty příliš neliší teplotou varu, udržuje termostat konstantní teplotu (izotermický proces). Pokud jsou teploty varu více rozdílné, mění se z časových důvodů teplota kolony v průběhu analýzy (30 – 40 °C/min). Pracovní teploty jsou v rozmezí 50 – 300 °C.

#### 4.5.2.2 Chemikálie, přístroje a sklo

- Chemikálie:
  - Směs n-hexan: diethylether v poměru 96:4
  - Koncentrovaná H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
  - Florisil
  - Isooktan
  - *Kalibrační směs* pro stanovení PCB
  - N<sub>2</sub> jako nosný plyn
- Pomůcky a sklo:
  - Běžné laboratorní, analytické vybavení
  - Mikropipety
  - Vialky
  - Rotační vakuová odparka Buchi
- Přístroje a zařízení:
  - Plynový chromatograf Hewlett-Packard 6890N series II.
  - Automatický dávkovač HP 7683

- PTV inlet
- Dva <sup>63</sup>Ni detektory elektronového záchytu
- N<sub>2</sub> jako make-up plyn
- 2 paralelní kolony:
  - HT8 (SGE, USA) 50m x 0,22 mm i.d., 0,25μm tloušťka filmu stacionární fáze 8% Phenyl Polycarbonate-Siloxane, pření detektor.
  - 2. DB-17ms, (Agilent JW, USA), 60m x 0,25 mm i.d. 0,25μm tloušťka stacionární fáze (50% Phenyl-)-methylpolysiloxane, zadní detektor.

#### **4.5.2.3 Nastavení přístrojů**

- Program PTV 90 °C po 0,1 min, potom 720 °C/min do 350 °C drženo 5 min, 10 °C/min do 220 °C
- Teplota detektoru: 300 °C
- Objem nástřiku: 2μl
- Teplotní program pece: počáteční teplota 100 °C, 30 °C/min do 200 °C, drženo 3 minuty, 3 °C/min do 230 °C, drženo 10 minut, 5 °C/min do 270 °C, drženo 5 minut a 10 °C/ min do 310 °C, drženo 15 minut
- Doba analýzy: 60,33 minut
- Nosný plyn dusík: konstantní průtok 1,1 ml/min
- Make-up plyn: dusík, průtok 10 ml/min

#### **4.5.2.4 Vlastní pracovní postup**

- Asi 0,150 g tuku se rozpouští v 1ml n-hexanu
- Do skleněné chromatografické kolony se za mírného poklepávání nasype florisil a naplní se n-hexanem
- Na kolonu se nanese vzorek rozpuštěný v n-hexanu
- k eluci se použije 50 ml směsi n-hexan:diethylether v poměru 94:6
- Po eluci se ke vzorku přidá 5 ml koncentrované kyseliny sírové
- Po 10ti minutách třepání se kyselina odebere pomocí Pasteurovy pipetky
- Vzorek je odpařen na vakuové odparce a vysušen do sucha pod proudem dusíku.
- Odparek se rozpustí v 2 ml isooctanu
- 100 μl vzorku je mikropipetou převeden do vialky pro GC a doplní se 900 μl isooctanu
- Takto získaný vzorek bude analyzován na plynovém chromatografu

#### **Analýza na GC:**

- Nastaví se parametry přístroje, změří se kalibrační směs pro PCB
- Analýza vzorku
- Přesný pracovní postup a ovládání přístroje vysvětlí vedoucí praktika
- Vyhodnocení chromatogramu se provede pod vedením vedoucího
- Při práci jsou dodržována pravidla správné laboratorní praxe

#### **4.5.2.5 Kritické body**

- Pro minimalizaci rizika hrubé chyby se dbá zvýšené opatrnosti především při přípravě roztoků, označení připravených roztoků a zvláště se soustředí na popis a označení připravených vzorků a získaných výsledků
- Plnění chromatografické kolony
- Nastavení průtoku chromatografickou kolonou
- Odpařování na odparce (vzorek se nesmí odpařit do sucha)

#### **4.5.2.6 Prezentace výsledků**

V protokolu bude uvedeno kromě standardních součástí uvedeno:

- Přehledná tabulka výsledků
- Výpočty výsledků v jednotkách ng/ml
- Přepočet výsledků na jednotky  $\mu\text{g}/\text{g}$  tuku
- Chromatogramy

## 4.6 Stanovení rtuti ve vzorku půdy přístrojem AMA 254

### 4.6.1 Rtuť

Za běžných teplot tekutá, bod tání (-38,87 °C), v horninách se vyskytuje ve formě sulfidů (HgS – cinabarit, rumělka)

Průmyslové využití [12]:

- elektrochemie (elektrody)
- barviva
- měřicí zařízení (teploměry atd.)
- zemědělství (moření osiva)
- zubní laboratoře (slitiny = amalgámy)
- armáda
- farmaceutický p. (amalgámy)
- papírenský p.
- polarografie

Toxické formy rtuti:

- Elementární  
 $\text{Hg}^0$  – vypařuje se za běžných teplot, toxická při inhalaci
- Anorganické  
 $\text{Hg}^{2+}$  -  $\text{HgCl}_2$  – chlorid rtuťnatý, prudký jed, dobře se rozpouští ve vodě  
 $\text{Hg}_2^{2+}$  -  $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$  – chlorid rtuťný, díky své nízké rozpustnosti ve vodě je poměrně málo toxický
- Organické  
Obzvláště nebezpečné sloučeniny, do živých organismů se mohou dostat pouhým stykem s pokožkou  
DIMETHYLRTUŤ  $\text{Hg}-(\text{CH}_3)_2$  – vysoce toxická, těkavá, smrtelná dávka pro člověka je pouze 0,1 ml, vzniká působením mikroorganismů na sloučeniny rtuti za anaerobních podmínek; je dobře rozpustná ve vodě a také je lipofilní

Podstata toxicity Hg je její vysoká afinita k – SH skupinám, narušení aktivity enzymů, změny permeability membrán, oxidativní stres a následně rozvrat metabolismu.

Akutní toxicita (závisí na formě Hg a vstupu do organismu) [12]:

- poškození plic (po inhalaci)
- krvavé průjmy, zvracení, poleptání sliznic (po ingesci)
- selhání ledvin
- poškození CNS (třes, poruchy sluchu, vidění)

Chronická toxicita [12]:

- 90% rtuti je obvykle přijímáno ingescí
- zpočátku nespecifické příznaky: únava, slabost, bolesti hlavy, poruchy trávení
- poškození CNS – třes

Rtuť se dostává do životního prostředí při spalování fosilních paliv, při zpracování rud, vyskytuje se v odpadních vodách ze zemědělství, kde se arylrtuťnaté sloučeniny používají k moření osiv, je v odpadních vodách z některých elektrochemických procesů, chemických laboratoří, z katalytických procesů při výrobě plastů a ze strojírenských výrob, kde se sloučeniny rtuti používají jako fungicidy chránící řezné emulze [20].

Rtuť se hromadí v sedimentech vodních nádrží a řek, odkud se dostává do potravního řetězce a akumuluje se v organismech. V rybách se rtuť vyskytuje převážně v organické formě, zejména jako methylrtuť [20].

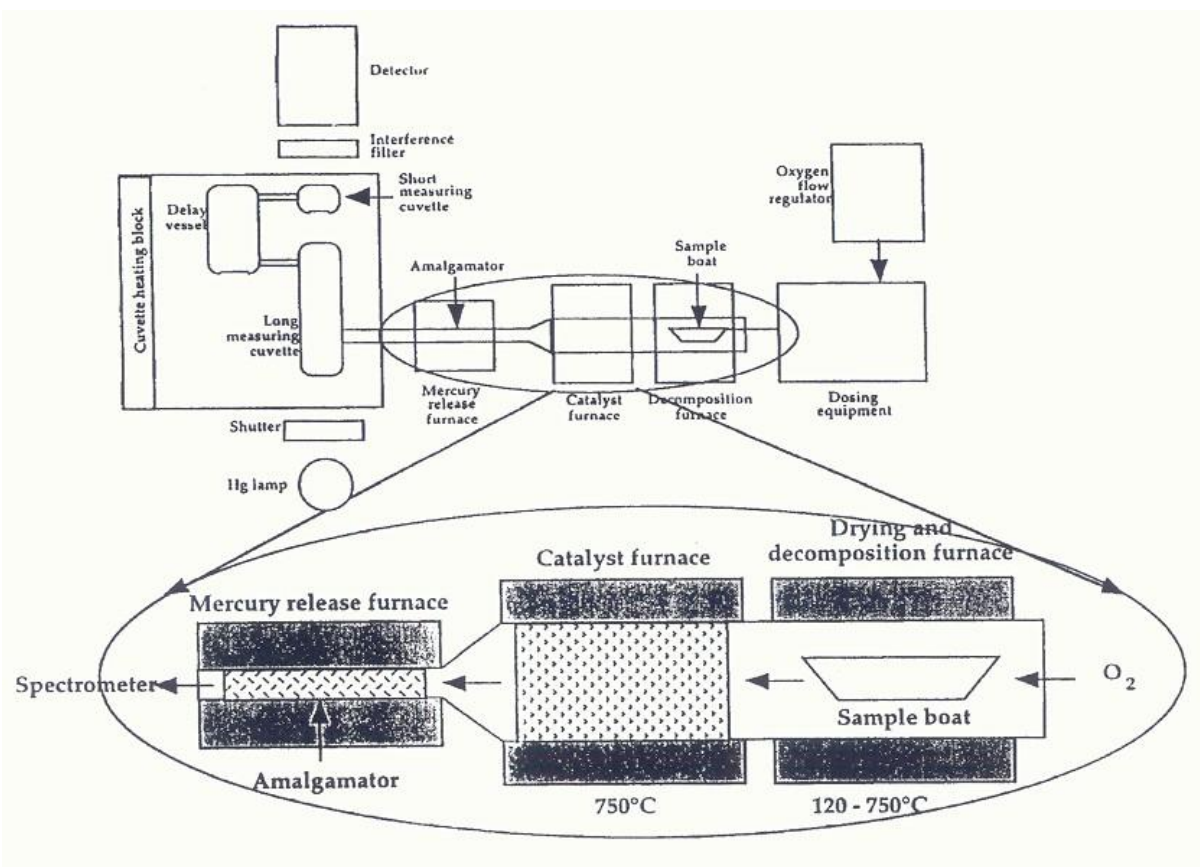
Rtuť lze stanovit kromě metody studených par také plamenovou AAS, voltametriky nebo fotometriky.

#### **4.6.2 Vlastní stanovení rtuti pomocí AMA 254**

AMA 254 je atomový absorpční spektrometr pro stanovení rtuti v kapalných a pevných vzorcích. Není nutná chemická úprava vzorku před vlastním stanovením. Výhoda přístroje je velmi vysoká citlivost, která je nezávislá na matrici vzorku.

Homogenizovaný vzorek je nadávkován na ocelové lodičce, která je automaticky zasunuta do spalovací pícky. Zde v proudu kyslíku dojde k jeho spálení. Produkty spalování jsou proudem kyslíku vedeny přes amalgamátor, který rtuť kvantitativně zachytí. Krátkodobým ohřevem amalgamátoru na vysokou teplotu se zadržaná rtuť uvolní a je nesena do tandemových měřících kyvet, kde se měří absorbance.

Zpracování vzorku v přístroji je tedy rozděleno do několika kroků charakterizovaných teplotním programem. Teplotní program má 3 části: sušení, termický rozklad, čekání. V praxi udává dobu (v sekundách) potřebnou pro jednotlivý krok např.: (60/120/45).



Obr. č. 9 schéma přístroje AMA 254[18]

- *Doba sušení*

Odstranění vody (rozpuštědla) nebo vzdušné vlhkosti ze vzorku. Doba potřebná k sušení lze vypočítat u kapalných vzorků jako 0,6 násobek vzorku v  $\mu\text{l}$ . U pevných vzorků, kde je voda přítomná jako vzdušná vlhkost, se doba vypočítá jako 0,6 násobek navážky násobené obsahem vody ve vzorku. Výsledek je doba v sekundách potřebná k dokonalému vysušení vzorku.

- *Termický rozklad vzorku*

Termický rozklad vzorku znamená uvolnění veškeré rtuti ze vzorku. Minimální doba termického rozkladu je 120 s, protože během této doby dosáhne spalovací pec maximální teploty. Většinou se používá čas 150 s, během této doby dosáhne maximální teploty i lodička se vzorkem.

Pro vodu a vodné roztoky je minimální doba 150 s, pro vodu a zředěné roztoky tato doba obvykle postačuje.

Pro anorganické materiály lze dobu potřebnou k termickému rozkladu odhadnout jako 0,4 násobek navážky v (mg) + 120 s.

- *Doba čekání*

Standardně postačuje 45 s, pouze pro dlouhé doby rozkladu (nad 200 s) se za každých dalších 100 s nad hodnotu 200 s připočítává ke standardním 45 s vždy 10 s.

- *Měření vzorků*

Při měření vzorků se postupuje od nejméně koncentrovaného k nejvíce koncentrovanému vzorku. Mezi jednotlivá měření se pravidelně vřazuje kontrolní standard. Pokud měření neznámého vzorku vykazuje výrazně vyšší koncentraci, než byla očekávána, musí se přístroj znovu vyčistit, protože výsledky by byly ovlivněny pamětí analyzátoru.

- Kapalné vzorky

Při dávkování kapalného vzorku je nutné před dalším dávkováním vyčkat cca 10 s, protože lodička má velmi vysokou teplotu a mohlo by dojít k varu, který vzorek znehodnotí. Dávkovaný objem se řídí koncentrací rtuti, maximální objem je 500  $\mu$ l.

- Pevné vzorky

Veškeré pomůcky je nutné bezprostředně před použitím vyžítat v plameni do červeného žáru, aby se odstranila kontaminace prachem v laboratoři. Navážka je dána předpokládaným obsahem rtuti ve vzorku. Lépe se pracuje se dvěma lodičkami, na jedné probíhá analýza a na druhou se navažuje.

#### **4.6.2.1 Chemikálie, přístroje a sklo**

- Chemikálie:

- Standard rtuti (0,2  $\mu$ g/l)

- Tlaková láhev s O<sub>2</sub>

- Pomůcky a sklo:

- Mikropipeta

- Běžné analytické, laboratorní vybavení

- Přístroje a zařízení:

- Advanced Merkury analyse AMA 2543

- Analytické váhy

#### **4.6.2.2 Postup práce [27]**

- Otevřít přívod kyslíku.

- Zapnout AMA 254, obrazovku a počítač.

- Spustit program AMA 254.

- Vyčkat 15 až 20 minut na ustálení teplot pecí v AMA 254.

- Spustit analýzu (čištění) kliknutím na ikonku se symbolem L. Nastavit parametry analýzy 60/120/45, nadávkovat 100 ml vodovodní vody a sledovat výsledek, je-li naměřená absorbance vyšší než 0,003, analýzu zopakovat.

- Spustit analýzu slepého pokusu kliknutím na ikonu se symbolem B. Nastavit parametry 60/60/45 a spustit analýzu. Při tomto kroku zůstává lodička prázdná! Naměřená hodnota by neměla přesáhnout 0,3 ng Hg.
- Ověřit platnost kalibrace (kliknutím na ikonku se symbolem S) – nastavit parametry analýzy 60/120/45 a nadávkovat známé množství rtuti (1-20 ng; tj. 100 ml roztoku o koncentraci 0,01-0,2 µg/l). Výsledkem by mělo být stejné množství rtuti, které bylo do přístroje nadávkováno. Překročí-li odchylka analytikem akceptovatelnou mez ( $\pm 10\%$ ), je vhodné analýzu opakovat. Není-li ani další výsledek vyhovující, je nutné ověřit správnost použitého standardního roztoku (namíchat nový).
- Znovu spustit analýzu (čištění) kliknutím na ikonku se symbolem L. Nastavit parametry analýzy 60/120/45, nadávkovat 100 ml vodovodní vody a sledovat výsledek, je-li naměřená absorbance vyšší než 0,003, analýzu zopakovat.
- Může se přistoupit k analýze neznámého vzorku.

Vypnutí přístroje:

- Spustit analýzu (čištění) kliknutím na ikonku se symbolem L. Nastavit parametry analýzy 60/120/45, nadávkovat 100 ml vodovodní vody a sledovat výsledek, je-li naměřená absorbance vyšší než 0,003, analýzu zopakovat.
- Spustit chlazení pecí.
- Přibližně po 30 minutách klesne teplota pecí pod 100 °C, můžeme vypnout program AMA 254.
- Vypneme přístroj AMA 254 a počítač.
- Uzavřít přívod kyslíku AMA 254.

Při práci jsou dodržována pravidla správné laboratorní praxe.

#### **4.6.2.3 Kritické body**

- Vzorek s vysokou koncentrací Hg
- Kontaminace vzorku okolím
- Pro minimalizaci rizika hrubé chyby se dbá zvýšené opatrnosti především při přípravě roztoků, označení připravených roztoků a zvláště se soustředí na popis a označení připravených vzorků a získaných výsledků

#### **4.6.2.4 Prezentace výsledků**

V protokolu bude uvedeno kromě standardních součástí uvedeno:

- Přehledná tabulka výsledků s výsledkem průměrné hodnoty v jednotkách ppm a ng
- Tabulku s hodnotou směrodatné odchylky, relativní směrodatné odchylky a obsah rtuti v sušině v jednotkách µg/kg
- Výpočty odchylek a sušiny, porovnání výsledků s vyhláškou č. 13/1994

#### 4.7 Stanovení nesteroidních protizánětlivých látek ve vodách pomocí CZE

Elektromigrační separační metody využívají dvou elektrokinetických jevů – elektroforézy a elektroosmózy. V prostředí obsahujícím roztok s nabitými částicemi a pevné povrchy stýkající se s roztokem, které mohou nést elektrické náboje (stěny kapiláry, povrchy přítomných částic), se vytváří elektrické dvojvrstvy. Časem vzniká určité rovnovážné rozdělení nábojů. V elektromigračních separačních metodách je na toto prostředí připojeno stejnosměrné elektrické pole, které poruší rovnováhu v rozložení nábojů a vyvolá jejich pohyb [13].

- *Elektroforéza* – po aplikaci napětí se nabitě částičky pohybují k opačně nabitě elektrodě
- *Elektroosmóza* – po aplikaci napětí se v křemenné nebo skleněné kapiláře pohybuje voda k záporné elektrodě

Principem separace složek vzorku je rozdílná rychlost jejich migrace, neboť nabitě částice různých složek se v určitém prostředí liší svou elektroforetickou pohyblivostí [13].

Elektroforéza představuje orientovaný pohyb elektricky nabitých částic (iontů, koloidních částic) v roztoku, vynucený stejnosměrným elektrickým polem. Nabitá částice je v daném prostředí unášena silou  $F_1$  úměrnou intenzitě stejnosměrného elektrického pole  $E$  (V/cm). Proti této síle působí odpor prostředí silou  $F_2$  [2].

$$F_1 = - F_2$$

$$F_1 = z e E$$

$$F_2 = - 6 \pi \eta r v = - k v$$

$$v = \frac{z e}{k} E = u E$$

$\eta$  – viskozita prostředí

$r$  – poloměr iontu

$v$  – rychlost pohybu částice

$u$  – elektroforetická pohyblivost (mobilita) iontu ( $u_{kat}$ ,  $u_{an}$ ) částice [ $cm^2 (m^2)V^{-1}s^{-1}$ ] a je definovaná jako rychlost iontu v elektrickém poli  $1 Vm^{-1}$

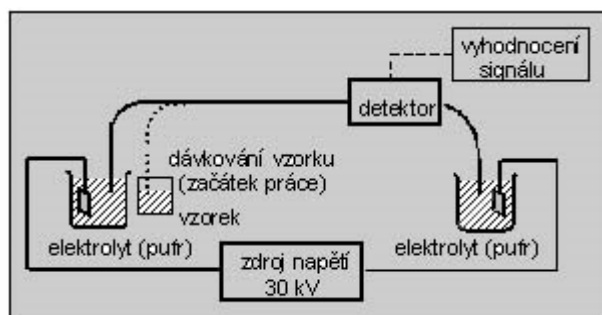
Pohyblivost částice je ovlivněna rozměrem, tvarem, a nábojem částice a také viskozitou prostředí [2].

##### 4.7.1 Cíl

Kvalitativní a kvantitativní analýza nesteroidních, protizánětlivých léčiv v odpadní vodě.

## 4.7.2 Vlastní stanovení nesteroidních léčiv

### 4.7.2.1 Kapilární zónová elektroforéza (Capillary Zone Electrophoresis, CZE)



Obr. č. 10 Schéma kapilární elektroforézy[13]

Oba konce kapiláry jsou ponořeny do zásobníků elektrolytu, do zásobníků jsou vloženy elektrody z platiny. Mezi elektrodami je vloženo napětí 10 – 30 kV.

- *Kapilára*

Kapilára je vyrobená z taveného křemene, její délka může být 25 – 100 cm, vnitřním průměru 25 – 100  $\mu\text{m}$ . Na povrchu je ochranný obal z polyimidu, který je porušený v místě detekce, aby kapilára propouštěla záření ve VIS a UV oblasti. Vnitřní povrch kapiláry může být modifikován pro různá použití.

- *Regulace teploty*

Regulací teploty kolem kapiláry se zajišťují stálé podmínky separace. Teplota může být regulována vzduchem nebo kapalnou chladicí směsí [13].

- *Dávkování vzorku*

Dávkuje se na protilehlé straně od detektoru; objem dávkovaného vzorku je v rozmezí 10 – 100 nl. Existují tři způsoby dávkování, a to tlakem, rozdílem hladin a elektrokineticky.

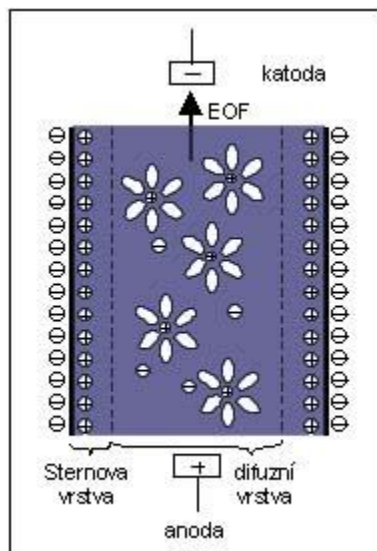
- *Detektor*

Detektory musí být velmi citlivé, protože průměr kapiláry je velmi malý. Nejpoužívanější detektory jsou založeny na absorpci UV záření a většinou využívají diodového pole (DAD). Záznam závislosti odezvy detektoru na čase se nazývá elektroforegram [13]. Může se použít detektor na bázi laserem indukované fluorescence nebo hmotnostní spektrometr, který poskytuje navíc také informace o struktuře analyzovaných látek

Kapilární zónová elektroforéza (CZE) je univerzálně použitelná pro nabitě i nenabitě sloučeniny při využití efektu elektroosmotického toku; tato metoda je vhodná především pro identifikace organických sloučenin, peptidů, proteinů, nukleových kyselin, farmak a anorganických komplexů. Metoda je rychlá, použitelná pro miniaturní objemy vzorků a má velkou dělicí účinnost (dosahuje hodnot až  $10^5$ ) [2].

Elektroforézu doplňuje elektroosmóza. Elektroosmotický tok (EOF) má za následek pohyb roztoku kapilárou k detektoru. Snižuje analytické časy a k detektoru unáší i částice elektroforeticky migrující opačným směrem [13].

### Elektroosmotický tok (*ElectroOsmotic Flow – EOF*)



Obr. č. 11 Elektroosmotický tok [13]

Silanové skupiny (SiOH) křemenné stěny kapiláry disociují při kontaktu s roztokem s  $\text{pH} > 7$ . Důsledkem disociace se vytvoří elektrické dvojvrstvy, která se skládá ze Sternovy vrstvy a difúzní vrstvy. Při vložení napětí se kationty difúzní části začnou pohybovat ke katodě. Kationty  $\text{H}^+$  jsou silně hydratovány a z toho důvodu sebou strhávají všechny částice v roztoku (kladné, záporné i neutrální) směrem ke katodě (detektoru).

Jev se nazývá elektroosmóza a tok se označuje jako elektroosmotický tok (EOF) [13]. Nejdříve jsou detekovány kationty, protože jsou nejrychlejší, pak neutrální částice (pohybují rychlostí elektroosmotického toku) a nakonec anionty.

Elektroosmotický tok lze ovládat změnou  $\text{pH}$ , iontové síly, viskozity (teplota, organický modifikátor) nebo přidáním povrchově aktivní látky.

### Techniky rozšiřující základní kapilární zónovou elektroforézu o další možnosti [13]

- **Kapilární zónová elektroforéza** (*Capillary Zone Electrophoresis, CZE*) neboli kapilární elektroforéza ve volném roztoku (*Free Solution Capillary Electrophoresis – FSCE*) je separace založená na rozdílech v náboji analytu a provádí se jako volná elektroforéza bez nosiče v tenké kapiláře.
- **Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie** (*Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, MECC*) se používá k separaci neutrálních sloučenin a využívá povrchové aktivity micel.
- **Kapilární gelová elektroforéza** (*Capillary Gel Electrophoresis, CGE*) využívá molekulově síťového efektu rozpuštěných látek v prostředí gelu.
- **Kapilární isoelektrická fokusace** (*Capillary Isoelectric Focusing, CIEF*) slouží k separaci amfolytů v gradientu  $\text{pH}$ .

- **Kapilární elektrochromatografie** (*Capillary ElectroChromatography*, CEC) pracuje na principu posuzování pohybu mobilní fáze elektroosmotického toku; separace nastává na silikagelu, který je stacionární fází. Separační selektivita v CEC je kombinací elektroforetického a chromatografického procesu.

Nejvíce používané separační techniky v kapilární elektroforéze jsou FSCE a MECC. CGE a CIEF jsou důležité pro separaci biomolekul jako DNA a proteinů a jejich význam roste s rozvojem biotechnologií léčiv. Všeobecně je kapilární elektroforéza využitelná pro vodné i nevodné roztoky [13].

#### 4.7.2.2 *Chemikálie, přístroje a sklo*

- Chemikálie
  - *Standardy*: diklofenak, ibuprofen, ketoprofen, naproxen, paracetamol
  - Tetraboritan sodný (dekahydrát)
  - Hydroxid sodný
  - Methanol
  - Mesityloxid
  - Mili-Q voda
- Přístroje a zařízení
  - Kapilární zónová elektroforéza Agilent CE s detektorem diodového pole (DAD)
  - Křemenná kapilára (ID = 75  $\mu\text{m}$ ; L  $\approx$  80 cm)
  - Ultrazvuková vodní lázeň
  - Automatické míchadlo
- Pomůcky a sklo
  - Mikropipety objemu 10–1000  $\mu\text{l}$
  - Vialky pro automatický dávkovač
  - Mikrofiltry 45  $\mu\text{m}$
  - Běžné laboratorní, analytické vybavení

#### **4.7.2.3 Příprava potřebných roztoků**

- 1) Základní elektrolyt (BGE) – vodný roztok tetraboritanu sodného o koncentraci 25 mM, který se nastaví potenciometrickou titrací hydroxidem sodným na pH = 10
- 2) Ze standardů léčiv se připraví roztoky o koncentracích 100 mg/l, navážka léčiva se nejprve rozpustí v malém množství methanolu a poté se doplní na požadovaný objem základním elektrolytem

#### **4.7.2.4 Nastavení přístrojů**

Před vlastním nastavením parametrů se nechá kapilára po dobu 20 minut promývat 0,1M roztokem hydroxidu sodného.

- Pracovní napětí: 30 kV, pozitivní polarita
- Teplota kapiláry: 25 °C
- Detekční vlnová délka: 210 nm (BW = 40 nm)
- Nástřik vzorku: hydrodynamicky, přetlakem na vstupu, 50 mbar, 5s
- Doba analýzy: 12 min
- Prekondicionace: 1 min promytí 0,1 M NaOH, 1 min promytí Mili-Q vodou, 3 min promytí BGE
- Postkondicionace: 1 min promytí Mili-Q vodou

#### **4.7.2.5 Pracovní postup**

- Do vialky pro automatický dávkovač se nadávkuje pomocí mikropipety 1,4 ml vzorku a přidá 0,5 µl mesityloxiu, který slouží jako neutrální marker elektroosmotického toku (EOF). Celý objem se potom ve vialce promíchá na automatické míchačce
- Roztoky standardů léčiv a vzorek odpadní vody se ve vialkách vloží do automatického dávkovače a v ovládacím programu se nastaví požadované parametry a spustí se měření
- Při vyhodnocení se z výsledků roztoků standardů se zjistí jejich migrační časy – vyhodnotí se jejich mobilita, poté se sestaví kalibrační křivky. Ze získaných dat pro standardy se kvalitativně a kvantitativně vyhodnotí vzorek odpadní vody
- Při práci jsou dodržována pravidla správné laboratorní praxe
- Vedoucí praktika může zadaný úkol a pracovní postup modifikovat

#### **4.7.2.6 Kritické body**

- Pro minimalizaci rizika hrubé chyby se dbá zvýšené opatrnosti především při přípravě roztoků, označení připravených roztoků a zvláště se pozornost soustředí na popis a označení připravených vzorků a získaných výsledků
- Kontaminace mesityloxiu při pipetování

#### **4.7.2.7 *Prezentace výsledků***

V protokolu bude, kromě standardních součástí, uvedeno:

- Přehledná tabulka výsledků – koncentrace a mobility vybraných léčiv
- Grafy kalibračních křivek s rovnicí regrese (v jednom grafu)
- Elektroforeogramy s popisy píků

## 4.8 Odběr vzorků půdy

Půda je velmi variabilní prostředí s různorodými chemickými, fyzikálními a biologickými vlastnostmi, a proto nelze určit univerzální metodu pro odběr vzorků. Existuje mnoho metod odběru, které jsou závislé na požadavku na vzorkování a na povaze matrice; nelze proto s jistotou stanovit obecně platný postup vzorkování pro široké spektrum analytů a pro velmi rozdílné půdní podmínky. Je prokázáno, že 90% variabilita výsledků je způsobena právě vzorkováním.

### 4.8.1 Odběr vzorků půdy teoretické laboratoře

První krok při vzorkování půdy je návrh vzorkovacího plánu. Vzorkovací plán se navrhuje pro každé zadané vzorkování půdy samostatně. Navrhnutý vzorkovací plán musí, co možná nejdříve, vystihovat poměry na odběrové lokalitě pro zajištění reprezentativního vzorku. Při navrhování vzorkovacího plánu se nejdříve stanoví úroveň kvality dat (*Data Quality Objectives*, DQO). Postupuje se ve třech fázích.

1. *fáze* – Identifikace problému, shromáždění všech dostupných informací o lokalitě, identifikace zdroje a posouzení mobility kontaminantů
2. *fáze* – Stanovení typu a množství potřebných dat (množství vzorků), úroveň kvality, pokud nelze z dostupných údajů spolehlivě stanovit potřebný počet vzorků, přistupuje se k fázovému vzorkování; v této fázi se stanovují parametry přesnosti, reprezentativnosti a detekční limit
3. *fáze* – Stanovení metod, pomocí kterých budou získána data (vzorky) s požadovanou kvalitou

Stanovení vzorkovacího schématu je rozhodující pro kvalitu výsledných dat. Rozlišuje se vzorkování:

1. *Náhodné*
2. *Utříděně náhodné*
  - lokalita rozdělena na několik menších okrsků, ve kterých se náhodným výběrem dílčích vzorků odebere vzorek
3. *Systematické*
  - Vzorkuje se pomocí systematické vzorkovací sítě, která může být například liniová, čtvercová, trojúhelníková a hexagonální
4. *Cílené*
  - Lokalita a hustota vzorkování je určena podle požadovaného cíle

Přehled základních vzorkovacích nástrojů; vhodný nástroj se volí podle hloubky, povahy substrátu a podle množství vzorku:

- Žlábková sondýrka
- Spirálový vrták – typ Edelman
- Šroubový vrták
- Pouzdrová sondýrka

#### **4.8.1.1 Osnova vzorkovacího plánu**

1. Základní vzorkovací schéma
2. Počet vzorků
3. Typ vzorku (porušený – neporušený; směsný – bodový)
4. Technika vzorkování
5. Hloubka odběru
6. Hmotnost vzorku
7. Čas a perioda vzorkování
8. Balení, uchování, přeprava vzorku
9. Dokumentace

#### **4.8.1.2 Běžně používané přístroje a zařízení**

- Pásmo, svinovací metr
- šroubový vrták, spirálový vrták – typ Edelman, žlábková sondýrka, pouzdrová sondýrka
- lopatka
- igelitové fólie
- mikrotenový sáček, vzorkovnice

#### **4.8.1.3 Pracovní postup**

Technik se nejdříve seznámí s požadavky zákazníka na vzorkování, půdními poměry na odběrové lokalitě a typem analytu. Z dostupných informací vypracuje vzorkovací plán, který předloží ke schválení managementu laboratoře. Při samotném odběru vzorků na lokalitě vyplňuje pracovník záznam o odběru vzorků. Osnova záznamu o odběru vzorků je uvedena níže. Záznam o odběru vzorků je součástí odběrového protokolu pro zákazníka. Při odběru vzorků technik dodržuje všechny zásady správné laboratorní praxe.

#### **4.8.1.4 Osnova záznamu z odběru vzorků**

- Čas, teplota, datum odběru vzorků
- Jméno technika přímo provádějícího odběr
- Popis a GPS souřadnice lokality
- Počasí a stav půdy
- Náčrt vzorkovacího schématu s příslušnými rozměry
- Hloubka odběru
- Popis vlastního odběru vzorků, seznam pomůcek použitých k odběru
- Způsob a podmínky při získání směsného vzorku
- Hmotnost jednotlivých bodových vzorků nebo celková hmotnost směsného vzorku
- Způsob a podmínky uchování vzorku
- Způsob a podmínky přepravy vzorků
- Způsob a podmínky skladování v laboratoři
- Celkový počet vzorků a jejich označení
- Poznámky (Jakékoliv odlišnosti mezi vlastním vzorkováním a vzorkovacím plánem nebo skutečnosti při odběru, uchování, přepravě vzorku, které by mohly ovlivnit reprezentativnost odebraných vzorků)
- Fotodokumentace odběru

#### **4.8.2 Odběr vzorků půdy studenty vysokoškolské laboratoře**

Studenti z této laboratoře neodebírají vzorky půdy za účelem výzkumu nebo komerční analýzy. Odběr i odebrané vzorky slouží pouze k výukové činnosti a zpravidla jsou odebrány v blízkosti budovy na protilehlém poli, a proto lze stanovit a použít obecný postup odběru vzorků.

##### **4.8.2.1 Nástroje a zařízení**

- Pásmo
- Lopatky
- Šroubový vrták
- Igelit
- Mikrotenové sáčky

#### **4.8.2.2 Pracovní postup**

- Vyměří se čtverec o stranách 10 m, rozdělí se úhlopříčkami na 4 stejné díly
- Bodové vzorky se odebírají:
  - V rozích čtverce (4 vzorky)
  - V polovině strany čtverce (4 vzorky)
  - V průsečíku úhlopříček (střed čtverce; 1 vzorek)
  - V polovině vzdálenosti mezi každým rohem čtverce a průsečíkem úhlopříček (4 vzorky)
- Hloubka odběru je asi 20 cm, hmotnost bodového vzorku cca 1 kg
- Z bodových vzorků se kvartací vyprodukuje jeden směsný vzorek o hmotnosti cca 3 kg
- Odebraný vzorek se uloží do mikrotenových sáčků
- Při odběru jsou dodržovány zásady správné laboratorní praxe

#### **4.8.2.3 Prezentace výsledků**

V odběrovém protokolu bude uvedeno:

- Stručný teoretický základ vzorkování půdy
- Použité nástroje
- Skutečný postup práce
- Vzorkovací schéma
- GPS souřadnice
- Počasí
- Místo, adresa
- Stav půdy
- Uchování vzorku
- Poznámky k odběru

## 5 ZÁVĚR

Na Fakultě chemické studenti navazujícího magisterského studia v rámci oborových předmětů absolvují předmět Praktikum z environmentální analýzy. Toto praktikum je časově náročnější (5 hodin výuky týdně) z toho důvodu, aby studenti v jeho průběhu zvládli provést pokud možno celou analýzu environmentálních vzorků, případně aby v rámci jednoho cvičení provedli izolaci analytů z dané matrice a v dalším praktiku pak jeho změření, vyhodnocení a případně také interpretaci získaných výsledků. Protože se po studentech v tomto předmětu požaduje, aby dodržovali pravidla správné laboratorní praxe, bylo předmětem této diplomové práce vypracovat Příručku jakosti pro laboratoř zabývající se environmentální analýzou. Požadavek při zadání diplomové byl takový, aby práce obsahovala i Standardní operační postupy pro úlohy, které jsou zpracovávány v rámci tohoto praktika.

V rámci řešení byly získány tyto důležité výsledky:

- ✚ V souladu s platnými normami ISO byla zpracována příručka jakosti, která bude studentům v rámci předmětu Praktikum z environmentální analýzy ukázána a bude požadováno, aby studenti dodržovali pravidla stanovená touto příručkou.
- ✚ V předložené práci jsou v krátkosti charakterizovány všechny metody instrumentální analýzy, které budou při vlastním praktiku používány. Tyto teoretické aspekty budou zveřejněny na e-learningu a povinností studentů bude se na tato praktika připravit.
- ✚ Text příručky byl zpracován do dvou hlavních kapitol, ve kterých je popsán systém managementu a technické požadavky na laboratoř environmentální analýzy.
- ✚ Součástí příručky jsou SOP následujících stanovení z oblasti environmentální analýzy:
  1. Analýza léčiv pomocí LC/MS
  2. Stanovení musk sloučenin pomocí SPME, GC/MS
  3. Stanovení obsahu PAHs v půdním extraktu pomocí HPLC
  4. Stanovení těžkých kovů v půdě metodou AAS
  5. Stanovení obsahu PCB ve vzorku tuku pomocí GC/ECD
  6. Stanovení rtuti ve vzorku půdy přístrojem AMA 254
  7. Stanovení nesteroidních protizánětlivých látek ve vodách pomocí CZE
  8. Odběr vzorků půdy.

## 6 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Oficiální stránky Českého institutu pro akreditaci, o. p. s., Praha, *Akreditace zkušebních laboratoří*, dostupné z: <http://www.cia.cz/attachment.aspx?id=1112>
- [2] Prof. RNDr. Lumír Sommer, DrSc. a kolektiv: *Základy analytické chemie II*, první vydání, Vysoké učení technické v Brně, 2000, ISBN 80-214-1742-0
- [3] Prof. Ing. Karel Hruška, DrSc., Ing. Petr Frank, Ing. Karel Hruška, *Zajišťování jakosti sv. 2: Kontrola jakosti a zkušebnictví*, FIE VUT v Brně, 2003, ISBN 80-7204-303-X
- [4] Doc. RNDr. Rudolf Fiedler, CSC. Ing. Petr Fiedler: *Základy managementu jakosti*, první vydání, Ústav mikroelektroniky FEI VUT v Brně, 1998, ISBN 80-214-1229-1
- [5] Český normalizační institut, 2005, ČSN EN ISO 9000:2005 Systémy managementu kvality – Základní principy a slovník
- [6] Český normalizační institut, 2005, ČSN EN ISO/IEC 17025:2005 Posuzování shody – Všeobecné požadavky na způsobilost zkušebních a kalibračních laboratoří
- [7] Portál eAGRI, *Standardní operační postupy*, dostupné z: [http://eagri.cz/public/web/file/65733/Prilohac\\_2\\_SOP.doc](http://eagri.cz/public/web/file/65733/Prilohac_2_SOP.doc)
- [8] Oficiální stránky Vysoké školy chemicko-technologické v Praze, *Extrakce*, dostupné z: [http://web.vscht.cz/poustkaj/ISM\\_LE\\_ASE\\_MASE\\_0907.pdf](http://web.vscht.cz/poustkaj/ISM_LE_ASE_MASE_0907.pdf)
- [9] Ing. Miloslav Pouzar Ph.D., *Rezidua léčiv v životním prostředí*, dostupné z: [www.mpouzar.net/prednasky/leciva.ppt](http://www.mpouzar.net/prednasky/leciva.ppt)
- [10] Oficiální stránky katedry Ekologie a životního prostředí PřF UP v Olomouci, *Toxické kovy*, dostupné z: [http://ekologie.upol.cz/ku/etxo/toxikologie\\_kovu.pdf](http://ekologie.upol.cz/ku/etxo/toxikologie_kovu.pdf)
- [11] Whitman College, *SPME* dostupné z: [http://people.whitman.edu/~dunnivfm/C\\_MS\\_Ebook/CH2/2\\_2\\_2.html](http://people.whitman.edu/~dunnivfm/C_MS_Ebook/CH2/2_2_2.html)
- [12] Oficiální stránky Fakulty lesnické a environmentální, Česká zemědělská univerzita v Praze, *Těžké kovy*, dostupné z: [http://fle.czu.cz/~ulbrichova/Skripta\\_HIO/kapitoly/Skodliviny/Tezkovyuvod.htm](http://fle.czu.cz/~ulbrichova/Skripta_HIO/kapitoly/Skodliviny/Tezkovyuvod.htm)
- [13] Ing. Pavel Klouda: *Moderní analytické metody*, druhé upravené vydání, nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava 2003, ISBN 80-86369-07-2, dostupné z: <http://knihy.pavko.cz/index/moderni-analyticke-metody>
- [14] Crawfordscientific, *Schéma funkce SPE*, dostupné z: [http://www.crawfordscientific.com/Silicycle\\_SPE.htm](http://www.crawfordscientific.com/Silicycle_SPE.htm)
- [15] The Association of Biomolecular Resource Facilities, *Schéma kvadrupólového analyzátoru a iontové pasti*, dostupné z: <http://www.abrf.org/ABRFNews/1996/September1996/sep96iontrap.html>
- [16] LAB-COMP Kft., *Schéma průběhu SPME*, dostupné z [http://www.lab-comp.hu/Termekek/?c2\\_7\\_goarticle=1203](http://www.lab-comp.hu/Termekek/?c2_7_goarticle=1203)
- [17] CHROMSERVIS s.r.o., *Schéma kvadrupólového analyzátoru*, dostupné z: <http://chromservis.cz/item/gc-ms-tof-description?lang=CZ>
- [18] Department of Chemistry and Biochemistry, New Mexico State University, *Schéma DAD detektoru*, dostupné z: [http://www.chemistry.nmsu.edu/Instrumentation/NMSU\\_1200HPLC\\_Procd.html](http://www.chemistry.nmsu.edu/Instrumentation/NMSU_1200HPLC_Procd.html)
- [19] Laboratoře geologických ústavů, PřF UK v Praze, *Schéma přístroje AMA 254*, dostupné z: <http://www.natur.cuni.cz/geologie/laboratore/laboratore-a-metody/analyzator-rtuti-ama-254>

- [20] Doc. Ing. Milan Popl, DrSc., prom. fyz. Jan Fährnich, CSc.: *Analytická chemie životního prostředí*, čtvrté přepracované vydání, Vydavatelství VŠCHT, 1999, ISBN 80-7080-336-3
- [22] Ing. Jiří Krofta. CSc. A kolektiv: *Návody pro laboratorní cvičení z analytické chemie II*, šesté přepracované vydání, Vysoká škola chemicko – technologická v Praze, 2001, ISBN 80-7080-451-3
- [23] Oficiální stránky Vysoké školy chemicko-technologické v Praze, *Analytické stanovení polyaromatických uhlovodíků v ovzduší*, dostupné z:  
<http://cesmina.vscht.cz/trp/images/Dokumenty/Navody-na-laboratore/Polyaromaticke-uhlovodiky.pdf>
- [24] Laboratorní návod z praktika environmentální analýzy: *Zpracování vzorku půdy před analýzou prvků*, rok 2009/10
- [25] Laboratorní návod z praktika environmentální analýzy: *Zpracování vzorků půdy pro analýzu organických kontaminantů*, rok 2009/10
- [26] Laboratorní návod z praktika environmentální analýzy: *Atomová absorpční spektrometrie*, rok 2009/10
- [27] Laboratorní návod z praktika environmentální analýzy: *Stanovení rtuti pomocí AMA254*, rok 2009/10
- [28] Laboratorní návod z praktika environmentální analýzy: *Stanovení PAHs v půdním extraktu pomocí HPLC s UV-VIS a FLD*, rok 2010/11
- [29] Laboratorní návod z praktika environmentální analýzy: *Zpracování bioty pro analýzu PCBs pomocí GC/ECD*, rok 2010/11
- [30] Laboratorní návod z praktika environmentální analýzy: *Analýza těkavých organických látek pomocí SPME – GC/MS*, rok 2010/11
- [31] Laboratorní návod z praktika environmentální analýzy: *Stanovení nesteroidních protizánětlivých látek ve vodách pomocí CZE*, rok 2010/11
- [32] Undergraduate Instrumentation Center, University of Nebraska – Lincoln: *Schéma ECD*, dostupné z: <http://www.chem.unl.edu/uic/gc-eed.shtml>
- [33] Sandra Wilson and Geoff Weir: *Food and Drink Laboratory Accreditation, A practical approach*, první vydání, Chapman & Hall, 1995, ISBN 0-412-59920-1
- [34] Parkany M.: *Quality Assurance for Analytical Laboratories*, Royal Society of Chemistry, 1993, London
- [35] Integrovaný registr znečišťování: *PAU*, dostupné z:  
[http://www.irz.cz/dokumenty/irz/metody\\_mereni/puda/PAU.pd](http://www.irz.cz/dokumenty/irz/metody_mereni/puda/PAU.pd)

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ŽP	Životní prostředí
ISO	International Organization for Standardization (Mezinárodní organizace pro normalizaci)
TQM	Total Quality Management (komplexní řízení jakosti)
SOP	Standardní operační postup
SPE	Solid Phase Extraction (extrakce pevnou fází)
LC	Liquid Chromatography (kapalinová chromatografie)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Vysoce účinná kapalinová chromatografie)
MS	Mass Spectrometry (Hmotnostní spektrometrie)
SIM, MID	single ion monitoring, multiple ion detection
EI	Electron impact (Elektronová ionizace)
Q	Quadrupole (Kvadrupólový analyzátor)
QIT	Quadrupole Ion Trap analyser (Kvadrupolová iontová past)
ESI	Elektrosprej
MALDI	Matrix assisted laser desorption/ionization,
TOF	Time Of Flight (Analyzátor doby letu)
FT-ICR	Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance (Iontová cyklotronová rezonance)
SPME	Solid Phase MicroExtraction (Mikroextrakce pevnou fází)
TCD	Thermal Conductivity Detector (Tepelně vodivostní detektor)
FID	Flame Ionization Detector (Plamenový ionizační detektor)
ECD	Electron Capture Detector (Detektor elektronového záchytu)
PID	PhotoIonization Detector (Fotoionizační detektor)
PAU, PAH	Polyaromatické uhlovodíky, Polyaromatic hydrocarbons
MASE	Microwave-Assisted Solvent Extraction (Extrakce podporovaná mikrovlnným ohřevem)
PES	Extrakce podporovaná tlakem
UV-VIS	Fotometrický detektor
FLD	Fluorescenční detektor
DAD	Diode Array Detektor (Detektor s fotodiodovým polem),
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
PP, PE	Polypropylen, Polyethylen
AAS	Atomová absorpční spektrofotometrie
PCB	Polychlorované bifenyly
AMA 2543	Advanced Merkury analyse
CNS	Centrální nervová soustava
CZE	Capillary Zone Electrophoresis (Kapilární zónová elektroforéza)

EOF	ElectroOsmotic Flow (Elektroosmotický tok)
MECC	MECC – Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography ( Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie)
CGE	Capillary Gel Electrophoresis (Kapilární gelová elektroforéza)
CIEF	Capillary IsoElectric Focusing (Kapilární isoelektrická fokusace)
CEC	Capillary ElectroChromatography (Kapilární elektrochromatografie)
DQO	Data Quality Objectives (Stanovení úrovně kvality dat)

## **8 SEZNAM PŘÍLOH**

- Požadavky na protokol, osnova
- Obrazová příloha konkrétních přístrojů používaných v praxi

## **Požadavky na protokol**

1. Hlavička
  - Název a číslo úlohy
  - Datum vypracování úlohy
  - Ročník studia
  - Jména všech pracovníků
2. Teorie
  - Charakteristika analyzovaných polutantů
  - Popis a princip funkce použitých přístrojů
3. Chemikálie, přístroje a zařízení, pomůcky a sklo
  - Stručný, nejlépe bodový výpis
4. Nastavení přístroje
  - Výpis nastavených parametrů přístroje
5. Pracovní postup
  - Skutečný pracovní postup při analýze
6. Výpočty
  - Výpočty roztoků, standardů a kalibračních směsí potřebných k analýze
7. Výsledky
  - Vyhodnocení naměřených dat
  - Přesnější instrukce k vyhodnocení dat a zápisu výsledků jsou na konci SOP, podrobně je specifikuje vedoucí praktika
8. Závěr
  - Přehledný zápis výsledků
  - Srovnání výsledků s normou, vyžaduje-li to povaha analytu
  - Nesrovnalosti nebo chyby, které vedly nebo mohly vést k chybným výsledkům a jejich zdůvodnění.

## Obrazová příloha

### Odběr vzorků půdy



*Šroubový vrták, spirálový vrták, žlábková sonda*

## Zpracování vzorků půdy pro analýzu organických kontaminantů



*Extrakce podporovaná tlakem (PES)*



*Mikrovlnná extrakce*



*Extrakce ultrazvukem*

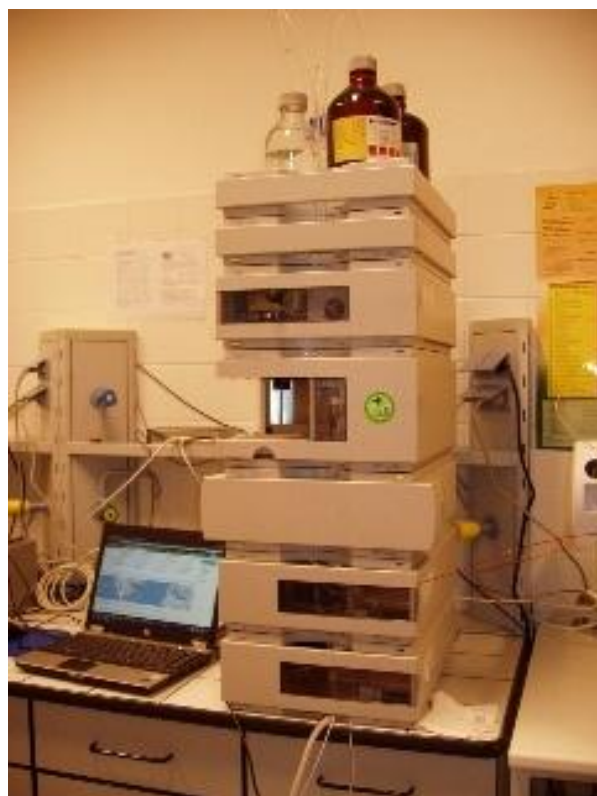


*Rotační vakuová odparka*



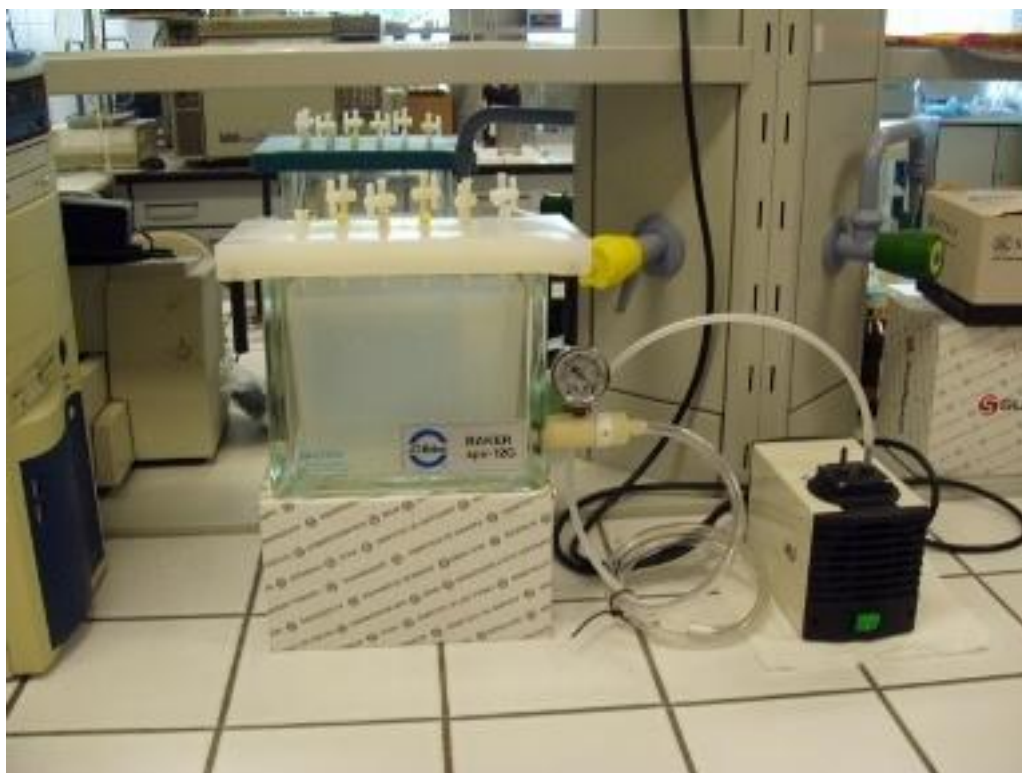
*Sušení dusíkem*

**Stanovení PAH v půdním extraktu**



*HPLC s UV-VIS a FLD detektorem*

## Úprava vzorku vody pro analýzu reziduí léčiv



*SPE s vakuovou pumpou*

## Analýza reziduí léčiv v odpadní vodě



*LC/MS*

## Stanovení nesteroidních protizánětlivých látek ve vodách



*CZE*

## Stanovení rtuti



*AMA 254*

## Stanovení těžkých kovů v půdě



*AAS s elektrotermickou atomizací*

## Stanovení PCB ve vzorku tuku



*GC s ECD detektorem*