

ULOHA Č. 6 - STANOVENÍ NEPOLÁRNÍCH EXTRAHOVATELNÝCH LÁTEK (NEL)

6.1 Teoretická část

V praxi se rozlišuje stanovení veškerých extrahovatelných látek (označení **EL**) a nepolárních extrahovatelných látek (označení **NEL**); extrakční postup může být totožný, v druhém případě (stanovení NEL) jsou vyextrahované látky polárního charakteru odstraněny vhodným polárním sorbentem (např. silikagel, oxidu hlinitém apod.)

Extrahovatelné látky (EL)

Pojmem extrahovatelné látky se označují ty látky, které za určitých podmínek přecházejí z pevné nebo vodné fáze vzorku (půdy, kalu, odpadní vody) do organického rozpouštědla a jsou ve formě roztoku v tomto rozpouštědle odděleny z analyzovaného prostředí. Mezi extrahovatelné látky patří oleje (minerální, rostlinné), tuky, mýdla, pryskyřice, vosky, těžké uhlovodíky, fenoly, PCB, organická rozpouštědla a řada dalších látek. Poněvadž neexistují selektivní organická rozpouštědla, do kterých by přecházely pouze jednotlivé typy jmenovaných látek, stanoví se jejich směs. Podle původu vzorku se odhadne typ přítomných extrahovatelných látek a zvolí se příslušná metoda stanovení. Pro získání reprodukovatelných výsledků a jejich vhodnou interpretaci je zapotřebí uvádět současně s výsledky stanovení i příslušný pracovní postup! Mají význam jako ukazatel přípustného znečištění např. odpadních vod z potravinářského průmyslu (výroby olejů, tuků, zpracování mléka, masa, ryb aj.)

Nepolárně extrahovatelné látky (NEL) – „ropné látky“

Podstatou stanovení NEL je jejich extrakce ze vzorku (vody, půdy, sedimentů, kalů) organickým nepolárním rozpouštědlem s následujícím odstraněním koextrahovaných slabě polárních organických látek sorpcí na silikagelu nebo Florisilu.

Podle normy ČSN EN ISO 9377-2 jsou NEL definovány jako suma koncentrací sloučenin extrahovatelných uhlovodíkovým rozpouštědlem bodu varu ležícího v rozsahu od 36 °C do 69 °C, které se neadsorbují na Florisilu (křemičitan hořečnatý)¹, které lze stanovit plynovou chromatografií a jejichž retenční časy leží mezi retenčními časy n-dekanu (C₁₀H₂₂) a n-tetrakontanu (C₄₀H₈₂) [ČSN EN ISO 9377-2].

- NEL_{GC} ~ stanovení nepolárních extrahovatelných látek metodou plynové chromatografie po jejich extrakci rozpouštědlem podle ČSN EN ISO 9377-2:2001
- NEL_{IR} ~ stanoví se především alifatické uhlovodíky, aromatické jsou zachycené až ve vysokých koncentracích (ČSN 75 7505).
- NEL_{UV} ~ stanoví se pouze aromatické uhlovodíky a alifatické uhlovodík s konjugovanými dvojnými vazbami
- NEL_{GR} ~ stanovení se provádí gravimetricky ztráta níževroucích uhlovodíků, nepoužívá se

Proč NE označení „ropné látky“: [Kontaminační hydrogeologie]

Pod pojmem ropné látky rozumíme totiž velmi širokou a různorodou směs látek nepolárního i polárního charakteru, kromě organických sloučenin obsahují ropné látky i

¹ Křemičitan hořečnatý – slouží k odstranění polárních látek

anorganické sloučeniny. Takto široce pojaté ropné látky samozřejmě nelze sumárně analyzovat.

Chemické složení ropných látek (ropy):

- nepolární organické látky
alkyny, isoalkany, alkeny, cykloalkany, aromáty (nejběžnější jsou označovány jako skupina BTEX – benzen, toluen, ethylbenzen, xyleny) a polyaromáty – polyaromatické uhlovodíky PAU
- polární organické látky
fenoly, naftenové kyseliny, trioly, thiofen, dusíkaté organické sloučeniny, vysokomolekulární látky aromatického charakteru (ropné pryskyřice, asfaltiny, karbény, karbidy apod.)
- anorganické látky např. sulfan a další sloučeniny S a organokovové sloučeniny V, Cu a Ni.

Stanovení NEL je nspecifickou screeningovou metodou, která zahrnuje kromě uhlovodíků i další nepolární látky, např. organické halogenderiváty a nitroderiváty, z nichž většina patří mezi tzv. prioritní škodliviny.

6.1.1 Stanovení nepolárních extrahovatelných látek

Z analytického hlediska lze nepolární extrahovatelné látky definovat jako látky, které se stanoví po extrakci vzorku (vody, půdy, kalu) nepolárním rozpouštědlem a odstraněním vyextrahovaných polárních látek. Pro sumární stanovení se jako koncovka používá gravimetrie, pyknometrie, chromatografie a spektroskopie v UV a zvláště IČ oblasti.

Stanovení nepolárních extrahovatelných látek lze rozdělit do několika fází:

1. *extrakce* - volba vhodného extrakčního postupu (dle konkrétního typu vzorku)
2. *úprava extraktu* - odvodnění extraktu, odstranění polárních látek

K odstranění polárních látek z vysušeného extraktu se používá aktivovaného silikagelu, Florisilu nebo oxidu hlinitého. Separace polárních látek se provádí na chromatografické koloně, tenkovrstvou chromatografií nebo vsádkovým způsobem. Nevýhodou odstraňování polárních látek na chromatografické koloně je časová náročnost, zředování extraktu elučním činidlem a neúplná eluce aromatických uhlovodíků z kolony. Při separaci polárních látek pomocí chromatografie na tenké vrstvě dochází ke ztrátám níževroucích ropných látek (zahušťováním extraktu). Nejjednodušší odstraňování polárních látek je vsádkovým způsobem. Pevný polární sorbent se dávkuje přímo do bezvodého roztoku organického rozpouštědla s vyextrahovanými látkami. Sorpce nasycených a aromatických uhlovodíků na sorbent je minimální a neovlivňuje vlastní stanovení nepolárních extrahovatelných látek.

3. *vlastní stanovení nepolárních extrahovatelných látek* - volba vhodné analytické metody.

NEL jsou směsí značného množství chemických individuí - uhlovodíků. V přírodních podmínkách se mění zastoupení jednotlivých uhlovodíků a již dříve uvedené pochody mění původní chemické složení těchto látek. Proto je nutno používat především ty analytické metody, u nichž není přesnost příliš závislá na chemickém složení stanovovaných látek.

Extrakční postupy a čištění vzorku (půda, sedimenty, kaly)

Vodu obsaženou ve vzorku je zapotřebí odstranit jedním z těchto způsobů:

- a) *vysušením vzorku v termostatu při teplotě okolo 120 °C*
Otázkou zde zůstává vliv teploty na extrahovatelné látky ve složité matici a kontaminace prostředí sušárny, event. laboratoře.
- b) *roztíráním v třecí misce se síranem sodným (chemické sušení)*
Tento postup lze doporučit, vhodný je zejména pro vzorky s nižším obsahem vody.
- c) *azeotropické sušení spojené s extrakcí*
Tento způsob je nejšetrnější, avšak je náročný na čas a použité vybavení.
- d) *superkritická fluidní extrakce*
Výrazné zkrácení doby extrakce ve srovnání s výše uvedenými postupy, ale vysoké pořizovací náklady, vysoké provozní náklady.

Superkritická fluidní extrakce

Superkritické tekutiny se vyskytují při teplotě a tlaku vyšším, než je jejich kritická hodnota. Tato analytická metoda využívá některých výhodných vlastností nadkritických tekutin jako například jejich zvýšené rozpouštěcí schopnosti, výrazně vyšší viskozitu a vyšší difuzivitu ve srovnání s kapalinami a dále téměř nulové povrchové napětí, usnadňující pronikání tekutiny do pórů matrice. Srovnání vlastností různých forem tekutiny je uvedeno v tabulce I. Fyzikálně-chemické vlastnosti těchto tekutin se nacházejí mezi kapalinou a plynem a jsou vhodné, aby byly využity jako mobilní fáze v chromatografii nebo pro extrakci organických látek z pevných materiálů tam, kde klasická extrakce kapalinou selhává, nebo je příliš pracná a zdouhavá. Jako nadkritické rozpouštědlo se používají např. oxid dusný, amoniak, freony apod., ale nejčastěji je to oxid uhličitý. Má nízkou kritickou teplotu (31°C) a tlak (7,38 MPa), je netoxický, nehořlavý, málo reaktivní a relativně levný. U některých aplikací však může být na závalu jeho nízká polarita (se stoupající polaritou analytů, klesá jejich rozpustnost); a tento problém se řeší použitím nadkritických tekutin s přídavkem vhodné polární látky - modifikátoru (např. methanol, ethanol, benzen, toluen, aceton, apod.)

Tab.I Některé vlastnosti plynů, superkritických tekutin a kapalin

Tekutina	Hustota (g.ml ⁻¹)	Viskozita (g.cm ⁻¹ .s ⁻¹)	Difuzivita cm ² .s ⁻¹
Plyn	(0,6 - 2,0).10 ⁻³	(0,5 - 3,5).10 ⁻⁴	0,01 - 1,0
Superkritická tekutina	0,2 - 0,9	(2,0 - 9,9).10 ⁻⁴	(0,5 - 3,3).10 ⁻⁴
Kapalina	0,8 - 1,0	(0,3 - 2,4).10 ⁻²	(0,5 - 2,0).10 ⁻⁵

Optimální provedení superkritické fluidní extrakce je dáno dosažením požadovaného stupně výtěžnosti v rozumném čase. Z tohoto důvodu je v případě každé konkrétní matrice nutno provést celkovou optimalizaci řady parametrů. Jsou to faktory ovlivňující solvatační sílu rozpouštědla: hustota fluida, teplota a složení fluida. K faktorům ovlivňujícím kinetiku

extrakce patří průtok, doba extrakce, typ extrakce (statická, dynamická), druh extrahované matrice a vlhkosti. Přičemž transport analytů z matrice do nadkritické tekutiny se děje ve čtyřech krocích: 1. povrchová desorpce analytu do fluida; 2. difuze analytů z vnitřního objemu matrice; 3. difuze analytů přes povrchovou hraniční vrstvu; 4. difuze a transport v objemu superkritické fluidní fáze. Negativní vliv vlhkosti ovlivňuje kinetiku extrakce, dochází k vytvoření povrchové vrstvy molekuly vody, které brání přístupu nepolární nadkritické tekutiny k povrchu. A dále voda i přes svoji nízkou rozpustnost v nadkritickém CO₂ může působit jako modifikátor, tj. zvyšovat polaritu CO₂.

Metody stanovení NEL po extrakci do rozpouštědla

a) gravimetrické metody

Jsou časově náročné (5 - 7 hodin) a při sušení extraktu vznikají ztráty vyextrahovaných níževroucích uhlovodíků. Citlivost této metody je 1 - 5 mg.l⁻¹ a přesnost ± 25 %. Metoda překonaná, dnes používaná výjimečně.

b) UV-spektrometrie

Není vhodná pro stanovení NEL s nízkým obsahem aromátů. Dobrých výsledků při stanovení ropného znečištění lze dosáhnout pouze tehdy, použije-li se jako kalibrační standard ropná látka, totožná s analyzovanou ropnou látkou. Což při analýze vzorků o neznámém znečištění, případně s obsahem ropných látek dlouhodobě vystavených přírodním podmínkám, je prakticky nemožné. Správné výsledky nedávají ani universální směsné standardy;

c) IČ-spektrofotometrie

Stanovení NEL pomocí valenčních vibrací C-H vazeb umožňuje jejich poměrně přesné stanovení. Vyhodnocením několika vhodně vybraných absorpčních pásů se zpřesňuje analytické stanovení ropných látek. Obsah ropných látek lze vyhodnotit pomocí "standardní látky" nebo využitím empirického vztahu. Přesnost IČ-metody je 5 % (i v případě, kdy se využije k výpočtu znečištění empirického vztahu) a i citlivost je dostatečná;

d) Plynová chromatografie

Z plynově chromatografických metod se nejčastěji využívá pro níževroucí uhlovodíky metoda „head space“ a při stanovení uhlovodíků do C₂₄ cirkulační striping dle Groba. Výhodou těchto metod je vysoká citlivost i přesnost (5 až 10 %). Použití hmotového detektoru umožňuje přesnou kvalitativní i kvantitativní analýzu velmi komplikovaných směsí organických látek.

6.2 Experimentální část

- Zadání:**
1. Stanovte účinnost extrakce NEL z vody a půdy. S
 2. Stanovte obsah NEL v zadaném vzorku odpadní vody a kontaminované půdy

Postup stanovení NEL

1. příprava modelové odpadní vody pro stanovení účinnosti extrakce

S přesností na pět desetinných míst se naváží na inertní vodou rozpustný nosič cca 10 – 15 mg standardní látky a „rozpustí“ se v cca 600 – 800 ml destilované vody. Přesnou navážku i objem je nutné zaznamenat pro výpočet skutečné koncentrace NEL ve vzorku modelové vody a k výpočtu účinnosti extrakce.

2. příprava modelové kontaminované půdy pro stanovení účinnosti extrakce

Modelovou kontaminovanou půdu studenti v rámci praktik nepřipravují, jedná se o časově i technicky náročný postup.

3. stanovení sušiny půdy

Petriho miska včetně víčka se vysuší při 105°C nejméně po dobu 30 min a nechá se vychladnout v exsikátoru nejméně 45 min. Do takto vysušené a zvážené Petriho misky vč. víčka se naváží cca 5 g půdy s přesností na 10 mg. Otevřené Petriho misky se vzorkem se umístí do sušárny vyhřáté na 105°C a suší se včetně víčka do konstantní hmotnosti (cca 3 h). Po ukončení sušení se víčkem uzavřená Petriho miska vloží do exsikátoru a po vychladnutí (nejdříve po 45 min) se zváží s přesností na 10 mg.

4. Příprava kalibračních standardů pro stanovení NEL v extraktu rozsahu 0-300 mg.l⁻¹

Zásobní roztok "standardní látky" o koncentraci cca 500 mg.l⁻¹

Vypočtené množství standardní látky se naváží s přesností na pět desetinných míst do 100 ml odměrné baňky a opatrně se doplní tetrachlorethylenem po rysku.

Příprava kalibračních standardů v 50 ml Erlenmayerových bankách

Ze zásobního roztoku se připraví do 50 ml Erlenmayerových baněk příslušné kalibrační "standarty" o celkovém objemu **30 ml** (viz. tab.II). Všechny roztoky se připravují v **daném rozpouštědle**. Takto připravené roztoky standardů se pak upravují podle postupu B. ÚPRAVA EXTRAKTU.

Tabulka II: Příprava kalibračních standardů v 50 ml Erlenmayerových bankách

Standard č.	pipetáž zásobního roztoku	pipetáž tetrachlorethylenu	teoretická koncentrace	Aktuální koncentrace
	[ml]	[ml]	[mg.l ⁻¹]	[mg.l ⁻¹]
1			0,0	
2			25,0	
3			50,0	
4			100,0	
5			200,0	
6			250,0	

A. Extrakce

Extrakce - stanovení NEL ve vodách - ČSN 830540

Vzorek se extrahuje ve skleněné láhvi, kde se rýskou označí objem daného vzorku (měří se po ukončení extrakce). Přidá se 5 g chloridu sodného a na elektromagnetické míchačce se míchá 5 minut. Poté se přidá 5 ml kyseliny sírové zředěné v poměru 1:4 a míchá se dalších 5 minut. Potom se přidá 30 ml extrakčního média (Tetrachlorethylen) a extrahuje se 24 h. K oddělení extraktu se obsah extrakční nádoby přelije do dělicí nálevky. (Pozor! zábrus kohoutu nesmí být namazán tukem, pouze vodou). Po protřepání se chvíli nechá stát, načež se spodní část z dělicí nálevky odpustí do 50 ml Erlenmayerovy baňky se zábrusem a uzavře.

Extrakce - Stanovení NEL v zemině mez 10 - 2000 mg.kg⁻¹

S přesností na 4 desetinná se naváží do 50 ml Erlenmayerovy baňky 5 g původního vzorku zeminy a vzorek se zasype 3 lžičkami bezvodého síranu sodného a směs se promíchává až do vysušení. Přidá se 25 ml extrakčního činidla, vzorek se protřepe, 30 min. se vystaví působení ultrazvuku a nechá se minimálně 6 hodin stát za občasných protřepání. Nejlépe však do příštího dne. Po ukončení extrakce se extrakční činidlo přefiltruje do Erlenmayerovy baňky.

B. Úprava extraktu

K oddělenému extraktu se přidá 5 g síranu sodného, po 30 minutách se roztok slije a přidá se 1 g silikagelu (pokud se odstraňují polární látky, tedy při stanovení NEL) a po 30 minutách (za občasných promíchání) se přefiltruje přes skelnou vatu do zkumavky se zábrusem a uzavře. Vzorky jsou připraveny k měření na IČ spektrometru.

C. Vlastní stanovení NEL v extraktu spektrofotometrickou metodou v IČ oblasti

Princip stanovení je založen na extrakci nepolárních a slabě polárních látek ze vzorku tetrachlorethylenem, odstranění zbytku polárních látek adsorbací na silikagelu, záznamu spektra v IČ oblasti vlnočtu od 3.150 do 2.750 cm⁻¹ a vyhodnocení valenčních vibrací charakteristických C - H skupin pomocí empirických vztahů nebo s použitím "standardní látky".

Vlastní měření:

Měření se provádí v 1 cm, křemenných kyvetách proti čistému rozpouštědлу v oblasti vlnočtu 3.150 cm⁻¹ - 2.700 cm⁻¹ dle přístrojového manuálu. Ze záznamu spektra se odečtou hodnoty absorbance příslušných valenčních vibrací skupin, a to:

A ₁ (pro aromatické a olefinické =CH-)	při (3.055 ± 25) cm ⁻¹
A ₂ (pro asymetrické CH ₃ -)	při (2.960 ± 15) cm ⁻¹
A ₃ (pro asymetrické - CH ₂ -)	při (2.925 ± 15) cm ⁻¹

Vyhodnocení:

Kalibrační křivka se sestojí vynesemím **součtu** absorbancí proti koncentraci základní látky v kalibračních roztocích v mg.l⁻¹. Stejným způsobem se proměří spektra extraktů vzorků zemin, popř. odpadní vody.

Zpracování výsledků (viz. pomocník pro psaní protokolů) v protokolu je nutné uvést veškeré prováděné výpočty včetně dosazovaných hodnot s důsledným popisem

1) teoretická část

princip vlastními slovy v rozsahu 200 – 500 slov (nepřípustné je doslovné kopírování návodů či jiných literárních nebo elektronických zdrojů)

2) experimentální část

3) postup: odkaz na literaturu a heslovitě uvést jednotlivé kroky práce v logické návaznosti, zdůraznit změny oproti citovanému postupu

4) stanovení sušiny půdy

5) příprava kalibračních standardů pro stanovení NEL

6) výsledky a diskuse (vyhodnocení experimentů)

- kalibrační křivka pro stanovení NEL v extraktu
- stanovení obsahu NEL v kontaminované půdě
 - stanovení účinnosti extrakce NEL z půdního vzorku - ϕ_P (%)
 - vlastní stanovení obsahu NEL ve vzorku půdy vztažené na účinnost extrakce a sušinu půdy
- stanovení obsahu NEL v odpadní vodě
 - stanovení účinnosti extrakce NEL z vodního vzorku - ϕ_{OV} (%)
 - vlastní stanovení obsahu NEL ve vzorku odpadní vody vztažené na účinnost extrakce a objem vzorku (odpadní vody)

7) diskuze

slovně okomentujte jednotlivé výsledky – míru účinnosti extrakce, nikoliv pouhé odkazy na data uvedená v tabulkách či grafech

8) závěr

Porovnejte výsledky analýzy s limitními hodnotami pro vody a půdy.

9) citovaná literatura