

VISOKA ŠOLA ZA VARSTVO OKOLJA

DIPLOMSKO DELO

**PRIMERJAVA ANALIZNIH METOD ZA DOLOČANJE
POLICIKLIČNIH AROMATSKIH OGLJIKOVODIKOV
V VODAH**

SAŠA TRAMŠEK

VELENJE, 2016

VISOKA ŠOLA ZA VARSTVO OKOLJA

DIPLOMSKO DELO

**PRIMERJAVA ANALIZNIH METOD ZA DOLOČANJE
POLICIKLIČNIH AROMATSKIH OGLJIKOVODIKOV
V VODAH**

SAŠA TRAMŠEK

Varstvo okolja in ekotehnologije

Mentorica: viš. pred. dr. Nataša Kovačič

Somentor: dr. Boštjan Križanec

VELENJE, 2016



Izjava o avtorstvu

Podpisana Saša Tramšek, z vpisno številko 34100075, študentka dodiplomskega študijskega programa Varstvo okolja in ekotehnologije, sem avtorica diplomskega dela z naslovom Primerjava analiznih metod za določanje policikličnih aromatskih ogljikovodikov v vodah, ki sem ga izdelala pod mentorstvom pred. dr. Nataše Kovačič in somentorstvom dr. Boštjana Križanca.

S svojim podpisom zagotavljam, da:

- je predloženo delo moje avtorsko delo, torej rezultat mojega lastnega raziskovalnega dela;
- da oddano delo ni bilo predloženo za pridobitev drugih strokovnih nazivov v Sloveniji ali tujini;
- da so dela in mnenja drugih avtorjev, ki jih uporabljam v predloženem delu, navedena oz. citirana v skladu z navodili VŠVO;
- da so vsa dela in mnenja drugih avtorjev navedena v seznamu virov, ki je sestavni element predloženega dela in je zapisan v skladu z navodili VŠVO;
- se zavedam, da je plagiatorstvo kaznivo dejanje;
- se zavedam posledic, ki jih dokazano plagiatorstvo lahko predstavlja za predloženo delo in moj status na VŠVO;
- je diplomsko delo jezikovno korektno in da je delo lektorirala Ksenija Pečnik, prof. slov. jezika;
- da dovoljujem objavo diplomskega dela v elektronski obliki na spletni strani VŠVO;
- da sta tiskana in elektronska različica oddanega dela identični.

V Velenju, dne _____

podpis avtorice

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorici viš. pred. dr. Nataši Kovačič in somentorju dr. Boštjanu Križancu za vodenje in usmerjanje ter strokovno pomoč in znanje, ki sta mi ga dajala ob nastajanju diplomske naloge.

Hvala Nacionalnemu laboratoriju za zdravje, okolje in hrano za izvajanje praktičnega usposabljanja.

Želela bi se zahvaliti tudi delovni mentorici Urški Červek za vso podporo in pomoč pri izvajanju eksperimentalnega dela.

Največja zahvala gre staršem in vsem mojim najbližjim, ki so mi v času študija stali ob strani in me spodbujali, da je bila pot lažja.

Izvleček:

Namen diplomske naloge je predlagati optimalno metodo za določanje policikličnih aromatskih ogljikovodikov v vodah. Postopek priprave vzorca je bila ekstrakcija na trdni fazi, za primerjavo pa je služila ekstrakcija tekoče – tekoče. Za določitev policikličnih aromatskih ogljikovodikov v vodi smo uporabili tekočinsko kromatografijo v povezavi z DAD-detektorjem in plinsko kromatografijo z masno selektivnim detektorjem (GC/MS). Rezultati so pokazali, da ima ekstrakcija na trdni fazi (SPE) številne prednosti pred ekstrakcijo tekoče – tekoče (LLE). Pri testiranju SPE metode nismo uspeli najti ustreznega postopka za določanje vseh PAO, zato lahko SPE metodo uporabljamo za določevanje izbranih policikličnih aromatskih ogljikovodikov (PAO).

Ključne besede: policiklični aromatski ogljikovodiki, ekstrakcija na trdno fazo, ekstrakcija tekoče – tekoče, tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

Abstract:

The purpose of the thesis is to suggest the optimal method for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in waters. The sample preparation procedure was solid phase extraction (SPE) and for comparative purposes we used liquid-liquid extraction. For the determination of PAH's in water we used liquid chromatography in connection with the DAD-detector and gas chromatography with mass spectrometry (GC/MS). The results showed that the SPE method has numerous advantages over liquid-liquid extraction. During testing of the SPE method we did not manage to find an appropriate procedure for the determination of all PAH's, therefore the SPE method can be used only for selected PAH's.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons, solid phase extraction, liquid-liquid extraction, high-definition liquid chromatography.

Kazalo vsebine

1. UVOD	1
2. TEORETIČNI DEL	2
2.1 Policiklični aromatski ogljikovodiki	2
2.1.1 Izvor in toksičnost policikličnih aromatskih ogljikovodikov	2
2.1.2 Fizikalne in kemijske lastnosti policikličnih aromatskih ogljikovodikov	3
2.1.3 Policiklični aromatski ogljikovodiki v vodah.....	4
2.2 Določanje policikličnih aromatskih ogljikovodikov v vodah	4
2.2.1 Ekstrakcija policikličnih aromatskih ogljikovodikov iz vode	4
2.2.2 Ekstrakcija tekoče – tekoče (LLE)	5
2.2.3 Ekstrakcija na trdno fazo (SPE)	6
2.2.3.1 Izbira primerne polnila SPE	8
2.2.4 Primerjava SPE in LLE	9
2.2.5 Mikroekstrakcija na trdno fazo.....	9
2.2.6 Ekstrakcija s tekočinsko fazo	10
2.3 KROMATOGRAFIJA	11
2.3.1 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)	12
2.3.2 Plinska kromatografija z masno selektivnim detektorjem – GC/MS	16
3. EKSPERIMENTALNI DEL	17
3.1 Kemikalije in reagenti	17
3.1.1 Priprava brezvodnega Na ₂ SO ₄	18
3.1.2 Priprava silika gela (SiO ₂), deaktiviranega s 5 % vode	18
3.1.3 Priprava aluminijevega oksida (Al ₂ O ₃), deaktiviranega z 2 % vode	18
3.2 Steklovina in laboratorijski pribor	18
3.3 Aparature	18
3.4 Ekstrakcija tekoče – tekoče, priprava vzorcev	18
3.4.1 Čiščenje ekstraktov s kolonsko kromatografijo.....	19
3.5 Ekstrakcija na trdni fazi (SPE)	20
3.5.1 Ekstrakcija na polnilu Lichrolut EN	20
3.5.1.1 Čiščenje ekstraktov s kolonsko kromatografijo	20
3.5.2 Ekstrakcija na kolonah ISOLUTE PAH SPE	21
3.6 Instrumentalna analiza	21
3.6.1 Določitev policikličnih aromatskih ogljikovodikov z metodo HPLC	21
3.6.2 Identifikacija spojin.....	22
3.6.3 Določitev izkoristkov ekstrakcije.....	22
3.6.4 Vrednotenje rezultatov	22
4. REZULTATI IN DISKUSIJA	23
4.1 Umeritvena krivulja PAO	23
4.2 Izbira primerne organskega topila.....	25
4.3 Vpliv pH vrednosti in organskega topila	25
4.3.1 Vpliv pH: Polnilo NH ₂ in C18 ISOLUTE PAH – Biotage (750 mg).....	25
4.3.2 Vpliv dodatka organskega topila: Polnilo NH ₂ in C18 ISOLUTE PAH - Biotage (750mg).....	27
4.4 Izbira primerne polnila za SPE	28
4.4.1 Polnilo Lichrolut EN (0,25 g)	28
4.4.2 Polnilo Lichrolut EN (0,50 g)	30
4.4.3 Polnilo NH ₂ in C18 ISOLUTE PAH – Biotage (750 mg)	31
4.4.4 Polnilo NH ₂ in C18 ISOLUTE PAH – Biotage (1,5 g).....	32
4.5 Izkoristki ekstrakcije tekoče – tekoče (LLE)	34
4.6 Medlaboratorijski primerjalni testi	35
4.7 Primerjava HPLC in GC/MS	36
5. ZAKLJUČEK.....	38
6. VIRI IN LITERATURA	40

Kazalo slik

Slika 1: Struktura 16 EPA policikličnih aromatskih ogljikovodikov.....	2
Slika 2: Ekstrakcija PAO iz vodne faze z diklorometanom.....	5
Slika 3: Shematski prikaz delovanja SPE.....	7
Slika 4: SPE-kolona za ekstrakcijo policikličnih aromatskih ogljikovodikov.....	8
Slika 5: Aminopropil, vezan na silicijev oksid.....	8
Slika 6: Oktadecil, vezan na silicijev oksid.....	9
Slika 7: Načini uporabe SPME.....	10
Slika 8: Ekstrakcija na vodnem in organskem sprejemniku.....	10
Slika 9: Shematski prikaz najenostavnejšega sistema za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.....	12
Slika 10: Kromatografska kolona za HPLC-sistem.....	13
Slika 11: FLD-detektor za HPLC-sistem.....	15
Slika 12: Shematski prikaz masno selektivnega detektorja.....	16
Slika 13: Aparat HPLC.....	17
Slika 14: Rotacijski stresalnik.....	19
Slika 15: Čiščenje ekstraktov s kolonsko kromatografijo.....	20
Slika 16: Ekstrakcija PAO z uporabo kolon ISOLUTE PAH.....	21
Slika 17: Kromatogram standardne raztopine PAO.....	23
Slika 18: Primer umeritvene krivulje za spojini piren in benzo[a]antracen.....	24
Slika 19: Kromatogram slepe matrice s standardnim dodatkom (10 ng/mL) pri pH = 7.....	26
Slika 20: Kromatogram slepe matrice s standardnim dodatkom (10 ng/ml) z dodanim metanolom (5 %) pri pH = 7.....	28
Slika 21: Kromatogram slepe matrice s standardnim dodatkom (10 ng/ml) po SPE na Lichrolut EN (0,25 g).....	29
Slika 22: Kromatogram slepe matrice s standardnim dodatkom (10 ng/ml) po SPE na Lichrolut EN (0,50 g).....	31
Slika 23: Kromatogram slepe matrice s standardnim dodatkom (10 ng/ml) po SPE na ISOLUTE PAH – Biotage (750 mg).....	32
Slika 24: Kromatogram slepe matrice s standardnim dodatkom (10 ng/ml) po SPE na ISOLUTE PAH – Biotage (1,5 g).....	33
Slika 25: Kromatogram slepe matrice s standardnim dodatkom (10 ng/ml) pri ekstrakciji tekoče – tekoče.....	35
Slika 26: HPLC kromatogram vzorca podzemne vode pri ekstrakciji tekoče – tekoče.....	36
Slika 27: GC/MS (SCAN) kromatogram vzorca podzemne vode po ekstrakciji tekoče – tekoče.....	37
Slika 28: Ionski tok masnega fragmenta m/z= 128.....	37
Slika 29: Masni spekter naftalena.....	38

Kazalo preglednic

Preglednica 1: Fizikalno-kemijske lastnosti policikličnih aromatskih ogljikovodikov.....	3
Preglednica 2: Kromatografski pogoji za metodo določanja PAO v vodah.....	21
Preglednica 3: Retencijski časi analiziranih spojin.....	24
Preglednica 4: Topnost različnih organskih topil.....	25
Preglednica 5: Izkoristki in izmerjene koncentracije slepe matrice z dodatkom standardne raztopine (c = 10 ng/mL) in pH = 7.....	26
Preglednica 6: Izkoristki in koncentracije slepe matrice z dodatkom standardne raztopine (c = 10 ng/mL) in metanolom, pH = 7.....	27
Preglednica 7: Izkoristki in koncentracije vzorca slepe matrice z dodano standardno raztopino pri uporabi polnila Lichrolut EN (0,25 g).....	29

Preglednica 8: Izkoristki in koncentracije vzorca slepe matrice z dodano standardno raztopino pri uporabi polnila Lichrolut EN (0,50 g)	30
Preglednica 9: Izkoristki in koncentracije vzorca slepe matrice z dodano standardno raztopino pri uporabi polnila ISOLUTE PAH – Biotage (750 mg)	31
Preglednica 10: Izkoristki in koncentracije vzorca slepe matrice z dodano standardno raztopino pri uporabi polnila ISOLUTE PAH – Biotage (1,5 g)	33
Preglednica 11: Izkoristki in koncentracije vzorca slepe matrice z dodano standardno raztopino pri ekstrakciji tekoče – tekoče.	34
Preglednica 12: Rezultati medlaboratorijskih primerjalnih testov za določanje PAO v vodah.	36

1. UVOD

Policiklični aromatski ogljikovodiki (PAO) so organske spojine, sestavljene iz dveh ali več benzenovih obročev. V okolju so prisotni zaradi naravnih termičnih procesov, kot so vulkani in požari. Naravno prisotni so na primer v nafti, premogu in katranu, v okolju pa so vse pogostejše prisotni zaradi različnih antropogenih vplivov. PAO lahko nastajajo pri različnih industrijskih termičnih procesih, pri industrijski predelavi jekla, aluminija, železa itd. Lahko nastajajo tudi med obdelavo živil pri visokih temperaturah.

V površinskih vodah so prisotni predvsem zaradi nafte in naftnih derivatov (razlitje nafte, asfalt, umetni materiali, maziva itd.). PAO lahko vstopajo v vode neposredno iz zraka s prahom in padavinami ali s spiranjem delcev iz tal. Transport PAO v vode (pitne, površinske, podtalne) je v primerjavi z zračnim relativno počasen.

Izpostavljenost PAO je nevarna za zdravje, odvisna je od doze in trajanja izpostavljenosti. Nekateri PAO so karcinogeni, genotoksični in še posebej toksični pri dolgotrajnejši izpostavljenosti. Spremljanje prisotnosti PAO v okolju je zato zelo pomembno. Za določevanje PAO je na razpolago več različnih postopkov in instrumentalnih tehnik.

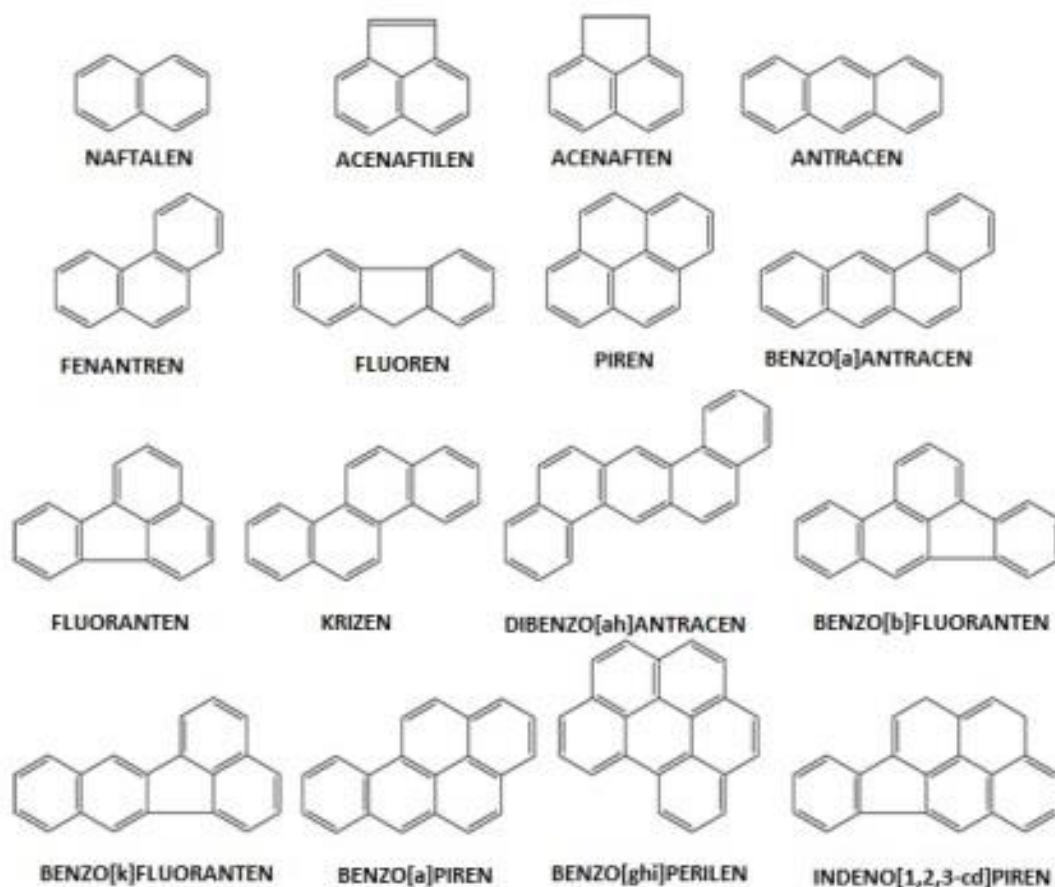
Namen diplomske naloge je bil zbiranje teoretičnih in praktičnih podatkov glede prednosti in slabosti izbranih analitskih metod za določanje PAO v vzorcih vod. Cilj diplomskega dela je bil na podlagi zbranih podatkov predlagati optimalno metodo za določanje PAO v vzorcih vod. V okviru laboratorijskih zmožnosti smo v praktičnem delu uporabili najpogostejše uporabljeni instrumentalni tehniki, in sicer tekočinsko kromatografijo v povezavi z detektorjema DAD (angl. *Diode Array Detector*) in FLD (angl. *Fluorescence Detector*) ter plinsko kromatografijo z masno selektivnim detektorjem (GC/MS).

2. TEORETIČNI DEL

2.1 Policiklični aromatski ogljikovodiki

PAO so organske spojine, sestavljene iz dveh ali več benzenovih obročev. V skupino PAO spadajo tudi policiklične aromatske spojine, ki vključujejo funkcionalne derivate (nitro- in hidroksi PAO) in heterociklične analoge, ki vsebujejo enega ali več hetero atomov v aromatski spojinii (aza-, oksa- in tia- areni) (Žnidar 2011a, str. 2).

PAO spadajo med najbolj razširjene organske onesnaževalce, od katerih so številni kancerogeni, mutageni in teratogeni. Ameriška agencija za okolje (The US Environmental Protection Agency – EPA) je tako dala poudarek na 16 PAO, ki so prikazani na sliki 1 (Marcé in Borrull 2000, str. 274).



Slika 1: Struktura 16 EPA policikličnih aromatskih ogljikovodikov (Vir: Marce et al. 2000, str. 274)

2.1.1 Izvor in toksičnost policikličnih aromatskih ogljikovodikov

Policiklični aromatski ogljikovodiki se v okolju pojavljajo zaradi naravnih procesov, kot so gozdni požari in vulkanski izbruhi. Vse več pa je PAO, ki so antropogenega izvora in nastajajo zaradi nepopolnega zgorevanja fosilnih goriv, pri industrijski predelavi aluminija, železa in jekla, pri ogrevanju, izpušnih plinih in kajenju. Nastajajo lahko tudi med obdelavo živil, predvsem maščob, pri visokih temperaturah z odsotnostjo kisika.

Glede na izvor v okolju lahko PAO razdelimo v naslednje skupine:

- pirogeni PAO,

- b) petrogeni PAO,
- c) biogeni PAO.

Pirogeni PAO nastajajo pri nepopolnem zgorevanju organskega materiala in fosilnih goriv pri visokih temperaturah. Petrogeni PAO nastajajo pri nizkih temperaturah skozi daljše časovno obdobje; najdemo jih v surovi nafti. Biogeni PAO pa so posledica bioloških procesov (Žnidar 2011b, str. 4).

Pri kronični izpostavljenosti imajo PAO karcinogene, genotoksične, mutagene in teratogene učinke, akutna toksičnost pa je nizka do zmerna. Absorbirajo se prek dihal, prebavil in kože ter se porazdelijo po vsem telesu. Dražijo kožo in sluznico, povzročajo alergije, zelo visoki odmerki lahko povzročijo glavobol, slabost, poškodujejo lahko eritrocite, jetra in ledvice. PAO imajo velik vpliv na zdravje. Njihova škodljivost je odvisna od kombinacij z drugimi kemikalijami, trajanja izpostavljenosti, doze in načina, na katerega smo jim izpostavljeni. Dokazano je, da nekateri povzročajo raka pri ljudeh. Med najbolj izpostavljenimi so benzo(a)piren, benzo(b)fluoranten, dibenzo(a,h)antracen in indeno(1,2,3-c,d)piren. Škodljive učinke mešanic PAO tako ocenjujejo prek koncentracije benzo(a)pirena kot kazalnika izpostavljenosti PAO (NIJZ 2014).

2.1.2 Fizikalne in kemijske lastnosti policikličnih aromatskih ogljikovodikov

PAO so pri sobni temperaturi v trdnem agregatnem stanju. Imajo nizek parni tlak in visoko temperaturo tališča in vrelišča. Dobro se topijo v organskih topilih in maščobah, v vodi pa so slabo topni. Z naraščanjem molekulske mase PAO padata parni tlak in topnost v vodi. Izmed PAO so nižje molekularni predstavniki relativno dobro topni v vodi. Višje molekularni predstavniki so bolj lipofilni in imajo lastnost, da se hitro adsorbirajo na površino različnih trdnih delcev. Nekateri so zelo obstojni, nekateri pa občutljivi na svetlobo in so podvrženi fotodegradaciji. Fizikalne in kemijske lastnosti so podane v Preglednici 1 in so odvisne od števila benzenovih obročev in molekulske mase (Skupinska et al. 2004, str. 233).

Preglednica 1: Fizikalno-kemijske lastnosti policikličnih aromatskih ogljikovodikov (Vir: Health Canada 2014)

SPOJINA	M _r	T _v (°C)	T _t (°C)	Parni tlak (Pa pri 25°C)	Topnost v vodi (mg/L)
Naftalen	128	218	80,5	10,4	31
Acenaftilen	152	270	92	9,0 × 10 ⁻¹	16,1
Acenaften	154	277	96,2	3,0 × 10 ⁻¹	3,8
Fluoren	166	295	116	9,0 × 10 ⁻²	1,9
Fenantren	178	339	101	2,0 × 10 ⁻²	1,1
Antracen	178	340	216	1,0 × 10 ⁻³	0,045
Fluoranten	202	375	111	1,2 × 10 ⁻³	0,26
Piren	202	360	156	6,0 × 10 ⁻⁴	0,132
Krizen	228	448	255	5,7 × 10 ⁻⁷	0,0016
Benzo[a]antracen	228	435	160	2,8 × 10 ⁻⁵	0,011
Benzo[b]fluoranten	252	481	168	6,7 × 10 ⁻⁵	0,0015
Benzo[k]fluoranten	252	481	217	5,2 × 10 ⁻⁸	0,0008
Benzo[a]piren	252	495	175	7,0 × 10 ⁻⁷	0,0038
Benzo[ghi]perilen	276	545	267	3,7 × 10 ⁻¹⁰	0,0006
Indeno[1,2,3-cd]piren	276	536	278	1,4 × 10 ⁻⁸	0,00026
Dibenzo[ah]antracen	278	524	163,6	1,3 × 10 ⁻⁸	0,062

2.1.3 Policiklični aromatski ogljikovodiki v vodah

PAO vstopajo v vodno okolje s padavinami ali neposredno iz zraka s prašnimi delci, vstopajo tudi s spiranjem različnih delcev iz tal. Do onesnaženja vode s PAO lahko pride tudi prek komunalnih odpadnih vod, izcednih vod iz odlagališč, sežiga odpadkov, proizvodnje plastike, naftne rafinerije, razlitja nafte ipd.

Ker je topnost PAO v vodi slaba, se ti absorbirajo na organske in anorganske suspendirane snovi in se tako akumulirajo v tleh (Perrin 2012, str. 2–3).

Prek različnih transportnih poti v okolju lahko PAO vstopajo tudi v pitno vodo, kjer predstavljajo neposredno nevarnost za zdravje ljudi. Izvor PAO v pitni vodi so lahko tudi neustrezni plastični materiali za vodovodne napeljave in nepravilna izvedba vodooskrbnega omrežja (Novak 2004, str. 4).

V prilogi Pravilnika o pitni vodi so navedeni parametri in mejne vrednosti za izbrane policiklične aromatske ogljikovodike, in sicer za: benzo(b)fluoranten, benzo(k)fluoranten, benzo(ghi)perilen in indeno(1,2,3-cd)piren. Mejna vrednost navedenih PAO je 0,10 µg/L (Uradni list RS, št. 19/2004).

2.2 Določanje policikličnih aromatskih ogljikovodikov v vodah

Pri določanju PAO v vodah sta največkrat zaradi nizkih mej določevanja potrebna dva koraka. Najprej je treba izvesti ekstrakcijo oziroma izolacijo PAO iz vode. Ekstraktom vzorcev po potrebi odstranimo moteče spojine, jih čistimo. V drugi stopnji sledi instrumentalno določevanje PAO v ekstraktih vzorcev.

2.2.1 Ekstrakcija policikličnih aromatskih ogljikovodikov iz vode

Ekstrakcija je kemijski postopek, kjer s topilom izvlečemo oz. ekstrahiramo spojine iz trdne zmesi ali raztopine. Postopek ekstrakcije poteka v dveh stopnjah. Najprej raztopino ali zmes spravimo v stik s topilom, nato obe fazi (topilo in topljenec) ločimo med seboj. Topnost neke spojine je odvisna od tega, v kolikšni meri so njene molekule sposobne tvoriti vezi s topilom.

Glede na to, ali ekstrahiramo spojine na trdno fazo ali iz raztopine, ločimo dve vrsti ekstrakcije. Ekstrakcija na trdni fazi (angl. *Solid Phase Extraction* – SPE) temelji na različni afiniteti posameznih spojin do trdne faze, oziroma do tekoče faze; ekstrakcija tekoče – tekoče (angl. *Liquid Liquid Extraction* – LLE) pa temelji na različni topnosti komponent zmesi v dveh topilih (Hojnik 2011, str. 21).

V literaturi se vse pogosteje omenja mikroekstrakcija na trdno fazo (angl. *Solid Phase Micro Extraction* – SPME). Ekstrakcija v tem primeru poteka na stacionarni fazi, ki jo predstavljajo vlakna igle, ki absorbira spojine iz tekočih, trdnih in plinastih vzorcev, dokler ni doseženo ravnovesje. Termična desorpcija spojin se nato običajno izvede v injektorju plinskega kromatografa (Pawliszyn 2000, str. 271).

Zelo razširjena je postala tudi metoda mikroekstrakcije s tekočinsko fazo (angl. *Liquid Phase Micro Extraction* – LPME), ki se od ekstrakcije tekoče – tekoče loči v manjši količini organskega topila. Zato predstavlja za analitika zmanjšano izpostavljenost organskim topilom. LPME-tehnika je hitra, enostavna in poceni. Temelji na porazdelitvenem učinku analizirane spojine med mikrokapljicami organskega topila na konico igle in vodno raztopino vzorca. Kapljice topila so izpostavljene raztopini vzorca in tako izvlečejo ciljne spojine iz vzorca v kapljice. (Hojnik 2011, str. 8).

2.2.2 Ekstrakcija tekoče – tekoče (LLE)

Za ekstrakcijo spojin iz vodne faze se pogosto uporablja ekstrakcija tekoče – tekoče, kjer se snov porazdeli med dve tekoči fazi, ki se med seboj ne mešata. Najpogosteje nastopi ločba dveh faz zaradi različnih gostot (voda in organsko topilo). Učinkovitost ekstrakcije je odvisna od izbire topila, od razmerja med volumnom vzorca in topila, časa ekstrahiranja in časa vzpostavitve ravnotežja med obema fazama.

Namen ekstrakcije je čim boljše raztapljanje merjenih komponent v topilu. Za ekstrakcijo iz raztopin se najpogosteje uporablja lij ločnik. Osnovni raztopini se doda ekstrakcijsko topilo (lahkohlapno organsko topilo), ki se z osnovno raztopino ne meša. Pri stresanju se spojine porazdelijo med obe topili glede na topnost. Nato počakamo, da se obe fazi v liju ločniku ustrezno ločita (Červek 2014, str. 36).

Pri izbiri ekstrakcijskega topila moramo upoštevati lastnosti spojin, ki jih želimo ekstrahirati. Organsko topilo pri LLE mora ustrezati naslednjim lastnostim (Červek 2014, str. 36):

- se ne meša in ne reagira z vodo in s snovmi, ki jih želimo ekstrahirati,
- topljenec mora biti v njem čim bolj topen,
- izkazovati mora čim večjo selektivnost, da se poleg iskane snovi v njem raztaplja čim manj ostalih snovi,
- ima čim boljši porazdelitveni koeficient za snov, ki jo ekstrahiramo,
- ima nizko viskoznost, saj tako hitreje pride do ločitve faz,
- ima veliko stabilnost in relativno nizko vrelišče, da ga lahko po uporabi enostavno odstranimo z odparevanjem.

Na Sliki 2 je prikazana ekstrakcija policikličnih aromatskih ogljikovodikov iz vode z organskim topilom diklorometanom. Vodno fazo predstavlja zgornja plast, spodnja plast pa je organsko topilo.



Slika 2: Ekstrakcija PAO iz vodne faze z diklorometanom (Vir: Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, 2015)

2.2.3 Ekstrakcija na trdno fazo (SPE)

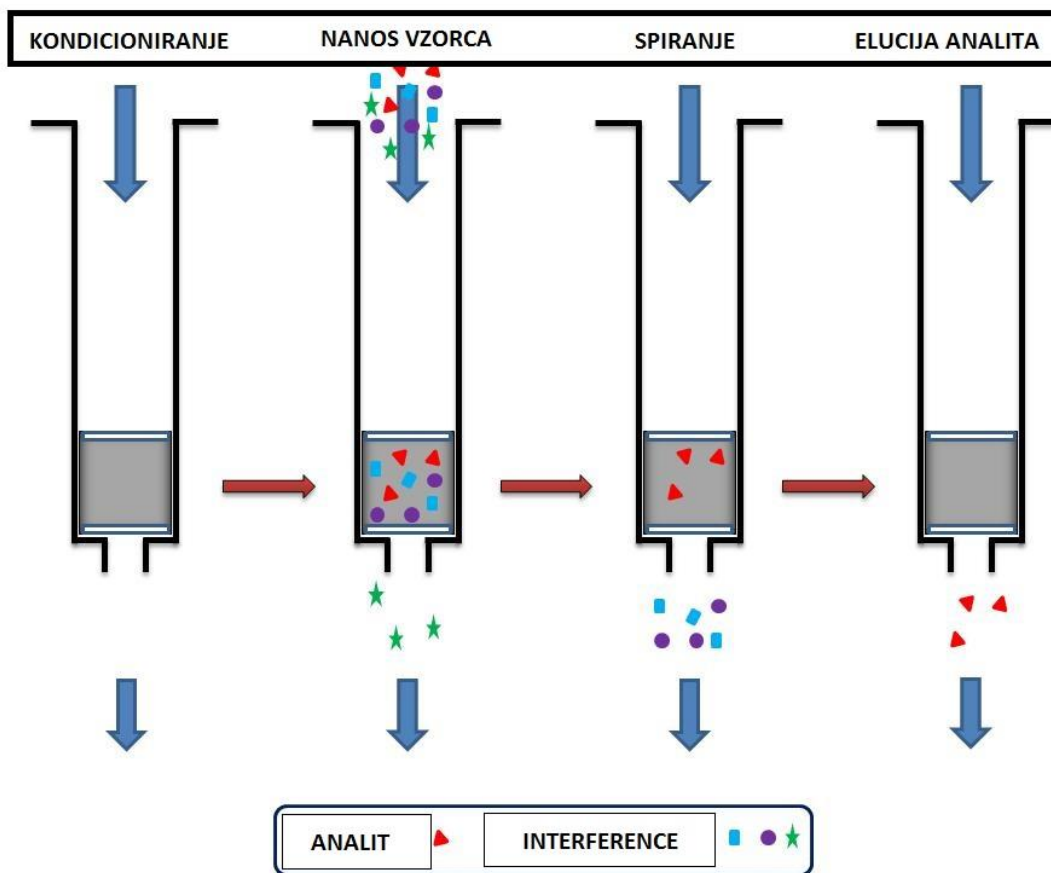
Za razliko od LLE je ekstrakcija na trdni fazi hitrejša, cenejša, uporabi se manj topila in potreben je manjši volumen vzorca. Učinkovitost ekstrakcije je odvisna od koncentracije analita in motečih spojin. Osnovni princip ekstrakcije na trdni fazi je porazdelitev komponent iz vzorca med trdno in tekočo fazo. Trdno fazo predstavlja kolona z ustreznim polnilom, mobilno fazo pa vzorec (Wells 2003, str. 79–81).

SPE izvajamo tako, da vzorec (mobilna faza), ki vsebuje merjeno komponento - analit, nanesimo na ekstrakcijsko kolono s primernim polnilom (stacionarna faza). Ko je dosežena ravnotežna porazdelitev merjene komponente med obema fazama, fazi ločimo s filtracijo ali z odlitjem tekoče faze. Kadar je polnilo učinkovito, bo merjena komponenta uspešno ekstrahirana iz tekoče na trdno fazo. Polarne komponente matrice spiramo iz kolone z vodo ali s primernim pufrom. Polnilo posušimo s prepihanjem zraka (plina), nato pa merjeno komponento speremo (eluiramo) iz kolone z organskim topilom (Al Mahdawi 2011a, str. 24).

Kadar imamo opravka z zelo nečistim vzorcem, ki vsebuje večje delce, moramo pred nanosom vzorca na kolono SPE le-tega ustrezno obdelati (npr. filtriranje). Priporočena je uporaba filtrov iz materialov, ki nimajo veznih mest za organske snovi in zato ne omogočajo adsorpcije preiskovanih komponent (Levart 2009, str. 13–14).

Postopek SPE (Slika 3) je običajno sestavljen iz petih faz (Brglez 2010, str. 12):

- kondicioniranje kolone: s tem aktiviramo funkcionalne skupine polnila kolone in tako v nadaljnjih fazah omogočimo vezavo analita;
- spiranje kolone: s tem odstranimo topilo, s katerim smo aktivirali kolono v prvi fazi. Za spiranje po navadi uporabimo vodo, kar je odvisno od tega, kakšen vzorec je, saj za spiranje uporabimo tekočino, ki ima podobne lastnosti kot vzorec;
- nanašanje vzorca: s pipeto ali prek cevki s pomočjo vakuumske črpalke, kar je odvisno od volumna vzorca. Pri uporabi vakuumske črpalke je treba zagotoviti enakomeren in dovolj majhen pretok, da se analit lahko veže na površino polnila kolone. Največji pretok za kolone je 5 mL/min.;
- spiranje nevezanih oziroma motečih spojin: uporabimo topilo, v katerem analit ni topen ali pa je le slabo topen; s tem odstranimo nekatere nečistoče. Zatem je treba kolono posušiti, kar po navadi storimo s prepihanjem z dušikom;
- elucija: v zadnji fazi analit speremo s kolone, kar storimo s topilom, v katerem je analit dobro topen. Povezava med analitom in površino polnila kolone se prekine in analit se izpere s kolone.



Slika 3: Shematski prikaz delovanja SPE (Vir: Intechopen, 2015)

Silika gel, aktivno oglje, magnezijev silikat in polimeri so najpogosteje uporabljena polnila oz. stacionarne faze, ki se uporabljajo pri SPE. Polnilo v ekstrakcijskih kolonah mora ustrezati vzorčnim matricam, iz katerih bo potekala separacija in z njimi ne sme reagirati ali se raztapljati. Polnilo je v plastični ali stekleni koloni v količini od 100 do 500 mg, velikost delcev polnila pa je običajno okrog 40 μm . Ekstrakcijske kolone lahko izberemo na dva načina (Brodnjak-Vončina 2006, str. 115):

- da ima polnilo visoko afiniteto do komponente, ki jo želimo analizirati, in jo zadrži na koloni; neželene komponente vzorca pa prepušča,
- da ima polnilo slabo afiniteto do merjene komponente in jo prepušča; na koloni pa zadrži interferenčne komponente.

S povečanjem molekulske mase se zmanjšuje topnost PAO v vodi, zato se za boljšo topnost dajejo vzorcu organska topila, kot so: metanol, acetonitril, 2-propanol in sulfaktant. Kritičen parameter je lahko koncentracija organskega topila, saj če je prenizka, se visoko molekularni PAO ne raztapljajo dovolj dobro in se adsorbirajo na steno embalaže. Pri prevelikem dodatku organskega topila pa lahko zmanjšamo ali pa celo onemogočimo adsorbcijo na stacionarno fazo. Tako so proučevali, kakšen vpliv ima dodatek 0 %, 10 % in 15 % 2-propanola v 200 ml vzorca na izkoristek PAO. Uporabili so ekstrakcijo skozi membranske diske, napolnjene s polnilom C_{18} in stiren-divinilbenzensko smolo. Rezultati so bili najboljši pri dodatku 10 % 2-propanola. Brez dodanega 2-propanola so bili izkoristki za visoko molekularne PAO nižji, pri 15 % dodanega 2-propanola pa so bili izkoristki za nizko molekularne PAO prav tako nižji (Marcé in Borrull 2000, str. 277).

2.2.3.1 Izbira primerne polnila SPE

Izbira mehanizma polnila (sorbenta) je odvisna od polarnosti merjene komponente in od sestave vzorčne matrice. Vsako polnilo znotraj danega ekstrakcijskega mehanizma predstavlja edinstvene lastnosti retencije in selektivnosti, ki so specifične za dano komponento. Pri SPE se največkrat uporabljajo reverzni, normalni in ionsko izmenjevalni ekstrakcijski mehanizmi (Al Mahdawi 2011b, str. 26):

- reverzna faza – ekstrakcija hidrofobnih in polarnih spojin iz vodnih vzorcev, sorbenti: strata-X, C₁₈, C₈, fenil, CN,
- normalna faza – ekstrakcija polarnih spojin iz nepolarnih topil, sorbenti: silika, CN, florisil, NH₂,
- ionsko izmenjevalna faza – ekstrakcija nabitih spojin iz vodnih in nepolarnih organskih vzorcev, sorbenti: strata-X-C, strata-X-CW, strata-X-AW, WAX, SAX, WCX, SCX).

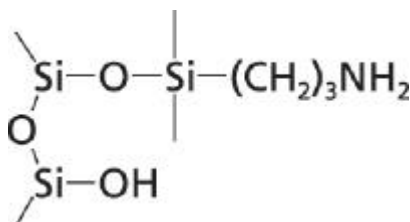
Polnila, ki se pogosto uporabljajo pri SPE:

- ISOLUTE® PAH – uporabljajo se za ekstrakcijo PAO iz vodnih vzorcev, ki vsebujejo polarne interference, kot so huminske kisline. Slika 4 prikazuje kolono SPE za ekstrakcijo PAO.



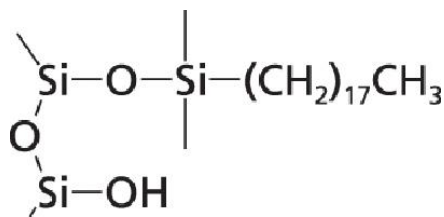
Slika 4: SPE-kolona za ekstrakcijo policikličnih aromatskih ogljikovodikov (Vir: Biotage, 2015)

- ISOLUTE® NH₂ – je po kemijski sestavi aminopropil, vezan na silicijev oksid (Slika 5), in je šibki ionski izmenjevalec, ki se uporablja za pridobivanje kislin iz vodnih vzorcev.



Slika 5: Aminopropil, vezan na silicijev oksid (Vir: Biotage, 2015)

- ISOLUTE® C18 – je nepolarno topilo, ki se uporablja za ekstrakcijo analitov iz vodnih vzorcev na principu zadrževanja nepolarnih delcev. Je najpogosteje uporabljeno polnilo za pridobivanje kislin, nevtralnih in bazičnih spojin iz vodnih vzorcev. Slika 6 predstavlja kemijsko sestavo oktadecila, vezanega na silicijev oksid (Biotage, 2015).



Slika 6: Oktadecil, vezan na silicijev oksid (Vir: Biotage, 2015)

2.2.4 Primerjava SPE in LLE

Ekstrakcija na trdni fazi postaja vse bolj razširjena za določanje PAO v vodah in počasi nadomešča ekstrakcijo tekoče – tekoče. V primerjavi z LLE je ta metoda hitrejša, učinkovitejša in povzroča manj odpadkov.

Prednosti SPE:

- dokaj hitra metoda,
- ekstrakcijska kolona je zelo selektivna,
- zaradi manjše količine uporabe organskih topil nastaja zelo majhna količina nevarnih odpadkov,
- relativno poceni metoda,
- v nekaterih primerih jo lahko uporabimo v povezavi z LLE,
- vzporedno lahko izvedemo večje število ekstrakcij.

Slabosti SPE:

- ekstrakcijskih kolon običajno ne moremo ponovno uporabiti,
- pretok skozi kolone je počasen (1–3 mL/min.).

Prednosti LLE:

- uporablja se lahko za široko koncentracijsko območje analita,
- uporabna za ekstrakcijo širokega nabora analitov.

Slabosti LLE (Marlap 2004, str. 33–36):

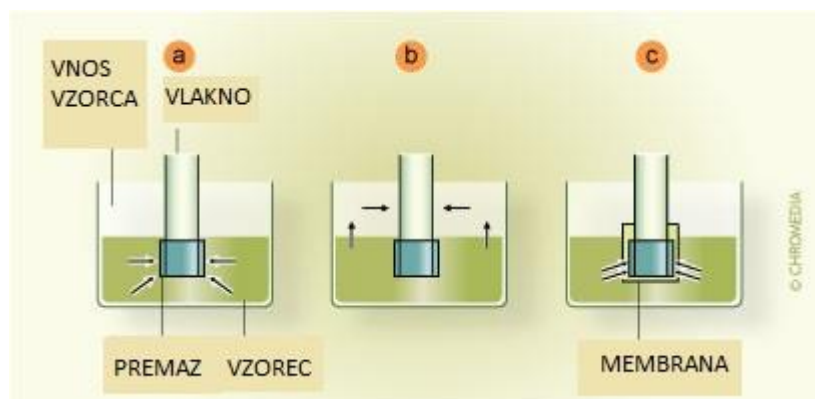
- težavna in zamudna metoda, kadar imamo veliko število vzorcev,
- pogosto se uporabljajo toksična in vnetljiva organska topila,
- uporabljajo se draga organska topila in nastajajo velike količine nevarnih odpadkov,
- na analizo lahko vplivajo že majhne količine nečistoč v topilu.

2.2.5 Mikroekstrakcija na trdno fazo

Mikroekstrakcija s trdno fazo (angl. *Solidphase microextraction* – SPME) je nova tehnika priprave vzorca, ki jo je odkril Pawlisizyn leta 1990 in se vse pogosteje uporablja za določanje okoljskih onesnaževalcev, vključno s pesticidi, PAO, substituiranimi benzenovimi spojinami in trihalometani v vodah. Pri metodi SPME (Slika 8) uporabljamo vlakna, ki so na zunaj prekrita s primerno stacionarno fazo. Od leta 1995 so razvili veliko število aplikativnih metod SPME za ekstrakcijo različnih bioloških vzorcev, kot so urin, serum, plazma, kri, slina in lasje.

Slika 7 prikazuje, na kakšen način lahko uporabimo SPME (Chromedia, 2015):

- a) neposredna ekstrakcija – vlakno se potopi neposredno v vodni vzorec;
- b) ekstrakcija iz parne faze – vlakno je postavljeno nad vodnim vzorcem, tako zajamemo samo hlapne delce analita;
- c) ekstrakcija, zaščitena z membrano – uporabljamo jo, kadar vzorec vsebuje veliko motočih spojin, kot so huminska kislina in proteini.

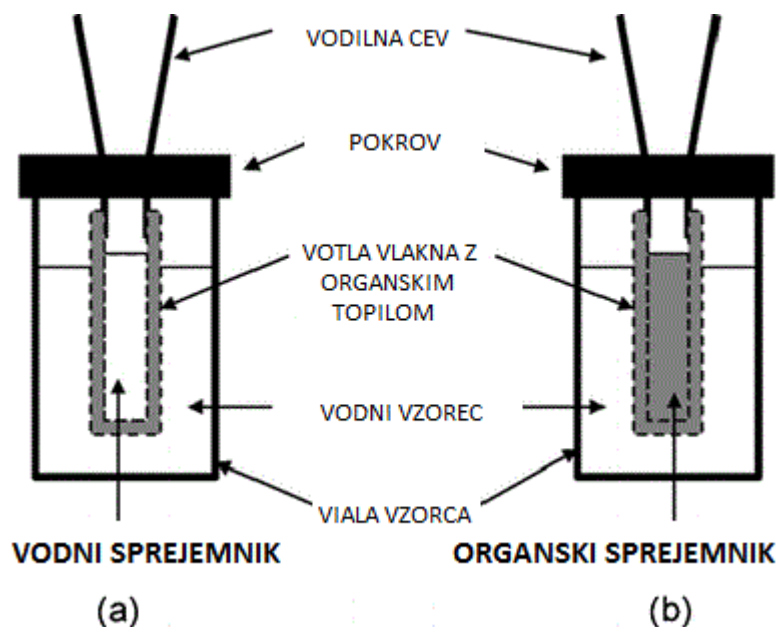


Slika 7: Načini uporabe SPME (Vir: Chromedia 2015)

Glavne prednosti tehnike SPME so (Trkovnik 2004, str. 6):

- enostavnost,
- hitrost,
- eliminacija topila,
- visoka občutljivost,
- majhen volumen vzorca,
- relativno nizka cena, saj samo z eno nitko SPME opravimo med 50 in 100 ekstrakcij,
- enostavna avtomatizacija.

SPME je metoda, ki hkrati vključuje tako ekstrakcijo analita iz vzorca kot tudi njegovo prekoncentriranje. Po poteku adsorpcije vzorec prenesemo v injektor na GC-MS, kjer poteče termična desorpcija (tehnika za pridobivanje in izolacijo hlapnih komponent iz različnih vzorcev) spojin iz nitke SPME v injektor (Levart 2009, str. 15–16).



Slika 8: Ekstrakcija na vodnem in organskem sprejemniku (Vir: Han, 2012)

2.2.6 Ekstrakcija s tekočinsko fazo

Ekstrakcija na »mikro« tekočinsko fazo LPME (angl. *Liquid Phase Micro Extraction*) je tehnika, ki temelji na porazdelitvenem učinku analizirane spojine med mikrokapljicami

organskega topila na konici igle in vodno raztopino vzorca. Kapljice topila so prve izpostavljene raztopini vzorca in s tem ekstrahirajo ciljne spojine iz vzorca v kapljice. Ko je doseženo ravnovesje, se kapljice s skoncentriranimi komponentami prenesejo v injekcijski prostor plinskega kromatografa (Hojnik 2011, str. 8).

LPME je nova tehnika za pripravo vzorcev, ki je hitra, poceni in minimalno izpostavljena toksičnim organskim topilom. Je kompatibilna s kapilarno plinsko kromatografijo (GC), kapilarno elektroforezo (CE) in tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC). Uporabna je za pripravo bioloških vzorcev za analizo različnih zdravil, kot so antidepresivi in osnovna zdravila. LPME vsebuje prozorna, polipropenska, votla vlakna (Trkovnik 2004, str. 4–5).

Mikroekstrakcija nadprostora HSME (angl. *Head Space Micro Extraction*) je zelo podobna tehniki LPME, vendar so tu kapljice ekstrakcijskega topila izpostavljene nadprostoru vzorca, ki po doseženem ravnovesju preidejo v injekcijski prostor in se injicirajo v plinski kromatograf. Kapljice imajo enako funkcijo, kot jo imajo vlakna pri SPME. Želene komponente v nadprostoru ekstrahirajo in skoncentrirajo v majhnem volumnu topila za nadaljnjo analizo.

Tehnika, ki se uporablja za ekstrakcijo le ene kapljice topila, se imenuje enokapljična mikroekstrakcija (angl. *Single Drop Micro Extraction – SDME*). Dokazano je, da je tehnika SDME zanesljiva alternativa tehnikam, kot so LLE, SPE in SPME, saj je natančna in preprosta za uporabo. Postopek poteka skoraj brez topila, zato je okolju prijazna tehnika.

Disperzivna mikro ekstrakcija tekoče – tekoče DLLME (angl. *Dispersive Liquid – Liquid Micro Extraction*) je ena od bolj učinkovitih mikroekstrakcijskih metod, vendar ima še nekaj pomanjkljivosti, kot sta uporaba strupenih organskih topil in tretje komponente (disperzijsko topilo), ki zmanjša porazdelitveni koeficient spojin v ekstrakcijskem topilu (Hojnik 2011, str. 8).

2.3 KROMATOGRAFIJA

Kromatografija je separacijski postopek, kjer ločimo posamezne komponente vzorca in jih nato zaznavamo z ustrezno detekcijo. Doseči skušamo čim boljšo ločljivost v čim krajšem času z optimizacijo vseh parametrov in komponent kromatografskega sistema.

Ločitev poteka tako, da mobilna faza stalno potuje vzdolž kolone in prenese komponente vzorca, ki jih nanese na kolono. Molekule vzdolž kolone stalno prehajajo med mobilno in stacionarno fazo, pri čemer se premikajo le v mobilni fazi, v stacionarni pa mirujejo. Porazdelitev se ponavlja vzdolž kolone, komponente pa se ločeno eluirajo iz kolone. Tam jih zaznajo specifični detektorji. Signali so podani kot kromatografski vrhovi, celotna krivulja pa kot kromatogram.

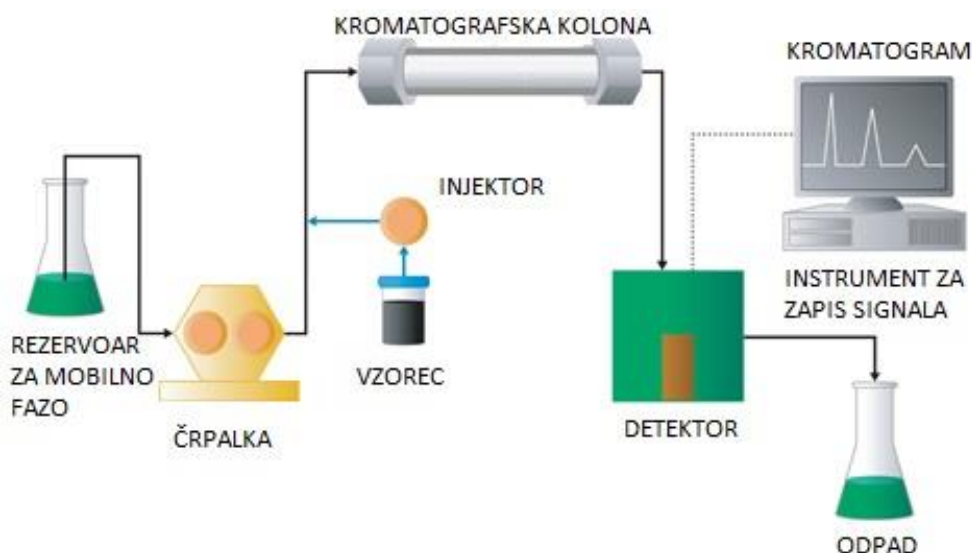
Pri kromatografiji je pomemben retencijski čas, ki je potreben, da določena snov pri izbranih pogojih eluira skozi kolono. Je čas, ko se komponenta zadržuje v koloni, in je konstanten za vsako organsko substanco pri določenih kromatografskih pogojih. Dve komponenti sta ločeni, če se njun retencijski čas razlikuje. Retencijski čas (t_r) je sestavljen iz dveh delov, in sicer iz časa, ki ga molekula prebije v mobilni fazi (t_m), in časa, ko se nahaja v stacionarni fazi (t'_r) (Brodnjak-Vončina 2006, str. 77).

2.3.1 Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) oziroma visokotlačna kromatografija je kolonska kromatografija, kjer za stacionarno fazo uporabimo zelo majhne delce (od 0,5 μm do 10 μm). Pri kromatografiji lahko v koloni potekajo različni separacijski postopki: porazdelitev med trdno in tekočo fazo, adsorpcija, ionska izmenjava in ločitev na osnovi velikosti molekul. Na razpolago imamo adsorpcijske stacionarne faze, kot je silika gel, reverzne faze z vezanimi različnimi funkcionalnimi skupinami in delci različnih velikosti, ionske izmenjevalce in kiralne stacionarne faze.

HPLC-sistem (Slika 9) je sestavljen iz naslednjih komponent (Rajh 2010, str. 7–12):

- rezervoarja za mobilno fazo,
- injektorja,
- črpalke,
- kromatografske kolone,
- termostata,
- detektorja,
- instrumenta za zapis signala.



Slika 9: Shematski prikaz najenostavnejšega sistema za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (Vir: Waters, 2015)

Rezervoar za mobilno fazo

Za separacijo pri HPLC je bistvenega pomena sestava mobilne faze, ki ne sme kemijsko reagirati s stacionarno fazo in mora ustrezati vrsti detektorja, ki ga uporabljamo. Biti mora zelo čist. Pri UV-detektorju uporabimo topila, ki v tem valovnem območju ne absorbirajo.

Mobilne faze, ki jih uporabljamo, so najpogosteje mešanica različnih organskih topil. Hranimo in črpamo jih iz steklene posode (rezervoar), ki mora biti dovolj tesno zaprta, da iz nje ne uhajajo hlapi topil, kar bi lahko povzročilo spremembo sestave mobilne faze med delom.

S spremembo polarosti mobilne faze bistveno skrajšamo čas kromatografije. Poleg tega pa lahko dosežemo boljšo ločljivost komponent v mešanici, izboljšamo obliko vrhov in občutljivost.

Topila, ki jih uporabljamo kot mobilno fazo v HPLC, so (prav tam, str. 12–13):

- normalno fazna: heksan, metilenklorid, kloroform, metanol, acetonitril,
- rezervno fazna: metanol/voda, acetonitril/voda, reagenti z ionskimi pari,
- ionska izmenjava: vodne raztopine pufrov,
- gelska izključitvena kromatografija: tetrahidrofuran, kloroform.

Črpalke

Visokotlačna črpalka omogoča potiskanje mobilne faze s tlakom 40–50 MPa. Delovni tlak je odvisen od kolone, skozi katero potiskamo topilo, od pretoka in od mobilne faze. Od stabilnosti pretoka je zelo odvisna natančnost analize, zato mora črpalka zagotavljati enakomerni pretok mobilne faze skozi kolono. Sodobne črpalke imajo to možnost, da lahko zagotovijo konstanten pretok ne glede na nihanje tlaka v koloni. Pomembno pa je tudi redno vzdrževanje črpalke z rednim izplinjanjem mobilnih faz in s filtriranjem skozi ustrezne filtre (prav tam, str. 13).

Injektor

Pri vnosu vzorca na kolono HPLC je potrebna tehnika, ki omogoča vnos v kromatografski sistem pri visokih tlakih. Uporabljajo se posebno konstruirani injekcijski ventili, na katere se lahko pritrdijo različno velike injekcijske zanke. Injiciranje vzorca v sistem mora predstavljati čim manjši delež, da ne pride do motnje pogojev. Med posameznimi, zaporedno injiciranimi vzorci mora biti kontaminacija čim manjša. Injektor mora omogočati dobro ponovljivost in injiciranje različnih volumnov ter s tem tudi različnih koncentracij vzorca. Pomembno je, da nam omogoči avtomatizacijo injiciranja.

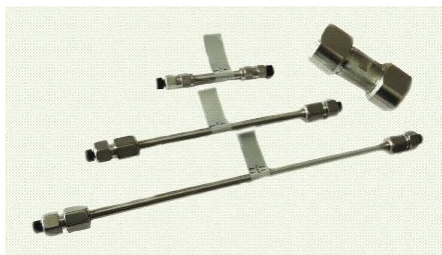
Danes so v uporabi injektorji z injiciranimi zankami, s katerimi lahko injiciramo na dva načina (prav tam, str. 14):

- v definirano zanko doziramo samo del njenega volumna; poljubno lahko spreminjamo dozirni volumen in s tem koncentracijo vzorca, vendar v mejah dozirne zanke;
- definirano zanko napolnimo v celoti z vzorcem; pred doziranjem je zanka popolnoma napolnjena z vzorcem, volumen in koncentracijo vzorca spreminjamo samo z zanko.

Kolona

Kolona (Slika 10) je bistveni del HPLC-sistema, saj se ob pravilno izbranih pogojih vrši popolna ali delna ločitev zmesi na posamezne komponente. Kakšen bo princip ločitve, je odvisno od polnila v koloni.

Kolona je izdelana iz primerne inertnega materiala, zapolnjena in zatesnjena s posebnimi elementi in napolnjena s stacionarno fazo (premer delcev je od 3 do 10 μm). Danes se za kolone uporablja skoraj izključno nerjaveče jeklo, steklene izvedbe so zelo redke. Notranja ploščina kolone mora biti še posebno dobro obdelana in inertna. Dolžine kolon so standardizirane in so običajno dolge 60–300 mm, notranji premer pa je 2–8 mm. Krajše dolžine kolon pomenijo slabšo ločitev, daljše dolžine pa pomenijo večji tlak v HPLC-sistemu.



Slika 10: Kromatografska kolona za HPLC-sistem (Vir: Agilent, 2015)

Pri delu z analitskimi HPLC kolonami se običajno pojavljata dve vrsti težav. Prva je ta, da se stacionarna faza počasi raztaplja v mobilni fazi, še posebej pri visokih pH vrednostih, kar privede do padca ločljivosti in posedanja kolone. Druga težava pa je lahko nenehna kontaminacija analitske metode, ki jo povzroča mobilna faza, ne glede na to, da so uporabljena najbolj čista topila. Posledica kontaminacije je prav tako padec učinkovitosti kolone. Da zmanjšamo oba pojava, uporabljamo predkolone, ki so po navadi krajše in polnjene z delci večjih dimenzij, kar pripomore k temu, da tlak v sistemu ne naraste preveč (prav tam, str. 14–15).

Termostat

Termostat uporabljamo za termostatiranje kolone. Z ohranjanjem konstantne temperature sistema omogočamo ponovljivost retencijskih časov. Povišana temperatura zmanjša viskoznost mobilne faze, skrajšajo se retencijski časi in lahko se izboljša ločitev. Zaradi možnega razpada stacionarne faze ali vzorca temperature po navadi ne presegajo 70 °C. Kadar izbiramo topilo, moramo biti pozorni na temperaturo vrelišča organskega topila. Povišana temperatura lahko povzroči uparjevanje lahko hlapnih organskih topil na koloni. Nastali parni mehurčki pa nato povzročajo težave pri kromatografiji in detekciji (prav tam, str. 15).

Detektor

Detektor je tisti del sistema HPLC, ki naredi substance, ločene na koloni, vidne. Vsi detektorji temeljijo na merjenju spremembe neke fizikalne količine, ki jo povzroči prehod substance skozi merilno pretočno celico detektorja.

Med najbolj pomembne metode detekcije sodijo:

- neposredna detekcija UV-VIS (angl. *Ultraviolet and Visible Absorption Spectroscopic detection*),
 - fluorescentna detekcija,
 - detekcija z masno spektrometrijo,
 - indirektna detekcija UV-VIS,
 - amperometrična detekcija,
 - konduktometrična detekcija.
-
- Fluorescenčni detektor (FLD) (Slika 11): za normalno delovanje je potrebna derivatizacija analitov, tako da nanje vežemo primerne fluorescentne skupine. Kot vir sevanja se uporablja vir svetlobe, in ko se analiti premikajo mimo detekcijskega okna, fluorescentne skupine oddajajo sevanje v različnih valovnih dolžinah. Občutljivost tega postopka se poveča, če je uporabljen zelo intenziven laserski vir. (Repnik 2012, str. 18)
S FLD detektorjem dosežemo nižje meje zaznavnosti, saj so naravno fluorescentne spojine manj številne. Detekcija poteka tako, da z žarkom svetlobe določene valovne dolžine molekulo najprej privedemo v višje energetske stanje (ekscitacija) in nato merimo svetlobo druge, višje valovne dolžine, ki jo molekula oddaja med vračanjem v osnovno energetske stanje. Fluorescenco merimo na temnem ozadju in s tem zmanjšamo šum, zato lahko s FLD detektorjem dosežemo precej nizke meje zaznavnosti in občutljivosti. (Preganc 2013, str.13)



Slika 11: FLD-detektor za HPLC-sistem (Vir: Directindustry, 2015)

- Detektor z nizom diod (DAD): temelji na absorpciji preiskovane spojine v UV (190-400 nm) in VIS (400-790 nm) območju, za kar mora analit v svoji strukturi vsebovati kromofor oziroma vsaj eno dvojno vez. Zaradi svoje enostavnosti, selektivnosti in zanesljivosti je med najbolj uporabljenimi detektorji predvsem v kontrolni analizi gotovih farmacevtskih oblik. (Peganc 2013, str.13)

Meja zaznave je lastnost detektorja samega in je različna za vsak posamezni detektor, oziroma analitski sistem. Meja zaznave je minimalna količina substance, injicirane na kolono, ki še povzroči tak signal, ki ga lahko nedvoumno ločimo od šuma.

Linearno območje detektorja je območje med spodnjo mejo zaznave določenega analita in določeno zgornjo mejo zaznave, pri čemer je izhodni signal linearen znotraj določenih odstopanj. S pomočjo detektorja lahko določimo koncentracijo kromatografsko ustrezno ločenih spojin.

Na delovanje detektorja lahko vplivajo: sprememba kemijskega ravnotežja, raztopljeni plini v mobilni fazi in pulziranje pretoka, spremembe lomnega količnika in temperatura (Rajh 2010, str. 15–16).

Instrument za zapis signala

S pomočjo rekorderja, integratorja ali računalnika lahko sledimo električnim signalom, ki jih posreduje detektor.

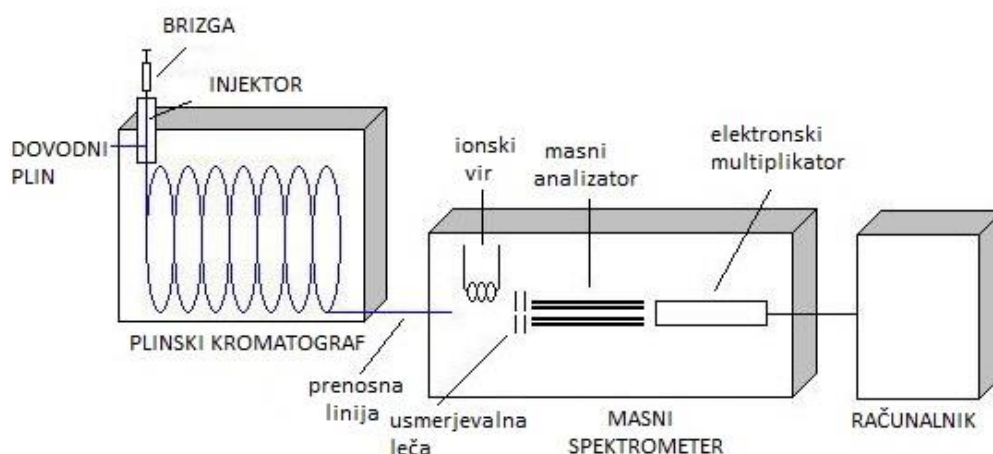
Danes se povečini uporabljajo računalniki, ki nam nudijo neomejeno hranjenje vseh podatkov o pogojih analize, kromatogramov, naknadnih obdelav in popolne kontrole HPLC-sistema (Rajh 2010, str. 16).

2.3.2 Plinska kromatografija z masno selektivnim detektorjem – GC/MS

Analitska naprava za analizo GC/MS (Slika 12) je sestavljena iz plinskega kromatografa (GC) in masnega spektrometra (MS) kot detektorja. S tehniko GC/MS je mogoče ločiti, identificirati in kvantificirati mešanice v komponenti (Žnidar 2011c, str. 14).

Vzorec kromatografsko ločimo v plinskem kromatografu, ločene spojine pa prek vmesnika vodimo v masni spektrometer.

Masno selektivni detektor je sestavljen iz ionskega izvora za elektronsko (EI) in kemično ionizacijo (CI), masnega analizatorja in sistema za detekcijo ionov (Hohnjec 2011, str. 16).



Slika 12: Shematski prikaz masno selektivnega detektorja (Vir: Chemwiki 2015)

Ionizacija vzorcev poteka v ionskem izvoru ob prisotnosti nizko- oz. visokoenergetskih elektronov (elektronska ionizacija – EI) ali s pomočjo ionov reakcijskega plina (kemična ionizacija – CI). Nastale ione pospešimo in jih prenesemo skozi sistem leč kot fokusirani curek v masni analizator. Masni analizator je kvadropol, kjer merimo razmerje med maso in nabojem posameznega iona (m/z). Ioni, ki zapustijo masni analizator, pridejo v sistem za detekcijo, ki ga imenujemo elektronska pomnoževalka. Tukaj nastaja signal, ki je sorazmeren številu ionov. Nastali signal elektronsko ojačimo in obdelamo s pomočjo računalniške opreme.

Ločimo dva načina tvorbe ionov v ionskem izvoru: elektronsko ionizacijo in kemično ionizacijo. Pri elektronski ionizaciji žareča katoda seva elektrone v ionski vir s kinetično energijo 70 eV. Posledica trkov teh elektronov z molekulami vzorca je razpad molekule in s tem nastanek ionov masnih fragmentov, ki so karakteristični za dano spojino. Elektronska ionizacija daje veliko informacij o strukturi molekul in se pogosto uporablja za identifikacijo kemijskih spojin (Hohnjec 2011, str. 17).

Instrumenti za analizo GC/MS omogočajo snemanje nastalih ionov na različne načine, in sicer snemanje celotnega masnega spektra (SCAN) in snemanje izbranih masnih fragmentov (angl. *selected ion monitoring* – SIM). S tehniko SCAN lahko posnamemo celoten masni spekter preiskovane spojine v zelenem masnem območju. Z uporabo tehnike izbranih masnih fragmentov (SIM) moramo poznati karakteristične fragmentne ione, ki jih tvori preiskovana spojina v ionskem izvoru. Te ione selektivno izberemo, saj morajo biti karakteristični za iskano spojino, ki jo analiziramo, in ne smejo predstavljati ionov ozadja vzorca. Ker sledimo le nekaj specifičnim ionom, zelo izboljšamo selektivnost merjenja, saj je vpliv ionov ozadja vzorca močno zmanjšan. Na ta način dosežemo večjo selektivnost in s tem povezano nižjo mejo zaznavnosti (Žnidar 2011d, str. 17).

3. EKSPERIMENTALNI DEL

PAO smo določevali z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti (angl. *high performance liquid chromatography* – HPLC) z detektorjema FLD (angl. *Flourescence Detector*) in DAD (angl. *Diode Array Detector*) (AT 1100 Agilent) (slika 13).

Uporabili smo tudi plinski kromatograf HP 6890 sklopljen z kvadrupolnim masno selektivnim detektorjem HP 5973 s posodobljenim inertnim ionskim izvorom.

Eksperimentalni del je bil opravljen v Nacionalnem laboratoriju za zdravje, okolje in hrano Maribor, Centru za kemijske analize živil, vod in drugih vzorcev okolja. Uporabili smo vzorce vode (milli-Q), ki smo jih ekstrahirali na dva načina, z ekstrakcijo tekoče – tekoče in ekstrakcijo na trdni fazi.



Slika 13: Aparat HPLC (Vir: Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, 2015)

3.1 Kemikalije in reagenti

Uporabili smo kemikalije, ki so primerne za analizo ostankov in ne smejo vsebovati merjenih spojin oziroma onesnaževal, ki bi lahko vplivali na analizo:

- voda: milli-Q,
- diklorometan (CH_2Cl_2); ENVISOLV™, $\geq 99,8\%$ (GC); Sigma-Aldrich,
- acetonitril (CH_3CN), HPLC gradient grade; J. T. Baker,
- heksan (C_6H_{14}), ultra resi; J. T. Baker,
- žarjen brezvodni natrijev sulfat (Na_2SO_4), p.a.; Merck.
- žarjen aluminijev oksid (Al_2O_3), nevtralni 90; Merck.
- žarjen silika gel (SiO_2) za kolonsko kromatografijo 60; Fluka,
- silika gel (SiO_2) deaktiviran s 5 % vode,
- aluminijev oksid (Al_2O_3), deaktiviran z 2 % vode,
- N,N – dimetilformamid ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$); A.C.S. reagent (čistost 99,8 %); Sigma-Aldrich,
- delovne standardne raztopine PAO,
- mešanica acetonitrila in vode (1:1, v/v),
- mešanica diklorometana in heksana (1:1, v/v).

3.1.1 Priprava brezvodnega Na_2SO_4

Brezvodni Na_2SO_4 , ki smo ga uporabili za sušenje organskih ekstraktov, žarimo 4 ure pri $500\text{ }^\circ\text{C}$ v žarilni peči. Po žarjenju ga hranimo ohlajenega v zaprtih steklenicah.

3.1.2 Priprava silika gela (SiO_2), deaktiviranega s 5 % vode

Silika gel žarimo 4 ure v žarilni peči pri $500\text{ }^\circ\text{C}$. Ohlajenemu med intenzivnim mešanjem dodamo 5 mL $\text{H}_2\text{O}/100\text{ g}$ silika gela. Pred uporabo pustimo stati en dan.

3.1.3 Priprava aluminijevega oksida (Al_2O_3), deaktiviranega z 2 % vode

Aluminijev oksid žarimo v žarilni peči 4 ure pri $500\text{ }^\circ\text{C}$. Ohlajenemu med intenzivnim mešanjem dodamo 2 mL $\text{H}_2\text{O}/100\text{ g}$ aluminijevega oksida. Pred uporabo pustimo stati en dan.

3.2 Steklovina in laboratorijski pribor

Laboratorijski pribor ne sme vsebovati preiskovanih spojin ali drugih motečih snovi, ki bi lahko vplivale na analizo. Pri delu smo uporabljali običajno laboratorijsko steklovino, zraven tega pa še:

- steklene kolone za kolonsko čiščenje ekstraktov,
- Lichrolut[®] EN polnilo (40–120 μm) za ekstrakcijo PAO; Merck,
- IST SPE kolone za ekstrakcijo PAO; ISOLUTE PAH 750 mg, 3 mL,
- IST SPE kolone za ekstrakcijo PAO; ISOLUTE PAH 1,5 g, 6 mL,
- analitsko kolono Agilent Zorbax Eclipse PAH, 3 x 250 mm, 5 μm ,
- transferni pipetor; 10–100 μL , 100–1000 μL , 500–5000 μL .

3.3 Aparature

Aparature, ki pridejo v stik z vzorcem, ne smejo vsebovati preiskovanih spojin, ki bi lahko vplivale na analizo:

- analitska tehnica; Metler Toledo,
- rotacijski uparjalnik s hladilno napravo; Buchi Rotavapor,
- koncentrador za koncentriranje pod dušikom; Zymark,
- centrifugalna tehnica CENTRIC 400 R,
- stresalnik za epruvete, Vortex,
- tekočinski kromatograf visoke ločljivosti s FLD- in DAD-detektorjem, AT 1100,
- plinski kromatograf HP 6890 sklopljen z kvadrupolnim masno selektivnim detektorjem HP 5973,
- vakuumski razdelilnik SPE.

3.4 Ekstrakcija tekoče – tekoče, priprava vzorcev

V 2-litrski lij ločnik smo nalili 1 l vzorca vode (milli-Q) ter dodali ekstrakcijsko topilo metilenklorid. Na rotacijskem stresalniku (Slika 14) za lije ločnike smo vzorce stresali 10 minut. Ko sta se obe fazi ločili, smo organsko fazo (ekstrakt) počasi odlili v 250 mL destilacijsko bučko. Da smo odstranili odvečno vodo, smo ekstraktu dodali žarjen brezvodni natrijev sulfat (Na_2SO_4). Sušenje ob občasnem mešanju smo izvajali 30 minut, nato smo ekstrakt oddekantirali v 250 mL destilacijsko bučko. Natrijev sulfat smo dodatno sprali z metilenkloridom in združili ekstrakte. Na rotacijskem uparjalniku pri temperaturi $30\text{ }^\circ\text{C}$ smo nato skoncentrirali ekstrakte na 2–3 mL. Koncentrirani ekstrakt smo kvantitativno prenesli v epruveto. Na koncentradorju za koncentriranje pod tokom dušika smo odstranili topilo na

približno 1 mL. K ekstraktu smo nato dodali 250 μL N,N – dimetilformamida ter dobro premešali na stresalniku za epruvete. Ekstrakte smo ponovno skoncentrirali pod dušikom na 200–250 μL in jih kvantitativno prenesli v merilno bučko. Dopolnili smo jih do oznake z mešanico acetonitrila in vode ($\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O} - 1:1$). Tako pripravljene ekstrakte smo uporabili za analizo policikličnih aromatskih ogljikovodikov s HPLC.



Slika 14: Rotacijski stresalnik (Vir: Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano, 2015)

3.4.1 Čiščenje ekstraktov s kolonsko kromatografijo

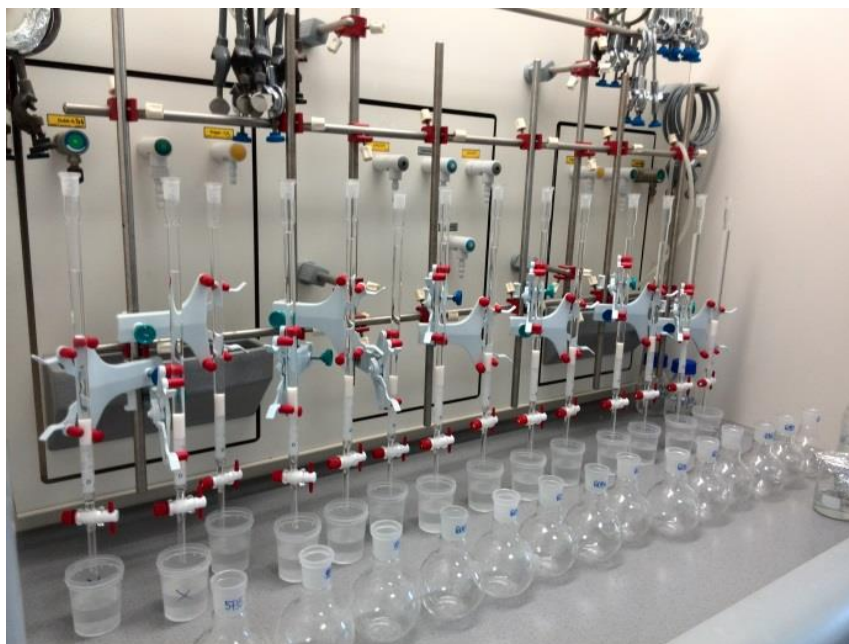
Pred čiščenjem ekstraktov s kolonsko kromatografijo (Slika 15) smo vzorec pripravili, kot je opisano pri pripravi vzorcev (poglavje 3.4), do koncentriranja na rotacijskem uparjalniku.

Priprava kolone

Kolono za čiščenje ekstrakta smo napolnili z mešanico heksana in metilenklorida (1:1). Dodali smo 2 g deaktiviranega silika gela (SiO_2) in počakali, da se posede («slurry» postopek). Nato smo dodali 2 g deaktiviranega aluminijevega oksida (Al_2O_3). Počakali smo, da se je polnilo popolnoma posedlo, potem pa smo iz kolone izpustili mešanico heksana in metilenklorida (1:1) do polnila. Kolono smo kondicionirali s 25 mL mešanice heksana in metilenklorida (1:1). Polnilo se pri tem ne sme posušiti.

Čiščenje ekstrakta

Na vrh kolone smo previdno nanесли približno 1 mL skoncentriranega ekstrakta. Bučko, v kateri je bil ekstrakt, pa smo sprali z majhno količino mešanice heksana in metilenklorida (1:1) in jo nanесли na kolono. Elucijo smo izvedli s 50 mL mešanice heksana in metilenklorida (1:1). Tako prečiščen ekstrakt smo na rotacijskem uparjalniku pri temperaturi 30 °C ponovno skoncentrirali na približno 2 mL. Nato smo izvedli koncentriranje in obrat topil za analizo s HPLC.



Slika 15: Čiščenje ekstraktov s kolonsko kromatografijo (Vir: Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hran. 2015)

3.5 Ekstrakcija na trdni fazi (SPE)

3.5.1 Ekstrakcija na polnilu Lichrolut EN

Za ekstrakcijo policikličnih aromatskih ogljikovodikov smo uporabili polnilo Lichrolut EN. Polnilo (0,25 g) smo zatehtali v steklene 3 mL kolonce. Kolonce smo nato kondicionirali s tremi volumni metilenklorida, tremi volumni metanola in na koncu s tremi volumni vode. Skozi tako pripravljeno kolono smo prečrpali 500 mL vzorca, ki smo mu dodali standardno raztopino PAO. Po nanosu celotnega vzorca smo kolone sušili pod vakuumom do suhega. Po končanem sušenju smo izvedli elucijo s tremi volumni mešanice metilenklorida in heksana (1:1). Tako pripravljen ekstrakt smo nato čistili s kolonsko kromatografijo.

3.5.1.1 Čiščenje ekstraktov s kolonsko kromatografijo

Priprava kolone

Uporabili smo 6 mL steklene kolone, ki smo jih napolnili z 1 g deaktiviranega silika gela (SiO_2) in z 1 g deaktiviranega aluminijevega oksida (Al_2O_3). Tako pripravljene kolone smo nato kondicionirali z dvema volumnoma mešanice metilenklorida in heksana (1:1). Polnilo se pri tem ne sme posušiti.

Čiščenje ekstrakta

Na tako pripravljene kolone smo nanесли ekstrakt. Epruveto, v kateri je bil ekstrakt, smo sprali z majhno količino mešanice metilenklorida in heksana (1:1) in jo nanесли na kolono. Kolono smo nato eluirali z dvema volumnoma mešanice metilenklorida in heksana (1:1).

Tako prečiščen ekstrakt smo nato skoncentrirali pod dušikom (Zymark) na približno 1 mL. Ekstraktu smo dodali 250 μL N,N-dimetilformamida. Ekstrakt smo nato ponovno skoncentrirali pod dušikom na 200–250 μL in ga kvantitativno prenesli v merilno bučko. Z mešanico acetonitrila in vode (1:1) smo dopolnili do oznake. Tako pripravljen ekstrakt smo uporabili za določanje policikličnih aromatskih ogljikovodikov s HPLC.

3.5.2 Ekstrakcija na kolonah ISOLUTE PAH SPE

Za ekstrakcijo PAO smo uporabili kolone ISOLUTE PAH (Slika 16). Kolone so dvoplastne, sestavljene iz NH₂ in polnila C18.

Kolone smo kondicionirali s tremi volumni metilenklorida, tremi volumni metanola in tremi volumni vode. Na tako pripravljene kolone smo nanесли 500 mL vzorca, ki smo mu dodali standardno raztopino PAO. Po končanem nanosu celotnega vzorca smo kolone sušili pod vakuumom do suhega. Nato smo vzorce eluirali s tremi volumni metilenklorida. Ekstrakt smo nato skoncentrirali pod dušikom (Zymark) na približno 1 mL, mu dodali 250 µL N,N-dimetilformamida ter dobro premešali na stresalniku za epruvete. Ekstrakt smo ponovno skoncentrirali pod dušikom na 200–250 µL ter ga kvantitativno prenesli v merilno bučko. Z mešanico za raztapljanje acetonitrila in vode (1:1) smo jo dopolnili do oznake. Tako pripravljen ekstrakt smo uporabili za določanje PAO s HPLC.



Slika 16: Ekstrakcija PAO z uporabo kolon ISOLUTE PAH. (Vir: Supelco, 2015)

3.6 Instrumentalna analiza

3.6.1 Določitev policikličnih aromatskih ogljikovodikov z metodo HPLC

V Preglednici 2 so navedeni kromatografski pogoji za metodo določanja PAO v vodah.

Preglednica 2: Kromatografski pogoji za metodo določanja PAO v vodah

Analitska kolona:	Zorbax Eclipse PAH, 250 x 3,00 mm, 5 µm
Mobilna faza:	A = voda, B = acetonitril (1:1)
Pretok:	1 mL/min.
Volumen injiciranja:	100 µL
Čas analize:	35 min.
Temperatura kolone:	30 °C
Valovna dolžina:	DAD: 230–360 nm FLD: Ex = 230–290 nm Em = 350–500 nm

3.6.2 Identifikacija spojin

Posamezne spojine v vzorcu smo identificirali s primerjavo retencijskih časov posameznih vrhov v kromatogramu vzorca z retencijskimi časi vrhov v kromatogramu standardne raztopine, posnetimi pod enakimi pogoji kot vzorec.

Če se v kromatogramu vzorca pojavi kromatografski vrh pri retencijskem času, ki je značilen za neko spojino, je prisotnost iskane spojine možna. Identiteto te spojine moramo potrditi še s primerjavo emisijskih ali eksitacijskih ter absorpcijskih spektrov (Standard operating procedure, str. 176).

3.6.3 Določitev izkoristkov ekstrakcije

Na osnovi določitve izkoristkov metode smo ugotovili razmerje odstopanj rezultatov med izmerjeno in dejansko vrednostjo. Pripravili smo standardno raztopino, kjer smo slepemu vzorcu matrice dodali – »cepili« znano količino analiziranih spojin in smo ga pripravili po enakem postopku kot vzorce. Izmerjeno koncentracijo analiziranih spojin smo nato primerjali z dejansko koncentracijo spojin standardne raztopine.

Izkoristek metode smo določili za vsako posamezno spojino PAO, kot je prikazano v enačbi (prav tam, str. 176):

$$I = (C_2/C_1) \times 100$$

I = izkoristek (%)

C₁ = dejanska koncentracija PAO (koncentracija standardne raztopine)

C₂ = izmerjena koncentracija PAO (odčitana iz umeritvene krivulje)

3.6.4 Vrednotenje rezultatov

Koncentracijo iskane spojine v vzorcu smo preračunali iz umeritvene krivulje, ki smo jo pripravljali dnevno po naslednji enačbi (prav tam, str. 176):

$$X = (A_v \times C_s) / A_s \times (V_e / M_v)$$

X = koncentracija spojine v vzorcu (ng/mL ali µg/mL)

A(v) = ploščina kromatografskega vrha spojine v vzorcu

A(s) = ploščina kromatografskega vrha v spojine standardu

C(s) = koncentracija spojine v standardni raztopini

V(E) = končni volumen ekstrakta v mL

M(v) = zatehta vzorca v g ali volumen vzorca v mL.

4. REZULTATI IN DISKUSIJA

Namen diplomske naloge je bil na podlagi zbranih podatkov predlagati optimalno metodo za določanje PAO v vzorcih vod. Cilj naloge je bil, da obstoječo metodo z LL ekstrakcijo nadomestimo z metodo SPE, ki je hitrejša ter zdravju in okolju prijaznejša. Za izkoristek ekstrakcije je bila ključnega pomena pravilna izbira organskega topila, polnila in pH vrednosti. Na izkoristek močno vpliva tudi hitrost pretoka topila, zato je pomembno, da elucija poteka počasi.

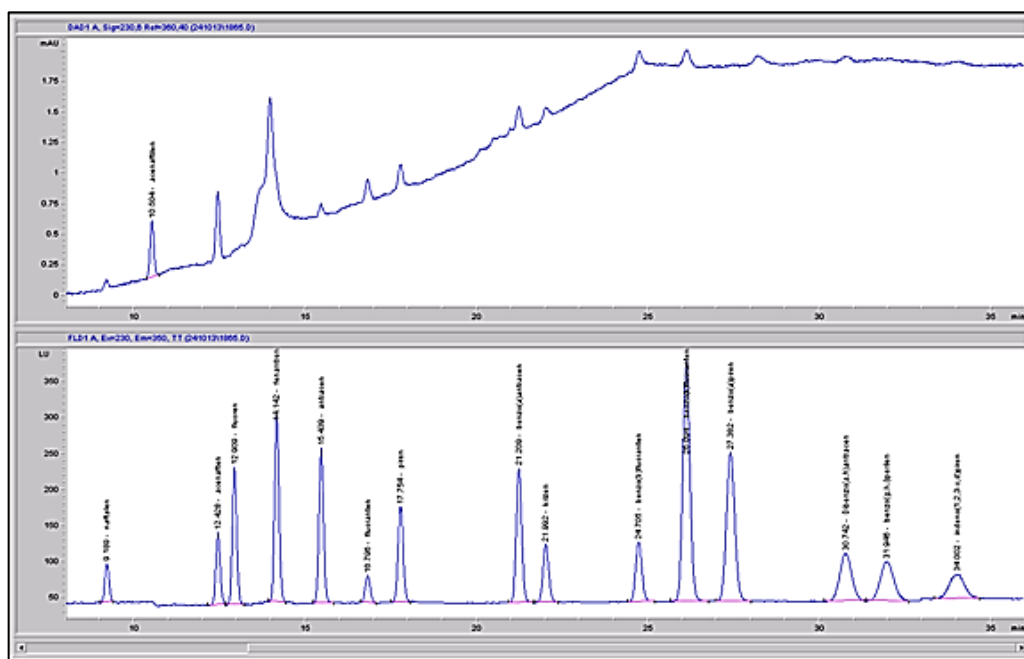
Vzorci vod smo pripravili vzporedno po dveh metodah: ekstrakcija tekoče – tekoče in ekstrakcija na trdni fazi. Pri SPE smo uporabili dve vrsti kolon, ki sta vsebovali različni polnili. Ena je vsebovala polnilo Lichrolut EN, druga pa je bila napolnjena s kombinacijo NH₂ in C18 polnila. Ekstrakte vzorcev smo kolonsko očistili z uporabo silika gela in aluminijevega oksida. Za določitev PAO v vzorcih vod smo uporabili metode tekočinske kromatografije z FLD in DAD detektorjem. Za primerjavo smo izvedli dodatna testiranja smo s plinsko kromatografijo z masno selektivnim detektorjem (GC/MS).

4.1 Umeritvena krivulja PAO

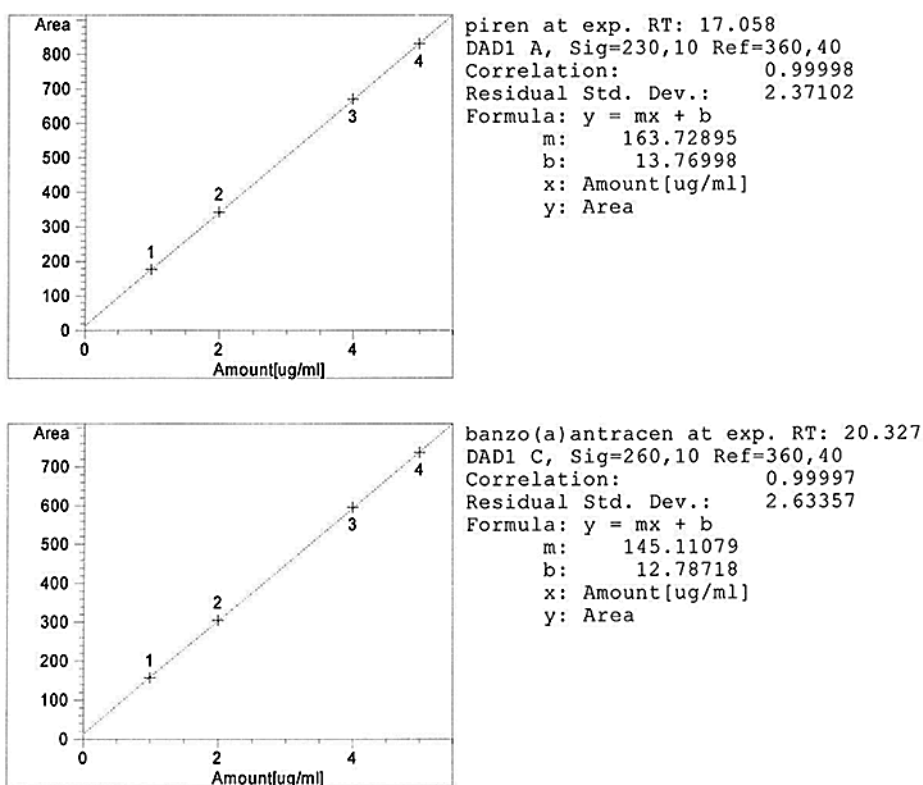
Za izračun PAO smo pripravili dnevno umeritveno krivuljo na štirih koncentracijskih ravneh. Koncentracijsko območje za določanje PAO je v območju od 2 ng/mL do 20 ng/mL. Na podlagi umeritvene krivulje smo merjenim vzorcem lahko pripisali ustrezne koncentracije različnih PAO.

Slika 17 prikazuje kromatogram kalibracijske standardne raztopine PAO za določanje PAO v vodah. Standardna raztopina PAO vsebuje 16 PAO – naftalen, acenaftilen, acenaften, fluoren, fenantren, antracen, fluoranten, piren, krizen, benzo(a)antracen, benzo(b)fluoranten, benzo(k)fluoranten, benzo(a)piren, dibenzo(a,h)antracen, benzo(g,h,i)perilen in ideno(1,2,3-c,d)piren.

Acenaftilen, ki ne fluorescira, smo merili z DAD-detektorjem, ostale vsebnosti PAO pa smo merili s FLD-detektorjem. Na Sliki 18 sta prikazani umeritveni krivulji za standardni spojini piren in benzo[a]antracen.



Slika 17: Kromatogram standardne raztopine PAO



Slika 18: Primer umeritvene krivulje za standardni spojini piren in benzo[a]antracen

V Preglednici 3 so prikazani retencijski časi analiziranih spojin standardne raztopine PAO ter vrsta uporabljenega detektorja.

Preglednica 3: Retencijski časi analiziranih spojin

Spojina	Retencijski čas (min)	Detektor
Acenaftilen	10,504	DAD
Naftalen	9,189	FLD
Acenaften	12,428	
Fluoren	12,909	
Fenantren	14,142	
Antracen	15,439	
Fluoranten	16,796	
Piren	17,754	
Benzo(a)antracen	21,209	
Krizen	21,992	
Benzo(b)fluoranten	24,705	
Benzo(k)fluoranten	26,094	
Benzo(a)piren	27,382	
Dibenzo(a,h)antracen	30,742	
Benzo(g,h,i)perilen	31,946	
Indeno(1,2,3-c,d)piren	34,002	

4.2 Izbira primernega organskega topila

Za čiščenje, kondicioniranje in elucijo pri SPE je zelo pomembna izbira primernega organskega topila. Preučili smo topnosti različnih topil v vodi in se na podlagi teh odločili za metilenklorid, heksan:metilenklorid (1:1) in metanol.

V Preglednici 4 so prikazane topnosti različnih organskih topil v vodi.

Preglednica 4: Topnost različnih organskih topil v vodi

TOPILO	TOPNOST V VODI (% v/v)
Aceton	100
Acetonitril	100
Benzen	0,18
Diklorometan	1,6
Dimetilformamid	100
Etanol	100
Etilacetat	8,7
Dietileter	6,89
n - heksan	0,001
Metanol	100
N - propanol	100
Toluen	0,05

4.3 Vpliv pH vrednosti in dodatek organskega topila

Testirali smo, kakšen vpliv imata pH vzorca in dodatek metanola k vzorcu na izkoristek ekstrakcije.

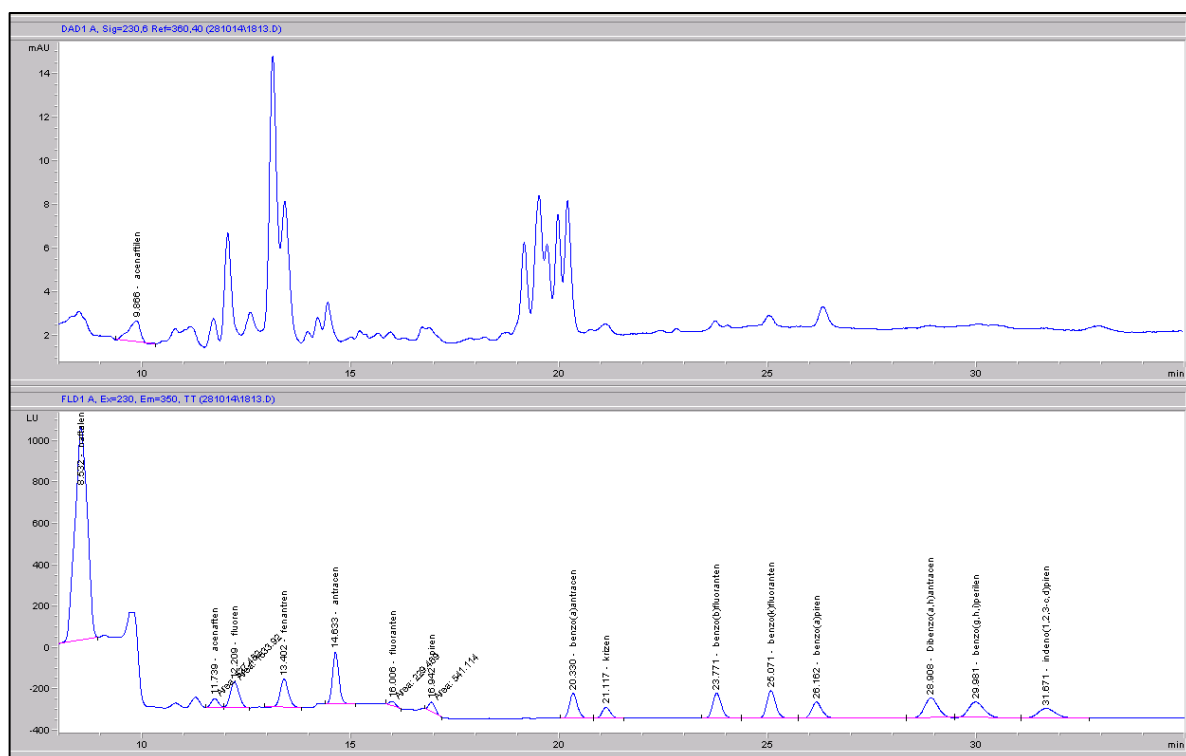
4.3.1 Vpliv pH: Polnilo NH₂ in C18 ISOLUTE PAH – Biotage (750 mg)

Pripravili smo vzorec slepe matrice s standardnim dodatkom. V 0,5 L milli-Q vode smo dodali ustrezno količino standardne raztopine, da smo pripravili vzorec s koncentracijo 10 ng/mL posameznih PAO. Vrednost pH smo z dodatkom NaOH naravnali na pH=7.

V Preglednici 5 so z oranžno označeni izkoristki, ki ustrezajo standardom in so v meji med 70 in 120%. Na Sliki 19 pa je prikazan kromatogram vzorca.

Preglednica 5: Izkoristki in izmerjene koncentracije slepe matrice z dodatkom standardne raztopine (c = 10 ng/mL) in pH = 7

Spojina	Izmerjena koncentracija ng/mL	Izkoristek (%)
Acenaftilen	10,95	109
Naftalen	91,13	911
Acenaften	8,36	84
Fluoren	13,53	135
Fenantren	15,78	158
Antracen	8,79	88
Fluoranten	3,13	31
Piren	4,62	46
Benzo(a)antracen	9,47	95
Krizen	9,55	95
Benzo(b)fluoranten	8,71	87
Benzo(k)fluoranten	8,65	87
Benzo(a)piren	8,14	81
Dibenzo(a,h)antracen	7,74	77
Benzo(g,h,i)perilen	7,64	76
Indeno(1,2,3-c,d)piren	7,77	78



Slika 19: Kromatogram slepe matrice s standardnim dodatkom (10 ng/ml) pri pH = 7

Pri naftalenu, fluorenu in fenantrenu je izkoristek neobičajno visok. To je posledica neustrezne vrednosti slepega vzorca in prisotnost motečih spojin iz polimernih materialov SPE. Za odpravo teh težav so potrebna nadaljnja testiranja glede ustreznega čiščenja in

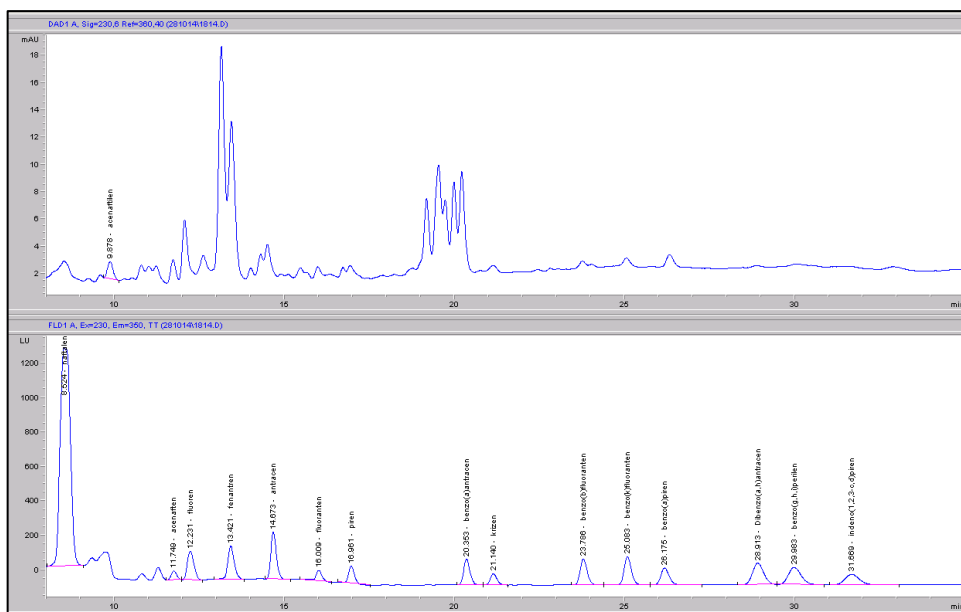
kondicioniranja SPE polnila. Fluoranten in piren imata nizke izkoristke. Za ostale PAO pa so izkoristki ustrezni, oziroma v območju med 70 in 120 %.

4.3.2 Vpliv dodatka organskega topila: Polnilo NH₂ in C18 ISOLUTE PAH – Biotage (750 mg)

Pripravili smo vzorec slepe matrice s standardnim dodatkom, ki smo mu dodali 5 % metanola. V 0,5 L milli-Q vode smo dodali ustrezno količino standardne raztopine in 5 % metanola. Vrednost pH smo z NaOH nastavili na 7. Pri ekstrakciji smo uporabili polnilo NH₂ in C18 ISOLUTE – Biotage (750 mg). V Preglednici 6 so podane izmerjene koncentracije in izkoristek za posamezne PAO, izkoristki označeni z oranžno ustrezajo standardom in so v meji med 70 in 120%. Na Sliki 20 pa je prikazan kromatogram vzorca.

Preglednica 6: Izkoristki in koncentracije slepe matrice z dodatkom standardne raztopine (c = 10 ng/mL) in metanolom, pH = 7

Spojina	Izmerjena koncentracija ng/mL	Izkoristek (%)
Acenaftilen	8,34	83
Naftalen	113,28	1.133
Acenaften	9,10	91
Fluoren	16,61	166
Fenantren	21,11	211
Antracen	10,37	104
Fluoranten	11,40	114
Piren	10,08	101
Benzo(a)antracen	11,39	114
Krizen	11,42	114
Benzo(b)fluoranten	10,75	108
Benzo(k)fluoranten	10,68	107
Benzo(a)piren	10,25	102
Dibenzo(a,h)antracen	10,00	100
Benzo(g,h,i)perilen	9,89	99
Indeno(1,2,3-c,d)piren	10,15	102



Slika 20: Kromatogram slepe matrice s standardnim dodatkom (10 ng/ml) z dodanim metanolom (5 %) pri pH = 7

Iz rezultatov je razvidno, da ima večina PAO zelo dobre izkoristke in so v območju med 70 in 120 %. V primerjavi z rezultati testov brez dodatka metanola so izkoristki nekoliko boljši predvsem za PAO, ki imajo višje molekulske mase in so v vodi slabše topni. Zelo visoke izkoristke imajo ponovno naftalen, fluoren in fenantren in so z uporabo metanola še nekoliko višji.

4.4 Izbira primernega polnila za SPE

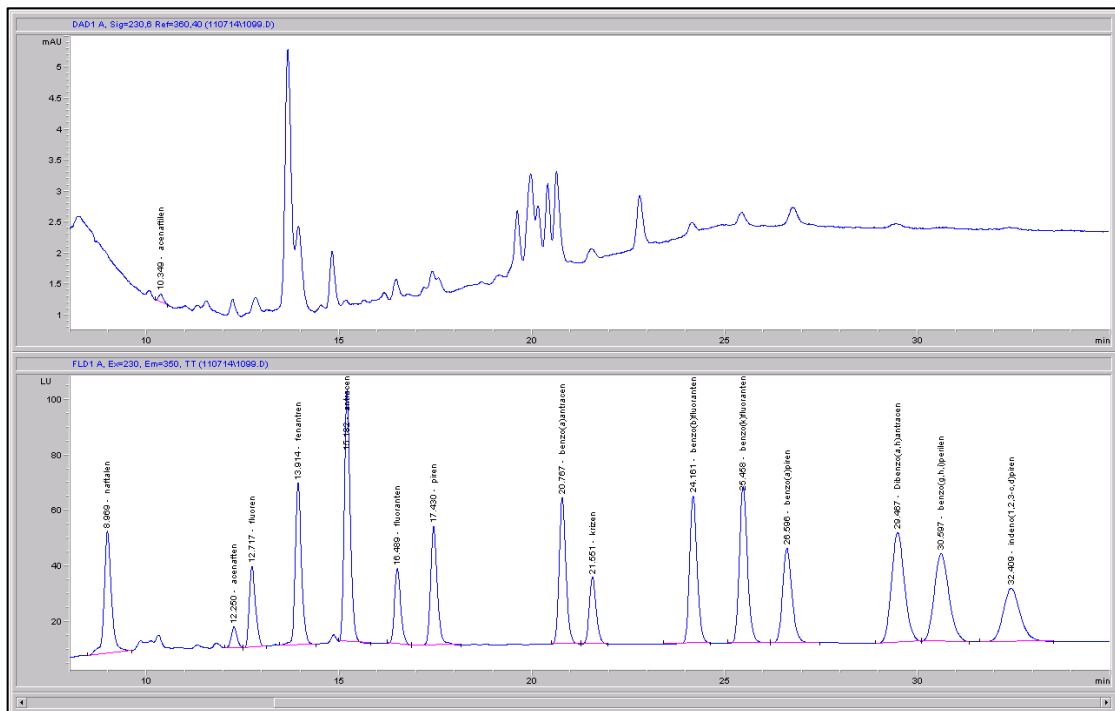
Za določevanje PAO smo preizkusili dve vrsti polnil SPE: polnilo Lichrolut EN in ISOLUTE PAH – Biotage. Primerjali smo izkoristke ekstrakcij in se na osnovi tega odločili, da bomo uporabili polnilo ISOLUTE PAH – Biotage. V vseh primerih so bili izkoristki za naftalen, fluoren in fenantren previsoki. Pri vseh ostalih PAO pa so bili izkoristki v okviru naših zahtev, in sicer da morajo biti v območju od 70 do 120 % (Standard operating procedure, str. 176).

4.4.1 Polnilo Lichrolut EN (0,25 g)

Pripravili smo vzorec slepe matrice s standardnim dodatkom. V 0,5 L vzorca milli-Q vode smo dodali ustrezno količino standardne raztopine ($c = 10 \text{ ng/mL}$). Za polnilo smo uporabili Lichrolut EN (0,25 g). V Preglednici 7 so podane izmerjene koncentracije in izkoristek za posamezne PAO, izkoristki označeni z oranžno ustrezajo standardom in so v meji med 70 in 120%. Na Sliki 21 pa je prikazan kromatogram vzorca.

Preglednica 7: Izkoristki in koncentracije vzorca slepe matrice z dodano standardno raztopino (c = 10 ng/mL) pri uporabi polnila Lichrolut EN (0,25 g)

Spojina	Izmerjena koncentracija ng/mL	Izkoristek (%)
Acenaftilen	1,25	13
Naftalen	4,95	50
Acenaften	2,33	23
Fluoren	4,73	47
Fenantren	10,83	108
Antracen	6,37	64
Fluoranten	8,58	86
Piren	9,49	95
Benzo(a)antracen	7,75	78
Krizen	7,96	80
Benzo(b)fluoranten	7,18	72
Benzo(k)fluoranten	7,12	71
Benzo(a)piren	7,48	75
Dibenzo(a,h)antracen	6,44	64
Benzo(g,h,i)perilen	6,45	65
Indeno(1,2,3-c,d)piren	6,61	66



Slika 21: Kromatogram slepe matrice s standardnim dodatkom (10 ng/ml) po SPE na Lichrolut EN (0,25 g)

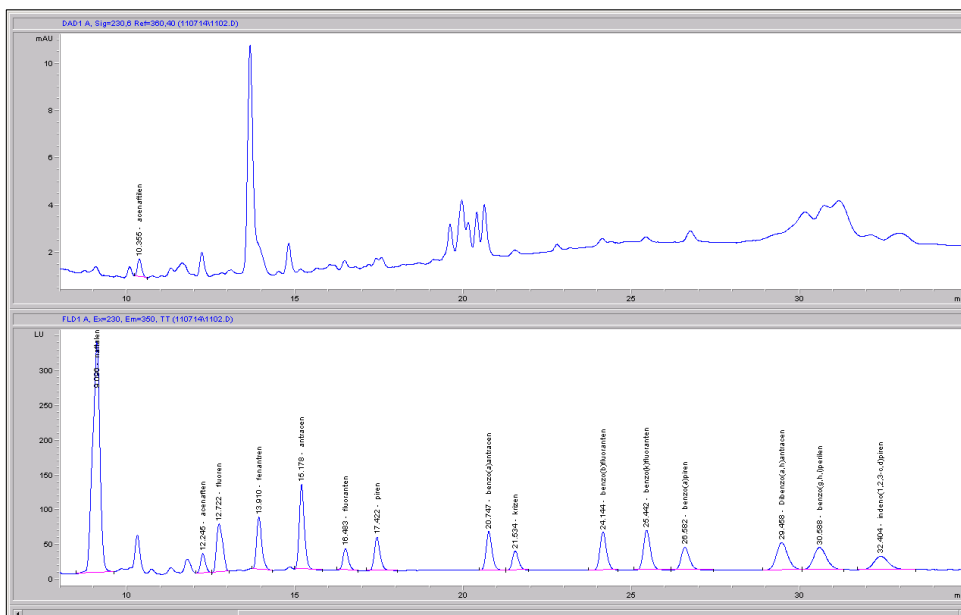
Iz rezultatov izkoristkov pri uporabi polnila Lichrolut EN (0,25 g) je razvidno, da so izkoristki neustrezni pri acenaftilenu, naftalenu, acenaftenu in fluorenu. Rezultati za ostale PAO, ki so obarvani oranžno, so v ustreznem območju med 70 in 120 %.

4.4.2 Polnilo Lichrolut EN (0,50 g)

Pripravili smo vzorec slepe matrice z dodano standardno raztopino. V 0,5 mL milli-Q vode smo dodali smo dodali ustrezno količino standardne raztopine ($c = 10 \text{ ng/mL}$). Za SPE polnilo smo uporabili Lichrolut EN (0,50 g). V Preglednici 8 so podane izmerjene koncentracije in izkoristek za posamezne PAO, izkoristki označeni z oranžno ustrezajo standardom in so v meji med 70 in 120%. Na Sliki 22 pa je prikazan kromatogram vzorca.

Preglednica 8: Izkoristki in koncentracije vzorca slepe matrice z dodano standardno raztopino pri uporabi polnila Lichrolut EN (0,50 g)

Spojina	Izmerjena koncentracija ng/mL	Izkoristek (%)
Acenaftilen	7,71	77
Naftalen	22,3	223
Acenaften	8,88	89
Fluoren	13,4	134
Fenantren	13,5	135
Antracen	8,61	86
Fluoranten	9,72	97
Piren	10,53	105
Benzo(a)antracen	8,18	82
Krizen	9,24	92
Benzo(b)fluoranten	7,39	74
Benzo(k)fluoranten	7,22	72
Benzo(a)piren	7,2	72
Dibenzo(a,h)antracen	6,39	64
Benzo(g,h,i)perilen	6,52	65
Indeno(1,2,3-c,d)piren	6,64	66



Slika 22: Kromatogram slepe matrice s standardnim dodatkom (10 ng/ml) po SPE na Lichrolut EN (0,50 g)

Rezultati izkoristkov pri uporabi polnila Lichrolut EN (0,50g) so za večino PAO dobri in so v območju med 70 in 120 %, zmotili so nas visoki izkoristki za naftalen, fluoren in fenantren.

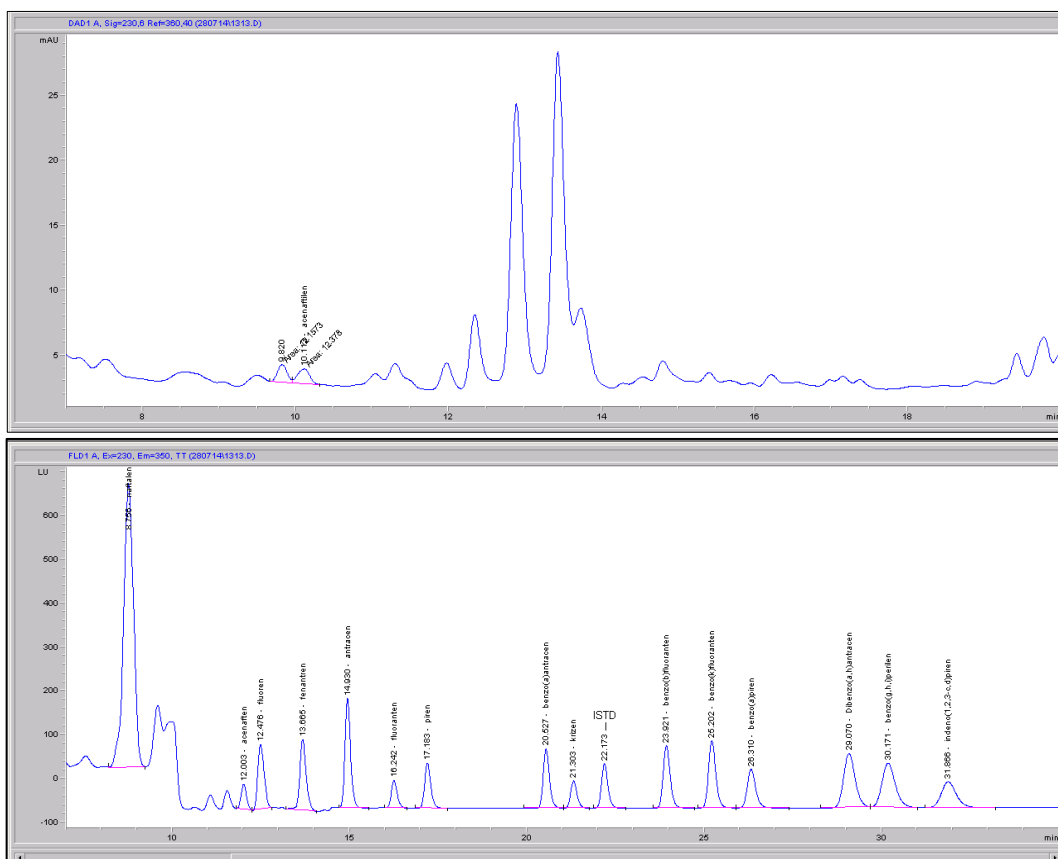
4.4.3 Polnilo NH₂ in C18 ISOLUTE PAH – Biotage (750 mg)

Pripravili smo vzorec slepe matrice z dodano standardno raztopino. V 0,5 L milli-Q vode smo dodali smo dodali ustrezno količino standardne raztopine (c =10 ng/mL). Pri ekstrakciji smo uporabili polnilo ISOLUTE PAH – Biotage (750 mg). V Preglednici 9 so podane izmerjene koncentracije in izkoristek za posamezne PAO, izkoristki označeni z oranžno ustrezajo standardom in so v meji med 70 in 120%. Na Sliki 23 pa je prikazan kromatogram vzorca.

Preglednica 9: Izkoristki in koncentracije vzorca slepe matrice z dodano standardno raztopino pri uporabi polnila ISOLUTE PAH – Biotage (750 mg)

Spojina	Izmerjena koncentracija ng/mL	Izkoristki (%)
Acenaftilen	7,24	72
Naftalen	56,11	561
Acenaften	9,77	98
Fluoren	14,05	141
Fenantren	17,18	172
Antracen	9,31	93
Fluoranten	10,17	102
Piren	11,58	116
Benzo(a)antracen	10,17	102
Krizen	10,51	105
Benzo(b)fluoranten	9,91	99

Benzo(k)fluoranten	9,81	98
Benzo(a)piren	9,57	96
Dibenzo(a,h)antracen	9,77	98
Benzo(g,h,i)perilen	10,05	101
Indeno(1,2,3-c,d)piren	9,81	98



Slika 23: Kromatogram slepe matrice s standardnim dodatkom (10 ng/ml) po SPE na ISOLUTE PAH – Biotage (750 mg).

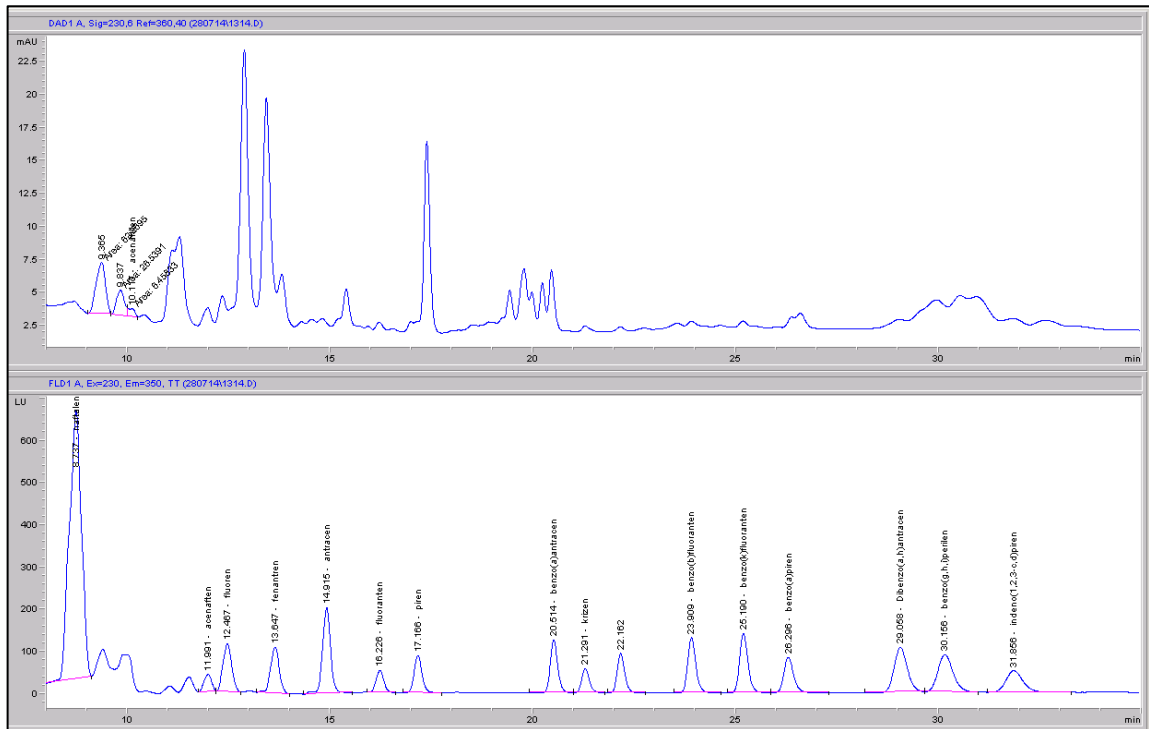
Rezultati izkoristkov pri uporabi polnila NH₂/C18 so za večino PAO zelo dobri in so v območju med 70 in 120 %. Neustrezni izkoristki so bili ponovno pri naftalenu, fluorenu in fenantrenu.

4.4.4 Polnilo NH₂ in C18 ISOLUTE PAH – Biotage (1,5 g)

Pripravili smo vzorec slepe matrice z dodano standardno raztopino. V 0,5 L milli-Q vode smo dodali smo dodali ustrezno količino standardne raztopine (c =10 ng/mL). Pri ekstrakciji smo uporabili polnilo ISOLUTE PAH – Biotage (1,5 g). V Preglednici 10 so podane izmerjene koncentracije in izkoristek za posamezne PAO, izkoristki označeni z oranžno ustrezajo standardom in so v meji med 70 in 120%. Na Sliki 24 pa je prikazan kromatogram vzorca.

Preglednica 10: Izkoristki in koncentracije vzorca slepe matrice z dodano standardno raztopino pri uporabi polnila ISOLUTE PAH – Biotage (1,5 g)

Spojina	Izmerjena koncentracija ng/mL	Izkoristek (%)
Acenaftilen	3,17	32
Naftalen	58,81	588
Acenaften	8,24	82
Fluoren	12,77	128
Fenantren	13,79	138
Antracen	9,63	96
Fluoranten	9,61	96
Piren	11,04	110
Benzo(a)antracen	9,67	97
Krizen	9,95	100
Benzo(b)fluoranten	9,21	92
Benzo(k)fluoranten	9,03	90
Benzo(a)piren	9,08	91
Dibenzo(a,h)antracen	8,36	84
Benzo(g,h,i)perilen	8,85	88
Indeno(1,2,3-c,d)piren	8,51	85



Slika 24: Kromatogram slepe matrice s standardnim dodatkom (10 ng/ml) po SPE na ISOLUTE PAH – Biotage (1,5 g)

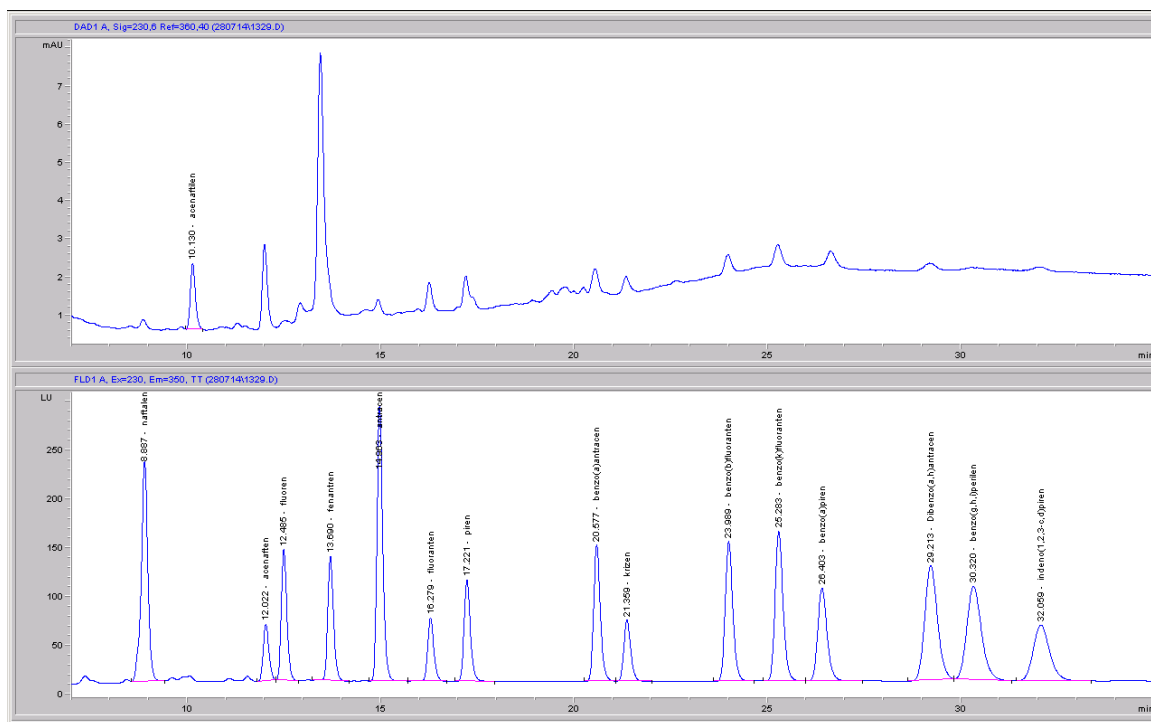
Rezultati izkoristkov pri uporabi polnila NH₂/C18 so za večino PAO ustrezni in so v območju med 70 in 120 %. Zelo visok izkoristek (neustrezen) ima naftalen, izkoristek nad 120 % imata tudi fluoren in fenantren. Izkoristek za Acenaftilen pa je v tem primeru prenizek.

4.5 Izkoristki ekstrakcije tekoče – tekoče (LLE)

Za primerjavo smo podali izkoristke, dobljene pri ekstrakciji tekoče – tekoče. Pripravili smo vzorec slepe matrice z dodatkom standardne raztopine ($c = 10 \text{ ng/mL}$), in izvedli postopek ekstrakcije, ki je opisan v razdelku 3.4. V preglednici 11 so podane izmerjene koncentracije in izkoristki za posamezne PAO, izkoristki označeni z oranžno ustrezajo standardom in so v meji med 70 in 120%. Slika 25 pa prikazuje kromatogram vzorca.

Preglednica 11: Izkoristki in koncentracije vzorca slepe matrice z dodano standardno raztopino pri ekstrakciji tekoče – tekoče

Spojina	Izmerjena koncentracija ng/mL	Izkoristek (%)
Acenaftilen	9,25	93
Naftalen	11,85	118
Acenaften	9,38	94
Fluoren	10,15	101
Fenantren	11,11	111
Antracen	9,94	99
Fluoranten	10,08	101
Piren	11,13	111
Benzo(a)antracen	10,26	103
Krizen	10,45	104
Benzo(b)fluoranten	9,94	99
Benzo(k)fluoranten	9,88	99
Benzo(a)piren	10,46	105
Dibenzo(a,h)antracen	9,41	94
Benzo(g,h,i)perilen	9,65	96
Indeno(1,2,3-c,d)piren	9,58	96



Slika 25: Kromatogram slepe matrice s standardnim dodatkom (10 ng/ml) pri ekstrakciji tekoče – tekoče

Rezultati izkoristkov pri ekstrakciji tekoče – tekoče so za vse PAO zelo dobri in so v območju med 70 in 120 %. V primerjavi s kromatogrami vzorcev po SPE ekstrakciji je tudi kemijsko ozadje bolj čisto, oziroma je prisotnih manj motečih spojin. Moteče spojine se pri SPE ekstrakciji pojavijo pri uporabi absorbentov in materialov iz umetnih mas, ki lahko vsebujejo določena PAO.

4.6 Medlaboratorijski primerjalni testi

Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano Maribor sodeluje v medlaboratorijskih primerjalnih testih za določanje PAO v vodah. V okviru diplomske naloge smo naredili primerjalni test tudi z SPE na ISOLUTE PAH – Biotage (750 mg), kot je opisano v razdelku 4.4.3. Ker so bili izkoristki pri testiranju SPE postopkov za naftalen, fuoren in fenantren previsoki, jih pri primerjalnem testu nismo določevali.

V Preglednici 12 so podani rezultati medlaboratorijskega testiranja. Odstopanje med pravo in izmerjeno vrednostjo je podano z oznako »z-score«. Interval odstopanja (z-score) mora biti med -2 in +2.

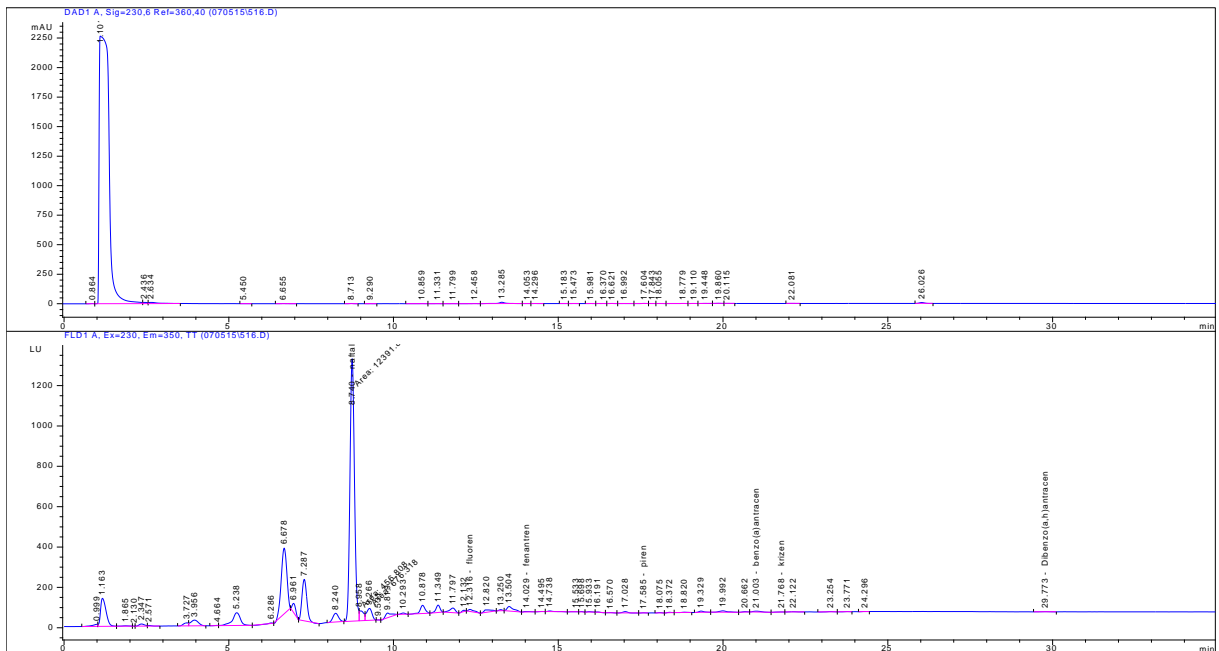
Iz preglednice 12 je razvidno, da je interval odstopanja (z-score) za posamezne PAO znotraj zahtevanih meja. S tem smo potrdili pravilnost in uporabnost metode za izbrane PAO. Za natančno določitev naftalena, fuorena in fenantrena z SPE postopkom ekstrakcije pa so potrebna nadaljnja testiranja pri čiščenju in kondicioniranju SPE polnila.

Preglednica 12: Rezultati medlaboratorijskih primerjalnih testov za določanje PAO v vodah

Spojina	Prava vrednost (ng/L)	Izmerjena vrednost (ng/L)	z-score
Naftalen	21,91	-	-
Acenaften	13,61	15,85	1,12
Fluoren	13,23	-	-
Fenantren	16,90	-	-
Antracen	8,58	9,37	0,39
Fluoranten	26,70	30,20	1,75
Piren	25,06	23,64	-0,71
Benzo(a)antracen	6,31	7,76	0,73
Krizen	17,82	19,46	0,82
Benzo(b)fluoranten	15,44	16,55	0,56
Benzo(k)fluoranten	18,71	17,55	-0,58
Benzo(a)piren	4,40	4,11	-0,15
Dibenzo(a,h)antracen	9,71	8,76	-0,48
Benzo(g,h,i)perilen	8,80	8,20	-0,30
Indeno(1,2,3-c,d)piren	21,82	18,83	-1,50

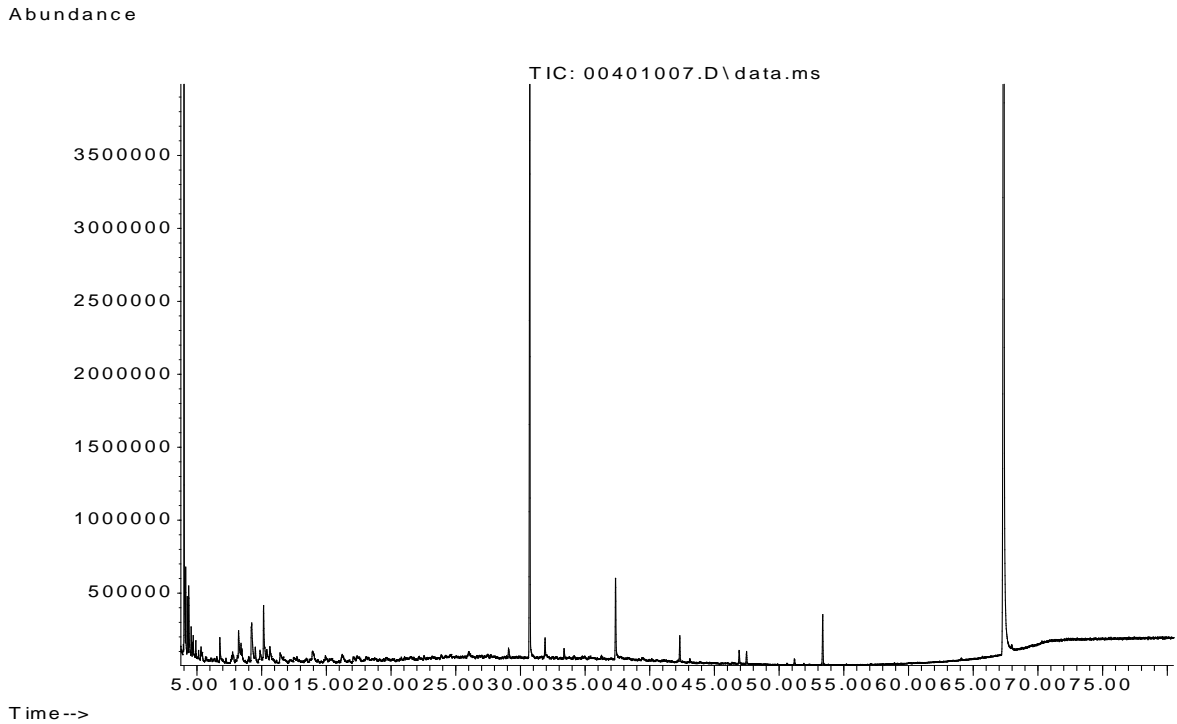
4.7 Primerjava HPLC in GC/MS

Pri realnem vzorcu podzemne vode smo primerjali tudi uporabo GC/MS in HPLC instrumentalne metode za določevanje PAO po ekstrakciji tekoče-tekoče z metilenkloridom. Na Sliki 26 je prikazan HPLC kromatogram vzorca po ekstrakciji tekoče-tekoče in čiščenju s kolonsko kromatografijo. Izmed analiziranih PAO je bila v vzorcu določena vsebnost naftalena v koncentraciji 0,23 µg/l.



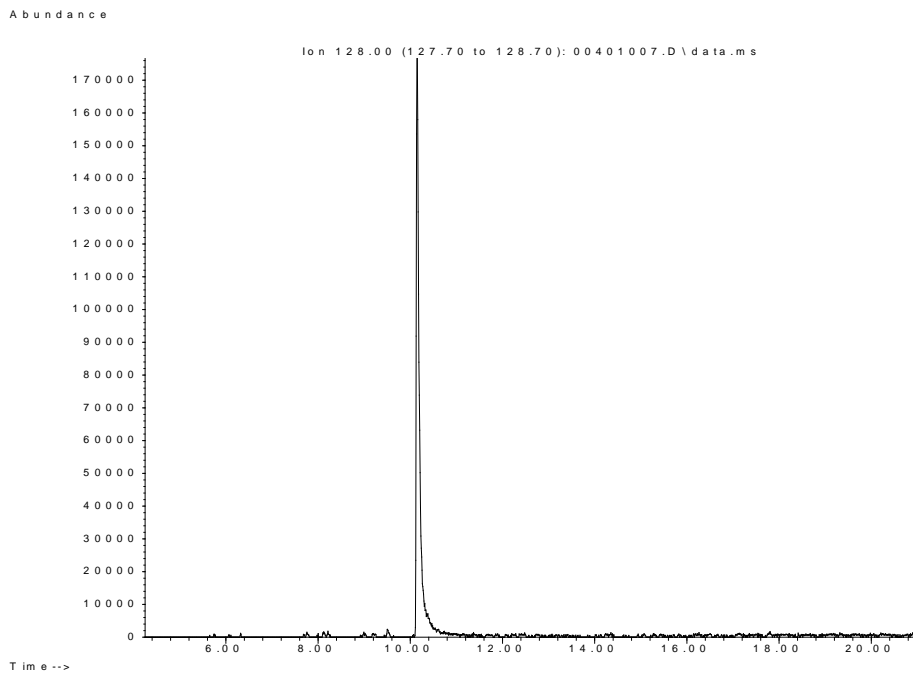
Slika 26: HPLC kromatogram vzorca podzemne vode pri ekstrakciji tekoče – tekoče.

Enak vzorec podzemne vode smo analizirali še z GC/MS, in sicer s tehniko snemanja celotnega masnega spektra (SCAN). Vzorec za analizo je bil pripravljen po principu ekstrakcije tekoče-tekoče z metilenkloridom brez dodatnega čiščenja s kolonsko kromatografijo. Kromatogram je prikazan na Sliki 27.

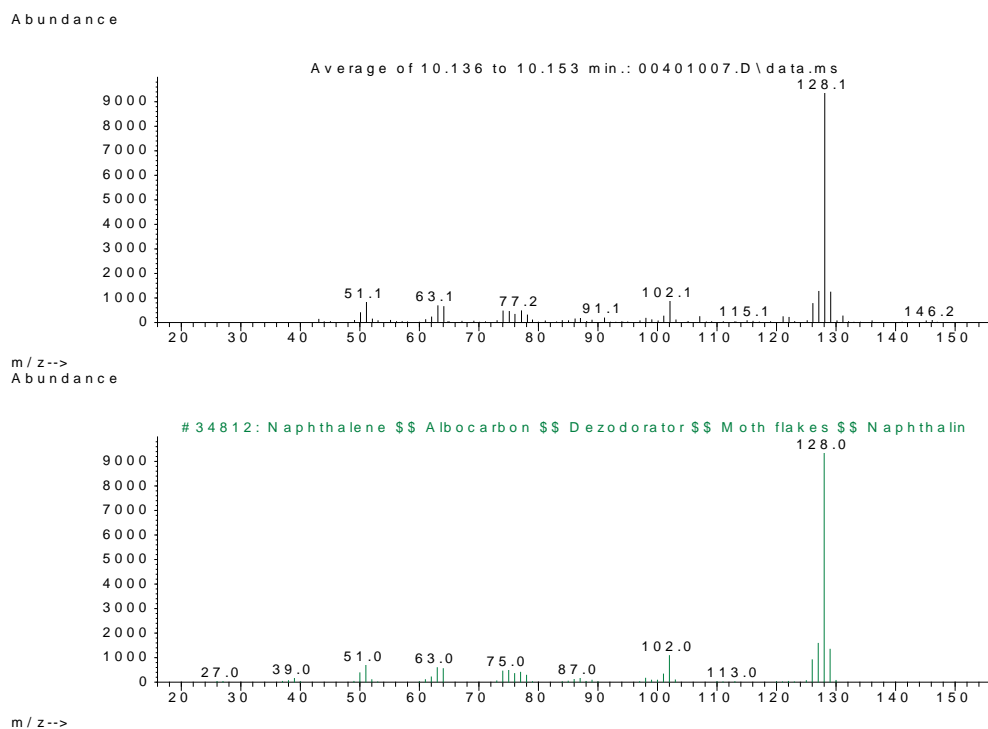


Slika 27: GC/MS (SCAN) kromatogram vzorca podzemne vode po ekstrakciji tekoče – tekoče

Zraven širokega nabora zaznanih spojin z GC/MS je bil kvalitativno določen tudi naftalen z retencijskim časom 10,153 min. Ionski tok masnega fragmenta $m/z=128$ je prikazan na Sliki 28. Masni spekter naftalena v vzorcu je prikazan na Sliki 29.



Slika 28: Ionski tok masnega fragmenta $m/z=128$



Slika 29: Masni spekter naftalena

Z GC/MS (SCAN) so bili v vzorcu kvalitativno določene še sledeče spojine: tetrahidro-2-metil-tiofen, etilbenzen, ksilen, tetrahidro-2-metil-2H-tiopiran, 1-metilcikloheksanol, 2-etil-tetrahidrotiofen, 1-fenil-buten-1, 2,6-dimetilfenol, tetrametilbenzen, ksilenol, tetrahidro-naftalen, trimetilfenol, dibutilfталat, oktil dodekanat, oktil miristat, oktil palmitat, oktil stearat.

Ker je v primerjavi s HPLC z DAD in FLD detektorjem instrumentalni sklop GC/MS veliko bolj selektiven, ni bilo potrebno pred instrumentalno analizo izvesti dodatnega čiščenja ekstrakta. Ker zraven PAO lahko določimo z GC/MS še široki nabor organskih spojin je smiselno, da združimo kvantitativno določitev PAO z metodami za kvalitativno in kvantitativno določitev z GC/MS.

5. ZAKLJUČEK

Organska onesnaževala predstavljajo veliko okoljsko tveganje, saj so dolgo obstojna v okolju in imajo lastnost, da se kopičijo v tleh in se postopoma preko prehranjevalne verige nalagajo v organizmih živali in ljudi. Za človekovo zdravje so lahko škodljivi že pri nizkih koncentracijah. Za to je potrebno upoštevati ukrepe za zmanjšanje izpustov organskih onesnaževal.

V diplomski nalogi smo iskali optimalno metodo za določanje policikličnih aromatskih ogljikovodikov v vodi, s ciljem, da obstoječo LLE nadomestimo z ekstrakcijo SPE.

Glede na podatke, pridobljene v diplomskem delu, sklepamo, da je glavna težava pri uporabi ekstrakcije SPE za določevanje PAO v vodah uporaba različnih adsorbentov in materialov iz umetnih mas. Ti materiali lahko vsebujejo določene PAO (naftalen, fuoren, fenantren) in ostale podobne spojine, ki lahko motijo natančno določitev PAO s HPLC v nizkih koncentracijah. V sledovih so te moteče spojine prisotne zaradi materiala SPE in sinteznih postopkov pridobivanja in obdelave adsorbentov SPE (npr. stiren-divinilbezenska smola).

Tudi z različnim kondicioniranjem in s spiranjem adsorbentov je kemijsko ozadje SPE analitskega pristopa bolj izrazito v primerjavi s kromatogrami po ekstrakciji LL.

Na podlagi rezultatov našega eksperimentalnega dela smo se odločili, da je najprimernejša uporaba komercialno dobavljivih SPE kolon za določevanje PAO (ISOLUTE PAH – Biotage), ki vsebujejo kombinacijo dveh vrst adsorbenta. Te kolone so zelo zanimive za rutinsko uporabo, saj lahko izvedemo postopek ekstrakcije in čiščenja sočasno. V okviru testiranja SPE nismo uspeli najti ustreznega postopka za določevanje vseh PAO (naftalen, fuoren, fenantren). Vsekakor ima uporaba SPE zaradi svojih dobrih lastnosti (manjša poraba topil, hitrejša izvedba itd.) številne prednosti pred ekstrakcijo LL. Glede na pridobljene podatke v diplomskem delu predlagamo uporabo SPE za določevanje izbranih PAO in nadaljnjo optimizacijo čiščenja in kondicioniranja adsorbentov.

Če uporabimo ekstrakcijo LL z metilenkloridom, pa je smiselno uporabiti ekstrakt še za nadaljnje neciljane analize ali pa združiti določevanje z ostalimi parametri, ki jih določujemo v laboratoriju (npr. ftalati). Ekstrakt vzorcev vod z metilenkloridom lahko analiziramo s plinsko kromatografijo v povezavi z masno selektivnim detektorjem, ki je zelo selektiven detektor in je vpliv nekaterih motečih spojin pri kvantitativni določitvi manjši kot pri HPLC z DAD in FLD. S tehniko snemanja celotnega masnega spektra (SCAN) ali pa v kombinaciji SCAN/SIM pa lahko dobimo informacijo o prisotnosti širokega nabora hlapnih organskih spojin (ftalati, ogljikovodiki itd.)

6. VIRI IN LITERATURA

Al Mahdawi, D. (2011). *Ločevanje lipidnih razredov s tankoplastno kromatografijo in ekstrakcijo na trdni fazi, diplomsko delo*. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.

Biotage. Medmrežje: <http://www.biotage.com/product-page/isolute-nh2> (1. 4. 2015).

Brglez, V. (2010). *Ugotavljanje učinkovitosti zmanjševanja estrogenske aktivnosti ksenoestrogenabisfenola A v procesu fentonove oksidacije, diplomsko delo*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta.

Brodnjak-Vončina, D. (2006). *Analizna kemija II, zbrano gradivo*. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.

Chemwiki: *Gaschromatography*. Medmrežje: http://chemwiki.ucdavis.edu/Analytical_Chemistry/Instrumental_Analysis/Chromatography/Gas_Chromatography (28. 1. 2015).

Chromedia, *Principles of SPME*. Medmrežje: http://www.chromedia.org/chromedia?wax_trapp=ujuijDsHonOvmOIIecCIBuFdG&subNav=abfyDsHonOvmOIIecCIBuFdGH (1.4. 2015).

Červek, U. (2014). *Analizne metode za določanje policikličnih aromatskih ogljikovodikov in njihov vpliv na okolje, diplomsko delo*. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.

Han, D., Row, K. H. (2012). Trends in liquid-phase microextraction, and its application to environmental and biological samples. *Mircochemica Acta*, 176, 1–22.

Hohnjec, I. (2011). *Določevanje ostankov pesticidov v vzorcih žitaric s plinsko kromatografijo in masno spektrometrijo, diplomsko delo*. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.

Hojnik, M. (2011). *Določanje nekaterih klorobenzenov, heksaklorobutadiena in heksakloroetana v vodah z ekstrakcijo tekoče – tekoče s plinsko kromatografijo in detektorjem za zajetje elektronov, diplomska naloga*. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.

Levart, K. (2009). *Določevanje estrogenske aktivnosti vtokov in iztokov čistilnih naprav, diplomsko delo*. Ljubljana, Biotehniška fakulteta.

Marcé, R. M., Borrull, F. (2000). *Solid-phase extraction of polycyclic aromatic compounds*. *Journal of Chromatography A*, 885, 273–290.

Navionalni inštitut za javno zdravje. *O posameznih parametrih na kratko*. Medmrežje: <http://www.nijz.si/o-posameznih-parametrih-na-kratko> (25.11.2014)

Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano Maribor, Center za kemijske analize. *Standard operating procedure*. Dosegljivo pri avtorju (NLZOH Mb, CKA).

Novak, I. (2004). *Optimizacija ekstrakcije na trdno fazo za določanje policikličnih aromatskih ogljikovodikov v vodi, diplomsko delo*. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.

Pawliszyn, J. (2000). *Theory of Solid-Phase Microextraction*. *Journal of Chromatographic Science*, 38, 271.

Peganc, A. (2013). *Analiza bisoprolola v plazmi s tekočinsko kromatografijo: razvoj in validacija metode, diplomsko delo*. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo.

Perrin, C. (2012). *Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in urban waters*. North Carolina, Cooperative extension service.

Rajh, E. (2010). *Optimizacija in validacija HPLC metode za ugotavljanje vsebnosti arbutina v pripravkih z ekstraktom vednozelenega gornika (arctostaphylosuva-ursi L.), diplomsko delo*. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.

Repnik, A. (2012). *Tekočinska kromatografija z masno detekcijo za določanje glukozinulatov, diplomsko delo*. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.

Pravilnik o pitni vodi, Uradni list RS, št. 19/2004.

Skoog, D. A., Leary, J. J. (1992). *Principles of instrumental analysis*, fourth edition. Saunders College Publisher.

Skupinska, K., Misiewicz, I., Kasprzycka-Guttman, T. (2004). Polycyclic aromatic hydrocarbons: physicochemical properties, environmental appearance and impact on living organisms. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 61, 3, 233–240.

Trkovnik, A. (2004). *Avtomatizirana analiza: Nove tehnike priprave vzorca v klinični in farmacevtski analizi*. Ljubljana, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.

Žnidar, N. (2011). *Določanje policikličnih aromatskih ogljikovodikov v zemlji*, diplomska naloga. Maribor, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo.

Wells, M.J. (2003). *Principles of extraction and the extraction of semivolatile organics from liquids*. Center for the Management, Utilization and Protection of Water Resources and Department of Chemistry.