



Fakulta rybnářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Metodika sledování kontaminace povrchových vod organickými cizorodými látkami pomocí pasivních vzorkovačů

R. Grabic, K. Grabicová, G. Fedorova,
O. Golovko, T. Randák





Fakulta rybnářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Metodika sledování kontaminace povrchových vod organickými cizorodými látkami pomocí pasivních vzorkovačů

R. Grabic, K. Grabicová, G. Fedorova,
O. Golovko, T. Randák

Vodňany

Vydání a tisk metodiky je uskutečněno za finanční podpory projektu

OP Rybářství 2007–2013:

Metodiky II (2014–2015); reg. č. CZ.1.25/3.1.00/13.00482



EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ RYBÁŘSKÝ FOND
„Investování do udržitelného rybolovu“

Obsahová část publikace byla zpracována za finanční podpory následujících projektů:

MŠMT projektu CENAKVA (CZ.1.05/2.1.00/01.0024) – 50 %
a projektu CENAKVA II (LO1205 v rámci programu NPU I) – 30 %

Bioindikace, nové přístupy k hodnocení kontaminace hydrocenóz a zdravotní aspekty
v chovech ryb (GAJU 087/2013/Z) – 10 %

Identifikace významných polutantů ve vodním ekosystému řeky Jang-c-ťiang s využitím
metod pasivního vzorkování a analytické hmotnostní spektrometrie (LH12179) – 10 %

č. 158

Vodňany

ISBN 978-80-7514-031-9



1. CÍL METODIKY	6
2. VLASTNÍ POPIS METODIKY	6
2.1. Úvod	6
2.2. Technické řešení	9
2.2.1. Popis vzorkování pomocí pasivních vzorkovačů	11
2.2.2. Doba expozice	14
2.2.3. Vyjmutí a skladování	15
2.2.4. Postup extrakce pasivních vzorkovačů	16
2.2.4.1. Extrakce SPMD	17
2.2.4.2. Extrakce POCIS	19
2.2.5. Chemická analýza	22
3. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“	24
4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY	24
5. EKONOMICKÉ ASPEKTY	25
6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	25
7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	28

1. CÍL METODIKY

Cílem metodiky je poskytnout základní informace o metodách pasivního vzorkování vody, komerčně dostupných typech pasivních vzorkovačů a jejich využití při sledování znečištění ve vodním prostředí. Zároveň je popsán standardizovaný postup pro extrakci dvou typů vzorkovačů – polopropustných membránových vzorkovačů a vzorkovačů pro stanovení polárních organických chemických látek.

2. VLASTNÍ POPIS METODIKY

2.1. Úvod

Pasivní vzorkování je relativně nová vzorkovací technika, která je založena na volném toku molekul stanovené sloučeniny ze vzorkovaného média do sběrného média jako výsledek rozdílu chemických potenciálů stanovené sloučeniny v těchto dvou médiích (Gorecki a Namiesnik, 2002). Tento způsob vzorkování může být použit pro stanovení organických i anorganických látek v různých složkách životního prostředí jako je voda, vzduch či půda (Johnson a kol., 2000; Mills a kol., 2011; Stockdale a kol., 2008; Vrana a kol., 2005). V případě vody jsou vzorkovány cílové sloučeniny pouze z biologicky aktivní frakce, která je rozpuštěná ve vodě (Lohmann a kol., 2012). Výsledná koncentrace stanovené látky v pasivním vzorkovači závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech stanovené sloučeniny, na době expozice, na teplotě, na koncentraci analytu ve vzorkovaném médiu a na rychlosti vzorkování vyjádřené vzorkovací konstantou (tzv. sampling rate, R_s) (Harman a kol., 2012; Huckins a kol., 2006; Mazzella a kol., 2007). Pro kinetiku vzorkování SPMD platí rovnice 1, kde C_w je koncentrace analytu ve vodě, C_{SPMD} je množství daného analytu v SPMD, V_s je objem membrány, R_s je rychlost vzorkování, K_{sw} je rozdělovací koeficient SPMD/voda a t je doba expozice.

Rovnice 1

$$C_w = \frac{C_{SPMD}}{V_s K_{sw} \left(1 - e^{\left(-\frac{R_s t}{K_{sw} V_s} \right)} \right)}$$

Jde o složenou logaritmickou funkci, která popisuje průběh vzorkování od začátku, kdy množství ve vzorkovači je přímo úměrné době vzorkování (lineární oblast) až po rovnovážnou oblast vzorkování, kdy rychlost vzorkování je stejná

METODIKA SLEDOVÁNÍ KONTAMINACE POVRCHOVÝCH VOD ORGANICKÝMI CIZORODÝMI LÁTKAMI POMOCÍ PASIVNÍCH VZORKOVAČŮ

jako rychlost úniku analytu ze vzorkovače. Pro lineární oblast vzorkování je možné rovnici zjednodušit do tvaru, který je shodný pro SPMD i POCIS.

Rovnice 2

$$C_w = \frac{C_{\text{Vzorkovač}}}{R_s t}$$

Pasivní vzorkovače jsou používány ke sledování kontaminantů v životním prostředí, ke sledování jejich distribuce mezi vodou a pevnou fází a také pro sledování jejich nespecifických efektů, jako jsou různé typy toxicity nebo hormonální aktivity (Echols a kol., 2000; Sabaliunas a Sodergren, 1997; Villeneuve a kol., 1997).

Mezi nejčastěji používané pasivní vzorkovače vodního prostředí patří SPMD – zařízení na principu polopropustné membrány (semi-permeable membrane device), nebo POCIS – integrální vzorkovač polárních organických látek (polar organic chemical integrative sampler), a DGT – vzorkovače založené na difuzi (diffusion gradient in thin-films) (Alvarez a kol., 2004; Davison a Zhang, 1994; Huckins a kol., 1990).

SPMD (obr. 1) jsou polopropustné membrány z polyetylénu nízké hustoty naplněné absorpčním médiem trioleinem. První experimenty s těmito vzorkovači proběhly koncem 80. let 20. století (Huckins a kol., 1990). SPMD jsou používány pro stanovení lipofilních organických látek (logaritmus rozdělovacího koeficientu oktanol-voda – $\log K_{ow} > 4$) jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), polychlorované bifenylly (PCB), polychlorované dibenzodioxiny a dibenzofurany (PCDD/F), organochlorované a organofosfátové pesticidy, ropné látky a další (Huckins a kol., 2006). Tyto vzorkovače navíc napodobují průchod látek biologickou membránou, a proto jsou používány jako bioindikátory, které napomáhají stanovení biokoncentračního faktoru dané sloučeniny ve vodních organismech (Chec a kol., 2008; Ke a kol., 2007). Mezi výhody vzorkování pomocí SPMD patří mimo jiné relativně dlouhá lineární fáze expozice (až 30 dní), jednoduchá obsluha a velké obohacení cílových sloučenin v záchytném médiu – trioleinu. Oproti živým organismům používaným jako bioindikátory nedochází při pasivním vzorkování k metabolickým přeměnám stanovovaného polutantu (Baussant a kol., 2001). Nevýhodou je pak složitější zpětný přepočítání koncentrace analytu ze vzorkovacího média na koncentraci ve vodě (Booij a kol., 2002; Booij a kol., 2003; Huckins a kol., 2002).



Obr. 1. Vzorkovač nepolárních sloučenin SPMD s přepravním obalem (Foto: R. Grabic, K. Grabicová).

Vodní prostředí není znečištěno pouze hydrofobními látkami, a proto byly vyvinuty i jiné typy pasivních vzorkovačů, které by byly schopné zachytit stopová množství polárních polutantů s $\log K_{ow} < 4$. Alvarez a kol. (2004) vyvinuli POCISy (obr. 2), což jsou vzorkovače, které se skládají ze dvou polyethersulfonových membrán s adsorpčním médiem mezi nimi. Vzorkovaná sloučenina přechází z vodné fáze do fáze pevné (na rozdíl od SPMD, kde jsou obě fáze kapalné). POCISy se používají pro stanovení léčiv, pesticidů, perfluorovaných sloučenin, hormonů, nelegálních drog a některých látek denní potřeby přítomných ve vodním prostředí (Fedorova a kol., 2014a; Grabic a kol., 2010; Harman a kol., 2011). Komerčně jsou dostupné dva typy těchto vzorkovačů. Varianta nazývaná pesticidní POCIS (pro stanovení středně polárních látek jako jsou pesticidy) má větší záchytnou kapacitu a také delší lineární dobu vzorkování, zatímco druhá varianta – farmaceutický POCIS (pro stanovení hydrofilních látek, např. léčiv) má větší vzorkovací rychlost a tudíž stačí kratší doba expozice (Fedorova a kol., 2013). Limitujícím faktorem pro použití POCIS jsou kalibrační data, která se získávají experimentálně a jsou známa jen pro malé množství sloučenin (Bartelt-Hunt a kol., 2011; Fedorova a kol., 2013; Harman a kol., 2011; Mazzella a kol., 2007; Soderstrom a kol., 2009). Kvantitativní výpočet koncentrací vzorkovaných polutantů ve vodě z POCIS není zatím možný. Vzhledem ke zkoncentrování analytů v POCISech, k částečnému odstranění matrice (ekvivalent SPE) a také delšímu vzorkovanému období je však možné a výhodné tyto vzorkovače

METODIKA SLEDOVÁNÍ KONTAMINACE POVRCHOVÝCH VOD ORGANICKÝMI CIZORODÝMI LÁTKAMI POMOCÍ PASIVNÍCH VZORKOVAČŮ

použit pro vyhledávání látek pro regulérní monitoring (stanovení rozsahu látek pro konvenční vzorkování), sledování dlouhodobých trendů či pro screening nových typů polutantů (Morin a kol., 2012).



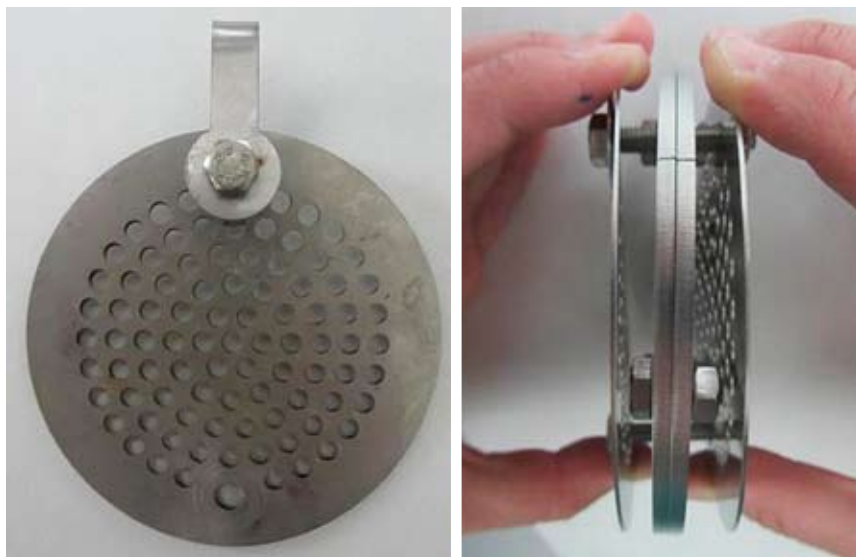
Obr. 2. Vzorkovač pro stanovení polárních organických chemických látek – POCIS (Foto: R. Grabic, K. Grabicová).

2.2. Technické řešení

Všechny výše uvedené typy vzorkovačů lze exponovat najednou s použitím standardizovaných vzorkovacích pomůcek. SPMD i POCIS jsou umístěny v ochranné kleci na držácích. Sestava pro 2 SPMD a tři POCISy je uvedena v obr. 3. Do komerčně dodávané klece lze umístit až pět nosičů SPMD nebo tři nosiče SPMD a jeden nosič pro tři POCISy. Sestava pro umístění dvou SPMD a tří POCISů je představena na obr. 3. Komerčně dostupné jsou také menší klece s prostorem pro pouze dva nosiče SPMD nebo jeden nosič pro tři POCISy. Pro vzorkování v malých tocích, kde může být umístění klece problematické, lze použít zjednodušenou verzi držáku pro jeden POCIS (obr. 4).



Obr. 3. Sestava ochranné klece se dvěma nosiči SPMD a jedním nosičem POCIS (Foto: R. Grabic, K. Grabicová).



Obr. 4. Ochranný držák pro jeden POCIS (Foto: R. Grabic, K. Grabicová).

2.2.1. Popis vzorkování pomocí pasivních vzorkovačů

Komerčně dodávané SPMD a POCISy jsou baleny po jednom v plechových obalech (SPMD) nebo pokovené fólii (POCIS). Obaly jsou většinou opatřeny předtištěnou nálepkou, která kromě údajů o šarži a druhu SPMD či POCIS, obsahuje také připravené kolonky pro datum a čas expozice. Vzhledem k povaze SPMD je nutné minimalizovat dobu, po kterou jsou exponovány i v ovzduší, neboť neustále dochází ke kumulaci nepolárních látek ve vzorkovači. Vzorkovače tedy uchováváme zmražené při $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ a transportujeme je pokud možno v původních neporušených obalech a chlazené.

Na vzorkovacím místě SPMD vyjmete z obalu, napneme na kovový držák (nosič na obr. 5) a umístíme do vzorkovací klece. Vzorkovací klec chrání membrány před mechanickým poškozením a udržuje vzorkovače pod hladinou. POCIS uchytneme na držák (obr. 6) pomocí šroubů a matic. Pokud necháváme současně exponovat oba typy POCISů (farm. i pest. POCIS), je nutné jednotlivé POCISy označit (např. vrytím písmena do kovové obroučky POCISu), neboť obě varianty vypadají opticky stejně. Držák slouží k uchycení až 3 kusů POCISů.



Obr. 5. SPMD vzorkovač na nosiči (Foto: R. Grabic, K. Grabicová).



Obr. 6. Příprava POCISu ke vzorkování s použitím obou typů POCISů (Foto: R. Grabic, K. Grabicová, T. Randák).

METODIKA SLEDOVÁNÍ KONTAMINACE POVRCHOVÝCH VOD ORGANICKÝMI CIZORODÝMI LÁTKAMI POMOCÍ PASIVNÍCH VZORKOVAČŮ

Do jedné klece můžeme umístit oba držáky s SPMD i s POCISy. Klec s pasivními vzorkovači umístíme na vzorkované místo (obr. 7) a upevníme pomocí ocelového lanka k pevnému základu (např. strom). Na základě dlouholeté praxe je možné doporučit pouze nerezová ocelová lanka a nerezový spojovací materiál. Pozinkovaná ocel koroduje a často nevydrží ani dvoutýdenní expozici, a textilní nebo umělohmotná lana nemají dostatečnou mechanickou odolnost. Další praktická zkušenost je vyvarovat se průchodu nebo úvazu přes hranu, kdy může dojít k předření i lana z nerezové ocele.

Při vzorkování místa, kde je proud příliš silný (výtok odpadní vody z ČOV, povodňové stavy), je možné osadit klec kotvou (obr. 8), která ji udrží na místě pod hladinou.



Obr. 7. Umístění klece s pasivním vzorkovačem a teploměrem do vzorkovaného média, vpravo pak spojky pro ocelová lanka (Foto: R. Grabic, K. Grabicová , T. Randák).



Obr. 8. Klec s kotvou (Foto: G. Fedorova).

2.2.2. Doba expozice

Kinetika pasivního vzorkování závisí na fyzikálně-chemických vlastnostech vzorkované sloučeniny, teplotě vody a lineární rychlosti vzorkovaného média. Obecně lze tvrdit, že rychlost vzorkování roste s teplotou a s lineární rychlostí proudění. Detailně, ale také velmi srozumitelně jsou kinetika vzorkování i její matematické modely popsány v monografii *Monitors of Organic Chemicals in the Environment: Semipermeable Membrane Devices* (Huckins a kol., 2006). Pro POCISy je tento model složitější, protože jsou v něm zahrnuty heterogenní a sorpční procesy. Pro POCISy je možné říci, že rychlost vzorkování je závislá na teplotě, ale mnohem méně závislá na rychlosti proudění.

Ideální stav pro pasivní vzorkování je ten, kdy jsou všechny vzorkované sloučeniny v lineární fázi kumulace analytů ve vzorkovači. Bohužel je tento stav, jako ostatně všechny ideály, reálně nedosažitelný. Pokud je vzorkování zaměřeno pouze na jeden typ látek (například polychlorované dioxiny a furany PCDD/F), je možné na základě literárních údajů odhadnout dobu lineární kumulace PCDD/F v SPMD (až několik měsíců). Pro multiresiduální analýzy či

METODIKA SLEDOVÁNÍ KONTAMINACE POVRCHOVÝCH VOD ORGANICKÝMI CIZORODÝMI LÁTKAMI POMOCÍ PASIVNÍCH VZORKOVAČŮ

dokonce paralelní expozici SPMD a POCIS půjde vždy o kompromis. Například naftalen se nachází v oblasti rovnovážného vzorkování již po týdnu expozice v řece při teplotě kolem 15 °C, zatímco benzo(a)pyren dosáhne tohoto stavu za stejných podmínek až po několika týdnech.

Doba expozice v podmínkách běžných v povrchových vodách ČR se pohybuje od dvou do tří týdnů, kdy hlavním limitujícím faktorem je lineární doba expozice POCIS (Fedorova a kol., 2013). Pro vzorkování v teplejší vodě je nutné tuto dobu zkrátit (pro vzorkování v Číně v Jang-c'ťiang v září bylo postačujících 10 dnů při teplotě vody okolo 23 °C).

2.2.3. Vyjmutí a skladování

V závislosti na lokalitě mohou být vzorkovače téměř čisté až silně pokryté (znečištěné) např. vrstvou biofilmu, sedimentem nebo tukem (nátok do ČOV). Někdy je obtížné provádět jakékoli úkony v terénu, ale v tomto případě je mnohem výhodnější očistit vzorkovače ihned po vyjmutí z vody. Pomůcky pro očištění vzorků na místě nejsou nijak nákladné nebo náročné. I pro silně znečištěné vzorkovače vystačíme s čistými neparfémovanými papírovými kapesníčky nebo papírovými utěrkami, destilovanou nebo ještě lépe HPLC vodou ve stříčce a metanolem nebo etanolem také ve stříčce nebo zásobní lahvi.

Mechanické nečistoty odstraníme protažením SPMD mezi vrstvami papírového ubrousku navlhčeného vodou nebo opatrným otřením POCISu stejným materiálem. Co nejlépe očištěné vzorkovače pak umístíme do původního obalu (SPMD – do plechovky; POCIS – do hliníkového sáčku), který je popsán lokalitou, datem a časem počátku a konce expozice. Při vzorkování v extrémně zatížených lokalitách (např. nátok do čistíren odpadních vod, dolní toky řek) mohou být klece i exponované vzorkovače zaneseny jak sedimentem, tak i kusy vegetace, plastu apod. (obr. 9). V případě nánosů tuku je výhodné použít místo vody metanol (ne pro POCIS). Očištěné vzorky uchováme při snížené teplotě během vzorkování (lednice nebo mrazák v autě) a poté v mrazáku při -20 °C do doby, než budeme vzorkovače extrahovat. Zde je na místě jedna důležitá poznámka: PES membrána POCIS je ve zmraženém stavu velmi křehká a snadno dojde k jejímu mechanickému poškození. Z tohoto důvodu je vhodné mezi jednotlivé POCISy, uložené ve svých původních obalech, vložit karton, který možnému poškození zabrání.

Jednou z výhod POCIS je sorpce vzorkovaného analytu na pevnou fázi, kdy je zásadním způsobem zpomalena degradace analytu. Stabilita většiny farmak ve vodné fázi je omezena na měsíce i v případě zmrazených vzorků (Fedorova a kol., 2014b), ale skladování zmrazených POCIS tuto nízkou stabilitu eliminuje.

Stabilita cílových sloučenin v extraktech pasivních vzorkovačů v metanolu je nižší než v POCISech, ale výrazně vyšší než ve vodných roztocích. Zde je nutné provést pro každou skupinu látek testy stability v metanolu. Pro farmaka je typická vysoká variabilita od relativně nestabilních sloučenin jako jsou antibiotika (roxithromycin nebo penicilin V) až po sloučeniny vysoce stabilní např. karbamazepin a atenolol.



Obř. 9. Pasivní vzorkovače po expozici v silně zatížených lokalitách (Foto: V. Žlábek).

2.2.4. Postup extrakce pasivních vzorkovačů

Vzhledem k tomu, že se oba typy vzorkovačů od původních konstrukcí nijak neliší, je možné používat původní validované postupy extrakcí (Alvarez a kol., 2004; Huckins a kol., 1990), které jsou takto vlastně standardizované. Drtivá většina publikovaných kalibračních dat je získána těmito standardními postupy, což zaručuje jejich aplikovatelnost pro standardní typy SPMD i POCIS.

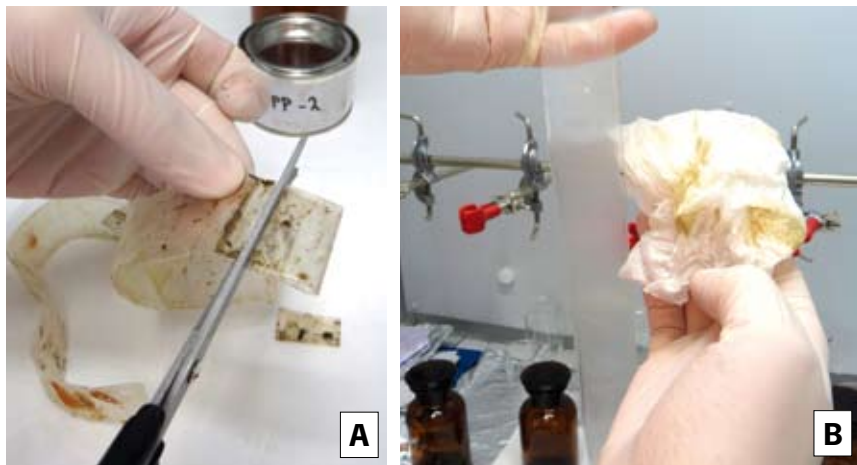
METODIKA SLEDOVÁNÍ KONTAMINACE POVRCHOVÝCH VOD ORGANICKÝMI CIZORODÝMI LÁTKAMI POMOCÍ PASIVNÍCH VZORKOVAČŮ

2.2.4.1. Extrakce SPMD

Konce rozmražených SPMD membrán sloužících k upevnění membrány k držáku opatrně ustříháme (dáme pozor, abychom neporušili membránu s trioleinem) a povrch očistíme ubrouskem namočeným nejprve ve vodě a pak v hexanu (obr. 10). Na povrchu membrány připravené pro extrakci nesmí zůstat žádné mechanické nečistoty ani tukový film. V případě železitých usazenin na povrchu membrány (většinou se to týká podzemních vod) je možné aplikovat 1M roztok HCl.

Čistou membránu vložíme do tmavé lahve se zábrusem, přidáme 200 ml hexanu (Suprasolv Merck nebo jiný ekvivalent této čistoty) a necháme 24 h dialyzovat (obr. 11). Hexanový extrakt slijeme do odpařovací baňky nebo nádoby, odpaříme jej na objem cca 2–3 ml (obr. 12), zakryjeme hliníkovou folií a ponecháme v digestoři ve tmě do druhého dne.

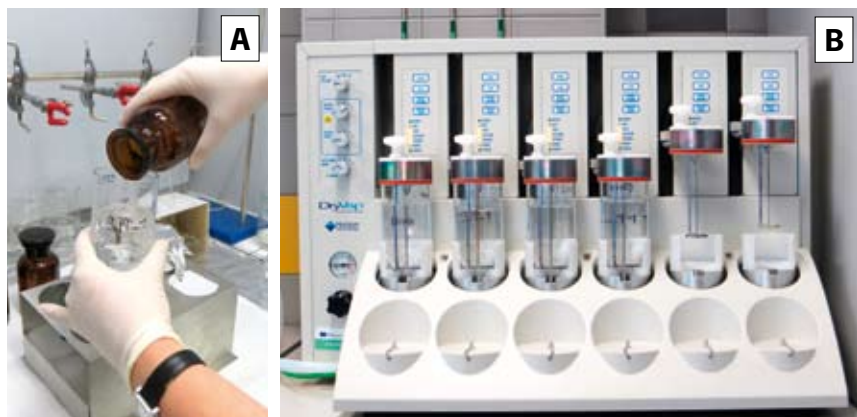
K membráně přilijeme dalších 200 ml hexanu a vzorek ponecháme dialýze dalších 24 h. Hexanový extrakt z druhé dialýzy přidáme do baňky k prvnímu odparku a zkoncentrujeme na cca 1 ml. Vzorek pak kvantitativně převedeme do 10 ml odměrné baňky nebo odvážené vialky a doplníme hexanem po rysku nebo na požadovaný objem. Tento extrakt pak uskladníme ve vialce se šroubovacím víčkem (zvážíme prázdnou vialku a vialku s extraktem) pro následná stanovení např. PAU a PCB při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Při vážení vialek je nutné tyto vážit i s víčkem a při uzavírání použít ta správná víčka na ty správné vialky, protože i drobné odchylky v jejich hmotnosti mohou ovlivnit přesnost následných analýz.



Obr. 10. Extrakce SPMD membrán – odstřížení konců sloužících k upevnění membrány k držáku (A) a očištěná membrána (B) (Foto: K. Grabicová, O. Golovko).



Obr. 11. Extrakce SPMD membrán – dialýza (Foto: K. Grabicová, O. Golovko).



Obr. 12. Extrakce SPMD membrán – přelití extraktu do odpařovací nádoby (A) a odpaření v koncentrátoru (B) (Foto: K. Grabicová, O. Golovko).

METODIKA SLEDOVÁNÍ KONTAMINACE POVRCHOVÝCH VOD ORGANICKÝMI CIZORODÝMI LÁTKAMI POMOCÍ PASIVNÍCH VZORKOVAČŮ

2.2.4.2. Extrakce POCIS

Všechny níže uvedené postupy extrakce odpovídají původnímu postupu optimalizovanému Alvarezem a kol. (2004).

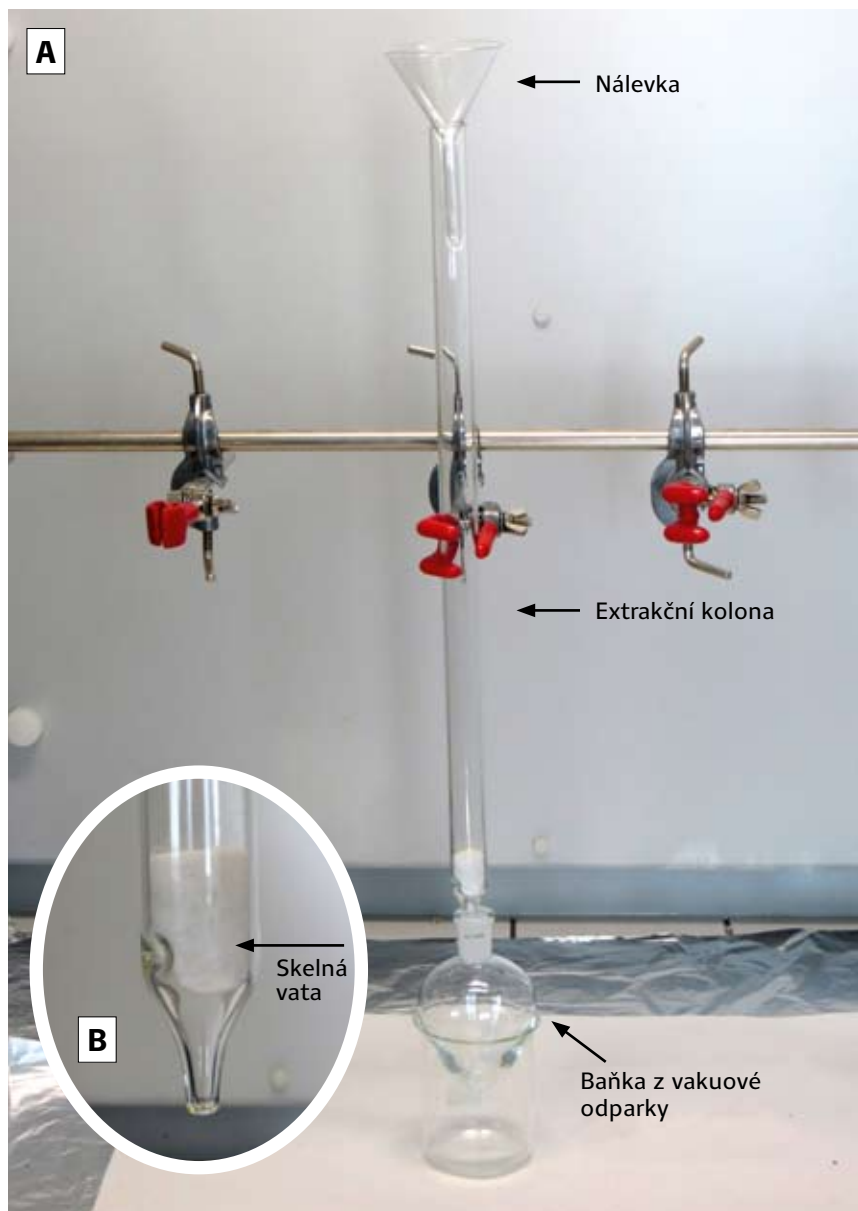
Nejprve si připravíme chromatografickou kolonu (průměr 12 mm x délka 420 mm), do které vložíme asi 1 cm vrstvu skelné silanizované vaty (např. Supelco) (obr. 13). Před extrakcí kolonu promyjeme 10 ml metanolu, který poté vylijeme do odpadu. Pod kolonu pak umístíme nádobku, ve které budeme extrakt odpařovat (srdcovou baňku nebo nádobku z koncentrátoru).

Očištěný a suchý POCIS před vlastní extrakcí rozšroubujeme nad hliníkovou fólií (abychom zabránili případným ztrátám sorbentu) a opatrně pinzetou přeneseme membránu na fólii. Farmaceutický POCIS obsahuje žlutý gelovitý sorbent (obr. 14a) zatímco v pesticidním POCISu je tmavý (často vlhký) prášek (obr. 14b). Tímto způsobem je možné rozeznat oba typy POCIS, pokud došlo během vzorkování k záměně. Sorbent opatrně převedeme z membrány přes nálevku do extrakční kolony spláchnutím malým množstvím metanolu (obr. 15). Použijeme přibližně 3 x 1 ml metanolu na každou membránu, abychom kvantitativně přesunuli veškerý sorbent do kolony.

Pro extrakci farm. POCISu použijeme 4 x 10 ml metanolu. Extrakt poté odpaříme v koncentrátoru (např. rotační vakuové odparce) na objem cca 1 ml a kvantitativně převedeme do předem zvážené vialky. Vialku se vzorkem zvážíme a uchováme při -20 °C až do doby analýzy.

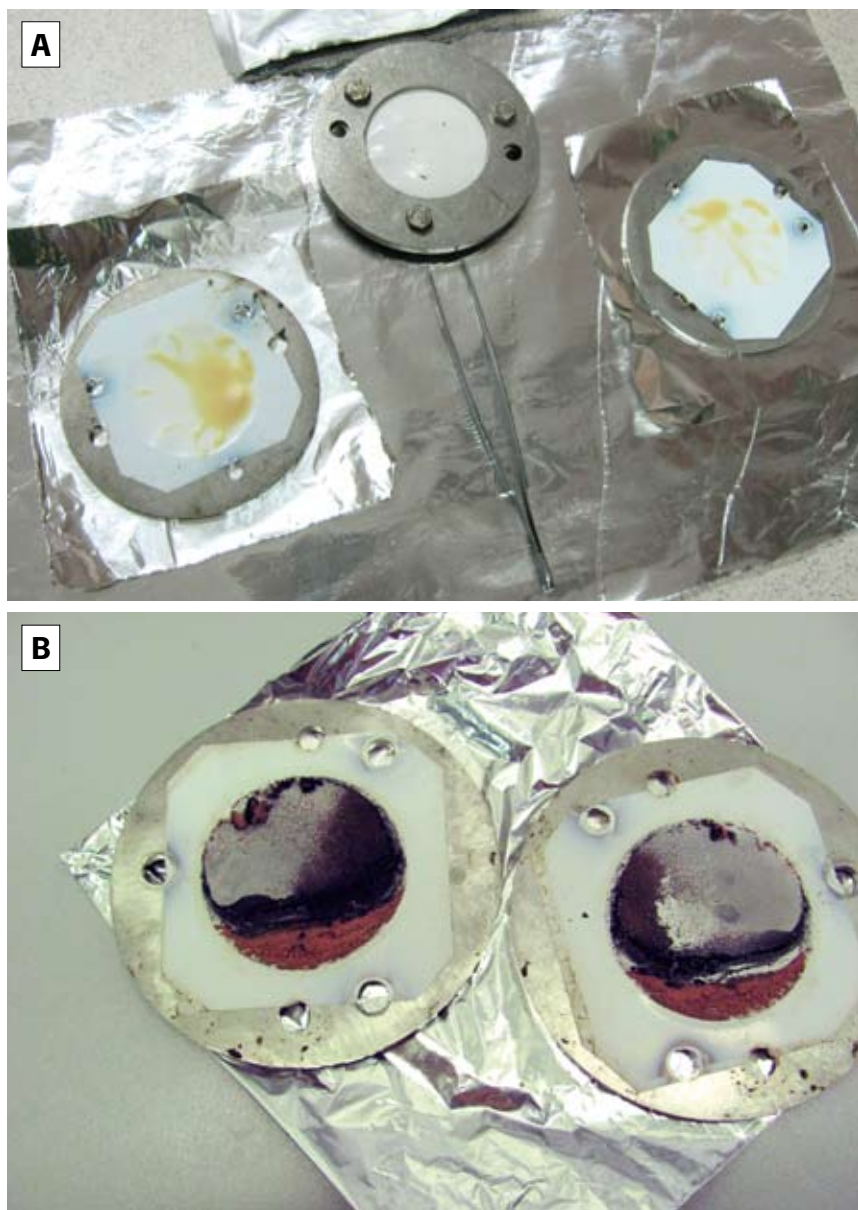
Pro extrakci pest. POCISu použijeme 5 x 10 ml směsi rozpouštědel metanol : toluen : dichlormetan v objemovém poměru 1 : 1 : 8. Extrakt odpaříme na cca 1 ml. Většinou je ve vzorku obsažena voda, která se zbytky toluenu vytváří dvě viditelné vrstvy. Vzhledem ke koncovce s použitím kapalinové chromatografie je nutné toluen odstranit. To provedeme přidáním 10 ml metanolu, protřepáním (s použitím vortexu) a opětovným odpařením extraktu na zhruba 1 ml. Tento krok opakujeme 2x až do odstranění zbytkového toluenu. Poté vzorek převedeme do předem zvážené vialky. Vialku se vzorkem zvážíme a uchováme při -20 °C až do doby analýzy.

Před analýzou odvážíme alikvotní podíl extraktu, přidáme vnitřní standardy a vzorek naředíme vodou v čistotě pro LC/MS v poměru 1 : 1 pro instrumentální analýzu.



Obr. 13. Souprava pro extrakci POCISu (A), detailní pohled na špičku kolony (B) (Foto: K. Grabicová, O. Golovko).

METODIKA SLEDOVÁNÍ KONTAMINACE POVRCHOVÝCH VOD ORGANICKÝMI
CIZORODÝMI LÁTKAMI POMOCÍ PASIVNÍCH VZORKOVAČŮ



Obr. 14. Rozšroubovaný exponovaný POCIS – Pharm-POCIS (A), Pest-POCIS (B) (Foto: K. Grabicová, O. Golovko).



Obr. 15. První krok extrakce POCISu – přenos sorbentu na kolonu (Foto: K. Grabicová, O. Golovko).

2.2.5. Chemická analýza

Pro vlastní analýzu je možné použít postupů, které jsou v laboratoři zavedené a validované nebo odeslat vzorek k analýze do jiné laboratoře. Ke každé sérii SPMD vzorků by měl být zpracován jak laboratorní procesní slepý vzorek, tak i tzv. field control – polní kontrolní vzorek, který se použije pro stanovení koncentrace PRC (performance reference compounds) sloučenin v bodě $t = 0$. Pro POCIS není tento field control vzorek nutný.

Zatímco extrakty z POCIS je možné použít bez dalších čistících kroků k analýze pomocí kapalinové chromatografie s různými typy hmotnostní detekce, extrakty SPMD je většinou nutné pro GC/MS analýzu přečistit postupem, který je v dané laboratoři zavedený (gelová permeační chromatografie, kolonová adsorpční chromatografie atd.).

Pokud je cílem vzorkování stanovení toxicity nebo jiných efektů např. androgenity, dioxin like aktivity apod., je nutné použít zhruba dvakrát nákladnější, ale čistější SPMD, která je plněná trioleinem bez metyloleátu, který způsobuje falešně pozitivní odezvu některých bioanalytických metod. Tato membrána je také vhodnější pro screening neznámých sloučenin ve vzorku.

V tab. 1 jsou sumarizovány alikvoty extraktu SPMD, které je nutné použít pro dosažení orientační meze stanovitelnosti (LOQ) při použití uvedené

METODIKA SLEDOVÁNÍ KONTAMINACE POVRCHOVÝCH VOD ORGANICKÝMI CIZORODÝMI LÁTKAMI POMOCÍ PASIVNÍCH VZORKOVAČŮ

instrumentální techniky pro obvyklé rozsahy požadovaných analytů. Tyto alikvoty jsou pro povrchové vody v ČR a výše doporučené doby vzorkování postačující pro stanovení i pozadové kontaminace.

Tab. 1. Přehled obvyklých analytů nebo jejich skupin stanovených v SPMD s orientační hodnotou LOQ pro daný alikvot SPMD. Analyty označené ve sloupci alikvot hvězdičkou, lze stanovit ze stejného alikvotu jako ostatní takto označené použitím identického čistícího postupu.

Analyt nebo skupina analytů	Alikvot SPMD	Orientační LOQ	Jednotky	Analytická metoda
16 EPA PAU + další PAU a jejich metyl deriváty	0,01	2–10	ng/SPMD	GC/MS/MS
PCB indikátorové nebo plná kongenerová analýza	0,3*	0,1–0,3	ng/SPMD	GC/MS/MS
Organochlorované pesticidy (HCH, HCB, DDT)	0,3*	0,1–0,5	ng/SPMD	GC/MS/MS
Polychlorované naftaleny PCN	0,3*	0,1–0,5	ng/SPMD	GC/MS/MS
Organocíníčitě sloučeniny	0,3	3–30	ng/SPMD	GC/MS
Frakce uhlovodíků	0,3	50–80	µg/SPMD	GC/FID
Chlorované parafíny	0,3	100–200	ng/SPMD	GC/MS
PCDD/F, 13 WHO PCB a PBDE	1	1–20	pg/SPMD	GC/HRMS

K analýze POCISu většinou postačuje 0,1 alikvot (100 µl z 1 ml) extraktu. K tomuto extraktu přidáme vnitřní standardy a naředíme jej vodou 1:1 tak, aby složení vzorku nerušilo chromatografickou separaci. Při obvyklém nástřiku 5–10 µl je možné provést z takového vzorku několik analýz kapalinovou chromatografií spojenou s tandemovým hmotnostním spektrometrem (LC/MS/MS) nebo spojenou s vysokorozlišujícím hmotnostním spektrometrem (LC/HRMS). Meze stanovitelnosti jednotlivých analytů jsou závislé spíše na ionizačních vlastnostech dané sloučeniny než na zahuštění vzorku. Při analýzách širokého spektra polárních organických sloučenin je použití čistících kroků spíše kontraproduktivní, protože interference se často chovají podobně jako cílový analyt.

Typickými látkami, které je možné vzorkovat pomocí POCISů jsou farmaka, polární pesticidy, nelegální drogy, perfluorované sulfonáty a kyseliny a metabolity všech těchto analytů.

3. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

Běžnou metodou ke sledování znečištění vodního prostředí je analýza vod bodovými odběry. Tento typ odběru vod odráží stav znečištění pouze v daném okamžiku. Při použití pasivního vzorkování se vzorkují sloučeniny po celou dobu expozice, výsledkem je tedy časově vážený průměr koncentrací.

Oproti použití živých organismů jako bioindikátorů je výhodou pasivního vzorkování nepřítomnost metabolických procesů, není tudíž nutno hledat možné metabolické či biotransformační produkty.

Hodnocení kvality vod je prováděno podle norem environmentální kvality, kde je hodnocení odvozeno od ročních průměrů daných ukazatelů. Pro chemické parametry jako jsou pesticidy či farmaka je to ekonomicky neproveditelné, proto se používají hodnoty z bodových odběrů - 1–12krát ročně. Pokud by byly zavedeny pasivní vzorkovače, tak se dramaticky zvýší vypovídací schopnost - zatím je roční průměrná hodnota počítána z jednodenních odběrů. Poměr vzorkované dny/počet dní v roce je 1/365–12/365. Pokud by tyto odběry byly nahrazeny pasivním vzorkováním, tak se tento poměr změní (při konzervativním odhadu 14 dní vzorkování na jeden pasivní odběr) na 14/365–168/365. Při zachování poloviny bodových odběrů (kontinuita se stávajícími metodami) a nahrazení poloviny pasivním vzorkováním lze konzervativně odhadnout, že počet dní v roce pokrytých vzorkováním se zvýší o minimálně 500 %.

4. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

V evropské legislativě jsou pasivní vzorkovače zařazeny jako doplňkové metody jak pro situační, tak i pro provozní a průzkumné monitoringu (Guidance Document No. 19, Guidance on surface water chemical monitoring under the water framework directive, Guidance Document No. 25, Guidance on chemical monitoring of sediment and biota under the Water Framework Directive). V české legislativě jejich použití není prozatím upraveno a metody pasivního vzorkování jsou pouze zmíněny v Rámcovém programu monitoringu (§ 3, vyhláška č. 98/2011 Sb.).

Většímu využití pasivních vzorkovačů polárních látek v praxi zatím brání to, že na rozdíl od bodových odběrů nemají standardizovanou metodiku odběru, úpravy vzorku a výpočtu koncentrací v jednotkách relevantních k hodnocení kvality vody ($\mu\text{g.l}^{-1}$). Kritéria hodnocení účinnosti metody pro monitoring a kritéria pro hodnocení účinnosti analytických metod jsou již jasně definována (Guidance Document No. 19, Guidance on surface water chemical monitoring under the Water Framework Directive). Implementace pasivního vzorkování je jediná možná cesta, jak rozšířit a kvalitativně zlepšit všechny druhy monitoringu

METODIKA SLEDOVÁNÍ KONTAMINACE POVRCHOVÝCH VOD ORGANICKÝMI CIZORODÝMI LÁTKAMI POMOCÍ PASIVNÍCH VZORKOVAČŮ

aniž by došlo k dramatickému nárůstu prostředků vynaložených na tyto účely. Zvýšení efektivity monitoringu výskytu reziduí pesticidních přípravků a jejich metabolitů v podzemních, povrchových a pitných vodách je obsaženo i v dílčím cíli 1 Národního akčního plánu k zajištění udržitelného používání pesticidů – NAP.

Tato metodika bude sloužit jako návod pro uživatele pasivních vzorkovačů, zejména pro firmy a instituce zabývající se kvalitou a znečištěním vodního ekosystému. V podmínkách ČR to jsou zejména podniky povodí, Český hydrometeorologický ústav a společnosti zodpovědné za kvalitu pitné vody.

5. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Pro chemické parametry jako jsou pesticidy či farmaka se používají hodnoty z bodových odběrů, které často ani nereflektují průměrné podmínky v toku. Pokud by bodové odběry byly částečně nahrazeny pasivním vzorkováním, tak se výrazně zvýší vypovídací schopnost vzorkování. Tato úspora se nepříliš dobře vyjadřuje v absolutní hodnotě finančních prostředků, ale na základě znalosti obou postupů je možné provést kvalifikovaný odhad.

Cena analýzy je stejná pro bodový či integrální vzorek, pouze do ceny vzorkování je nutné pro pasivní vzorkovače počítat s cca 1 000 Kč navíc. Nicméně vzhledem k navýšení počtu vzorkovaných dní lze některé odběry vypustit a celková cena za odběry by tak zůstala zachována, či byla dokonce menší. Při zachování 45 % bodových odběrů (kontinuita se stávajícími metodami) a nahrazení 30 % pasivním vzorkováním lze odhadnout úsporu 20 % prostředků při výrazném kvalitativním zlepšení monitoringu

6. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

- Alvarez, D.A., Petty, J.D., Huckins, J.N., Jones-Lepp, T.L., Getting, D.T., Goddard, J.P., Manahan, S.E., 2004. Development of a passive, in situ, integrative sampler for hydrophilic organic contaminants in aquatic environments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 1640–1648.
- Bartelt-Hunt, S.L., Snow, D.D., Damon-Powell, T., Brown, D.L., Prasai, G., Schwarz, M., Kolok, A.S., 2011. Quantitative evaluation of laboratory uptake rates for pesticides, pharmaceuticals, and steroid hormones using POCIS. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30: 1412–1420.
- Baessant, T., Sanni, S., Jonsson, G., Skadsheim, A., Borseth, J.F., 2001. Bioaccumulation of polycyclic aromatic compounds: 1. Bioconcentration in two marine species and in semipermeable membrane devices during chronic exposure to dispersed crude oil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 1175–1184.

- Booij, K., Hofmans, H.E., Fischer, C.V., Van Weerlee, E.M., 2003. Temperature-dependent uptake rates of nonpolar organic compounds by semipermeable membrane devices and low-density polyethylene membranes. *Environmental Science & Technology* 37: 361–366.
- Booij, K., Smedes, F., van Weerlee, E.M., 2002. Spiking of performance reference compounds in low density polyethylene and silicone passive water samplers. *Chemosphere* 46: 1157–61.
- Davison, W., Zhang, H., 1994. In-Situ Speciation Measurement of Trace Components in Natural-Waters Using Thin-Film Gels. *Nature* 367: 546–548.
- Echols, K.R., Gale, R.W., Schwartz, T.R., Huckins, J.N., Williams, L.L., Meadows, J.C., Morse, D., Petty, J.D., Orazio, C.E., Tillitt, D.E., 2000. Comparing polychlorinated biphenyl concentrations and patterns in the Saginaw River using sediment, caged fish, and semipermeable membrane devices. *Environmental Science & Technology* 34: 4095–4102.
- Fedorova, G., Golovko, O., Randak, T., Grabic, R., 2013. Passive sampling of perfluorinated acids and sulfonates using polar organic chemical integrative samplers. *Environmental Science and Pollution Research* 20: 1344–1351.
- Fedorova, G., Randak, T., Golovko, O., Kodes, V., Grabicova, K., Grabic, R., 2014a. A passive sampling method for detecting analgesics, psycholeptics, antidepressants and illicit drugs in aquatic environments in the Czech Republic. *Science of The Total Environment* 487: 681–687.
- Fedorova, G., Golovko, O., Randak, T., Grabic, R., 2014b. Storage effect on the analysis of pharmaceuticals and personal care products in wastewater. *Chemosphere* 111: 55–60.
- Gorecki, T., Namiesnik, J., 2002. Passive sampling. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 21: 276–291.
- Grabic, R., Jurcikova, J., Tomsejova, S., Ocelka, T., Halirova, J., Hypr, D., Kodes, V., 2010. Passive sampling methods for monitoring endocrine disruptors in the Svatka and Svitava rivers in the Czech Republic. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29: 550–5.
- Harman, C., Reid, M., Thomas, K.V., 2011. In Situ Calibration of a Passive Sampling Device for Selected Illicit Drugs and Their Metabolites in Wastewater, And Subsequent Year-Long Assessment of Community Drug Usage. *Environmental Science & Technology* 45: 5676–5682.

METODIKA SLEDOVÁNÍ KONTAMINACE POVRCHOVÝCH VOD ORGANICKÝMI CIZORODÝMI LÁTKAMI POMOCÍ PASIVNÍCH VZORKOVAČŮ

- Harman, C., Allan, I.J., Vermeirssen, E.L.M., 2012. Calibration and use of the polar organic chemical integrative sampler - a critical review. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31: 2724–2738.
- Huckins, J.N., Tubergen, M.W., Manuweera, G.K., 1990. Semipermeable-membrane devices containing model lipid - a new approach to monitoring the bioavailability of lipophilic contaminants and estimating their bioconcentration potential. *Chemosphere* 20: 533–552.
- Huckins, J.N., Petty, J.D., Lebo, J.A., Almeida, F.V., Booij, K., Alvarez, D.A., Clark, R.C., Mogensen, B.B., 2002. Development of the permeability/performance reference compound approach for in situ calibration of semipermeable membrane devices. *Environmental Science & Technology* 36: 85–91.
- Huckins, J.N., Petty, J.D., Booij, K., 2006. *Monitors of Organic Chemicals in the Environment: Semipermeable Membrane Devices*. Springer Science+Business Media, LCC.
- Chec, E., Podgorska, B., Wegrzyn, G., 2008. Comparison of the use of mussels and semipermeable membrane devices for monitoring and assessment of accumulation of mutagenic pollutants in marine environment in combination with a novel microbiological mutagenicity assay. *Environmental Monitoring and Assessment* 140: 83–90.
- Johnson, B.T., Huckins, J.N., Petty, J.D., Clark, R.C., 2000. Collection and detection of lipophilic chemical contaminants in water, sediment, soil, and air - SPMD-TOX. *Environmental Toxicology* 15: 248–252.
- Ke, R.H., Li, J., Qiao, M., Xu, Y.P., Wang, Z.J., 2007. Using semipermeable membrane devices, bioassays, and chemical analysis for evaluation of bioavailable polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 53: 313–320.
- Lohmann, R., Booij, K., Smedes, F., Vrana, B., 2012. Use of passive sampling devices for monitoring and compliance checking of POP concentrations in water. *Environmental Science and Pollution Research* 19: 1885–1895.
- Mazzella, N., Dubernet, J.F., Delmas, F., 2007. Determination of kinetic and equilibrium regimes in the operation of polar organic chemical integrative samplers - Application to the passive sampling of the polar herbicides in aquatic environments. *Journal of Chromatography A* 1154: 42–51.
- Mills, G.A., Greenwood, R., Vrana, B., Allan, I.J., Ocelka, T., 2011. Measurement of environmental pollutants using passive sampling devices - a commentary on the current state of the art. *Journal of Environmental Monitoring* 13: 2979–2982.

- Morin, N., Miege, C., Randon, J., Coquery, M., 2012. Chemical calibration, performance, validation and applications of the polar organic chemical integrative sampler (POCIS) in aquatic environments. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*. 36: 144–175.
- Sabaliunas, D., Sodergren, A., 1997. Use of semi-permeable membrane devices to monitor pollutants in water and assess their effects: A laboratory test and field verification. *Environmental Pollution* 96: 195–205.
- Soderstrom, H., Lindberg, R.H., Fick, J., 2009. Strategies for monitoring the emerging polar organic contaminants in water with emphasis on integrative passive sampling. *Journal of Chromatography A* 1216: 623–630.
- Stockdale, A., Davison, W., Zhang, H., 2008. High-resolution two-dimensional quantitative analysis of phosphorus, vanadium and arsenic, and qualitative analysis of sulfide, in a freshwater sediment. *Environmental Chemistry* 5: 143–149.
- Villeneuve, D.L., Crunkilton, R.L., DeVita, W.M., 1997. Aryl hydrocarbon receptor-mediated toxic potency of dissolved lipophilic organic contaminants collected from Lincoln Creek, Milwaukee, Wisconsin, USA, to PLHC-1 (*Poeciliopsis lucida*) fish hepatoma cells. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 977–984.
- Vrana, B., Mills, G.A., Allan, I.J., Dominiak, E., Svensson, K., Knutsson, J., Morrison, G., Greenwood, R., 2005. Passive sampling techniques for monitoring pollutants in water. *Trac-Trends in Analytical Chemistry* 24: 845–868.

7. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

- Fedorova, G., Grabic, R., Randak, T., Turek, J., Golovko, O., 2011. Evaluation of POCIS sampling rates under the field conditions, WWTP's effluent. In: 4th International Passive Sampling Workshop and Symposium, Krakow, Poland. *Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava, Ostrava*. (bez dedikace)
- Fedorova, G., Golovko, O., Randak, T., Grabic, R., 2013. Passive sampling of perfluorinated acids and sulfonates using polar organic chemical integrative samplers. *Environmental Science and Pollution Research* 20: 1344–1351. (CENAKVA CZ.1.05/2.1.00/01.0024, GAJU 047/2010/Z, Kontakt II LH12179)

METODIKA SLEDOVÁNÍ KONTAMINACE POVRCHOVÝCH VOD ORGANICKÝMI CIZORODÝMI LÁTKAMI POMOCÍ PASIVNÍCH VZORKOVAČŮ

- Fedorova, G., Randak, T., Golovko, O., Kodes, V., Grabicova, K., Grabic, R., 2014. A passive sampling method for detecting analgesics, psycholeptics, antidepressants and illicit drugs in aquatic environments in the Czech Republic. *Science of the Total Environment* 487: 681–687. (CENAKVA No. CZ.1.05/2.1.00/01.0024, NPU I – LO1205, Kontakt II LH12179, GAJU 087/ 2013/Z, CZ.1.07/2.3.00/20.0024)
- Grabic, R., Kodeš, V., Fedorova, G., Randák, T., 2011. POCIS screening of pharmaceuticals in surface water in Czech Republic 2008–2010. In: 4th International Passive Sampling Workshop and Symposium, Krakow, Poland. *Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava, Ostrava.* (bez dedikace)

Poznámky

Poznámky

Externí odborný oponent

Mgr. Vít Kodeš, Ph.D.

*Český Hydrometeorologický Ústav (ČHMÚ) Praha, Odbor jakosti vody,
Na Šabatce 17, 143 06 Praha 4*

Interní odborný oponent

Ing. Daniel Červený

*Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybnářství a ochrany
vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz
a Výzkumný ústav rybnářský a hydrobiologický, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany*

Oponent za státní správu

RNDr. Pavel Punčochář, CSc.

*Ministerstvo zemědělství, Sekce vodního hospodářství (15100), Těšnov 17,
117 05 Praha 1*

**Osvědčení o uplatněné certifikované metodice č.4959/2015-MZE-15100
ze dne 23. 1. 2015**

*Vydalo: Ministerstvo zemědělství, Sekce vodního hospodářství, Těšnov 17,
117 05 Praha 1.*

Adresa autorského kolektivu

*Mgr. Roman Grabic, Ph.D. (60 %); Ing. Kateřina Grabicová, Ph.D. (20 %);
M.Sc. Ganna Fedorova, Ph.D. (10 %); M.Sc. Oksana Golovko, Ph.D. (5 %);
doc. Ing. Tomáš Randák, Ph.D. (5 %)*

*Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybnářství a ochrany
vod, Jihočeské výzkumné centrum akvakultury a biodiverzity hydrocenóz
a Výzkumný ústav rybnářský a hydrobiologický, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany,
www.frov.jcu.cz*

V edici Metodik (technologická řada)

*vydala Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybnářství
a ochrany vod, Zátíší 728/II, 389 25 Vodňany, www.frov.jcu.cz;*

*redakce: dr hab. Ing. Josef Velíšek, Ph.D., Ing. Antonín Kouba, Ph.D.,
Zuzana Dvořáková, Ing. Blanka Vykusová, CSc.*

*náklad: 200 ks, 1. vydání; metodika uplatněna v roce 2015;
vytištěna v roce 2015;*

grafický design a technická realizace: Profitisk-group, s.r.o.



Fakulta rybnářství
a ochrany vod
Faculty of Fisheries
and Protection
of Waters

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice



ISBN 978-80-7514-031-9

Vydání a tisk metodiky je uskutečněno za finanční podpory projektu
OP Rybnářství 2007–2013
Metodiky II (2014–2015), CZ.1.25/3.1.00/13.00482



EVROPSKÁ UNIE
EVROPSKÝ RYBNÁŘSKÝ FOND
„Investování do udržitelného rybolovu“