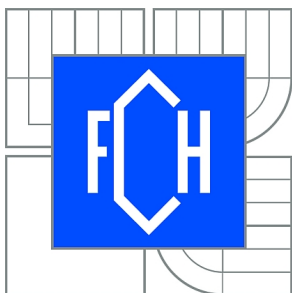


VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY
ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF
ENVIRONMENTAL PROTECTION

SUBSTITUOVANÉ POLYAROMATICKÉ SLOUČENINY VE SLOŽKÁCH ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

SUBSTITUTED POLYAROMATIC COMPOUNDS IN ENVIRONMENTAL COMPONENTS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

DAVID KUBALÍK

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. MILADA VÁVROVÁ, CSc.

BRNO 2011



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce:	FCH-BAK0578/2010	Akademický rok: 2010/2011
Ústav:	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka):	David Kubalík	
Studijní program:	Chemie a chemické technologie (B2801)	
Studijní obor:	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805R002)	
Vedoucí práce	prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.	
Konzultanti:		

Název bakalářské práce:

Substituované polyaromatické sloučeniny ve složkách životního prostředí

Zadání bakalářské práce:

1. Práce je teoretického charakteru a bude zaměřena na zhodnocení základních fyzikálně chemických a environmentálních vlastností vybraných substituovaných polyaromatických sloučenin, nejčastěji se vyskytujících ve složkách životního prostředí.
2. Další část literární rešerše bude zaměřena na zhodnocení analytických postupů používaných pro jejich stanovení.
3. Bude zpracován vzorový Standardní operační postup pro stanovení vybraných analytů v jedné z abiotických složek životního prostředí.

Termín odevzdání bakalářské práce: 6.5.2011

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

David Kubalík
Student(ka)

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2011

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce je zaměřena na substituované polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) ve složkách životního prostředí. V práci je posuzován vznik těchto sloučenin a jejich průnik do ekosystému. Vzhledem k jejich prokázaným negativním vlastnostem je třeba se věnovat také jejich toxikologii. V další části práce jsou diskutovány vhodné metody, včetně vzorkování, úpravy vzorku a finálního stanovení. Závěr předložené práce tvoří návrh Standardního operačního postupu pro jejich stanovení.

ABSTRACT

This work is focused on substituted polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in environmental compartments. The thesis examined the development of these compounds and their entry into the ecosystem. Due to their proven negative characteristics to be addressed also their toxicology. The next section discusses the appropriate methods, including sampling, sample preparation and final determination. The conclusion of this work forms draft standard operating procedure for their determination.

KLÍČOVÁ SLOVA

Polycyklické aromatické uhlovodíky, toxikologie, extrakce, chromatografie

KEYWORDS

Polycyclic aromatic hydrocarbons, toxicology, extraction, chromatography

KUBALÍK, D. *Substituované polyaromatické sloučeniny ve složkách životního prostředí*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2011. 34 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....
podpis studenta

Poděkování:

Rád bych poděkoval paní Prof. RNDr. Miladě Vávrové, CSc. za ochotu, laskavost, odborné i cenné rady, které mi usnadnily vypracování této bakalářské práce.

OBSAH

1. ÚVOD	7
2. POLYCYKlickÉ AROMATICKÉ UHLOVODÍKY	8
2.1. Obecná charakteristika	8
2.2. Fyzikálně-chemické vlastnosti	9
2.3. Výskyt.....	9
2.4. Původ PAH	9
2.5. Nebezpečné vlastnosti	10
2.6. Osud v prostředí.....	10
3. SUBSTITUOVANÉ POLYAROMÁTY	11
3.1. Úvod	11
3.1.1. Formy výskytu.....	11
3.2. Vznik substituovaných PAH a jejich zdroje	12
3.2.1. Nitro-deriváty polycyklických aromatických uhlovodíků	12
3.2.2. Alkyl-deriváty polycyklických aromatických uhlovodíků	14
3.2.3. Oxy-deriváty polycyklických aromatických uhlovodíků.....	14
4. TOXIKOLOGICKÉ VLASTNOSTI	15
4.1. Základní pojmy	15
4.2. Nitro-deriváty PAH.....	15
4.2.1. Metabolismus nitro-PAH.....	16
4.3. Oxy- a hydroxy-deriváty PAH	16
4.4. Alkyl-deriváty PAH	17
5. VZORKOVÁNÍ A IZOLACE PAH Z ENVIRONMENTÁLNÍCH MATRIC	18
5.1. Vzorkování.....	18
5.1.1. Vzorkování pomocí bioindikátorů	19
5.1.2. Pasivní vzorkování	19
5.2. Izolační metody	20
5.2.1. Extrakce v Soxhletově přístroji	20
5.2.2. Extrakce pomocí ultrazvuku (USE).....	20
5.2.3. Extrakce kapalinou pod tlakem (PLE).....	21
5.2.4. Extrakce tekutinou v nadkritickém stavu (SFE)	21
5.3. Zakoncentrování PAH.....	21
5.3.1. Kolonová (sloupcová) chromatografie	22
5.3.2. Gelová chromatografie	22
5.4. Přechištění extraktu	22

6. VÝSLEDNÁ ANALÝZA	23
6.1. Plynová chromatografie	23
6.1.1. Plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem	24
6.1.2. Plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickým detektorem GC-MS	24
6.2. Kapalinová chromatografie (HPLC).....	25
6.2.1. Spektrofluorimetrická detekce.....	26
7. NÁVRH STANDARDNÍHO OPERAČNÍHO POSTUPU PRO NPAH	28
7.1. Vzorkování.....	28
7.2. Extrakce	28
7.3. Čištění extraktu od balastních látek.....	28
7.4. Výsledná analýza.....	28
8. ZÁVĚR.....	30
9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	31
10. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	34

1. ÚVOD

Negativní dopad intenzivní činnosti člověka souvisí s distribucí nebezpečných chemických látek do všech složek životního prostředí. Znamená to, že pokud chceme kontrolovat úroveň zatížení životního prostředí nebezpečnými chemickými látkami, musíme je zjišťovat v jeho jednotlivých složkách, tj. v atmosféře, pedosféře a hydrosféře. Na základě tohoto tvrzení lze konstatovat, že znečištěním souvisejícím s přítomností chemických látek je ohrožena nejen celá planeta, ale také zdraví člověka, protože kontaminující látky mohou přecházet do potravního řetězce a následně se kumulovat v lidském organismu.

Mezi nejvýznamnější kontaminanty patří perzistentní organické polutanty (POPs), které vznikají výhradně lidskou činností. O těchto látkách je známo, že jsou nebezpečné především proto, že jsou to látky toxické, mají schopnost se bioakumulovat v živých organismech, dále jsou schopny dálkového přenosu a u většiny z nich byl již prokázán škodlivý vliv na lidské zdraví.

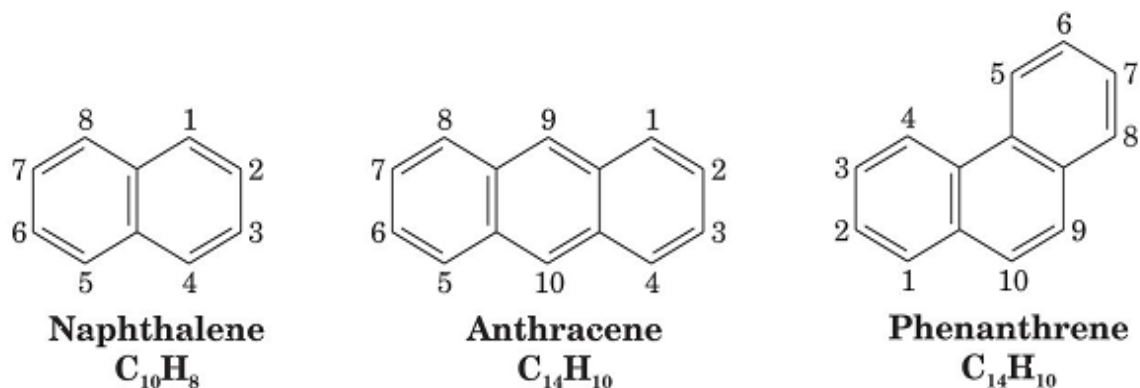
Značná část kontaminujících látek, a to zejména těch, které vznikají antropogenní činností, jsou organické sloučeniny. Organická chemie je základní chemická věda zabývající se studiem velkého množství chemických látek a jejich sloučenin, a to od jednoduchých alkanů až po složité struktury RNA, DNA. Tyto látky mohou být pro člověka životně nezbytné (např. aminokyseliny, bílkoviny, sacharidy, aj.), ale naopak mohou vykazovat i nebezpečné vlastnosti (toxiny, mutageny, karcinogeny, apod.). Do skupiny škodlivých látek nebezpečných pro člověka i pro životní prostředí patří rovněž polycyklické aromatické uhlovodíky a jejich deriváty. Jedná se o skupinu látek, jejichž výskyt byl již prokázán ve všech složkách životního prostředí; díky svým negativním vlastnostem se intenzivně sledují v ekosystémech a zejména se klade velký důraz na získávání dalších informací, které by pomohly snížit obsah PAH v životním prostředí. Tyto prioritní organické polutanty jsou prokázanými karcinogeny, případně i mutageny.

Pro řadu polycyklických aromatických uhlovodíků se vesměs používají triviální názvy. Názvy ortho- a peri-kondenzovaných polycyklických uhlovodíků, které nemají triviální názvy, se tvoří z názvu uhlovodíku, pro který existuje vhodný název a prefixů, označujících povahu a polohu dalších kruhů, například benzo(a)pyren. Celkem bylo zjištěno, že může existovat 1896 potenciálních izomerů nesubstituovaných polyaromatických sloučenin s počtem benzenových jader 2 – 8. Jejich počet se zvyšuje, pokud jsou přítomny např. pětiuhlíkaté cykly.

2. POLYCYKLIČKÉ AROMATICKÉ UHLOVODÍKY

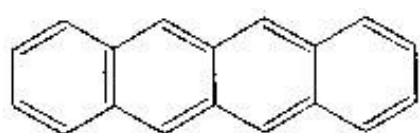
2.1. Obecná charakteristika

Polycyklické aromatické uhlovodíky jsou skupinou organických látek aromatického charakteru, která obsahuje více jak 100 sloučenin. Skládají se z uhlíku, vodíku a minimálně 2 benzenových jader. Pro názornost jsou na obr. č. 1 uvedeny základní typy polycyklických aromatických uhlovodíků se 2 a 3 benzenovými jádry.

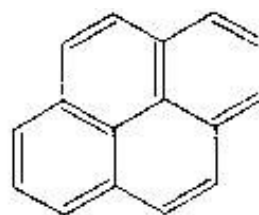


Obr. č. 1: Základní typy polycyklických aromatických uhlovodíků[1]

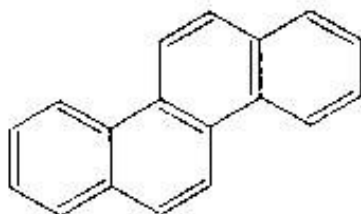
Podle uspořádání benzenových jader se tyto chemické sloučeniny dělí na lineární, angulární nebo klastrové. Díky tomu mohou být jádra různě substituována, což vede k nesmírné rozmanitosti těchto látek. Uspořádání také predikuje jejich stabilitu, která roste od lineárních k angulárním. Lineární jsou proto nejméně stabilní, zatímco angulární mají stabilitu maximální. Příklad uspořádání je zřejmý z obrázku č. 2:



lineárně anelované (tetracen)



klastrové (pyren)



angulární (chrysen)

Obr. č. 2: Příklad uspořádání benzenových jader u PAH [11]

Jiná klasifikace rozlišuje PAH na anelované a perikondenzované. V anelovaných molekulách jsou terciární uhlíky centry dvou jader, kdežto u perikondenzovaných systémů jsou některé terciární uhlíky centry tří kondenzovaných kruhů [2, 4, 11].

2.2. Fyzikálně-chemické vlastnosti

Čisté sloučeniny PAH jsou za normálních podmínek bílé nebo žluté krystalické látky. Jsou špatně rozpustné ve vodě, ale snadno se rozpouštějí v tucích nebo olejích, tzn. že jsou lipofilní. Mezi další významné vlastnosti bezpochyby patří molekulová hmotnost, tenze par, teplota tání, případně teplota varu. Obecně platí, že s rostoucí molekulovou hmotností se snižuje těkavost a rozpustnost ve vodě, ale naopak vzrůstá jejich bod tání nebo varu. PAH s vyšší molekulovou hmotností jsou sorbovány na partikulárních částech, a proto nejsou volně přítomné v ovzduší [2, 4, 11, 15].

2.3. Výskyt

PAH jsou široce rozšířeny v životním prostředí a byly detekovány prakticky ve všech jeho složkách, jak v průmyslových oblastech, tak i v oblastech velmi vzdálených od průmyslových a městských center. Doba setrvání PAH v různých částech prostředí je různá a závisí na vlastnostech dané sloučeniny i prostředí. Nejdelší doba kumulace byla zjištěna pro sedimenty.

Díky své schopnosti dlouhodobého přetrvávání v životním prostředí jsou právoplatně považovány za typické představitele perzistentních organických polutantů (POP), tzn., že mají velkou schopnost odolávat přirozeným rozkladným procesům. PAH jsou převážně vázány na povrch tuhých částic, avšak vyskytují se také v plynné fázi. Zájem se soustřeďuje především na PAH adsorbované na povrchu částic, protože tyto představují větší riziko pro zdraví člověka i ostatních živých organismů, než PAH přítomné v plynné fázi.

Distribuce PAH v atmosféře probíhající mezi plynnou a tuhou fází je určena řadou faktorů, z nichž tenze par (která je funkcí teploty), množství tuhých částic a jejich povrch (vhodný pro sorpci) a afinita jednotlivých PAH k matici jsou nejdůležitější. Předpokládá se, že až 75 % PAH je sorbováno na nejjemnější frakce tuhých částic, tzn. respirabilních submikronové velikosti (PM₁). Těkavější PAH (s výjimkou fluorantenu) jsou vázány na částice hrubší (PM_{2,5} nebo PM₁₀) jako produkt kondenzace [2, 4, 11].

2.4. Původ PAH

PAH vznikají především během spalování fosilních paliv a to zejména při jejich nedokonalém spalování. Do prostředí se mohou dostat dvěma různými způsoby:

- Antropogenní zdroje (spalování fosilních paliv, výroba koksu, hliníku, rafinace odpadních látek, zpracování ropy, požáry, spalování odpadů, cigaretový kouř)
- Neantropogenní zdroje (vulkanická činnost, biochemická syntéza mikroorganismů).

Do těla člověka se dostávají především z potravy nebo z ovzduší. Obsah PAH v potravinách je různý a zpravidla závisí na jeho tepelné úpravě. Při grilování, uzení nebo pečení, tj. při kulinárních úpravách, kdy se dosahuje teplot nad 200°C, je koncentrace PAH

větší. Navíc kuřáci si dopříváním cigarety zvyšují přirozený přísun PAH do těla, což již bylo vědecky dokázáno; tak si ohrožují své zdraví výrazněji než nekuřáci.

Každý zdroj emisí PAH je charakteristický určitým typickým (byť malým) množstvím sloučenin. Např. doprava je zdrojem těžkých PAH, jako jsou koronen a benzo(ghi)perylene, spalovací procesy jsou zdrojem fluorantenu a pyrenu, přičemž pro spalování uhlí je charakteristická přítomnost sirných heterocyklických polyaromatických sloučenin (benzonaftothiofeny, dibenzothiofeny aj.) [2, 3, 11].

2.5. Nebezpečné vlastnosti

Nejzávažnější problém týkající se polycyklických aromatických uhlovodíků je ten, že se jedná o látky mutagenní a karcinogenní, které mají svůj velký podíl na vzniku nádorů. Nejznámější karcinogen této skupiny organických látek je benzo[a]pyren. Díky této negativní vlastnosti se obsah PAH ve vzduchu nebo v potravinách začal více zjišťovat. Obsah polycyklických aromatických uhlovodíků je vyjadřován jako Σ PAH, tzn. součet jednotlivých PAH. Podle US EPA bylo pro hodnocení zvoleno 16 základních PAH. Mezi ně patří: naftalen, acenaftyleen, acenaften, fluoren, fenanthren, anthracen, fluoranthen, pyren, benz(a)anthracen, chrysen, benzo(b)fluoranthen, benzo(k)fluoranthen, benzo(a)pyren, indeno(123cd)pyren, dibenz(ah)anthracen a benzo(ghi)perylene [2, 3].

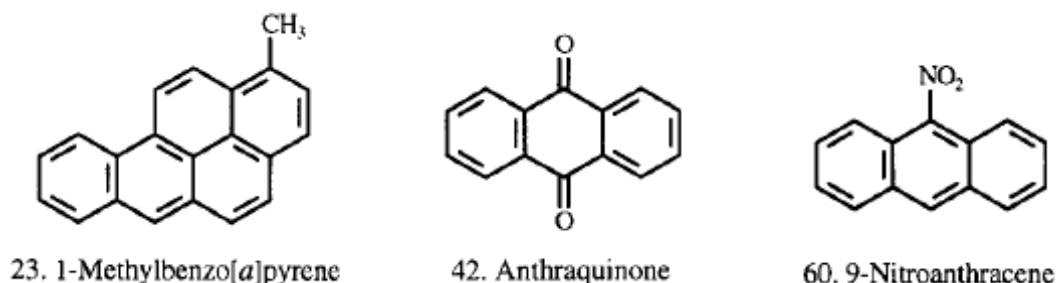
2.6. Osud v prostředí

PAH jsou látky v prostředí stabilní, a proto jsou považovány za POPs. Rychlost jejich následného rozkladu v ovzduší je ovlivňována zejména nosičem, na kterém jsou sorbovány. Vyskytují se totiž zpravidla vázané na partikulárních částicích. Fotooxidační rozklad pomocí slunečního záření je díky sorpci na popílku nebo sazích zpomalen ve srovnání s reakcemi probíhajícími v roztoku. Naproti tomu mohou být katalytickým působením nosiče urychlovány reakce PAH s ostatními složkami v atmosféře. Může tak dojít například k oxidaci za vzniku hydroxyderivátů nebo chinonů; s oxidy dusíku k nitraci apod. Z atmosféry jsou PAH odstraňovány také sedimentací částic na zemský povrch, což se projevuje následnou kontaminací rostlin, půdy a také vodních zdrojů. V půdě jsou potom PAH rozkládány půdními bakteriemi [19].

3. SUBSTITUOVANÉ POLYAROMÁTY

3.1. Úvod

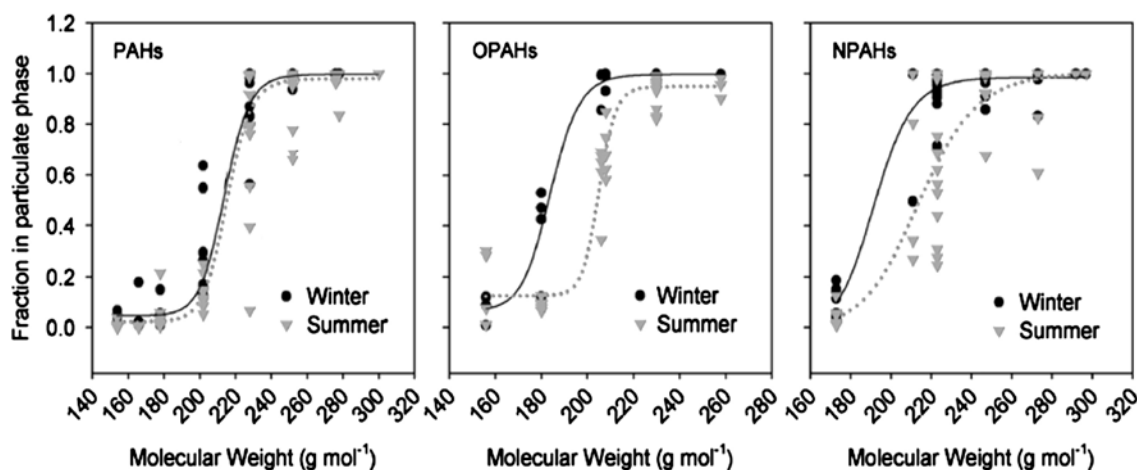
V životním prostředí se nevyskytují pouze základní PAH, ale byly zde detekovány i jejich deriváty. Nejvýznamnější substitučními deriváty jsou nitro-, oxy-, hydroxy- a alkyl-PAH.



Obr. č. 3: Některé příklady substituovaných PAHs [5]

3.1.1. Formy výskytu

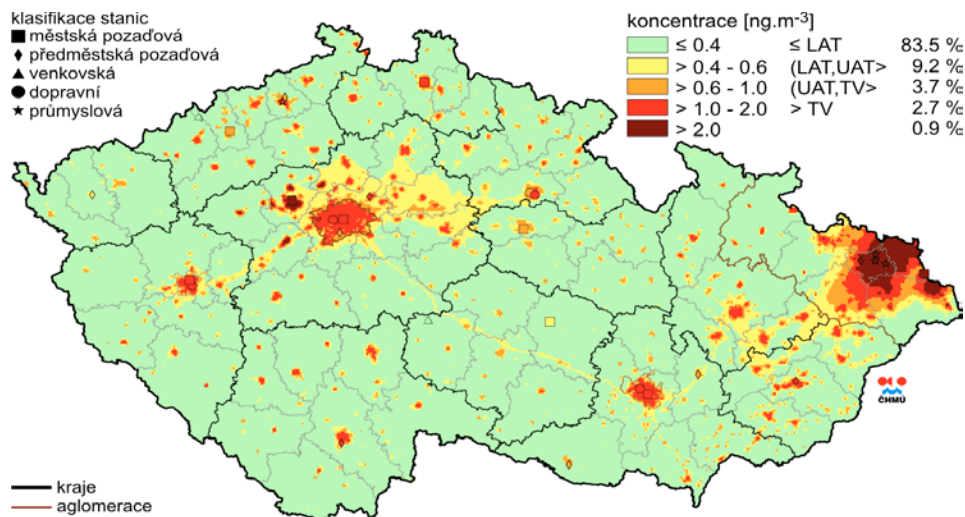
Významnou vlastností derivátů polycyklických aromatických uhlovodíků je také bezesporu jejich forma výskytu v ovzduší. V atmosféře se mohou nacházet v plynné fázi, případně mohou být vázány na povrchu pevných částic. Zpravidla bývají partikulárně vázány spíše PAH s větší molekulovou hmotností (obsahují většinou více jak 4 aromatická jádra). Jejich výskyt závisí též na ročním období.



Obr. č. 4: Výskyt partikulárních frakcí PAH, oxy-PAH a nitro-PAH v zimě a létě v závislosti na molekulové hmotnosti [8]

Dalším důležitým faktorem majícím vliv na produkci a výskyt PAH v ovzduší je i lokalita. Ve velkých městských aglomeracích bude jejich výskyt větší než na vesnicích, neboť doprava a průmysl jsou zde zastoupeny v mnohem větší míře. Z každoročně publikované zprávy o kvalitě životního prostředí v České republice, vydávané Ministerstvem životního prostředí ČR vyplývá, že v roce 2008 byl benzo(a)pyren sledován na 29 stanicích, z toho na 17 stanicích došlo k překročení cílového imisního limitu (58,6 % stanic). Počet stanic s překročením cílového imisního limitu se v porovnání s rokem 2007 snížil. Území, kde došlo k překročení

cílového imisního limitu benzo(a)pyrenu, představuje 3,6 % území státu. Velmi zatížená oblast je Ostravsko a dále Praha, kde se projevuje velký vliv dopravy, v Ostravě navíc ještě vliv průmyslu. V Ostravě-Bartovicích byl cílový imisní limit překročen více jak 9x (roční průměrná koncentrace 9,3 ng.m⁻³).



Obr. č. 5: Pole roční průměrné koncentrace benzo(a)pyrenu v ovzduší v roce 2008 [10]

Rozložení vázaných polycyklických uhlovodíků a jejich derivátů má rovněž významný vliv na posuzování jejich škodlivosti, neboť větší částice se usazují v horních cestách dýchacích, zatímco menší částičky se mohou snadno dostat až do plicních sklípků [8, 9, 10].

3.2. Vznik substituovaných PAH a jejich zdroje

3.2.1. Nitro-deriváty polycyklických aromatických uhlovodíků

Nitro-deriváty polycyklických aromatických uhlovodíků se vyskytují v životním prostředí, zejména v atmosféře. Vznikají buď z primárních zdrojů, nebo v důsledku environmentálních reakcí základních, nesubstituovaných PAH v ovzduší.

Mezi primární zdroje patří především spalování paliv v dieselových motorech, při kterém se uvolňují výfukové plyny, kterých jsou součástí.

Druhý způsob je nitrace mateřských polycyklických aromatických uhlovodíků v plynné fázi. Tato reakce však může probíhat buď:

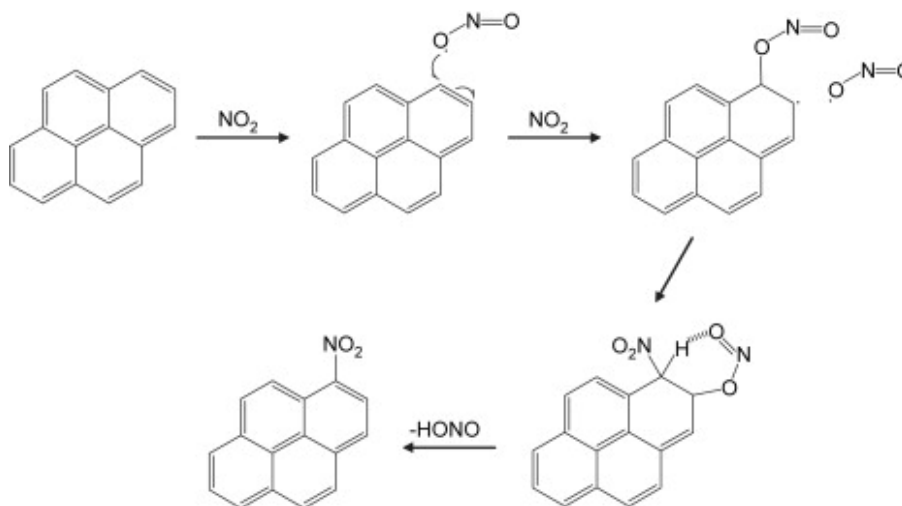
- Ve dne
- V noci

Ve dne dochází k reakci PAH s hydroxylovým radikálem OH*. Tento radikál napadá aromatické jádro na pozici s nejvyšší elektronovou hustotou. Následným krokem je adice NO₂, ztráta vody a vznik výsledného nitro-derivátu PAH (NPAH).

V noci je vznik NPAH obdobný, ale na místo hydroxylového radikálu OH* se využívá radikálu nitrátového NO₃* v přítomnosti oxidů dusíku NO_x. Tento NO₃* radikál napadá

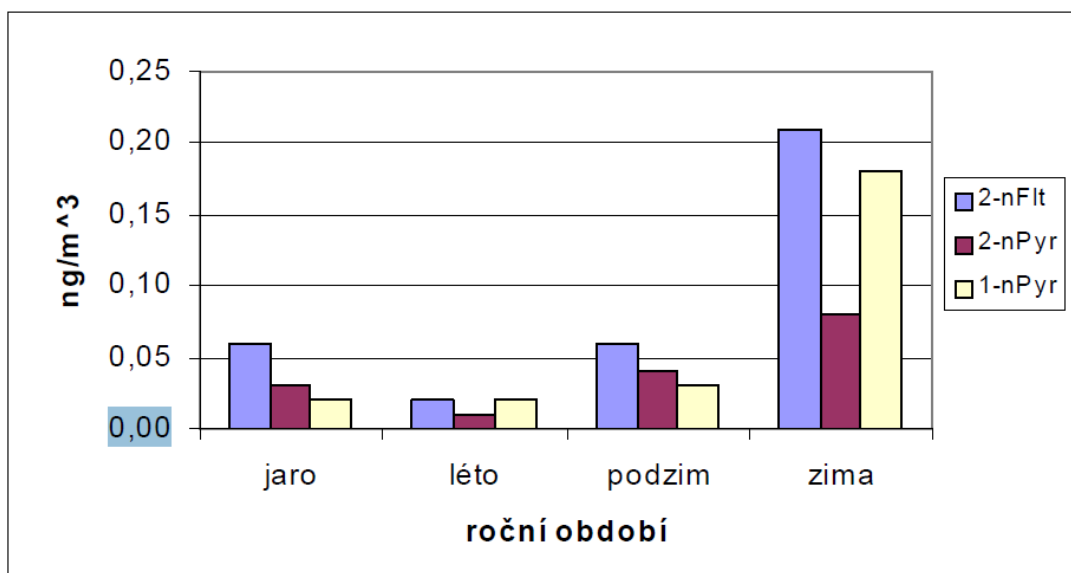
rovněž aromatické jádro v místě nejvyšší elektronové hustoty, následně potom dochází k navázání NO_2 a závěrečným krokem je odštěpení kyseliny dusičné HNO_3 [6].

Na základě studie K. Mieta [12] lze vypožorovat, že NPAH mohou dále vznikat i heterogenickou reakcí PAH s NO_2 za tmy, jak je patrné na obrázku č. 6:



Obr. č. 6: Mechanismus nitrace pyrenu [12]

Nitro PAH se v ovzduší vyskytují v koncentracích o několik řádů nižších než mateřské PAH. V Aténách byl v roce 1996 prováděn monitoring ovzduší a ukázalo se, že koncentrace nitro-PAH byla nejvyšší v zimním období, pravděpodobně prioritním působením klimatických změn ovlivňujících distribuci těchto látek. Ke zvýšení koncentrací v tomto ročním období přispívá rovněž využívání pevných paliv k vytápění domácností.



Obr. č. 7: Sezónní koncentrace některých nitroPAH v ovzduší Atén roku 1996 [20]

Koncentrace nitroderivátů PAH vzniklých atmosférickou reakcí jsou většinou úměrné koncentracím oxidů dusíku (NO_x). Pouze 3-nitrofenanthren a 4-nitrofenanthren korelovaly s

NO_x negativně; byly jedinými nitro-PAH pozitivně korelujícími s koncentracemi přízemního ozonu, což svědčí o jiném mechanismu jejich vzniku v atmosféře [20].

3.2.2. Alkyl-deriváty polycyklických aromatických uhlovodíků

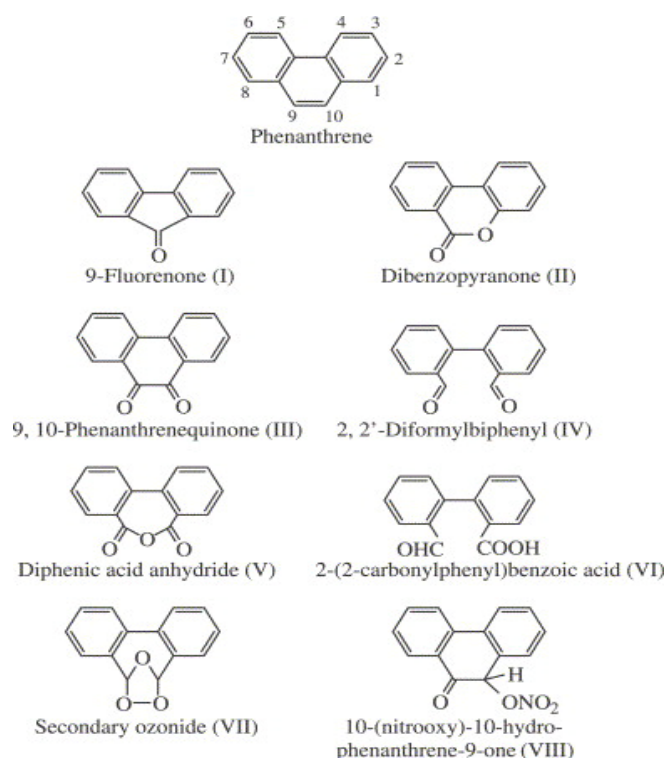
Alkyl deriváty polycyklických aromatických uhlovodíků se opět dostávají do ovzduší jako součást emisí dieselových motorů, jelikož jsou již přítomny v palivové směsi pro motory. Vyskytují se v něm zejména methyl deriváty naftalenu, fenantrenu, dibenzothiofenu a fluorenu. Přítomny jsou však také ethyl deriváty [7].

3.2.3. Oxy-deriváty polycyklických aromatických uhlovodíků

V kontrastu s mateřskými PAH, které se dostávají do životního prostředí zejména při spalovacích dějích, se oxy-deriváty dostávají do atmosféry buď ze spalovacích procesů, nebo troposférickou přeměnou základních polycyklických aromatických uhlovodíků v atmosféře. Tyto deriváty se získávají formováním ze základních polycyklických derivátů pomocí fotochemických reakcí nebo reakcí s hydroxylovým radikálem, NO₃ radikálem nebo ozonem.

PAH, které se vyskytují v plynné fázi, podléhají zejména reakcím s hydroxylovým radikálem (během dne) nebo s NO₃ radikálem (během noci); ozon hraje v tomto případě spíše vedlejší roli.

PAH, vázané na částice obsahující více jak 5 aromatických kruhů a jsou méně náchylné na reakce s radikály. Nicméně podléhají transformačním reakcím, kterými je především fotolýza, avšak s pomalejší kinetikou než ve fázi plynné. Delokalizace elektronů jim umožňuje absorbovat sluneční světlo a tím může dojít k fotooxidaci za atmosférických podmínek [8].



Obr. č. 8: Fenanthren a jeho možné oxy-deriváty [13]

4. TOXIKOLOGICKÉ VLASTNOSTI

4.1. Základní pojmy

Polycyklické aromatické uhlovodíky mají mutagenní a karcinogenní účinky. Prokázaná karcinogenita byla již zjištěna u benzo(a)pyrenu. Takto negativní účinky však nevykazují všechny PAH.

Tabulka č. 1: Relativní karcinogenní potenciál některých PAH (vztaženo k benzo(a)pyrenu pro myši a králíky)[11]

látk	relativní karcinogenní potenciál	mutagenita
benzo(b)fluoranten	$5 \cdot 10^{-5}$	?
benzo(a)antracen	$1 \cdot 10^{-3}$	+
antracen	$6 \cdot 10^{-7}$	-
benzo(a)pyren	1	+
dibenzo(ah)antracen	$3 \cdot 10^{-1}$	+

Podle mutagenních efektů pak lze PAH dělit na mutageny:

- Přímé
- Nepřímé

Přímé mutageny mají negativní mutagenní účinky i přesto, že neprošly systémem mikrosomálních enzymů, kterým prochází většina cizorodých látek, které se dostanou do těla. Jejich mutagenní vlastnosti jsou dány reaktivitou jich samotných.

Nepřímé mutageny při vstupu do organismu nejsou samy o sobě mutagenními, ale působením mikrosomálních enzymů (především pak cytochromu P450) vznikají vysoce mutagenní produkty.

Mikrosomální enzymy metabolizují přeměnu PAH zejména v játrech při tzv. první fázi detoxikačního cyklu. Cílem tohoto děje je přeměna látek lipofilních na látky hydrofilní, které pak lze z organismu vyloučit. Druhou fází cyklu je exkrece, při níž dochází ke konjugaci hydrofilního produktu s endogenními látkami, např. s glutationem, kyselinou glukuronovou apod. a následuje vyloučení z organismu [11].

4.2. Nitro-deriváty PAH

Nitro-PAH je skupina s početným zastoupením (na více jak 200 různých sloučenin). Navzdory tomu, že jsou chemicky velmi dobře stabilní, jsou v organismu snadno metabolizovány. Bývají řazeny mezi karcinogeny přímé a některé z nich dokonce mají také mutagenní vlastnosti. Předpokládá se, že nitro-PAH jsou zodpovědné za 90 % veškeré mutagenity ve výfukových plynech; z toho připadá na 1-nitropyren dokonce až 20% podíl. Největší množství nitro-PAH emitují motory naftové (zhruba 1,5-5 μg 1-nitropyrenu na kilometr). Benzínové motory s katalyzátorem pak emitují přibližně 10-krát menší množství NPAH.

Mutagenita a karcinogenita nitroderivátů závisí rovněž na poloze nitro skupiny na aromatickém jádře, a proto je rozdílná u geometrických izomerů. Např. 1-, 2- a 3-nitrobenzo(a)pyren vykazovaly značnou mutagenitu, kdežto izomer 6-nitrobenzo(a)pyren vykazoval mutagenitu slabou. Tento vliv polohy nitro skupiny je vysvětlován nejen orientací nitro skupiny, ale také mírou interakce nitro skupiny s π -systémem kondenzovaných aromatických kruhů. Síla mutagenity pak vzrůstá s mírou interakce.

Dinitroizomery NPAH všeobecně vykazují vyšší mutagenitu než je tomu u mononitroizomerů. Roku 1997 byl izolovaný 3-nitrobenzantron (3-nitro-7H-benzo/d,e/anthracen-7-on) ze vzorků výfukových plynů naftových motorů a z částic nacházejících se v atmosféře. Tato látka byla definována jako nejsilnější mutagen, který byl kdy testován a nahradil tak na prvním místě 1,8-dinitropyren, který byl do té doby považován za nejsilnější bakteriální mutagen [11, 16].

4.2.1. Metabolismus nitro-PAH

Metabolismus nitro-derivátů polycyklických aromatických uhlovodíků závisí na vstupu do organismu, tj. zda jde o cestu respirabilní, nebo orální.

Při vdechování jsou nitroderiváty PAH metabolizovány v plicích za tvorby potenciálních mutagenních produktů – hydroxylovaných nitro-PAH, které dále přecházejí do krevního oběhu a následně do jater, někdy společně s nezemetabolizovanými nitro-PAH. V játrech, kde jsou ještě nezemetabolizované nitro-PAH metabolizovány rovněž na hydroxyl-nitro-PAH, dochází reakcí s kyselinou glukoronovou ke vzniku glukoronových konjugátů, které jsou sice z organismu vylučovány, avšak ve střevech může docházet k jejich štěpení, a to působením β -glukuronidázy opět na hydroxyl-nitro-PAH, které pak představují potencionální karcinogeny ve střevech.

Při orálním vstupu nitroderivátů PAH do organismu je většina nitro-PAH metabolizována ve střevech a vyloučena do 48 hodin. Ve střevech dochází k metabolické nitroredukci na příslušné aminoderiváty PAH, přičemž míra jejich nitroredukce závisí na poloze nitro skupiny. Aminoderiváty PAH jsou dále metabolizovány v játrech cestou acetylace a následné hydroxylace. Hydroxylované acetyl-amino-PAH jsou pak vylučovány buď samotné, nebo v konjugované formě [11].

4.3. Oxy- a hydroxy-deriváty PAH

Tyto substituenty také podléhají metabolismu mikrosomálních enzymů a mohou se do těla dostat přímo z atmosféry, kde se vyskytují vázány na partikulárních částicích; případně mohou v organismu vznikat přeměnou jiných derivátů polycyklických aromatických uhlovodíků (zejména nitro-PAH) [11].

4.4. Alkyl-deriváty PAH

Alkylované substituenty polycyklických aromatických uhlovodíků se vyznačují tím, že mají zpravidla stejnou toxicitu jako mateřské, nesubstituované PAH, neboť alkylový zbytek nemá větší vliv na toxicitu. Z tohoto hlediska se alkyl-PAH věnuje při analýzách nejmenší pozornost [14].

5. VZORKOVÁNÍ A IZOLACE PAH Z ENVIRONMENTÁLNÍCH MATRIC

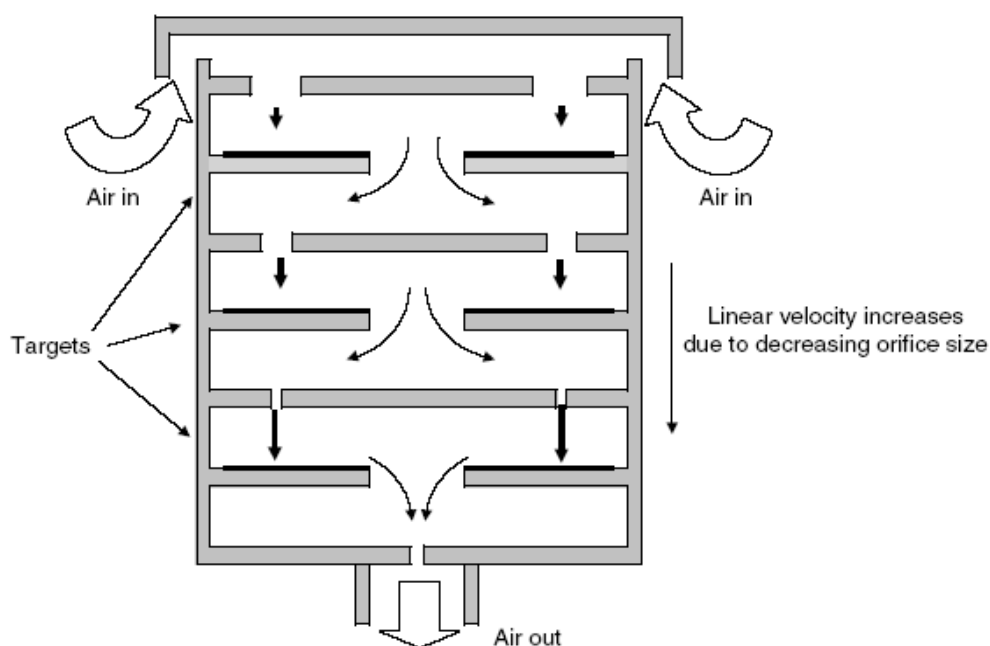
Všechny analytické postupy popsané pro identifikaci a kvantifikaci PAH jsou vesměs prováděny v následujících krocích: odběr vzorku, následná izolace PAH ze vzorku, zakoncentrování izolovaného analytu a jeho vlastní stanovení. Volba jednotlivých metod je vždy ovlivněna druhem vzorku a požadavky na analýzu; také musí být zohledněno vybavení dané laboratoře.

5.1. Vzorkování

Podstatná část polycyklických aromatických uhlovodíků je v atmosféře sorbována na pevných částicích (PAH se čtyřmi a více benzenovými jádry) a proto odběr vzorku spočívá především na zachycení těchto částic.

Sedimentační metoda není příliš vhodná, neboť se při ní vzorek obohacuje částicemi o průměru vyšším jak 20 μm . Tyto částice však nepronikají do dýchacích orgánů a proto takto odebraný vzorek pak není reprezentativní. Nejčastěji používanými metodami jsou metody aspirační, při kterých je vzorek prosáván čerpadlem přes filtr ze skelných vláken, na kterém se částice zachycují. Povrch vláken bývá většinou silanizován, aby se zabránilo nežádoucí sorpci na aktivních centrech. Odběry se provádí většinou krátkodobé, aby PAH nebyly vystavovány dlouhodobému vlivu NO_2 , O_3 a nedocházelo tak ke zkreslení. Navíc může docházet i k následné desorpci.

Při odběru pomocí impaktorů se zachycované částice dělí na frakce podle velikosti částic. Jejich oddělenou analýzou lze zjistit, jak závisí obsah stanovované složky na velikosti částic přítomných v atmosféře. Toto dělení je důležité také z toxikologického hlediska, neboť nejmenší prachové částice se mohou dostat až do plicních sklípků.



Obr. č. 9: Schéma kaskádového impaktoru [17]

Odběr vzorků musí dále zohledňovat fakt, že část 2 až 4 jaderných aromátů se vyskytuje v plynné fázi. Odběrové zařízení se proto skládá ze dvou částí, z nichž ta první má za úkol mechanicky zachytit prachové částice a druhá pak sorbovat plynné PAH. K zachycení prachových částic se využívají filtry zhotovené z křemenných nebo skleněných mikrovláken. Sorpce plynných PAH může probíhat buď v sorpční koloně naplněné polymerním sorbentem (např. Amberlite XAD-2) nebo ve válci z polyurethanové pěny (PUF). Polymerní sorbent lze přechytit před použitím dichlormethanem v Soxhletově přístroji. PUF se čistí podobným způsobem, avšak pro extrakci se používá aceton. Polyurethanová pěna je využívána častěji.

Po skončení odběru vzorků je třeba zaznamenat objem prosátého vzduchu a meteorologické podmínky (směr a rychlost větru, teplota, atmosférický tlak, intenzita slunečního svitu, srážky a výška sondy nad povrchem terénu). Filtry a válce se poté zabalí do hliníkové folie, která zabrání fotolýze a umístí se do vzduchotěsných nádob. Takto ošetřené vzorky lze při laboratorní teplotě skladovat až 4 týdny, aniž by došlo k degradaci nebo ztrátě zachycených PAH. Zachycené PAH lze dělit na :

- PAH, které jsou při normální teplotě těkavé a jsou zachyceny převážně v PUF nebo sorbentu (naftalen, fenanthren, anthracen)
- PAH, které jsou zčásti zachyceny na filtru a zčásti na PUF nebo sorbentu (pyren, fluoranthen)
- PAH, které mají nepatrnou těkavost a jsou zachyceny na prachových částicích na filtru (benz[a]anthracen, benzo[a]pyren) [19].

5.1.1. Vzorkování pomocí bioindikátorů

Vhodným bioindikátorem pro zhodnocení úrovně kontaminace PAH a jiných organických polutantů znečišťujících atmosféru může být vegetace, případně její jednotlivé části. Nejčastěji jsou v případě PAH a jejich derivátů využívány vyšší rostliny. Nálezy polycyklických aromatických uhlovodíků v rostlinách jsou dány morfologií rostlin, délkou vegetačního období a vlivem okolních podmínek, tj. zejména teplotou, slunečním svitem a množstvím srážek. Mezi nevýhody rostlinných bioindikátorů patří jejich omezená dostupnost na různých místech a též různá variabilita vlastností majících vliv na měření (charakter a plocha povrchu, tvar, apod.). Jako osvědčený bioindikátor pro PAH a nitro-PAH se projevil smrk ztepilý (*Picea abies*). Povrchový vosk na jehličí dobře zachytává zejména PAH obsažené v plynné fázi [20].

5.1.2. Pasivní vzorkování

Pasivní vzorkování se využívá při dlouhodobém sledování kontaminace, tj. při několikaletých monitorovacích studiích, neboť jsou málo citlivé na náhodné extrémní změny v koncentraci polutantů. Principem je proudění vzduchu kolem určitého sorbentu, na kterém se polutanty zachytávají. Řídící a separační proces je založen na různé koncentraci škodlivin obsažených v životním prostředí a v sorpčním médiu. Pro PAH a jejich deriváty je vhodná metoda SPMD (Semipermeable Membrane Device). Jedná se o trubici tvořenou polyethylenem o nízké hustotě (LDPE) bez aditiv, která je naplněná 1 ml trioleinu o minimální čistotě 95 %. Organické polutanty difundují přes semipermeabilní membránu

z okolního prostředí do trioleinu. Zachycené analyty se následně izolují dialýzou v prostředí nepolárního rozpouštědla, tj. n-hexanu nebo pentanu a následně se zpracují. Jejich výhodou pro izolaci PAH a jejich derivátů, jakými jsou například nitro-PAH, je především možnost stanovit tyto POPs přítomné v ovzduší, v půdách, ve vodách i v sedimentech [20].



Obr. č. 10: SPMD zařízení [26]

5.2. Izolační metody

Izolační metody jsou odlišné, jedná-li se o aromáty zachycené v prachových částicích na filtru, a nebo pro aromáty sorbované na PUF pěně nebo polymerním sorbentu. Nejtěžší je izolace PAH z prachových částic; pro tento analytický krok existuje odlišných metod [19].

5.2.1. Extrakce v Soxhletově přístroji

Jedná se o extrakci rozpouštědlem. Extrakčními činidly jsou nejčastěji benzen nebo toluen, případně směsi těchto rozpouštědel s methanolem, ethanolem nebo isopropanolem. Polárnější rozpouštědlo sice zvyšuje výtěžek extrakce, současně však stoupá obsah balastních látek v extraktu. Extrakční činidlo může ovlivňovat chemickou stabilitu analytu. Látky citlivé na teplo je proto třeba extrahovat za pokojové teploty. Látky náchylné na oxidaci vzdušným kyslíkem je vhodné extrahovat v inertní atmosféře. S ohledem na fotolabilitu a snadnou oxidovatelnost PAH je doporučeno chránit extraktor před světlem zabalením do hliníkové folie. Velkou nevýhodou této metody je dlouhý časový interval; tato extrakce trvá 8-24 hodin [19, 8, 22].

5.2.2. Extrakce pomocí ultrazvuku (USE)

Používáním ultrazvukových lázní pro extrakci se docílí toho, že se vzorek v roztoku intenzivně pohybuje, přičemž se mohou rozpadat shluky částic. Výhoda tohoto procesu tkví v tom, že se doba extrakce snižuje zhruba na 15-30 min. Filtr se vloží do baňky, převrství

např. směsí dichlormethan-methanol a baňka se umístí do ultrazvukové lázně. K dosažení maxima extrakce je důležité, aby hladina vody v ultrazvukové lázni byla vždy ve stejné výši a hladina rozpouštědla v baňce ve stejné výši s hladinou vody v lázni. Musí se brát ohled také na výběr rozpouštědla. Lintelmann [8] zjistil, že použití ethylacetátu jako extrakčního činidla při USE mělo za následek zvýšení účinnosti extrakce benzo[a]pyrenedionů, a to v porovnání s extrakcí směsí methanol-toluen. Dalším důležitým faktorem při této extrakci je teplota. Účinnost extrakce fenantren-9,10-dione, chrysen-5,6-dione a 4-oxa-benzo[def]chrysen-5-on vzrůstá s rostoucí teplotou, pokud jako extrakční činidlo použijeme ethylacetát, v porovnání s extrakcí benzo[a]pyrenedionů (zejména benzo[a]pyrene- 7,8-dione a benzo[a]pyrene-11,12-dione); v tomto případě dochází pravděpodobně k termickému rozkladu [8, 19, 22].

5.2.3. Extrakce kapalinou pod tlakem (PLE)

Další moderní typ extrakce, tzv. extrakce kapalinou pod tlakem (PLE) má za následek zvýšení účinnosti extrakce i s použitím konvenčních rozpouštědel (dichlormethan, acetonitril, methanol, atd.) při zvýšené teplotě (50-200 °C) a tlaku 0,3-21 MPa. Zvýšená teplota zvyšuje extrakční kinetiku a zvýšený tlak pak udržuje rozpouštědlo pod jeho bodem varu. Tento postup lze využít jak pro nitro deriváty, tak pro oxy deriváty PAH. Nutno však upozornit na to, že při teplotách nižších než 100 °C a tlaku menším než 10,7 MPa může dojít k degradaci nebo přesmyku chinonů PAH [22].

5.2.4. Extrakce tekutinou v nadkritickém stavu (SFE)

Metoda je vhodná pro extrakci PAH a jiných silně sorbovaných látek z popílků, půd, sazí, atd. K extrakci se většinou používá oxid uhličitý v nadkritickém stavu, který má podobné rozpouštěcí schopnosti jako hexan, avšak na rozdíl od tohoto rozpouštědla má podstatně nižší viskozitu, což zlepšuje přenos hmoty. Pro extrakce OPAH a NPAH se využívá při aplikaci této metody dvou kroků. V prvním kroku je vzorek extrahován čistým CO₂ (140 °C, 15,2 MPa); při tomto kroku se odstraní nepolární sloučeniny, jakými jsou například alifatické uhlovodíky a některé PAH. Druhý krok spočívá ve využití směsi toluen-CO₂ (5:95 v/v, 90 °C a 35,5 MPa) a při tomto kroku se vyextrahují výsledné nitro a oxy deriváty. Účinnost této metody se pohybuje v rozmezí 87-99 %. Výhodou je také skutečnost, že spotřeba rozpouštědla je při této metodě zhruba 6x menší než při USE [8, 19, 22].

5.3. Zakoncentrování PAH

V extraktu izolovaném ze vzorku se vedle PAH vyskytují rovněž další látky, které mohou rušit nebo zcela znemožnit vlastní analýzu. K odstranění těchto látek se používá nejčastěji kolonová (sloupcová) nebo gelová chromatografie. Metody jako extrakce kapalina-kapalina a chromatografie na tenké vrstvě se v současnosti využívají méně často.

Chromatografie je separační proces založený na rozdělování sloučenin mezi dvě navzájem se nemísící fáze, mobilní (pohyblivá) a stacionární (nepohyblivá). Vzorek je nanášen na počátek stacionární fáze a následným pohybem mobilní fáze přes stacionární fázi je vzorek unášen. Složky vzorku mohou být při přenosu stacionární fázi zachycovány, a proto se při

přenosu zdržují. Ty složky, které jsou ke stacionární fázi poutány silněji, se zdrží déle. Díky tomuto jevu se složky od sebe postupně separují a na konec stacionární fáze se tak dostávají nejprve složky méně zadržované. Chromatografii lze dělit podle různých kritérií, z nichž nejznámější jsou následující tři:

1. Podle skupenství mobilní fáze
 - Kapalinová chromatografie (LC)
 - Plynová chromatografie (GC)
2. Podle uspořádání stacionární fáze
 - Kolonová chromatografie
 - Plošné techniky (papírová PC; tenkovrstvá chromatografie TLC)
3. Podle povahy děje při separaci
 - Rozdělovací chromatografie
 - Adsorbční chromatografie
 - Ionově-výměnná chromatografie
 - Gelová chromatografie
 - Afinitní chromatografie [19,21].

5.3.1. Kolonová (sloupcová) chromatografie

Při sloupcové chromatografii se jako stacionární fáze využívá silikagel s vyšším zrněním nebo alumina; v tomto případě mobilní fáze protéká kolonou dostatečnou rychlostí pouhým působením gravitace. Vzorek se nanese na kolonu v nepolárním rozpouštědle (petrolether, hexan) a z kolony se pak nasycené uhlovodíky vymývají. Polární látky zůstávají sorbovány na koloně. Nevýhodou je to, že pro každý vzorek je třeba připravit novou kolonu [19, 24].

5.3.2. Gelová chromatografie

Při tomto typu chromatografie se pro izolaci využívá slabých interakcí PAH se skeletem gelu. Díky tomuto jevu jsou PAH eluovány až za pracovní oblastí gelu, zatímco velká většina ostatních látek je vylučována z pórů gelu dříve. Nejčastěji se využívají gely styren-divinylbenzenové s benzenem nebo tetrahydrofuranem jako mobilní fází. Eluáty se odpaří téměř do sucha a naředí se vhodným rozpouštědlem na požadovaný objem [19].

5.4. Přechištění extraktu

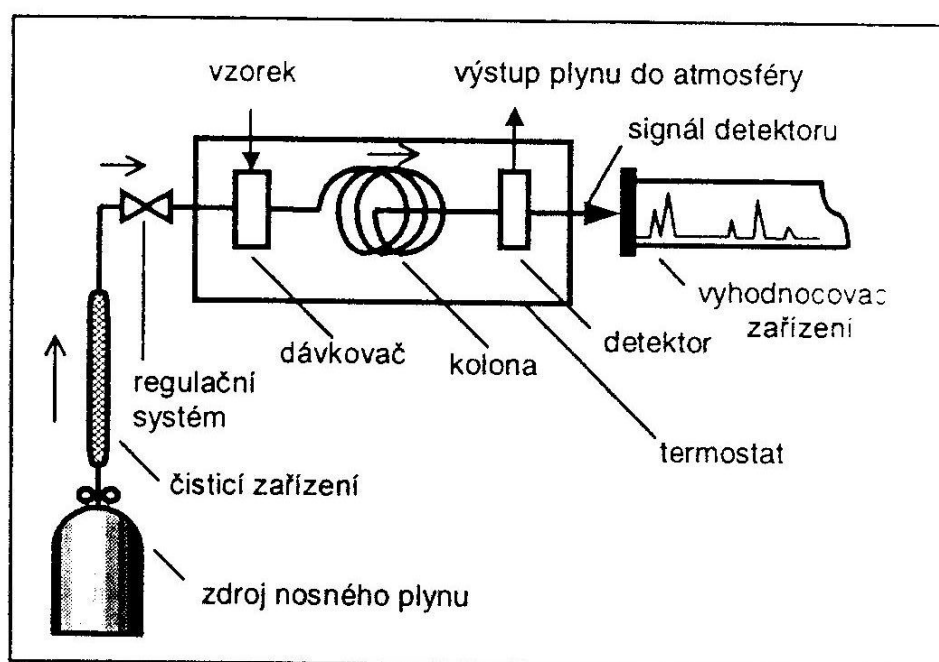
K přechištění extraktu se může použít postupná extrakce roztokem kyseliny a zásady. Tímto je možné docílit toho, že lze ze vzorku odstranit kyselé a bazické podíly, které mohou být následně podrobeny oddělené analýze. Polární látky se dají částečně odstranit extrakcí mezi nepolární rozpouštědla, jako jsou cyklohexan nebo pentan a směs methanolu s vodou [19, 24].

6. VÝSLEDNÁ ANALÝZA

Pro stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků a jejich derivátů v přečištěných extraktech se nejčastěji využívá kombinací chromatografických a spektrálních metod. Standardní postupy pracují buď s chromatografií plynovou a hmotnostně spektrometrickou detekcí (GC-MS) nebo je aplikována metoda kapalinové chromatografie se spektrofluorimetrickou detekcí nebo detekcí DAD [19].

6.1. Plynová chromatografie

Plynovou chromatografií (GC) lze považovat za nejrozšířenější metodu pro stanovení PAH. Schéma plynového chromatografu je zobrazeno na obr. č. 11:



Obr. č. 11: Schéma plynového chromatografu [21]

Důležitým a ovlivňujícím faktorem při plynové chromatografii jsou vysoké body varů těchto látek, a proto lze touto metodou stanovovat PAH s maximálně 7 aromatickými jádry. Zdrojem nosného plynu je tlaková láhev, která může obsahovat inertní plyny jako dusík, helium, argon nebo vodík. Vodík je nejčastěji využíván, ovšem jeho slabina tkví v jeho výbušnosti ve směsi se vzduchem. Volba nosného plynu závisí na druhu detektoru, kolon, avšak důležité je i ekonomické hledisko. Nosný plyn se dále čistí od různých nečistot a vlhkosti, například pomocí molekulárních sít.

Důležitým článkem plynového chromatografu je dávkovač. Ten umožňuje nanášet vzorek do proudu nosného plynu, a proto je nutné zajistit odpaření vzorku v co nejkratším čase. Vzorek je dávkován pomocí injekční stříkačky, zpravidla do objemu 10 μ l. Nástřik může být prováděn různými způsoby:

- Nástřik do kolony (on column)
- Nástřik pomocí děliče toků (split injection)
- Bezděličový nástřik (splitless injection)

Analýzy se provádí výhradně na kapilárních kolonách délky 12-50 m o vnitřním průměru 0,2-0,35 mm. Stacionární fázi bývá zpravidla polysiloxan se skupinami (např. 5% difenyl, 95% dimethyl); tato stacionární fáze je potom mírně polární. Vhodné nepolární fáze jsou na bázi poly(dimethylsiloxanu). Separace probíhá při programované teplotě kolony v rozmezí teplot 80-300 °C (při stanovení PAH už se dvěma aromatickými jádry) nebo při teplotách 140-300 °C, pokud analýza začíná přibližně u fluoranthenu [19, 21].

6.1.1. Plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem

K detekci PAH byl po dlouhou dobu využíván plamenový ionizační detektor (FID). Tento detektor je schopen detekovat aromatický uhlovodík, pokud je jeho hmotnost v nástřiku kolem 0,2-1 ng. Princip tohoto detektoru je založen na vedení elektřiny v plynech. Molekuly plynu se ionizují v kyslíkovodíkovém plameni a následně vedou proud mezi elektrodami. Přítomnost složky, kterou zjišťujeme, zvýší ionizaci a elektrický proud se tím zvýší. Organické látky se teplem štěpí na radikály, které následně reagují s vodíkem v redukční části plamene za vzniku radikálů CH^* . Ty se oxidují za vzniku iontů CHO^+ a elektronů, které jsou důležité pro odezvu detektoru. Odezva roste se zvyšujícím se počtem uhlíkových atomů poskytujících CHO^+ a díky tomu je tento detektor velmi vhodný pro uhlovodíky. FID však není selektivním detektorem. Abychom mohli využít plamenově ionizační detektor k detekci PAH, je nutné dokonalé vyčištění vzorku od ostatních složek, které mají stejné eluční objemy jako PAH. Díky své malé selektivitě je však tato metoda detekce na ústupu a upřednostňována je detekce s hmotnostním detektorem.

6.1.2. Plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickým detektorem GC-MS

GC-MS představuje optimální analytický postup, vhodný pro identifikaci a kvantifikaci PAH a jejich derivátů. I v tomto případě se využívá opět kolon kapilárních, které se připojují pomocí vyhřívané restriční kapiláry přímo k hmotnostnímu spektrometru. K detekci se využívají hmotnostní spektrometry malé, relativně levné, které pracují na bázi kvadrupolu nebo iontové pasti. Tato detekce má dvě výhody, pokud ji porovnáváme s detekcí pomocí FID:

- Snižuje mez detekce zhruba o jeden řád, což umožňuje zkrátit dobu odběru vzorku a snížit tak riziko ztrát při odběru [19]
- Zaznamenává selektivně analyty s vybranou molekulovou hmotností [19]

Druhý bod ovšem současně konstatuje nevýhodu, že spektra jednotlivých izomerů jsou prakticky totožná [19].

Při analýze se využívá jako nosného plynu helia. Je nutné, aby kapilární chromatografická kolona měla takovou účinnost, aby nedocházelo ke koeluci izomerů.

Nitro deriváty se většinou stanovují touto metodou. Stanovení vysokých koncentrací je bezproblémové. Problém nastává tehdy, je-li koncentrace nitro-PAH zhruba o 2 řády menší

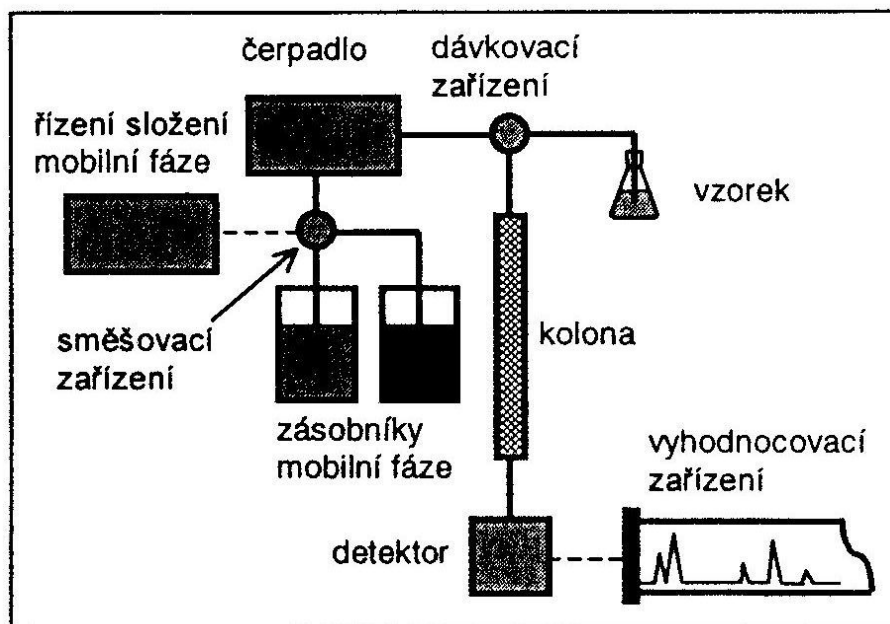
než koncentrace mateřských PAH; potom může být stanovení pomocí GC/MS-EI nedostatečné. Právě proto je v současnosti doporučována metoda HRGC/MS s využitím negativní chemické ionizace (NCI). Tato metoda se vykazuje vyšší mezí detekce, ale navíc interferující látky detekované jinými detektory nejsou v tomto případě analyzovány. To však neznamená, že odezvy nitro-PAH by nebyly ovlivňovány jinými složkami obsaženými v analytu, a proto je nezbytné dostatečné přečištění. V NCI nedochází k interferencím mezi PAH a nitro-PAH.

U některých sloučenin PAH může být malá odezva na použitou metodu; v tomto případě je nutné aplikovat derivatizaci, čímž se zlepšuje možnost detekce. Např. chinony PAH lze převést na jejich acetyl deriváty pomocí zinku a acetylacetátu. Naproti tomu jsou hydroxy-PAH derivatizovány silylací. Silylace probíhá za použití N,O-bis-trimethylsilyltrifluoroacetamidu (BSTFA) a trimethylchlorosilanu a pyridinu při teplotě 70 °C [19, 20, 22].

6.2. Kapalinová chromatografie (HPLC)

V kapalinové chromatografii je mobilní fází kapalina a tato metoda je preferována pro stanovení netěkavých analytů. O separaci složek obsažených ve vzorku rozhodují jejich interakce se stacionární fází, ale také se na ní podílí mobilní fáze. Během separace se analyt rozděluje mezi stacionární a mobilní fází a čas, který stráví v jedné nebo druhé fázi závisí na afinitě analytu ke každé z nich. Rozdíl ve využití kapalinové chromatografie (LC) pro stanovení PAH od chromatografie plynové je takový, že není omezena těkavostí PAH a lze proto pracovat již za laboratorní teploty. K separaci těchto látek se využívá nejčastěji kapalinové chromatografie s obrácenými fázemi, kde je nepolární stacionární fáze a polární mobilní fáze.

Jako stacionární fáze se uplatňuje silikagel, na kterém jsou chemicky vázány alkyly (oktadecyl, oktyl). K eluci pak slouží vodné roztoky methanolu nebo acetonitrilu. Dělení izomerů je v kapalinové chromatografii v některých případech lepší než v plynové chromatografii. K separaci se využívají klasické kolony o délce 15-25 cm a vnitřním průměru 3-4,6 mm, naplněné sférickými částicemi. Eluce se využívá tzv. gradientová. Nejprve jsou z kolony vymyty PAH s nižší molekulovou hmotností, a to mobilní fází s nejvyšším obsahem vody. Postupně se v mobilní fázi snižuje obsah vody a díky tomu tak vzrůstá eluční síla mobilní fáze. Tím se také zvyšuje eluce PAH s vyšší molekulovou hmotností a současně se rovněž zvyšují výšky píků na chromatogramu.



Obr. č. 12: Schéma kapalinového chromatografu [21]

Detekce v HPLC lze provádět pomocí spektrofotometrických detektorů, často umístěných v diodovém poli, které zaznamenávaly absorpci ultrafialového světla. Avšak vzhledem ke zvýšeným požadavkům na nízkou mez detekce a vyšší selektivitu začaly být rovněž používány spektrofluorimetrické detektory, a to především jako konfirmační metoda [19, 21].

6.2.1. Spektrofluorimetrická detekce

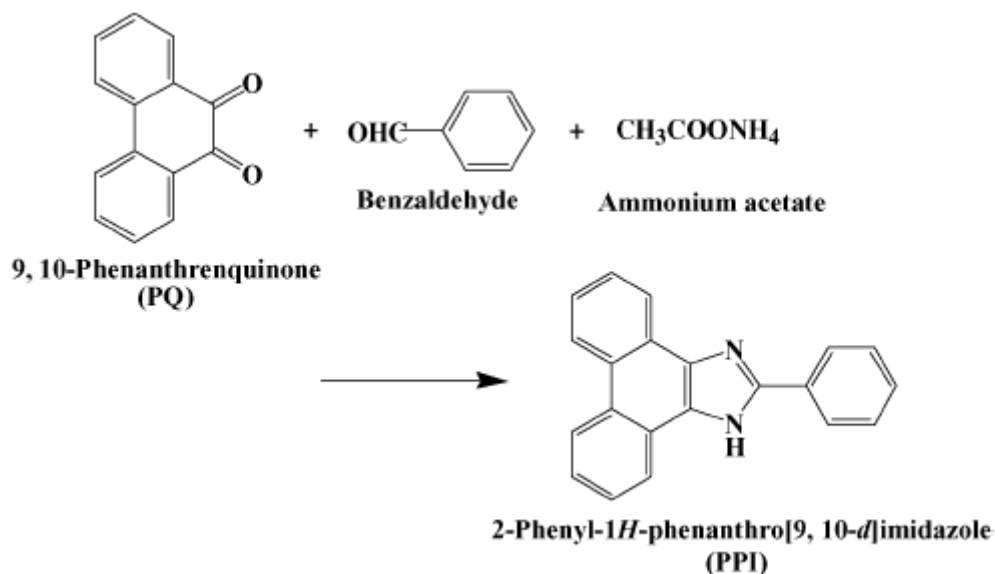
PAH mají systém snadno excitovatelných π -elektronů a díky tomu absorbují záření jak v ultrafialovém tak i ve viditelném spektru. Většina polycyklických aromatických uhlovodíků potom i při svém návratu do svého základního excitačního stavu produkuje fluorescenční záření, při velmi nízkých teplotách dokonce i záření fosforescenční. Fluorescenční emisní spektrum je charakteristické pro jednotlivé PAH, protože většina spekter má dobře patrnou vibrační strukturu.

Dokazování jednotlivých PAH je specifitější díky tomu, že spektrofluorimetrické detektory jsou schopny kromě výběru vhodné emisní vlnové délky provést i výběr excitační vlnové délky. Poměrem těchto vlnových délek lze zaznamenat určitou sloučeninu, i když se současně eluují jiné látky, jež také fluoreskují. Pro látky, které mohou podat dostatečně vysoký kvantový výtěžek fluorescence, je fluorescenční detekce 10 až 1000krát citlivější než detekce fotometrická [19].

Tabulka č. 2: Excitační a emisní vlnové délky některých PAH při fluorimetrické detekci[19]

sloučenina	λ_{ex} (nm)	λ_{em} (nm)
Fluoren, fenanthren	248	374
Anthracen, fluoranthren	232	420
Pyren, benz[a]anthracen	264	384
Chrysen, benzo[b]fluoranthren Benzo[k]fluoranthren, benzo[a]pyren Dibenzo[a,h]anthracen, benzo[ghi]perylene	295	405
Indeno[1,2,3-cd]pyren	300	500

Stanovení nitro-PAH pomocí fluorimetrické detekce je možné až po převedení (redukci) nitro skupiny na fluoreskující amino skupinu. Redukce se provádí on-line pomocí Ph/Pt katalyzátoru, avšak nutno upozornit na to, že vzniklé amino-PAH jsou značně nestálé. Také některé OPAH se vyznačují nízkou fluorescencí, zejména 9,10-fenanthrenchinon. Pokud však použijeme reakci s benzaldehydem v přítomnosti octanu amonného, vzniká 2-fenyl-1H-fenanthro[9,10-d]imidazol. Ten již vykazuje dostatečnou fluorescenci a dá se proto touto metodou dobře stanovit [20, 23].



Obr. č. 13: Reakční schéma fluorescenční derivatizace 9,10-fenanthrenchinonu [23]

7. NÁVRH STANDARDNÍHO OPERAČNÍHO POSTUPU PRO NPAH

Tento optimální postup, který by mohl tvořit základ standardního operačního postupu, byl zpracován pouze teoreticky, nebyl dosud experimentálně ověřen, což ani nebylo cílem předložené bakalářské práce.

Metoda spočívá v PSE extrakci následovaná přečištěním kolonovou chromatografií. Výsledná analýza je prováděna pomocí GC/MS.

7.1. Vzorkování

Odběr vzorku ovzduší probíhá pomocí vysokoobjemového vzorkovače s různými hlavicemi pro zachycení potřebných částic (PM_{10} , $PM_{2,5}$, atd.), a to nejméně po dobu 24 hodin. Využívá se přitom PUF filtrů nebo filtrů ze skleněných vláken. Filtry jsou pak následně uskladněny bez přístupu světla při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$ [24, 25].

7.2. Extrakce

NPAH extrakce probíhá na PSE extraktoru, kde je jako rozpouštědlo použit dichlormethan (DCM). Vzorek prachu o příslušné velikosti částic je společně se 3 g bezvodého síranu sodného naplněn do 11 ml extrakční nádoby a volné místo je vyplněno skleněnými korálky. Pro každý vzorek je nutné provést 2 extrakční cykly po 5 minutách, a to při teplotě $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ a tlaku 14 MPa. Extrakty se následně kvantitativně převedou do 40 ml vialek, odpaří se do sucha na vakuové rotační odparce při $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a rozpustí se ve 2 ml n-hexanu, cyklohexanu nebo dichlormethanu. Nerozpuštěný odparek lze v dalším podílu rozpouštědla rozpustit s využitím ultrazvuku [24].

7.3. Čištění extraktu od balastních látek

1000 μl surového extraktu rozpuštěného v organickém rozpouštědle je aplikováno na vrchol kolony naplněné silikagelem. Kolona, zpravidla o rozměrech 250 mm x 10 mm, se naplní 5 g aktivovaného silikagelu a jako poslední vrstva se ještě aplikuje 1-2 g bezvodého síranu sodného. Před samotným použitím extraktu se sloupec silikagelu promyje 10 ml n-hexanu. Eluci lze provádět s využitím n-hexanu, cyklohexanu, dichlormethanu (DCM) a methanolu, nebo použitím jejich směsí, čímž se získá nepolární, aromatická a následně polární frakce. Nejprve se použije 10 ml n-hexanu, následně 15 ml n-hexanu-DCM (1:1, v/v), 10 ml DCM a nakonec 10 ml směsi DCM-methanol. Frakce se vysuší, odparek se rozpustí ve 100 μl izooktanu a provede se analýza pomocí GC/MS [24, 25].

7.4. Výsledná analýza

Vlastní rozhodčí analýza NPAH izolovaných ze vzorku je nejčastěji prováděna na plynovém chromatografu s hmotnostní detekcí, a to za následujících chromatografických podmínek.

Kolona: 30 m x 0,25 mm i.d; 0,25 µm tloušťka vrstvy

Teplota: 70 °C po dobu 1 min, 25 °C/min do 180 °C, 10 °C/min do 290 °C, 25 min na 290 °C

Nástřik: splitless, uzavřen na 1 min, objem vzorku 2 µl, teplota 250 °C

Nosný plyn: Helium pod konstantním tlakem 150 kPa [24].

Tento postup může být použit pro monitorizační studie i pro kontrolní činnost.

8. ZÁVĚR

Tato bakalářská práce je zaměřena na problematiku substituovaných polycyklických aromatických uhlovodíků. Tyto látky se v životním prostředí vyskytují zejména jako důsledek negativní lidské činnosti. Bylo prokázáno, že největším zdrojem kontaminace je průmysl a doprava, především dieselové motory.

PAH a také jejich substituční deriváty, zejména nitro-, hydroxy- a alkyl- deriváty, jsou díky svým negativním účinkům, a to zejména karcinogenním a mutagenním, důsledně sledovány ve všech složkách životního prostředí.

Nejvyšší důraz je přitom kladen na sledování PAH nesorbovaných na prachových částicích, zejména těch, které označujeme $PM_{2,5}$. Tyto částice jsou díky své malé velikosti nejvíce nebezpečné. Důvodem je to, že se v organismu mohou dostávat až do plicních sklípků. V organismu jsou tyto látky rovněž metabolizovány a jejich negativní účinky, tj. karcinogenní a mutagenní, mohou být ještě zvětšeny.

Při stanovení PAH i jejich substitučních derivátů se klade velký důraz na vzorkovací procesy. PAH se vesměs vzorkují pomocí aktivních i pasivních vzorkovačů. V určitých případech, a to především při dlouhodobém sledování úrovně kontaminace těmito analyty, je možné využít i vhodné bioindikátory.

Pro izolaci PAH i substituovaných PAH z filtru se využívá řada extrakčních postupů, z nichž je nutné jmenovat Soxhletovu extrakci, ultrazvukovou extrakci, extrakci kapalinou v nadkritickém stavu apod. K čištění extraktu se vesměs využívá kolonová (sloupcová) chromatografie, případně gelová permeační chromatografie.

Vlastní chromatografickou separaci těchto analytů lze provést dvěma způsoby, a to buď plynovou chromatografií, nebo kapalinovou chromatografií.

Plynová chromatografie patří k často používaným postupům, jako vhodný detektor se nejlépe osvědčil hmotnostní detektor. Ionizace může být elektronová, ionizace polem, chemická ionizace, atd. Aby bylo možné stanovit všechny deriváty, je doporučována spíše metoda negativní chemické ionizace, která je optimální zejména pro stanovení nitro-PAH.

Druhou, rovněž hojně využívanou metodou, je vysokoúčinná kapalinová chromatografie se spektrofotometrickou detekcí. Pro tyto účely je nejvhodnější detektor DAD. Kromě toho se při detekci v případě využití kapalinové chromatografie rovněž využívá toho, že PAH i jejich substituční deriváty mají schopnost fluoreskovat, a proto je často při jejich stanovení aplikován fluorescenční detektor.

Součástí předložené bakalářské práce je také možná metoda pro jejich stanovení, jejíž princip byl popsán pouze na podkladě zpracované literární rešerše.

9. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. SOLOMONS, T. W. Graham; FRYHLE, Craig B. *Organic chemistry*. 8th ed. Hoboken : John Wiley & Sons, 2004. 1255 s. ISBN 0-471-44890-7.
2. HAVEL, Milan. [Http://www.bezjedu.arnika.org](http://www.bezjedu.arnika.org) [online]. 2010 [cit. 2010-10-21]. Budoucnost bez jedů. Dostupné z WWW: <<http://www.bezjedu.arnika.org/chemicke-latky/polycyklicke-aromaticke-uhlovodiky-pahs>>
3. TOMANIOVÁ, Monika; KOCOUREK, Vladimír; HAJŠLOVÁ, Jana. Polycyklické aromatické uhlovodíky v potravinách. *Chemické listy* [online]. 1997, 91, [cit. 2010-10-21]. s. 357-366. Dostupný z WWW: <http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1997_05_357-366.pdf>.
4. *Integrovaný registr znečišťování* [online]. 2005-2008 [cit. 2010-10-21]. Integrovaný registr znečišťování. Dostupné z WWW: <http://www.irz.cz/latky/polycyklicke_aromati>.
5. DURANT, John L., et al. Human cell mutagenicity of oxygenated, nitrated and unsubstituted polycyclic aromatic hydrocarbons associated with urban aerosols. *Mutation Research/Genetic Toxicology*. 20 December 1996, č. 371, s. 123-157.
6. BAMFORD, Holly A.; BAKER, Joel E. Nitro-polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations and sources in urban and suburban atmospheres of the Mid-Atlantic region. *Atmospheric Environment*. May 2003, č. 37, s. 2077-2091.
7. TANCELL, Paul J., et al. Diesel combustion of an alkylated polycyclic aromatic hydrocarbon. *Fuel*. May 1996, č. 75, s. 717-723.
8. WALGRAEVE, Christophe, et al. Oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate matter: Molecular characterization and occurrence. *Atmospheric Environment*. May 2010, č. 44, s. 1831-1846.
9. ALBINET, A., et al. Nitrated and oxygenated derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air of two French alpine valleys Part 2: Particle size distribution. *Atmospheric Environment*. January 2008, č. 42, s. 55-64.
10. *Ministerstvo životního prostředí* [online]. 2008 [cit. 2011-02-10]. Kvalita ovzduší. Dostupné z WWW: <http://mzp.cz/cz/kvalita_ovzdusi>.
11. FARA, Milan. *Český hydrometeorologický ústav* [online]. prosinec 2003 [cit. 2011-02-10]. Integrované hodnocení a řízení kvality ovzduší v návaznosti na dceřiné směrnice týkající se TK, PAHs, PM10 a benzenu. Dostupné z WWW: <http://old.lb.chmi.cz/uoco/prj/vav_740_3_02/dp1dod.pdf>.

12. MIET, K., et al. Heterogeneous reactivity of pyrene and 1-nitropyrene with NO₂: Kinetics, product yields and mechanism. *Atmospheric Environment*. February 2009, č. 43, s. 837-843.
13. WANG, Lin; ATKINSON, Roger; AREY, Janet. Formation of 9,10-phenanthrenequinone by atmospheric gas-phase reactions of phenanthrene. *Atmospheric Environment*. March 2007, č. 41, s. 2025-2035.
14. RHODES, Spencer, et al. The effects of dimethylated and alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons on the embryonic development of the Japanese medaka. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. March 2005, č. 60, s. 247-258.
15. HOLOUBEK, Ivan. *Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs) v prostředí*. Praha : Český ekologický ústav, 1996. 134 s. ISBN 80-85087-44-8.
16. PROUSEK, Jozef. *Rizikové vlastnosti látok*. 1. vydanie. Bratislava : Vydavateľstvo STU, 2001. 247 s. ISBN 80-227-1497-6.
17. REEVE, Roger N. *Introduction to Environmental Analysis*. Chichester: John Wiley and Sons Ltd., 2002. 301 s. ISBN 04-714-9295-7
18. DEAN, John R. *Methods for environmental trace analysis*. Chichester: John Wiley & Sons, 2003. 259 s. ISBN 04-708-4422-1
19. POPL, Milan; FÄHNRIK, Jan. *Analytická chemie životního prostředí*. 3. přepr.vyd. Praha : VŠCHT, 1995. 262 s. ISBN 80-708-0238-3
20. KOCOUREK, Vladimír. *Vědecký výbor fytozsanitární a životního prostředí* [online]. prosinec 2004 [cit. 2011-02-21]. Vědecký výbor fytozsanitární a životního prostředí - Projekty 2004. Dostupné z WWW: <<http://www.phytosanitary.org/projekty/2004/vvf-09-04.pdf>>.
21. KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava : Pavel Klouda, 2003. 132 s. ISBN 80-863-6907-2
22. CASTELLS, P.; SANTOS, F. J.; GALCERAN, M. T. Development of a sequential supercritical fluid extraction method for the analysis of nitrated and oxygenated derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban aerosols. *Journal of Chromatography A*. August 2003, č. 1010, s. 141-151.
23. KISHIKAWA, Naoya, et al. Highly sensitive and selective determination of 9,10-phenanthrenequinone in airborne particulates using high-performance liquid chromatography with pre-column derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*. November 2004, č. 1057, s. 83-88.

24. PRYČEK, Jiří; CIGANEK, Miroslav; ŠIMEK, Zdeněk. Development of an analytical method for polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives. *Journal of Chromatography*. 19 March 2004, č. 1030, s. 103-107.
25. CIGANEK, M., et al. A combined chemical and bioassay analysis of traffic-emitted polycyclic aromatic hydrocarbons. *Science of The Total Environment*. 1 December 2004, č. 334-335, s. 141-148.
26. NOAA - *National Oceanic and Atmospheric administration* [online]. 2006 [cit. 2011-04-19]. Semi-permeable Membrane Device (SPMD). Dostupné z WWW: <<http://oceanexplorer.noaa.gov/technology/tools/spmds/media/open.html>>.

10. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

PAH ... Polycyklické aromatické uhlovodíky

RNA ... Ribonukleová kyselina

DNA ... Deoxyribonukleová kyselina

POP ... Perzistentní organické polutanty

PM... Partikulární částice

US EPA... United States Environmental Protection Agency

NPAH... Nitro-deriváty polycyklických aromatických uhlovodíků

OPAH...Oxy-deriváty polycyklických aromatických uhlovodíků

PUF... Polyurethanová pěna

GC-MS... Plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí

GC... Plynová chromatografie

FID... Plamenový ionizační detektor

SPMD... Semipermeable Membrane Device

LDPE...Polyethylen s nízkou hustotou

USE... Ultrazvuková extrakce

PLE... Extrakce kapalinou pod tlakem

SFE... Superkritická fluidní extrakce

LC... Kapalinová chromatografie

GC/MS-EI... Plynová chromatografie s hmotnostně spektrofotometrickou detekcí s elektronovou ionizací

HRGC/MS... Vysokorozlišovací plynová chromatografie

NCI... Negativní chemická ionizace

HPLC... Vysoce účinná kapalinová chromatografie

PC... Papírová Chromatografie

TLC... Chromatografie na tenké vrstvě

DCM... Dichlormethan

DAD... Detektor diodového pole