

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

JEHLIČÍ JAKO BIOINDIKÁTOR PRO HODNOCENÍ ÚROVNĚ
KONTAMINACE PAHS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

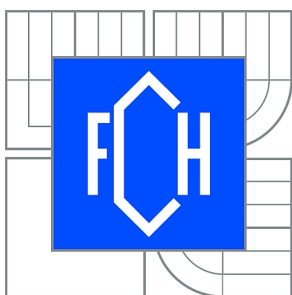
IVA MIKULÍKOVÁ

BRNO 2014



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

JEHLIČÍ JAKO BIOINDIKÁTOR PRO HODNOCENÍ ÚROVNĚ KONTAMINACE PAHS

NEEDLES AS BIOINDICATORS FOR ASSESSING CONTAMINATION LEVELS OF PAHS

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

IVA MIKULÍKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. RNDr. MILADA VÁVROVÁ, CSc.

BRNO 2014



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

Zadání bakalářské práce

Číslo bakalářské práce: **FCH-BAK0779/2013** Akademický rok: **2013/2014**
Ústav: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí
Student(ka): **Iva Mikulíková**
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:

Jehličí jako bioindikátor pro hodnocení úrovně kontaminace PAHs

Zadání bakalářské práce:

1. Vypracovat rešerši na téma bioindikátory a PAHs
2. Zvolit vhodnou preanalytickou a analytickou metodu pro stanovení
3. Optimalizovat analytický postup na modelových uměle kontaminovaných vzorcích jehličí
4. Tento postup aplikovat na reálné vzorky
5. Provést zhodnocení výsledků a jejich interpretaci

Termín odevzdání bakalářské práce: 23.5.2014

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu bakalářské práce. Toto zadání je přílohou bakalářské práce.

Iva Mikulíková
Student(ka)

prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2014

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Bioindikátory slouží ke sledování úrovně znečištění životního prostředí. K nejrozšířenějším bioindikátorům patří rostlinné bioindikátory, z nichž nejčastěji používanými jsou mechy, lišejníky a jehličí. Tato práce je zaměřena na sledování koncentrace alkyl – derivátů polycyklických aromatických uhlovodíků ve vzorcích jehličí odebraného z různých lokalit České republiky. Sledované analyty byly ze vzorků extrahovány směsí n-hexanu a dichlormethanu. Získaný extrakt byl přečištěn sloupcovou chromatografií s aktivovaným silikagelem a florisilem. K vlastní analýze byla použita metoda plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem.

ABSTRACT

Bioindicators are used to monitor the level of the environmental pollution. Plant bioindicators are most frequently used, particularly mosses, lichens and conifers. This thesis focuses of the monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons alkyl-derivates concentration in the needles, that were taken in different locations in the Czech Republic. Analytes were extracted by mixture of n-hexane and dichlormethane. The acquired extract was cleaned up by column chromatography with activated silicagel and florisil. Gas chromatography - mass spectrometry was used for final analysis.

KLÍČOVÁ SLOVA

Rostlinné bioindikátory, polycyklické aromatické uhlovodíky, sloupcová chromatografie, plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem

KEYWORDS

Plant bioindicators, polycyclic aromatic hydrocarbons, column chromatography, gas chromatography – mass spectrometry

MIKULÍKOVÁ, I. *Jehličí jako bioindikátor pro hodnocení úrovně kontaminace PAHs*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2014. 55 s. Vedoucí bakalářské práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně, a že všechny použité literární zdroje jsem citovala 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 v Brně.

.....
podpis studenta

Poděkování

Ráda bych poděkovala prof. RNDr. Miladě Vávrové CSc. za odborné vedení a pomoc při zpracování mé bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat Ing. Michalovi Šubrtovi za cenné rady a účinnou pomoc při měření experimentální části mé práce.

| | |
|---|----|
| 1. Úvod..... | 7 |
| 2. Bioindikátory..... | 8 |
| 2.1. Rozdělení bioindikátorů | 8 |
| 2.1.1. Senzitivní bioindikátory | 8 |
| 2.1.2. Akumulační bioindikátory | 8 |
| 2.2. Druhy bioindikátorů | 8 |
| 2.2.1. Houby..... | 8 |
| 2.2.2. Rostliny | 9 |
| 2.2.3. Živočichové..... | 9 |
| 2.2.4. Mikroorganismy..... | 10 |
| 3. Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs)..... | 11 |
| 3.1. Základní vlastnosti PAHs | 12 |
| 3.2. Výskyt..... | 12 |
| 3.3. Dopad na životní prostředí | 13 |
| 4. Deriváty PAHs | 14 |
| 4.1. Alkyl - deriváty..... | 14 |
| 4.2. Nitro - deriváty | 14 |
| 4.3. Oxo - deriváty..... | 14 |
| 4.4. Hydroxy - deriváty | 14 |
| 5. Izolace analytů..... | 16 |
| 5.1. Odběr vzorků | 16 |
| 5.2. Vzorek a jeho extrakce | 16 |
| 5.2.1. Extrakční techniky | 18 |
| 5.3. Přečištění a zakoncentrování | 19 |
| 5.3.1. Kolonová chromatografie..... | 19 |
| 6. Stanovení PAHs | 21 |
| 6.1. Plynová chromatografie..... | 21 |
| 6.1.1. Stacionární fáze | 22 |
| 6.1.2. Mobilní fáze – nosný plyn..... | 22 |
| 6.1.3. Regulátor tlaku a průtoku..... | 22 |
| 6.1.4. Injektor | 22 |
| 6.1.5. Kolona | 22 |
| 6.1.6. Detektor..... | 23 |

| | | |
|--------|---|----|
| 6.1.7. | Kvantitativní vyhodnocení | 24 |
| 6.2. | Hmotnostní spektrometrie | 25 |
| 6.2.1. | Ionizační techniky | 25 |
| 6.2.2. | Analyzátory | 26 |
| 6.2.3. | Detekce iontů | 27 |
| 6.2.4. | Čerpací vakuové systémy | 27 |
| 7. | Experimentální část | 28 |
| 7.1. | Sběr vzorků | 28 |
| 7.2. | Analýza vzorků | 29 |
| 7.2.1. | Použité chemikálie | 29 |
| 7.2.2. | Laboratorní přístroje a sklo | 29 |
| 7.2.3. | Optimalizace sloupcové chromatografie | 29 |
| 7.2.4. | Postup práce s reálnými vzorky | 30 |
| 7.2.5. | Plynová chromatografie | 31 |
| 7.2.6. | Hmotnostní spektrometr | 31 |
| 7.2.7. | Parametry měření | 32 |
| 7.3. | Diskuze a výsledky | 32 |
| 7.3.1. | Optimalizace sloupcové chromatografie | 33 |
| 7.3.2. | Mez detekce a kvantifikace | 34 |
| 7.3.3. | Koncentrace 2 - methylnaftalenu v reálných vzorcích | 35 |
| 8. | Závěr | 37 |
| 9. | Zdroje | 38 |
| 10. | Zkratky | 41 |
| 11. | Seznam obrázků | 42 |
| 12. | Seznam příloh | 43 |
| 13. | Přílohy | 44 |

1. ÚVOD

Úkolem biomonitoringu je sledování faktorů znečištění životního prostředí pomocí bioindikátorů a biomarkerů. Poskytuje informace o působení nebo výskytu některého činitele ve vnějším prostředí. Bioindikace se uskutečňuje na různých úrovních životních dějů a projevů. Již bylo popsáno, že toto sledování může probíhat na úrovni makromolekul, buněk, orgánů, organismů, populací, společenstev a ekosystémů. Bioindikátorem nemusí být jen mikroorganismy nebo rostliny, ale také živočichové a dokonce i člověk.

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs) jsou jednou z nejvýznamnějších skupin perzistentních organických polutantů (POPs), jejichž karcinogenní a mutagenní vlastnosti a úroveň kontaminace již byly popsány v mnoha studiích. Na základě údajů zde prezentovaných lze konstatovat, že se prakticky vyskytují téměř ve všech složkách životního prostředí. Jak přírodní, tak rovněž antropogenní zdroje umožňují jejich následnou distribuci do složek životního prostředí; toto šíření je důsledkem atmosférického transportu, ukládání a transportu do různých ekosystémů.

Rostlinné druhy jsou ideálními bioindikátory a jako takové jsou používány již od šedesátých let dvacátého století. Důvodem je to, že rostliny jsou často na svém povrchu pokryty kutikulou s vysokým obsahem lipidů, která je právě místem kumulace perzistentních organických polutantů (POPs). Ty mohou vstupovat do rostlin dvojitým způsobem, a to buď prostřednictvím kořenů z kontaminované půdy, nebo přes povrch listů z atmosféry.

Vzhledem ke své citlivosti na znečištění ovzduší patří mezi nejpoužívanější rostlinné indikátory jehličnaté stromy. Jejich použití souvisí především s tím, že jehličí vydrží na větvích za běžných podmínek i několik let. Jehličí je vystaveno působení škodlivých faktorů déle, než je tomu u listnatých stromů, jejichž listy pravidelně každý rok opadávají. Tyto uvedené vlastnosti jehličnanů jsou příčinou toho, že jehličí je považováno za vhodný bioindikátor, ve kterém se dlouhodobě kumulují právě POPs.

2. BIOINDIKÁTORY

Termín bioindikátor se používá pro označení organismů nebo skupiny organismů, které reagují na zatížení znečišťujícími látkami změnami svých vitálních funkcí. Nejdůležitějšími důvody použití bioindikátorů jsou přímá stanovení biologických účinků, dále stanovení synergických a antagonistických účinků různých znečišťujících látek na organismus, včasné rozpoznání poškozujících účinků, které se následně projeví na rostlinách, případně až na člověku. Dalším důvodem jsou relativně nízké náklady ve srovnání s finančními náklady na vzorkovací zařízení. Velký potenciál bioindikátorů pro monitoring životního prostředí je často konfrontován s obtížnými otázkami metodiky vyplývající z použití „živých měřících přístrojů“. Účinky nežádoucích látek na životní prostředí nelze vždy jasně odlišit od přírodních stresových faktorů. Nedostatek praktických zkušeností s určitými bioindikátory často způsobuje problém s interpretací zjištěných skutečností, a to především pro ten případ, kdy nejsou k dispozici žádná srovnatelná měření znečišťujících látek.

Díky intenzivnímu výzkumu se v posledních desetiletích zlepšila dostupnost mnoha bioindikátorů, které splňují požadavky na vhodnost, standardizaci a především na finanční náklady na prováděné analýzy [1].

2.1. Rozdělení bioindikátorů

Podle reakce na faktory prostředí rozdělujeme bioindikátory na senzitivní a akumulací.

2.1.1. Senzitivní bioindikátory

Mají úzký toleranční rozsah a reagují již na nízké koncentrace stresoru. Nejčastěji se používají při monitoringu ovzduší, přičemž v tomto případě jsou spíše využívány rostliny než živočichové. Patří sem zejména koniklec velkokvětý (*Pulsatilla grandis*), mečík holandský (*Gladiolus sp.*), které jsou optimálními indikátory emisí fluoru, dále tabák virginský (*Nicotiana tabacum*), který reaguje citlivě na změnu koncentrace ozonu v ovzduší a také arábkovka Thalova (*Arabidopsis thaliana*) reagující především na chlorofylové mutace [2].

2.1.2. Akumulační bioindikátory

Tyto bioindikátory mají širokou amplitudu toleranční oblasti. Jsou zvláště významné při hodnocení chemické zátěže ekosystémů. Z této skupiny jsou často používány např. palina obyčejná (*Artemisia vulgaris*), vrba křehká (*Salix fragilis*) a rašeliník (*Sphagnum sp.*) [2].

2.2. Druhy bioindikátorů

Při biomonitoringu se nejčastěji používají následující druhy organismů: houby, rostliny, živočichové a mikroorganismy.

2.2.1. Houby

Houby se jako bioindikátory používají při monitoringu kontaminace životního prostředí těžkými kovy. Mezi sledované prvky patří As (arsen), Cd (cadmium), Hg (rtuť), Cr (chrom), Cu (měď), Ni (nikl), Zn (zinek), Mn (mangan) a Pb (olovo).

Nejčastěji používanými houbami jsou suchohřib hnědý (*Xerocormus badius*) - Cr; hřib smrkový (*Boletus edulis*) - Cr, Hg; bedla vysoká (*Macrolepia procera*) - As, Cu; muchomůrka růžová (*Amanta rubences*) - Hg; holubinka sp. (*Russula sp.*) - As, Cu, Zn; lištička pomerančová (*Hygrophoropsis aurantiaca*) – Ni, Pb, Mn [3, 4].

2.2.2. Rostliny

Obecně je známo, že rostliny mohou sloužit jako indikátory antropogenního znečištění toxickými perzistentními organickými polutanty (POPs), jako jsou polychlorované bifenyly (PCB), polyaromatické uhlovodíky (PAHs), dioxiny, apod. V posledních letech se ukázalo, že akumulace organických látek v rostlinách může umožnit lépe určit zdroje znečištění, rovněž jsou využitelné při sestavení modelů regionální a globální kontaminace, případně mohou být využity ke sledování kvalitativních změn historické oblasti životního prostředí [5].

Různé druhy rostlin jsou různě citlivé na působení toxických látek v prostředí. Mezi zvláště citlivé bioindikátory patří např. mečíky (fluorovodík HF), tabák (oxidy dusíku NO_x a fytogenní smog), petúnie (oxidy dusíku NO_x a fytogenní smog) a borůvka (kyselost a vlhkost stanoviště) [3].

Mezi nejčastěji používané matrice můžeme zařadit především borové jehlice, lišejníky, mechy a listy vyšších rostlin. Dokonce byly provedeny i studie s využitím borové kůry jako bioindikátoru. Všechny již zmíněné matrice jsou velmi dobře dostupné, a proto mohou být použity jako pasivní vzorkovače mnoha sloučenin.

Lišejníky vzhledem ke své stavbě těla, dlouhověkosti a citlivosti na znečištění prostředí patří mezi oblíbené bioindikátory. Lišejníky jsou především citlivé na oxid siřičitý SO₂ přítomný ve vzduchu. Podle citlivosti ke znečištění je lze rozdělit na tolerantní (*Pleurococcus vulgaris*, *Lecanora conizaeoides*, *Hypocenomyces calaris*, *Buellia punctata*, *Lepraria incana*), málo citlivé (*Physia tenella*, *Hypogymnia physoides*, *Parmelia sulcata*, *Phaeophyscia orbicularis*, *Physcia abscendens*), středně citlivé (*Parmeliopsis ambigua*, *Xanthoria parietina*, *Pseudovernia furfuracea*, *Evernia prunastri*, *Lecanora chlarotera*) a velmi citlivé (*Platismatia glauca*, *Bryoria fuscescens*, *Ramalia fastigiata*, *Ramalia farinacea*, *Usnea filipendula*).

Dalšími zástupci nižších rostlin jsou mechy. Mechy se používají zejména při monitoringu depozice prvků v atmosféře (As, Cr, Cd, Mn, Ni, Cu, Zn, Pb, Hg). Monitorovanými zástupci jsou obvykle rokyt cypřišovitý (*Hypnum cupressiforme*), travník Schreberův (*Pleurozium schroeberi*), případně dvouhrotec chvostnatý (*Dicranum scoparium*) [3, 4].

Jehličnany, jako zástupci vyšších rostlin, patří k nejčastěji používaným matricím ke sledování organických polutantů, a to nejen vzhledem k obsahu lipidové složky, ale také díky svému celkovému rozšíření na našem území [6].

2.2.3. Živočichové

Informací o působení znečištěného ovzduší na zvířata je mnohem méně než o jeho vlivu na rostliny. To je zapříčiněno především tím, že živočichové nejsou trvale vázáni na jedno místo, a proto je těžké určit vliv toxických složek znečištěného ovzduší. Nejzávažnější zdravotní poruchy jsou způsobeny sloučeninami arzenu, fluoru, případně

pesticidy (DDT, HCH, tributylcín, atrazin atd.). V oblasti monitoringu znečištění životního prostředí se používají nejčastěji zástupci drobných savců, jako např. hraboš polní (*Microtus arvalis*), norník rudý (*Clethrionomys glareolus*), myšice lesní (*Apodemus flavicollis*) a myšice křovinná (*Apodemus sylvaticus*). Dalšími používanými druhy jsou zástupci hmyzu a drobných měkkýšů [3, 4].

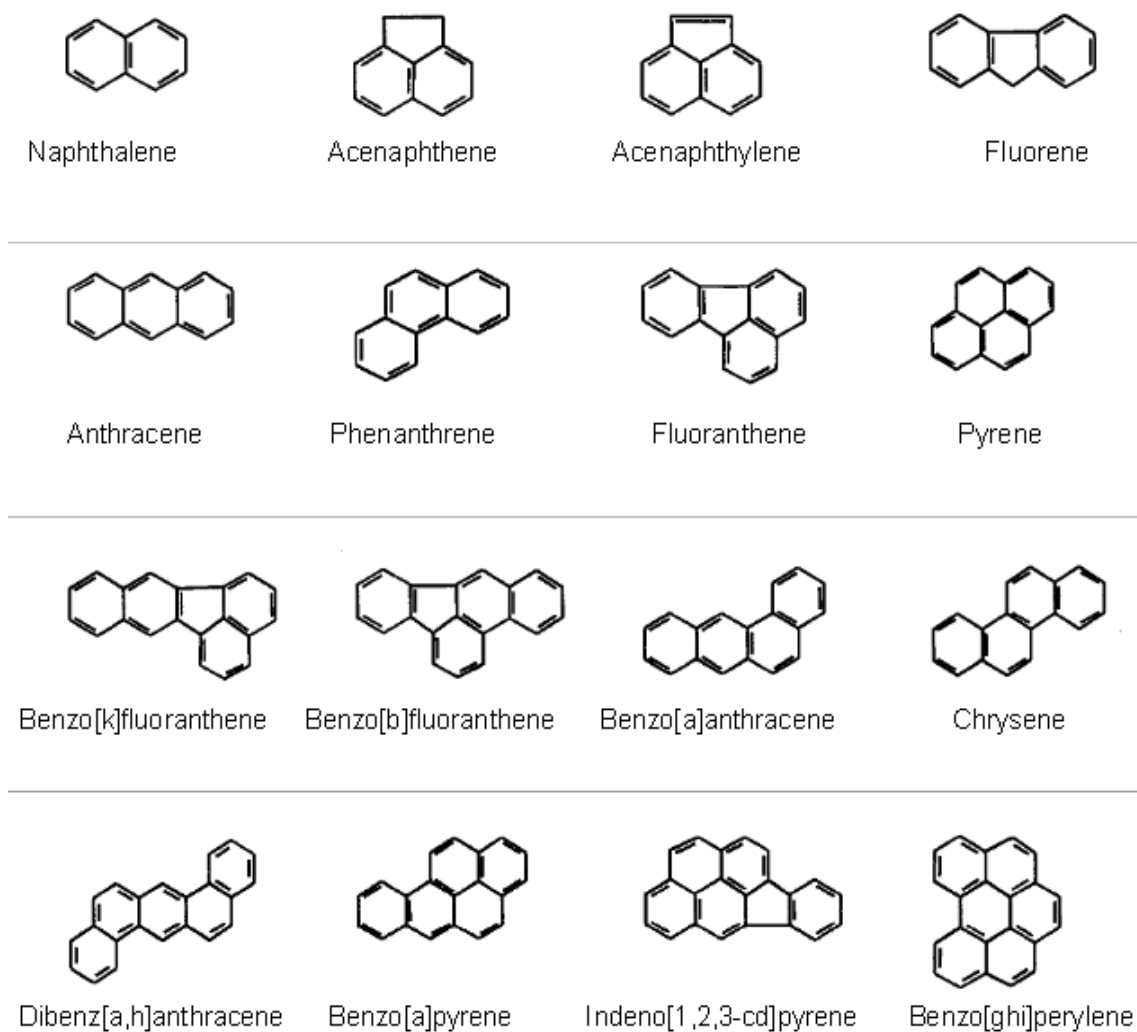
2.2.4. Mikroorganismy

Mikroorganismy jsou schopny metabolizovat rizikové prvky (Hg, As, Se, Cd, Pb) a toxické látky (pesticidy) obsažené v životním prostředí. Některé z nich, pokud jsou vystaveny působení znečišťujících látek delší dobu, produkují navíc stresové proteiny. Měřením hladiny stresových proteinů, a to jako biomarkerů, můžeme získat představu o míře znečištění daného ekosystému. Nejpoužívanějšími mikroorganismy jsou zástupci rodu *Bacillus*, ale často používaná je i *Escherichia coli* [3,7].

3. POLYCYKLIČKÉ AROMATICKÉ UHLOVODÍKY (PAHs)

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs) patří do skupiny perzistentních organických polutantů (POPs) vyznačujících se vysokou toxicitou, perzistencí, schopností bioakumulace a především škodlivým vlivem na životní prostředí a na zdraví člověka.

PAHs jsou semivolatilní lipofilní látky. Většina z nich se dostává do životního prostředí z antropogenních zdrojů, jako je např. spalování fosilních paliv v elektrárnách, domácí vytápění, spalování odpadů, průmyslové procesy a spalovací motory vozidel. Existuje více než 100 různých PAHs. Obvykle se vyskytují jako komplexní směsi (součást spalin) a ne jako jednotlivé sloučeniny. Ačkoliv účinky jednotlivých PAH na zdraví nejsou stejné, byla vybrána skupina 16 PAHs s podobným profilem, které jsou zvláště závažné z hlediska ochrany zdraví člověka, a proto jsou monitorovány. Do této skupiny patří acenaften, acenaftylen, antracen, benzo[a]antracen, benzo[a]pyren, benzo[g,h,i]perylen, benzo[b]fluoranten, naftalen, fluoranten, fluoren, fenantren, chrysen, pyren, benzo[k]fluoranten, indeno[1,2,3-c,d]pyren a dibenz[a,h]antracen [8, 9].



Obrázek 1: Polycyklické aromatické uhlovodíky [10]

3.1. Základní vlastnosti PAHs

Základní strukturní jednotkou molekuly jsou minimálně dvě kondenzovaná aromatická jádra. Za normálních podmínek jsou PAHs bezbarvé, bílé až žluté krystalické látky. Fyzikálně-chemické vlastnosti značně závisí na jejich molekulové hmotnosti. S klesající molekulovou hmotností klesá bod varu, bod tání i lipofilita, ale naopak vzrůstá jejich těkavost a rozpustnost ve vodě.

PAHs se často dělí na dvě skupiny, a to PAHs s nízkou molekulovou hmotností (LPAHs) a PAH s vysokou molekulovou hmotností (HPAHs). LPAHs (např. naftalen, acenaften, acenaftylen, fluoren, antracen, fenantren) jsou tvořeny dvěma až třemi benzenovými jádry, HPAHs (fluorantren, pyren, benzo[a]pyren, benzo[fluorantren) obsahují ve své molekule čtyři nebo více benzenových jader. PAHs o vysoké molekulové hmotnosti jsou považovány za karcinogenní, mutagenní a teratogenní i za nízkých koncentrací. Nicméně lehčí PAHs jsou přítomny zejména v městském prostředí v ovzduší, kde reagují s dalšími znečišťujícími látkami, což může mít za následek vznik ještě více toxických derivátů.

Další dělení PAHs je založeno na uspořádání benzenových jader, podle kterého je rozdělujeme na lineární, angulární a klastrové. Vzhledem k variabilitě v prostorovém uspořádání existuje mnoho typů PAHs a jejich derivátů.

Díky svému hydrofobnímu charakteru a nízké rozpustnosti jsou PAHs mnohem odolnější vůči biologické degradaci a v životním prostředí se mohou akumulovat prostřednictvím potravního řetězce. Jsou poměrně stabilní, nicméně vlivem slunečního světla a chemických látek obsažených v ovzduší u nich dochází během několika týdnů ke změnám a ke vzniku nových produktů. Jejich rozklad závisí nejen na typu nosiče, na kterém jsou sorbovány, ale také na přítomnosti molekulových skupin navázaných na benzenovém jádře. Rozklad ve vodě a půdě trvá obvykle několik týdnů až měsíců a je způsoben činností mikroorganismů [8, 11,12, 13].

3.2. Výskyt

Jak již bylo zmíněno, PAHs vstupují do ovzduší především při:

- sopečné činnosti
- lesních požárech
- nedokonalém spalování dřeva v domácnostech a v elektrárnách
- zahřívání a pyrolýze organických látek
- provozu spalovacích motorů v automobilech.

Při ochlazení kouřových zplodin mohou kondenzovat na sazích a unikat spolu s nimi do ovzduší. Díky tomu může být v okolí koksoven, ropných a metalurgických závodů a výroben sazí zvýšená koncentrace těchto látek. Mohou vznikat i otěrem asfaltových vozovek a pneumatik [9].

Pohyb PAHs v přírodě závisí na jejich fyzikálně-chemických vlastnostech. Obecně nejsou moc dobře rozpustné ve vodě a v ovzduší se vyskytují převážně ve formě par nebo jsou sorbovány na povrchu malých pevných částic. V uvedených formách mohou urazit dlouhé vzdálenosti. Na zem spadnou ve formě dešťových srážek nebo jako sedimentující částice. Některé PAHs se do atmosféry dostávají odpařením z povrchových vod, ale většina zůstává sorbována na pevných částicích tvořících

sediment na dně potoků, řek a jezer. V půdě jsou rovněž sorbovány na pevné částice. Některé z nich se odpařují do atmosféry nebo přecházejí do půdní vody a kontaminují tak podzemní vodu. Jejich obsah v rostlinách a v tělech živočichů může být několikanásobně vyšší než jejich obsah v půdě nebo ve vodě [11].

3.3. Dopad na životní prostředí

PAHs patří mezi látky nebezpečné jak pro životní prostředí, tak i pro člověka. Jsou to látky s karcinogenními, mutagenními i teratogenními účinky. Největším problémem PAHs je jejich perzistence, tj. jejich odolnost vůči degradačním procesům. Další problematickou vlastností je možnost transportu na velké vzdálenosti. Díky tomu je lze nalézt i několik kilometrů od zdroje kontaminace. Pokud se týče dopadu na zdraví člověka, mohou ohrozit vývoj plodu, způsobit rakovinu nebo popáleniny kůže.

Vzhledem k nízkým hodnotám koncentrací PAHs v ovzduší však nehrozí akutní nebezpečí pro člověka [12, 19].

4. DERIVÁTY PAHS

V životním prostředí se nevyskytují pouze samotné mateřské PAHs, ale spolu s nimi se zde nachází i jejich deriváty. Nejvýznamnějšími deriváty jsou především alkyl -, hydroxy -, nitro - a oxo - PAHs. Tvorba derivátů PAHs závisí především na zdroji emisí, počasí a na přítomnosti jiných znečišťujících látek (CO, NO_x, O₃) [13].

4.1. Alkyl - deriváty

Alkyl - PAHs mají na své centrální molekule navázány různé skupiny uhlovodíků. Nejčastěji navázanými skupinami jsou methylové a isopropylové skupiny. Alkyl - PAHs mohou být analyzovány buď jako jednotlivé izomery, nebo jako sumy homologových skupin (C0-, C1-, C2-, C3-, C4-, C5-, apod.) odvozené z celkových iontových chromatogramů (TIC) použitím GS/MS (plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem). Některé alkyl - PAHs jsou méně toxické než nesubstituované sloučeniny, zatímco jiné jsou naopak více toxické. Například chrysen je považován za mírně karcinogenní prohodavce, zatímco 5 - methylchrysen je silný karcinogen a je běžně používán jako modelový karcinogen ve vědeckých studiích. Umístění alkylové skupiny na benzenovém jádru výrazně ovlivňuje karcinogenitu a další toxické účinky. Anthracen je obecně považován za nekarcinogenní, avšak 9,10 - dimethylantracen je již silně karcinogenní. Rovněž nesubstituovaný benz[a]anthracen, případně 1 - nebo 2 - methylbenz[a]anthracen jsou pouze slabě karcinogenní, zatímco 7 - a 12 - methylbenz[a]anthracen jsou silné karcinogeny [14].

4.2. Nitro - deriváty

Nitro - deriváty patří mezi nejvíce rozšířené kontaminanty životního prostředí, které jsou obsaženy v různých zdrojích a kontaminují složky životního prostředí. Závažnými zdroji jsou emise z dieselových motorů, emise vznikající při spalování z petrolejových ohřivačů, plynového paliva, popílku ze spalování uhlí a nezanedbatelnými zdroji jsou také potraviny. Kromě toho mohou vznikat radikálově iniciovanými reakcemi mezi mateřskými PAHs a oxidy dusíku nebo kyselinou dusičnou, které jsou přítomny ve znečištěném ovzduší. Ty mohou PAHs substituovat, případně oxidovat, za vzniku mono - nebo dinitroderivátů. Vzhledem k jejich rozsáhlému rozšíření v životním prostředí, genotoxické a mutagenní aktivitě a karcinogenitě představují vážné zdravotní riziko pro člověka [15, 16].

4.3. Oxo - deriváty

Oxo - deriváty jsou především produkty spalovacích procesů, které však mohou vznikat také heterogenními reakcemi PAHs s ozonem. Oxo - deriváty jsou těžké sloučeniny s vyšší molekulovou hmotností a nižším tlakem par než mateřské PAHs. Na rozdíl od mateřských PAHs vykazují oxo - deriváty, vyskytující se jako navázané na pevné částice, přímé toxické a mutagenní účinky [17].

4.4. Hydroxy - deriváty

Hydroxy - deriváty mohou být emitovány nedokonalým spalováním, případně mohou být produktem atmosférických reakcí po oxidaci mateřských PAHs hydroxylovými radikály. Reakce probíhají jak v plynné tak i v pevné fázi. Během dne převládají reakce

s hydroxylovými radikály za vzniku hydroxy – radikálů a v průběhu noci probíhají reakce s NO_3 za vzniku nitro - derivátů. V závislosti na molekulové struktuře PAHs bude jedna reakce převládat nad druhou, aby byly odstraněny mateřské PAHs. Hydroxy – deriváty jsou méně volatilní než mateřské PAHs a mají tendenci spojovat se ve shluk částic [13].

5. IZOLACE ANALYTŮ

Izolace analytů spočívá v získání pokud možno maximálního množství analytů z matrice. Izolace maximálního množství analytů je závislá na přípravě vzorků pro analýzu. Podle povahy vzorku je vždy zvolena vhodná extrakční technika. Extrakce patří mezi nejčastěji používané izolační procesy [18].

5.1. Odběr vzorků

Pro odběr vzorků PAHs z atmosféry můžeme použít dva typy vzorkování, a to pasivní a aktivní. Aktivní metody odběrů vzorků využívají sekvenční odběrové kolony, které jsou konstruovány tak, aby zachytávaly PAHs mající různé fyzikální vlastnosti. Aktivní vzorkovače (vysoko objemový podtlakový systém, filtry, fyzikální a chemické sorbenty) však mají své nevýhody. Jednou z nich je vysoká cena vybavení, jejich náročná údržba a provoz.

Pro pasivní vzorkování se nejčastěji používají dva typy pasivních vzorkovačů. Jsou to polopropustné membrány SPMDs a vegetace. Mezi výhody SPMDs patří dlouhodobý sběr dat, nízké náklady a snadné použití. Hlavní nevýhodou je spotřeba velkého množství rozpouštědla a dlouhá doba extrakce. Použití vegetace jako pasivního vzorkovače je mnohem ekonomičtější, protože není zapotřebí speciálního vybavení pro odběr vzorků. Jako nejlepší pasivní vzorkovače pro izolaci PAHs se osvědčily jehlice z jehličnanů, protože jsou k dispozici po celý rok a mohou být rozlišeny podle ročních porostů. Provedené studie prokázaly, že akumulace PAHs je nepřímo závislá na teplotě, avšak silně závisí na druhu dřevin [14].

5.2. Vzorek a jeho extrakce

V rámci této práce byly sledovány dva druhy jehličí, a to ze smrku ztepilého a borovice lesní.

Smrk ztepilý, latinsky *Picea abies*, patří do čeledi Pinaceae. Zástupci této čeledi jsou rozšířeny na většině území severní polokoule. V oblasti tropického a subtropického podnebního pásu se vyskytují především v horských oblastech. Na našem území je smrk ztepilý velmi rozšířený, a to od nížin až po vysoké hory.

Smrk je jehličnatý, neopadavý strom, dorůstající výšky až 50 metrů. Jeho kůra je červenohnědá až šedohnědá, šupinovitěho vzhledu. Jehlice jsou tmavozelené barvy a převážně dorůstají do délky 1 až 2,5 cm. Jsou ploché nebo čtyřhranné s jedním cévním svazkem a na konci jsou zakončeny špičkou. Jehlice opadávají po 5 až 7 letech. Květy jsou jednopohlavné. Samčí květy jsou uspořádány ve válcovitých červených šištících o délce až 2 cm. V průběhu vegetace šištice mění barvu z červené na žlutou. Samičí květy jsou uspořádány v přisedlých červených nebo zelených šištících o délce až 6 cm. Zralé hnědé šišky dosahují délky až 16 cm. Dozrávají na podzim prvního roku a vcelku opadávají. Smrk kvete od května do června v pravidelných čtyřletých cyklech. Jeho přirozeným stanovištěm jsou rašeliniště s vlhkou a hlinitou půdou [20, 21].

Borovice lesní, latinsky *Pinus sylvestris*, patří do čeledi Pinaceae. Borovice je jehličnatý, vřdzyzelený strom, dorůstající do výšky až 40 metrů. Často se však můžeme setkat s nižším až keřovitým vzrůstem. Roste na slunných stanovištích, a to především

na písčitých až kamenitých půdách. Kůra je vrásčitá, v přízemní části oplývá šedohnědým zbarvením, zatímco v horní části zbarvením rezavě červeným.

Jehlice vyrůstající po dvou z brachyblastů jsou tuhé, špičaté a dosahují délky až 8 cm. Vyznačují se rozdílným zbarvením na horní a dolní straně. Horní strana je zbarvena tmavě zeleně a spodní strana šedozeleně. Jehlice opadávají po 2 až 3 letech. Samčí šištice vyrůstají v dolní části koruny na konci prýtu místo jehlic. Šištice vejcovitého tvaru jsou žlutě zbarvené a dosahují délky 4 až 8 mm. Samičí šištice rostou naopak v horní části koruny na konci větvíček vyrostlých v předešlém roce. Tvar šištic je spíše kulovitý a zbarvení se pohybuje od růžové po fialovou. Šišky vyrůstají jednotlivě na krátkých stopkách. V průběhu zrání mění své zbarvení ze zelené na šedohnědou. V době zralosti dřevnatí, otevírají se a po vysemenění odpadávají [21].



Obrázek 2: Smrk ztepilý [22]



Obrázek 3: Borovice lesní [23]



Obrázek 3: Jehlice borovice lesní [23]



Obrázek 5: Jehlice smrku ztepilého [22]

5.2.1. Extrakční techniky

Izolace analytů z pevných matric se provádí extrakcí kapalinou nebo plynem. Mezi nejčastěji používané extrakční techniky aplikované při analýze PAHs v jehličí patří Soxhlet, Soxtec, ultrazvuková extrakce, superkritická fluidní extrakce (SFE) a extrakce kapalinou pod tlakem (PLE, PSE) [7].

Soxhletův extraktor

Tato metoda patří k nejstarším extrakčním technikám, a proto je každá nově zaváděná extrakční technika s ní porovnávána. Jako každá metoda, má i tato extrakce své výhody a nevýhody. Mezi výhody patří jednoduchost a nižší pořizovací náklady. Nevýhodou je velká spotřeba rozpouštědla a poměrně dlouhá doba extrakce (3 - 24 hodin).

Aparatura se skládá z topného zařízení (např. topné hnízdo), varné baňky, Soxhletova nádstavce a chladiče. Pevný vzorek (tuhá fáze) je umístěn v patroně ze speciálního papíru, skla s fritou nebo z porézní keramiky. Při zahřívání se rozpouštědlo, které je umístěné ve varné baňce odpařuje a jeho páry stoupají vzhůru do chladiče, kde kondenzují. Vzniklá pára zkondenzuje a jako kapalina stéká na vzorek umístěný v patroně. Po dosažení určité hladiny přetéká rozpouštědlo s rozpuštěnou látkou přepadem zpět do varné baňky [18].

Extraktor Soxtec

Tento extraktor je obdobou předešlé Soxhletovy aparatury, avšak je již mnohem propracovanější, rychlejší, ale má mnohem vyšší pořizovací a provozní náklady. Nejdůležitější částí přístroje je extrakční patrona zavěšená na závěsu. V závislosti na umístění této patrony rozlišujeme tři fáze extrakce. V první fázi je extrakční patrona ponořena do vařícího extrakčního rozpouštědla. Páry rozpouštědla stoupají vzhůru do chladiče, kde kondenzují a stékají jako kapalina zpět dolů. V této fázi dochází k intenzivnímu kontaktu rozpouštědla a vzorku a tím i k intenzivnější extrakci. Ve druhé fázi, tj. v tzv. Soxhletovském módu, je patrona posunuta vzhůru, takže již není v kontaktu s vroucím rozpouštědlem. Páry rozpouštědla stoupají vzhůru do chladiče, kde kondenzují a stékají zpět navzorek. Tuto fázi lze označit jako oplach vzorku čistým rozpouštědlem. Ve třetí fázi zůstává kondenzát v horní části přístroje a proto nedochází k jeho kontaktu se vzorkem. Vzorek je tímto způsobem zakoncentrován [18].

Ultrazvuková extrakce (USE)

Metoda je založena na tom, že pomocí ultrazvuku dochází ke zvýšení intenzity pohybu analyzované látky a doba extrakce je tak snížena na 15 až 30 minut.

Vzorek je kvantitativně převeden do baňky. Poté je k němu přidáno určité množství rozpouštědla a baňka je vložena do ultrazvukové lázně. Hladina lázně by neměla dosahovat pod úroveň hladiny rozpouštědla v baňce. Důležitou roli hraje i volba teploty a vhodného rozpouštědla nebo směsi rozpouštědel [6].

Superkritická fluidní extrakce (SFE)

Nejdůležitější součástí přístroje je extrakční patrona naplněná pevným vzorkem, která je umístěná v termostatované komoře. Do patrony je vháněno extrakční médium (CO₂). Opačnou stranou patrony je médium pomocí kapiláry (restriktoru) odváděno

do sběrného rozpouštědla (1 ml hexanu). Dochází k dekompresi a CO₂ přechází do plynného stavu a uniká do okolí. Vyextrahované látky jsou jímány ve sběrném rozpouštědle. Výhodou metody je úspora rozpouštědla, volnost jeho výběru a selektivita extrakce pro dané látky obsažené ve vzorku. Navzdory tomu je tato metoda podstatně složitější, vyžaduje pečlivou přípravu vzorku a optimalizaci podmínek extrakce. Pro tuto metodu není v současné době dostupný žádný jednodušší postup [18].

Tlaková extrakce rozpouštědlem (PSE, PFE, ASE, PLE)

Základem metody je práce za zvýšené teploty (do 200°C) a tlaku (5 – 20 MPa). Zvýšením teploty nad atmosférický bod varu se zvýší difúzní koeficienty a tím se zvýší i extrakční účinnost. Čím vyšší jsou difúzní koeficienty nebo difúze látek desorbovaných z pevného povrchu, tím účinnější může být extrakce.

Metoda je rychlá (5 – 15 minut) a má nízkou spotřebu rozpouštědel, která lze namíchat a vytvořit selektivní směsi. Náklady jsou sice relativně vysoké, avšak vzhledem k vysoké rychlosti je možné zpracovat velký počet vzorků. Při práci s tímto zařízením je nejprve nutné ho profouknout dusíkem, a to pro odstranění zbytku kyslíku, případně rozpouštědla po předešlé extrakci. Poté jsou do zařízení umístěny patrony se vzorkem, ke kterým je pod tlakem dopraveno rozpouštědlo. Následně se přístroj zahřeje, což vede k uvolnění extraktu ze vzorku, který je zachytáván ve speciálních vialkách.

Po skončení extrakčního procesu je rozpouštědlo vytlačeno ze systému a zařízení je znovu vyčištěno dusíkem [18].

5.3. Přečištění a zakoncentrování

Vzorek po extrakci obsahuje balastní látky, které by mohly narušovat finální analýzu. Je proto nutné je ze vzorku odstranit.

5.3.1. Kolonová chromatografie

Jedná se o techniku založenou na rozdělování sloučenin mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze. V každém chromatografickém systému je vždy jedna fáze stacionární (nepohyblivá) a jedna fáze mobilní (mobilní). Separace závisí na rozdílné afinitě k mobilní a stacionární fázi. Pokud je stacionární fáze nepolární, tak má i větší afinitu k nepolárním látkám. Vzorek je v rámci chromatografické separace unášen spolu s mobilní fází. Složky vzorku, které vykazují vyšší afinitu ke stacionární fázi než k fázi mobilní, jsou zpomalovány a zadržovány na stacionární fázi. Tak dochází k separaci jednotlivých složek vzorku.

Nejčastěji používanými stacionárními fázemi jsou silikagel, alumina a florisil.

Silikagel

Jedná se o polární typ adsorbentu s velikostí pórů cca 10 nm a se specifickým povrchem v rozmezí 100 - 500 m²/g. Na povrchu silikagelu jsou k dispozici hydroxylové skupiny polárního charakteru, které jsou schopny prostřednictvím vodíkových můstků reagovat se separovanými látkami. Aktivace probíhá asi 2 – 3 hodiny při teplotě kolem 200°C.

Alumina

Krystalický oxid hlinitý s průměrnou velikostí pórů 10 – 20 nm a se specifickým povrchem 100 – 200 m²/g. Na povrchu jsou, a to podobně jako u silikagelu, přítomny hydroxylové skupiny. Aktivace probíhá zahřátím nad 200°C.

Florisil

Tento sorbent, tj. křemičitan hořečnatý, je používán především na odstranění lipidů a dalších polárních látek. Jeho vlastnosti jsou podobné jako u aluminy. Aktivace probíhá v muflově peci po dobu 4 hodin při teplotě 650°C [24].

6. STANOVENÍ PAHS

K finální analýze polycyklických aromatických uhlovodíků, a to zejména substituovaných, se používá metoda plynové chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem (GS-MS).

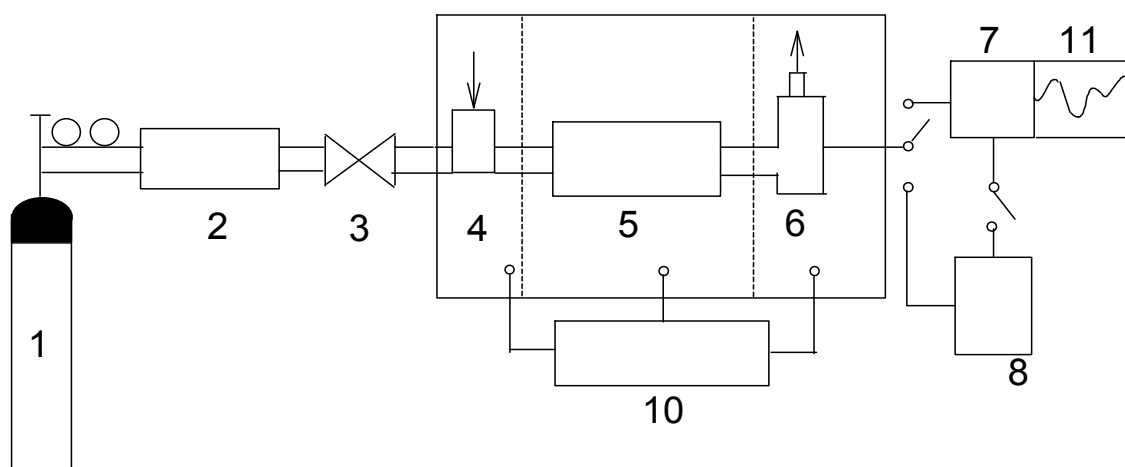
6.1. Plynová chromatografie

Plynová chromatografie je separační metoda založená na principu rozdělení složek mezi dvě heterogenní fáze. Jednou fází je fáze stacionární (nepohyblivá), která je tvořena sorpčně aktivní látkou a druhou fází je fáze mobilní (pohyblivá), která je tvořena plynem. Interakce mezi stacionární fází a molekulou plynu je založena na druhu mezimolekulových sil. Důležitou roli hraje také difúze [25].

Plynová chromatografie umožňuje stanovit nejen plyny, ale také látky, které lze převést do stavu páry. Jedná se jak o kapaliny, tak i o pevné látky. Látky, pro které může být tato metoda použita, mohou být permanentní plyny i kapaliny s bodem varu obvykle do 400°C, někdy i vyšším. Kromě toho to mohou být málo těkavé kapalné látky po jejich převedení na těkavé deriváty a pevné látky po pyrolytickém rozkladu. Teploty, při kterých se stanovení provádí, se pohybují od -70°C do 400°C. Analýzy trvají krátkou dobu, někdy pouze několik sekund, případně minut, avšak v případě multireziduálních metod, kde je zjišťováno více než 30 analytů, maximálně 2 hodiny.

Z fyzikálně - chemického hlediska umožňuje tato metoda sledovat sorpční nebo katalytické procesy, určovat termodynamické veličiny, mechanismus a kinetiku reakcí, difúzní pochody apod. Díky poměrně jednoduchému aparaturnímu vybavení a rychlosti analýzy může snadno konkurovat klasickým metodám [25].

Základními částmi přístroje používaného pro plynovou chromatografii jsou zdroj, regulace proudu nosného plynu, dávkovací systém, kolona, detekční zařízení, termostaty pro dávkovač, kolonu a detektor, zapisovač a vyhodnocovací systém.



Obrázek 6: Schéma plynového chromatografu [25]

| | | |
|-----------------------|--------------------------|---------------------|
| 1 zdroj nosného plynu | 5 kolona | 9 termostat |
| 2 čisticí zařízení | 6 detektor | 10 regulace teploty |
| 3 regulační zařízení | 7 zapisovač | 11 chromatogram |
| 4 dávkovač | 8 vyhodnocovací zařízení | |

6.1.1. Stacionární fáze

V systému plyn - pevná látka (GSC) je stacionární fáze představována povrchově aktivní látkou, a to např. aktivním uhlím, silikagelem, molekulovými sítěmi nebo porézním sklem. Systém plyn - kapalina (GLC) obsahuje v roli stacionární fáze kapalinový film navázaný na inertním nosiči. Rozdíl mezi systémy není ani tak v konstrukci přístroje, jako spíše ve způsobu separace. Zatímco separace v GSC systému je založena na adsorpci, separace v GLC systému je založena na rozpouštění [25].

6.1.2. Mobilní fáze – nosný plyn

Mobilní fáze je v plynové chromatografii realizována nosným plynem. Mezi nejčastěji používané nosné plyny patří především vodík, dusík, helium a argon. Při jeho výběru je nutné myslet zejména na faktory jako je viskozita, účinnost, čistota, reaktivita, detektor a finanční náklady.

Průtok nosného plynu musí být nastaven tak, aby bylo dosaženo co nejlepšího rozdělení látek na koloně. Tím je myšleno nejmenší rozšíření zón separovaných látek. Děje podílející se na rozšiřování zón jsou:

- vířivá difúze - molekuly různého typu urazí různé vzdálenosti;
- podélná molekulová difúze - molekuly migrují z místa s vyšší koncentrací na místo s nižší koncentrací, a to po směru i proti směru pohybu nosného plynu;
- odpor proti přenosu hmoty ve stacionární fázi - molekuly různého typu pronikají různě hluboko do stacionární fáze;
- odpor proti přenosu hmoty v nosném plynu - rychlostní profil nosného plynu má tvar paraboly [26].

6.1.3. Regulátor tlaku a průtoku

Elektronické regulační zařízení sloužící k ovládní průtoku a tlaku nosného plynu. Regulátor průtoku zajišťuje stálý průtok nosného plynu kolonou a detektorem. Tlak je nastavován automaticky na základě hodnot viskozity plynu, vnitřního průměru kolony a délky kolony tak, aby byl zajištěn stálý průtok plynu kolonou [26].

6.1.4. Injektor

Analyzovaná látka je vpravena do plynového chromatografu přes septum pomocí speciální injekční stříkačky. Ta představuje dělicí hranici mezi vnějším a vnitřním prostředím chromatografu. K odpaření vzorku vlivem vysoké teploty dochází ve skleněné vložce, lineru, která je součástí injektoru. Mezi kolonu a injektor je umístěn dělič toku sloužící k vedení části odpařeného vzorku na kolonu. Při stopové analýze nebo analýze směsi látek s odlišným bodem varu se používá nástřík bez děliče [26].

6.1.5. Kolona

Existují dva typy kolon, náplňové a kapilární. Náplňová kolona je tvořena trubicí, která je vzhledem k malému prostoru určenému pro její umístění stočena do spirály. Dříve byly trubice vyrobeny ze skla, avšak vzhledem k jejich křehkosti bylo sklo nahrazeno nerezovou ocelí. Délka trubic se pohybuje v rozsahu 1 - 5 m a vnitřní průměr v rozsahu 2 - 4 mm. Ideální trubice má délku 3 m a průměr 3 mm. Trubice bývá naplněna adsorbentem nebo nosičem se zakotvenou kapalnou fází.

Kapilární kolona představuje tenkou a dlouhou trubici vyrobenou z velmi čistého SiO₂ potaženého vrstvou polyamidu. Vrstva polyamidu zaručuje pružnost, odolnost a snadnou manipulaci. Délka kolony se pohybuje v rozmezí 10 - 60 m a vnitřní průměr v rozmezí 100 - 530 μm. Nejpoužívanějším průměrem je 250 μm [25, 27].

6.1.6. Detektor

Nedílnou součástí analýzy je volba vhodného detektoru. Nejpoužívanějším typem detektoru je tepelně vodivostní detektor (TCD), plamenově ionizační detektor (FID) a detektor elektronového záchytu (ECD). V současnosti patří mezi nejpoužívanější a neúčinnější detektory hmotnostně spektrometrický detektor (MS).

Tepelně vodivostní detektor - katarometr (TCD)

Vzhledem ke své univerzálnosti a velkému rozpětí linearit odezvy patří k nejčastěji užívaným detektorům. Princip metody spočívá v rychlosti ochlazování zahřátého tělesa. Rychlost ochlazování závisí na složení plynu, který proudí kolem zahřátého tělesa. Základem katarometru je vlákno vyrobené z materiálu, jehož elektrický odpor se mění v závislosti na změnách teploty. Vlákno je zahříváno konstantním elektrickým proudem na určitou teplotu. Pokud katarometrem prochází nosný plyn o konstantním průtoku, tak také jeho teplota i elektrický odpor jsou konstantní. Jakmile je v nosném plynu přítomna eluovaná látka, dochází ke změně teploty i elektrického odporu vlákna. Vzhledem k vyšší tepelné vodivosti se jako nosné plyny nejčastěji používají helium nebo vodík. V praxi se používají dva katarometry zařazené vedle sebe. Do jednoho je veden čistý nosný plyn a do druhého nosný plyn z kolony. Vlákna obou katarometrů jsou zapojena do Wheatstonova můstku. Pokud je v nosném plynu obsažena eluovaná látka, dochází k menšímu ochlazování vlákna a také ke změně odporu. To se pak projeví na záznamu eluční křivky [18, 24].

Plamenově ionizační detektor (FID)

Elektrická vodivost v plynech je dána počtem ionizovaných částic a proto je úměrná množství látky procházející detektorem. U tohoto detektoru je zdrojem ionizovaných částic plamen. Do nosného plynu s eluátem přicházejícího z kolony je v detektoru přiveden vodík a vzduch. Organické látky přicházející z kolony jsou vlivem vysoké teploty rozštěpeny na radikály CH₃•, CH₂•, CH•, ionty H⁺ a fragmenty OH. Mezi uhlíkatými radikály a kyslíkatými fragmenty dochází k exotermní reakci za vzniku dalších radikálů. Uvolněná energie je využita k jejich ionizaci. Vzniklé ionty, radikály a elektrony vedou mezi elektrodami elektrický proud [18, 24].

Detektor elektronového záchytu (ECD)

Detektor používaný především v analytice životního prostředí, protože poskytuje odezvu na halogenderiváty, které patří k nejzávažnějším kontaminantům životního prostředí. Zdrojem ionizace je radioaktivní zářič (⁶³Ni). Jako nosný plyn se zde používá dusík nebo argon, jelikož se oba snadno ionizují β-zářením.

Zdrojem záření a zároveň i katodou je kovový válec potažený vrstvou izotopu niklu (⁶³Ni). Anoda je představována sběrnou elektrodou. Na elektrody je vloženo napětí. β-zářením emitované ⁶³Ni ionizuje dusík, čímž vzniká kation dusíku a 2 elektrony.

Tyto elektrony jsou velmi pomalé. Pokud je v nosném plynu přítomna elektronegativní sloučenina, jsou elektrony pohlceny touto sloučeninou. Pohyblivost takto vzniklých záporně nabitých částic je mnohem menší než pohyblivost volných elektronů. Tím se zvýší pravděpodobnost jejich srážky s kladně nabitými částicemi přítomnými v nosném plynu. Rekombinací kladně a záporně nabitých částic dochází ke snížení počtu záporně nabitých částic a tím ke snížení ionizačního proudu procházejícího mezi katodou a anodou [18, 24].

6.1.7. Kvantitativní vyhodnocení

Metoda vnitřní normalizace

Metoda se používá k určení obsahu látek ve směsi. Nevýhodou je, že látky ve směsi musí být předem známé a nesmí jich být mnoho. Množství jednotlivých komponent se vyjadřuje jako procentuální podíl z celku.

Absolutní kalibrace

Tato metoda slouží ke stanovení absolutní koncentrace nebo absolutního množství látky z kalibrační závislosti. Správnost metody závisí na reprodukovatelnosti dávkovaných objemů.

Metoda vnitřního standardu

Ke vzorku se přidá určité množství známé látky. Podmínkou je, že tato látka nesmí být obsažena v původním vzorku, nesmí reagovat s žádnou ze složek vzorku a musí být eluována blízko stanovované látky. Přesný objem nástřiku vzorku není nutné znát. Koncentrace stanovované látky ve vzorku lze určit pomocí faktoru citlivosti detektoru f_x (response factor). Tento faktor je nutné stanovit kalibrací pro danou látku a vnitřní standard. Tvar přímky může mít tento tvar:

$$\frac{A_x}{A_{IS}} = f_x \left(\frac{c_x}{c_{IS}} \right) \quad (6.1)$$

A_x ... plocha signálu látky x v roztoku standardu

A_{IS} ... plocha signálu vnitřního standardu v roztoku látky x

f_x ... faktor citlivosti detektoru (response factor)

c_x ... koncentrace roztoku standardu látky x

c_{IS} ... koncentrace vnitřního standardu v roztoku látky x

Metoda standardního přídatku

Základem metody je známý přídatek stanovované látky ke vzorku. Množství látky v původním vzorku se určí z plochy píku stanovované látky ve vzorku a plochy píku po přidání známého množství látky ke vzorku [26].

6.2. Hmotnostní spektrometrie

Metoda založená na interakci iontů a polí, a to magnetického a elektrického. Výstupem je hmotnostní spektrum, což je záznam popisující intenzitu jevu souvisejícího s interakcí. Tato metoda má výsadní postavení mezi spektrometrickými metodami, protože je použitelná pro všechny prvky (celá periodická tabulka prvků). S její pomocí lze analyzovat sloučeniny organické i anorganické. K analýze je zapotřebí jen malé množství vzorku a mezi další výhody patří mimořádně široká oblast lineární odezvy (až 12 řádů).

Základními částmi hmotnostního spektrometru jsou zdroj záření, iontová optika, disperzní prvek, štěrbina, detektor, čerpadlo a vyhodnocovací systém (počítač) [27].

6.2.1. Ionizační techniky

Existuje mnoho typů různých technik. Pro různé typy látek se používají různé ionizační techniky. Mezi nejvýznamnější techniky současné doby patří: elektronová ionizace a chemická ionizace pro plynné skupenství; elektrosprej, chemická ionizace za atmosférického tlaku, fotoionizace za atmosférického tlaku pro kapalné vzorky; MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) pro ionizaci z pevného skupenství a indukčně vázané plazma pro prvkovou analýzu. Nejčastěji používanými ionizačními technikami ve spojení plynového chromatografu s hmotnostním spektrometrem (GC-MS) jsou elektronová a chemická ionizace.

Elektronová ionizace

Základem je iontový zdroj, jehož nejdůležitější částí je žhavené vlákno emitující elektrony. Elektrony jsou přitahovány protilehlou elektrodou s kladným nábojem. Na této dráze je elektronům udělena energie 70 eV. V kolmém směru na trajektorii elektronů je do iontového zdroje přiváděn vzorek v plynném skupenství (neutrální molekuly analyzovaných látek). Molekuly vzorku se potkají s elektrony. Elektrony vyrazí z elektronového obalu molekuly další elektron a vzniká kladně nabitý ion (radikálkation) a dva elektrony.



Množství dodané energie je daleko větší než je třeba k ionizaci. Nadbytek energie se projeví tak, že dojde k fragmentaci radikálkationu a vytvoří se fragmentované ionty a neutrální ztráty.



Vznikají molekulové ionty (radikálkation) a fragmenty. Molekulové ionty mohou informovat o molekulové hmotnosti dané sloučeniny. Ve fragmentech je skryta strukturní informace. Pro správnou funkci této techniky je třeba udržovat v iontovém zdroji tlak 10^{-3} Pa. Technika umožňuje tvorbu knihoven.

Chemická ionizace – dvoustupňový mechanismus

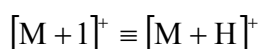
a) interakce elektronu s reakčním plynem (methan)

Interakce elektronu s reakčním plynem vede ke vzniku radikalkationtu a uvolnění dvou elektronů. V iontovém zdroji je obsaženo velké množství methanu, proto se radikalkation potká s další molekulou methanu a vznikne reaktivní částice CH_5^+ a odštěpí se radikál methanu.

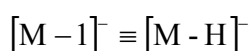


b) ionizace molekul analytu pomocí produktů ionizace reakčního plynu

V tomto kroku nevzniká radikalkation, ale vzniká ion se sudým počtem elektronů (kvazimolekulární ion). Kvazimolekulární ion vzniká spojením iontu s protonem.



Mohou se tvořit i negativní ionty:



Pro správnou funkci této techniky je třeba udržovat v iontovém zdroji tlak 10 - 100 Pa. Tato technika neumožňuje tvorbu knihoven [27].

6.2.2. Analyzátoary

Kvadrupolový analyzátoary

Používá se při spojení s plynovou a kapalinovou chromatografií nebo s kapilární elektroforézou. Základ tvoří čtyři kovové tyče kruhového nebo hyperbolického průřezu připojené ke zdroji stejnosměrného a vysokofrekvenčního střídavého napětí.

Ionty nalétávají do prostoru mezi tyčemi. Zde vlivem střídavého elektrického pole oscilují. Při správné volbě poměru stejnosměrného a střídavého elektrického napětí projdou prostorem mezi tyčemi pouze ionty o určitém poměru m/z . Ionty o jiném poměru m/z se zachytí na stěnách tyčí nebo přístroje. Změnami napětí lze regulovat průchod iontů v určitém poměru m/z [18, 28].

Iontová past

Je tvořena třemi elektrodami - dvěma vstupními kruhovými elektrodami, které jsou uzemněny a jednou prstencovou elektrodou, na kterou se přivádí střídavé napětí s proměnnou amplitudou.

Vstupním otvorem jsou do prostoru iontové pasti přivedeny ionty analyzované látky. Vlivem napětí přivedeného na prstencovou elektrodu dochází k periodickému

přítahování a odpuzování iontů. Při dalším zvyšování amplitudy střídavého napětí jsou ionty podle rostoucího poměru m/z vypuzeny z pasti a výstupním otvorem jsou vedeny do detektoru [18, 28].

Průletový analyzátor

Hlavní součástí je evakuovaná trubice. K rozdělení iontů s různým poměrem m/z dochází na základě doby letu z iontového zdroje do detektoru. Ionty lišící se poměrem m/z přicházející z iontového zdroje se při stejné kinetické energii pohybují různou rychlostí. Ion s vyšší hmotností se pohybuje pomaleji, proto vstoupí do detektoru později než ion s nižší hmotností. Rozlišení iontů závisí na délce dráhy uražené ionty při průletu analyzátozem. Analyzátor bývá často doplněn reflektorem, což je v podstatě elektrostatické zrcadlo znásobující průletovou dráhu iontů.

Analyzátor se nejčastěji používá u kombinace LC – MS (kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem) pro analýzu vysokomolekulárních látek [18, 28].

6.2.3. Detekce iontů

Elektronásobičové detektory

Existují dva typy s různou konstrukcí. Elektronásobičové detektory s diskretním dynodovým polem a s kontinuální dynodou. První typ detektoru je tvořen kovovými destičkami (dynodami) elektricky propojenými pomocí rezistorů. Po vložení napětí jsou elektrony urychleny ve směru k vedlejší dynodě a zachyceny kolektorem. Po dopadu iontu na první dynodu jsou z dynody vyraženy elektrony. Počet vyražených elektronů se dopadem na další dynody znásobí.

Druhý typ detektoru je představován zakřivenou trubicí vyrobenou z olovnatého skla s vysokým elektrickým odporem. Vnitřní stěna trubice je pokryta vrstvičkou oxidu berylnatého nebo hlinitého. Konce trubice jsou připojeny ke zdroji napětí. Po dopadu iontu jsou z materiálu trubice vyraženy elektrony a urychleny elektrickým polem směrem ke kolektoru. Opakovanými nárazy vznikají další elektrony [28].

Fotonásobičové detektory

Konstrukce fotonásobičového detektoru je složitější než konstrukce předchozího detektoru, avšak tyto detektory jsou mnohem citlivější a mají delší životnost.

Ionty dopadají na pomocnou kovovou elektrodu, kde jsou konvertovány na elektrony. Ty dopadají na scintilační stínítko a poskytují fotony vstupující do fotonásobiče [28].

6.2.4. Čerpací vakuové systémy

K udržení dostatečně nízkého tlaku potřebného pro správnou funkci přístroje se používá vakuový čerpací systém. Nejčastěji se používá dvoustupňový systém, kdy se nejdříve předčerpává běžnými mechanickými rotačními pumpami a na pracovní tlak se dočerpává difúzní nebo turbomolekulární pumpou. Mechanickou rotační pumpou lze dosáhnout tlaku 0,1 – 1 Pa, difúzní pumpou tlaku 10^{-6} Pa a turbomolekulární pumpou při použití dostatečně vysokých otáček ($15\ 000\text{--}60\ 000\ \text{min}^{-1}$) tlaku až 10^{-8} Pa [28].

7. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

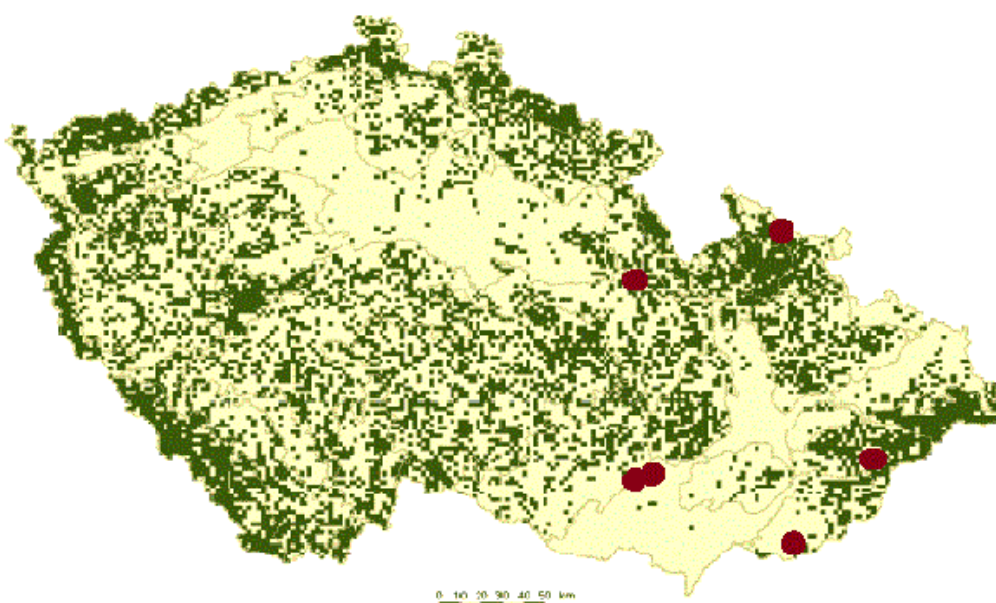
7.1. Odběr vzorků

Vzorky jehličí byly odebrány z různých lokalit České republiky. Větve smrku byly ořezány ve výšce 1 – 2 m a větve borovice ve výšce 2 – 5 m. Následně byly ponechány po dobu 24 hodin k proschnutí, aby se jehlice daly snáze trhat. Jehlice byly vloženy do mikrotenového sáčku a uloženy do mrazicího boxu při teplotě -72°C .

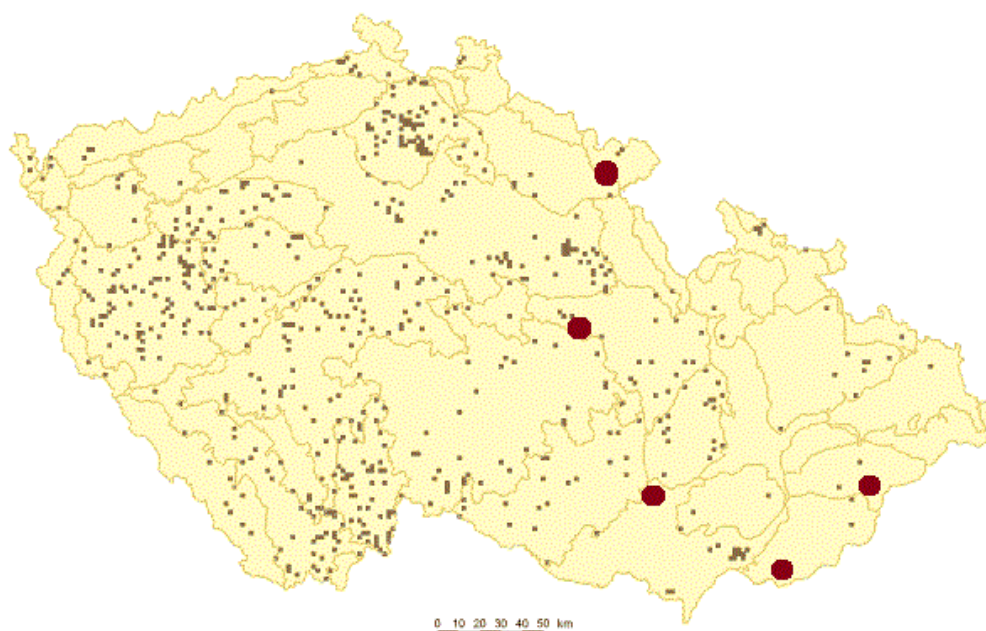
Bylo odebráno celkem 12 vzorků jehličí - 6 vzorků smrku a 6 vzorků borovice. Jednotlivé lokality jsou uvedeny v tabulce 1. Pro lepší orientaci v uvedených lokalitách jsou na obrázcích 7 a 8 zobrazeny mapy s vyznačenými místy odběru.

Tabulka 1: Lokality sběru vzorků

| Smrk ztepilý | | Borovice lesní | |
|---|----------------------------------|--|--------------------------------|
| Lokalita | GPS souřadnice | Lokalita | GPS souřadnice |
| Mikulovice, okres Jeseník | 50°17'47.688"N 17°19'30.539"E | Havlovice, okres Trutnov | 50°28'47.332"N 16°2'8.590"E |
| Brno - Líšeň, okres Brno - město | 49°13'53.7"N 16°41'41.5"E | Svratka, okres Žďár nad Sázavou | 49°42'33.73"N 16° 2'4.80"E |
| Česká Třebová, okres Ústí nad Orlicí | 49°53'49.367"N 16°25'54.978"E | Javorník, okres Hodonín | 48°52'04.2"N 17°32'25.8"E |
| Javorník, okres Hodonín | 48°52'04.2"N 17°32'25.8"E | Brno - Židenice, okres Brno - město | 49°11'16.1"N 16°39'34.6"E |
| Růžďka okres Vsetín | 49°22'55.7"N 18°02'13.6"E | Brno - Lesná, okres Brno - město | 49°13'00.1"N 16°37'05.1"E |
| Troubsko, okres Brno - venkov | 49°10'28.4"N 16°30'29.4"E | Růžďka okres Vsetín | 49°22'44.7"N 18°01'29.5"E |



Obrázek 7: Mapa výskytu smrku ztepilého s vyznačenými místy odběru vzorků



Obrázek 8: Mapa výskytu borovice lesní s vyznačenými místy odběru vzorků

7.2. Analýza vzorků

7.2.1. Použité chemikálie

- n-hexan pro kapalinovou chromatografii, MerckKGaA, Germany
- Dichlormethan (DCM) pro organickou residuální analýzu, J. T. Barker, USA
- Florisil, Sigma – Aldrich, ČR
- Silikagel 60 (0,040 – 0,063 mm), MerckKGaA, Germany
- Síran sodný bezvodý p. a. , Na₂SO₄, PENTA, Praha

7.2.2. Laboratorní přístroje a sklo

- Analytické váhy HR-120, A&D Instruments, Japonsko
- Ultrazvuková lázeň, KRAINTEK
- Vakuová odparka BÜCHI, SRN
- Přístroj EVATERM pro sušení pod dusíkem, Labicom, ČR
- Elektrická laboratorní pec L05/11 HT 40, LAC, s.r.o. Rajhrad
- Muflova pec, LAC s.r.o. , ČR
- Běžné laboratorní sklo a pomůcky (kádinky, baňky, pipety, vialky, aj.)

7.2.3. Optimalizace sloupcové chromatografie

Skleněná kolona pro sloupcovou chromatografii byla naplněna za mokra sloupcem silikagelu o výšce 5 cm a sloupcem florisilu o stejné výšce. Bylo připraveno celkem 5 chromatografických kolon. Silikagel byl aktivován 2 hodiny při 220°C v elektrické peci a florisil v muflově peci po dobu 4 hodin při teplotě 650°C. Plnění za mokra probíhalo tak, že nejdříve byla kolona naplněna n-hexanem. K n-hexanu byl za stálého sklepávání po malých částech přisypáván silikagel. Poté byl stejným způsobem nadávkován i florisil. Přebytný n-hexan byl upuštěn tak, aby jeho hladina byla 1 mm nad sloupcem florisilu. Následně byl nadávkován 1 ml standardního roztoku o koncentraci 100 µg/ml. Roztok byl eluován 10 ml n-hexanu a 5 ml směsi n-hexanu

a DCM v poměru 4:1, z důvodu odstranění alifatických sloučenin přítomných ve vzorku. Výsledné frakce jednotlivých kolon byly získány po eluci 20 ml směsí n-hexanu a DCM v poměrech uvedených v tabulce 2.

Tabulka 2: Použité směsi n-Hexanu a DCM

| Číslo kolony | Poměr n-hexanu a DCM |
|--------------|----------------------|
| 1 | 70:30 |
| 2 | 60:40 |
| 3 | 50:50 |
| 4 | 40:60 |
| 5 | 30:70 |

7.2.4. Postup práce s reálnými vzorky

Nejdříve bylo naváženo 10 g zmrazeného jehličí. To bylo rozetřeno v třecí misce a následně vloženo do baňky, viz obrázek 9. K jehličí byl přidán 1 ml standardního roztoku o koncentraci 100 µg/ml.



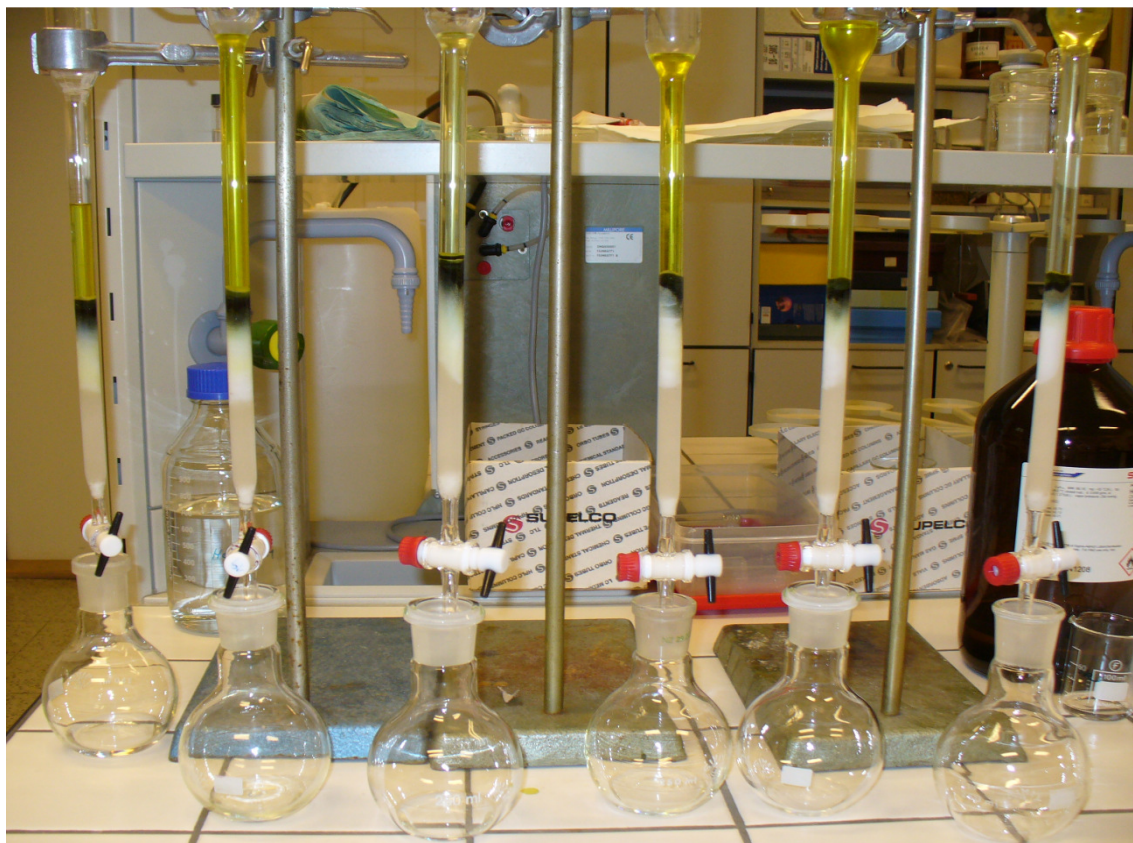
Obrázek 9: Baňky s jehličím připravené na extrakci

Vzorek byl extrahován 30 ml směsí DCM a n-hexanu smíchaných v poměru 1:1 v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut. Po extrakci byl roztok vysušen síranem sodným bezvodým a přefiltrován přes acetonovou vatu. Následně byl roztok odpařen na vakuové odparce na objem 4 – 5 ml. Zahuštěný roztok byl kvantitativně převeden na chromatografickou kolonu.

Během odpařování byla připravena chromatografická kolona. Kolona byla za mokra naplněna desetimetrovým sloupcem aktivovaného silikagelu a florisilu. Silikagel byl aktivován 2 hodiny při teplotě 220°C a florisil 4 hodiny při 650°C.

Vzorek byl poté eluován 10 ml n-hexanu a 5 ml směsí n-hexanu a DCM v poměru 4:1, a to kvůli odstranění alifatických sloučenin přítomných ve vzorku. Požadovaná frakce byla získána elucí 20 ml směsí n-hexanu a DCM v poměru 40:60, viz obrázek 10.

Tato frakce byla odpařena na vakuové odparce přibližně na objem 1 ml a zbytek rozpouštědla byl vysušen pod proudem dusíku. Odparek byl rozpuštěn v 1 ml n-hexanu a převeden do vialky. Takto připravený vzorek byl dále analyzován na plynovém chromatografu s hmotnostně spektrometrickou detekcí.



Obrázek 10: Chromatografické kolony s reálnými vzorky

7.2.5. Plynová chromatografie

- GC x GC – TOF MS system Pegasus 4D (LECO Instrumente, Michigan, USA), plynový chromatograf 6890N (Agilent Technologies, St. Clara, USA), hmotnostní spektrometr HS TOF MS (LECO Instrumente, Michigan, USA)
- Autosampler (100 vzorků)
- Split/splitless injektor
- Primární a sekundární kolona
- Kryogenický modulátor LN2
- Termostat
- Zásobník na tekutý dusík

7.2.6. Hmotnostní spektrometr

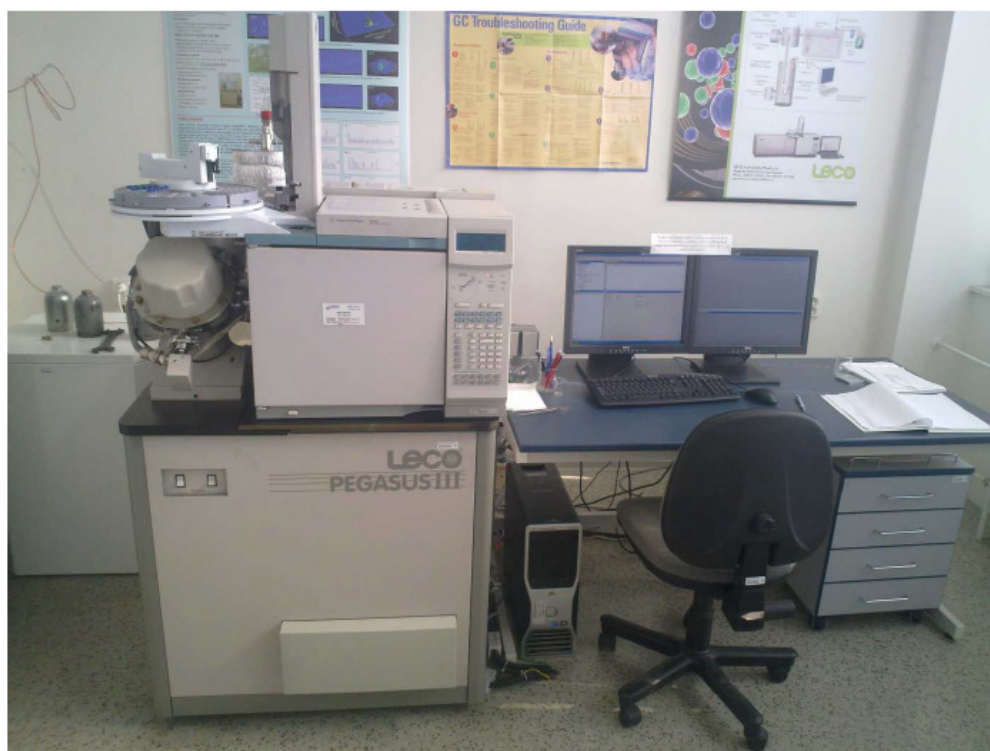
- TOF Hmotnostní spektrometr (LECO Instrumente, Michigan, USA)
- Elektronová ionizace (70 eV)
- Teplota iontového zdroje: 250°C
- Rozsah detekovaných molekulových hmotností: 40 – 400 m/z
- Skenovací rychlost: 100 spekter/s
- Napětí na detektoru: 1850 V

7.2.7. Parametry měření

Podmínky měření jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3: Parametry měření

| | |
|------------------|---|
| Kolona | 28 m x 0,25 mm x 0,25 μ m |
| Teplotní program | 50°C na 1 min 10°C/min do 220°C na 0 min 5°C/min do 320°C na 12 min |
| Nástřik | splitless, uzavřený na 1 min nástřik 1 μ l teplota nástřiku 270°C |
| Nosný plyn | helium pod tlakem 100 kPa |

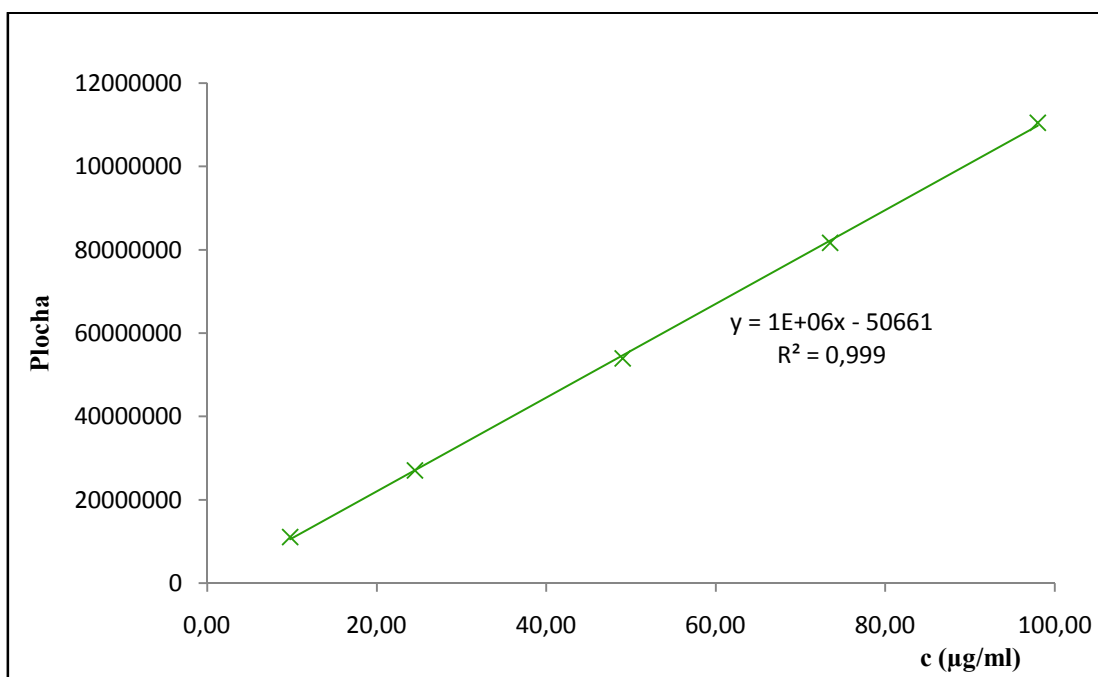


Obrázek 11: GC x GC – TOF MS system Pegasus 4D

7.3. Diskuze a výsledky

V předložené bakalářské práci byla řešena problematika stanovení alkyl - derivátů PAHs, například 1 - methylnaftalenu, 2 - methylnaftalenu, případně 1 - ethylnaftalenu. Pro experimentální stanovení byl vybrán jeden zástupce, a to 2 – methylnaftalen (dále 2 - MN).

Pomocí standardu 2 – MN byla sestrojena pětibodová kalibrační křivka, která je zobrazena na grafu 1.



Graf 1: Kalibrační křivka standardu 2 - MN

7.3.1. Optimalizace sloupcové chromatografie

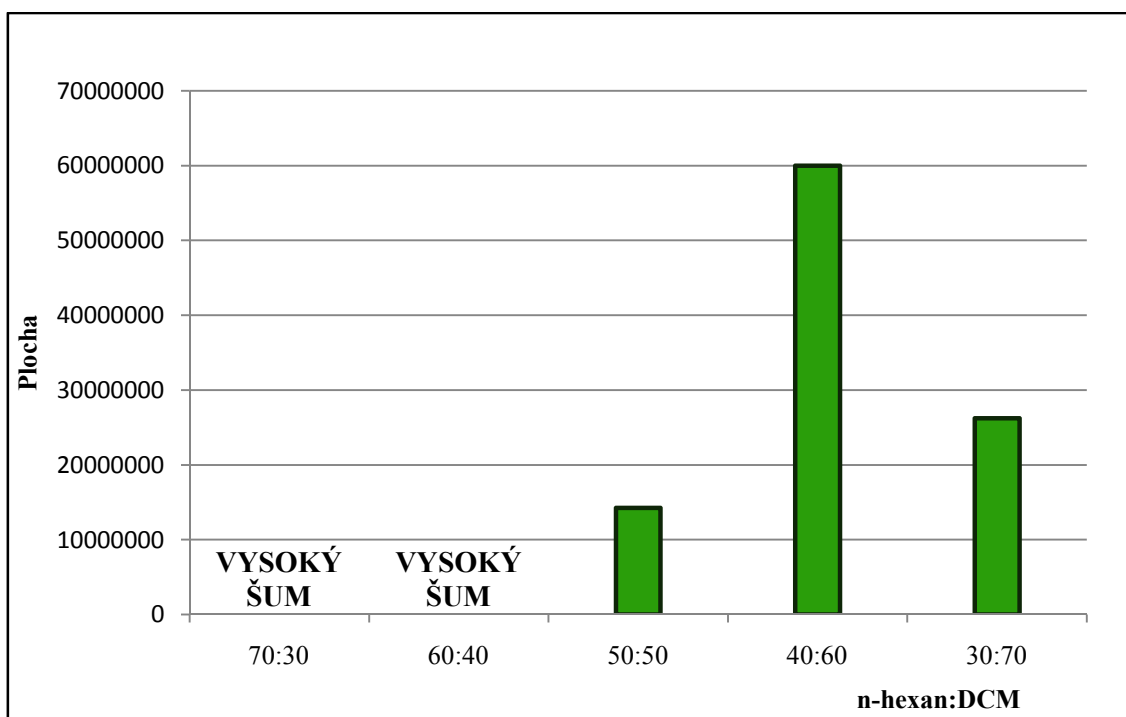
Pro čištění extraktů byla použita sloupcová chromatografie. Při její optimalizaci byly použity různé směsi n-hexanu a DCM. Výtěžnost tohoto optimalizovaného postupu je, a to spolu s množstvím použitých činidel, uvedena v tabulce 4. Grafické znázornění výtěžnosti jednotlivých elučních činidel je prezentováno v grafu 2.

Z tohoto grafu jednoznačně vyplývá, že výtěžnost eluce roste s vyšším množstvím DCM v eluční směsi, avšak pouze do určitého poměru. V rámci optimalizace bylo prokázáno, že nejúčinnějším elučním činidlem byla směs n-hexanu a DCM v poměru 40:60. Její výtěžnost byla opravdu vysoká, protože následující směs elučních činidel, tj. 30:70, byla nižší o více než o polovinu. Z tohoto důvodu byla směs n-hexanu a DCM v poměru 40:60 následně použita i pro eluci u reálných vzorků.

Z důvodu vysokého šumu nebylo možné určit výtěžnost u prvních dvou použitých poměrů činidel, tj. u směsi 70:30 a 60:40 n-hexanu a DCM.

Tabulka 4: Výtěžnost a množství použitých elučních činidel

| Číslo kolony | Množství směsi [ml] | Poměr n-hexanu a DCM | Výtěžnost [%] |
|--------------|---------------------|----------------------|---------------|
| 1 | 20 | 70:30 | - |
| 2 | 20 | 60:40 | - |
| 3 | 20 | 50:50 | 16 |
| 4 | 20 | 40:60 | 54 |
| 5 | 20 | 30:70 | 26 |



Graf 2: Výtěžnost různých směsí n-hexanu a DCM použitých při eluci

7.3.2. Mez detekce a kvantifikace

Pro potřeby optimalizace je rovněž nezbytné stanovit základní metrologické parametry, mezi které patří mez detekce a mez kvantifikace. Vztah pro jejich výpočet byl převzatý z literatury [29].

Tyto metrologické parametry byly vypočteny z kalibrační křivky; pro výpočet meze detekce (LOD) a meze stanovitelnosti, případně kvantifikace (LOQ), byly použity vzorce 7.1 a 7.2. Hodnota s_n v těchto vzorcích udává šum na základní linii a n je směrnice kalibrační přímky. Výsledné hodnoty jsou uvedeny v tabulce 5.

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot s_n}{n} \quad (7.1)$$

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot s_n}{n} \quad (7.2)$$

Tabulka 5: Mez detekce a mez kvantifikace

| Mez detekce | | Mez kvantifikace | |
|--------------------------|--------|--------------------------|--------|
| LOD [$\mu\text{g/ml}$] | 0,0679 | LOQ [$\mu\text{g/ml}$] | 0,2264 |

7.3.3. Koncentrace 2 - methylnaftalenu v reálných vzorcích jehličí

V tabulce 6 jsou uvedeny výsledky stanovení koncentrace 2 - MN v reálných vzorcích, konkrétně v jehlicích smrku ztepilého. Jednotlivé koncentrace byly vypočítány pomocí kalibrační křivky. Nejvyšší koncentrace byla kvantifikována u vzorku z lokality Javorník. Vzhledem k velké schopnosti PAHs vázat se na povrch pevných částic v ovzduší a prostřednictvím ovzduší se dále transportovat na velké vzdálenosti, může být tato vysoká koncentrace způsobena činností průmyslové továrny - Kordárna Plus a.s., která se nachází v sousední obci, vzdálené cca 3 km od místa odběru vzorku. Továrna je v provozu již od roku 1950 a zabývá se produkcí kordových tkanin pro gumárenský průmysl a výrobou dalších technických tkanin. Hodnoty koncentrací ve vzorcích z ostatních lokalit se vyskytovaly pod mezí kvantifikace.

Tabulka 6: Koncentrace 2 - MN ve vzorcích smrku ztepilého

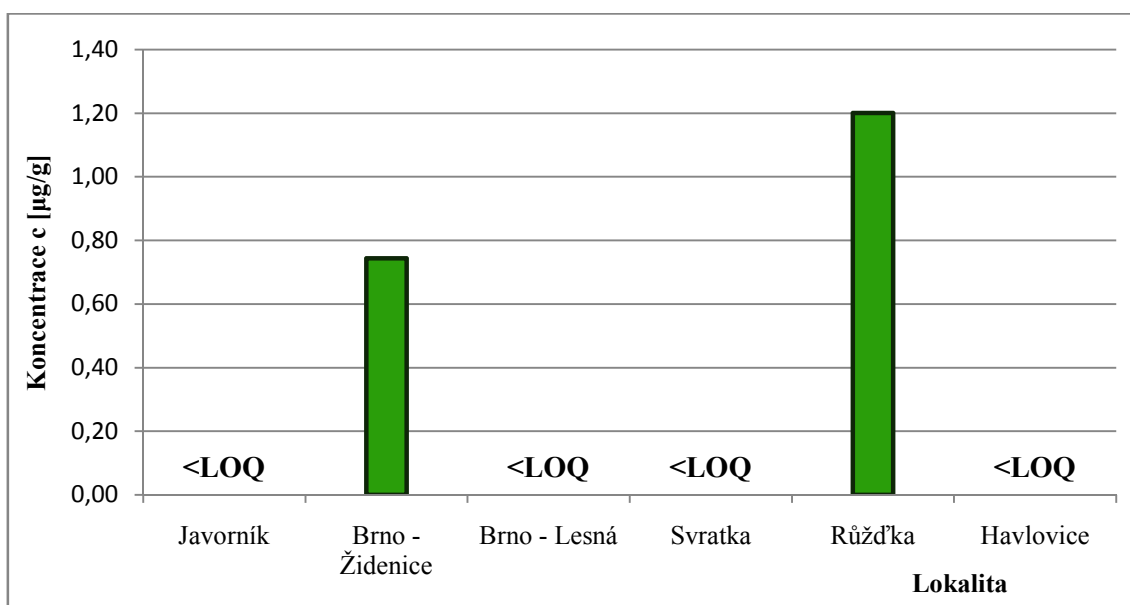
| Lokalita | Strom | Množství [$\mu\text{g/g}$] |
|---------------|-------|------------------------------|
| Javorník | smrk | 0,3682 |
| Brno - Líšeň | smrk | <LOQ |
| Troubsko | smrk | <LOQ |
| Růžďka | smrk | <LOQ |
| Mikulovice | smrk | <LOQ |
| Česká Třebová | smrk | <LOQ |

Pomocí tabulky 7 jsou prezentovány koncentrace 2 - MN obsažené ve vzorcích jehlic borovice lesní. Jednotlivé koncentrace byly rovněž vypočítány z kalibrační křivky. Nejvyšší koncentrace byla stanovena u vzorku z lokality Růžďka. Jedním z možných příčin této vysoké koncentrace mohou být emise z automobilové dopravy, protože vzorky byly odebírány v blízkosti silniční komunikace. Dalším důvodem může být také sekundární kontaminace pocházející z průmyslové továrny - Deza, a.s., která je situovaná ve Valašském Meziříčí, vzdáleném od místa odběru vzorku 14 km. Továrna zpracovává surový benzol a vysokoteplotní černouhelný dehet, ze kterých vyrábí řadu aromatických sloučenin, jako např. naftalen a antracen. Druhá nejvyšší koncentrace byla naměřena v lokalitě Brno - Židenice. Vysoká koncentrace může být v tomto případě způsobena emisemi z automobilové dopravy, případně může pocházet z blízké spalovny městského odpadu Sako Brno, a.s. Koncentrace ve vzorcích z ostatních lokalit byly stanoveny pod mezí kvantifikace. Grafické vyjádření je zpracováno do grafu 3.

Tabulka 7: Koncentrace 2 - MN ve vzorcích borovice lesní

| Lokalita | Strom | Množství [$\mu\text{g/g}$] |
|-----------------|----------|------------------------------|
| Javorník | borovice | <LOQ |
| Brno - Židenice | borovice | 0,7440 |
| Brno - Lesná | borovice | <LOQ |
| Svratka | borovice | <LOQ |
| Růžďka | borovice | 1,2007 |
| Havlovice | borovice | <LOQ |

Vzhledem k tomu, že se většina výsledných koncentrací pohybuje pod mezí detekce i kvantifikace, nelze pomocí získaných výsledků jednoznačně posoudit, zda je jehličí vhodným bioindikátorem pro stanovení substituovaných PAHs v životním prostředí. Pro jednoznačné posouzení by bylo pravděpodobně vhodné analyzovat větší soubor reálných vzorků.



Graf 3: Koncentrace 2 – MN ve vzorcích jehlic borovice lesní

Hodnoty, které byly detekovány a kvantifikovány v jehlicích smrku ztepilého a borovice lesní, nelze porovnat s podobnými údaji publikovanými v ČR a v zahraničí, protože v dostupné literatuře nebyly k dispozici žádné publikace s podobnými údaji, které by bylo možné použít pro toto porovnání. Existují pouze některé ucelené studie, které jsou však zaměřeny na PAHs, nikoliv na substituované PAHs [30].

Na našem pracovišti byly již na toto téma zpracovávány diplomové práce využívající jehličí smrku, borovice a jedle jako rostlinného bioindikátoru, avšak tyto byly zaměřené výhradně na stanovení organohalogenovaných sloučenin, tj. polychlorovaných bifenyly a polybromovaných difenyletherů [31].

8. ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši na téma využití bioindikátorů rostlinného původu pro stanovení substituovaných PAHs.

Pro splnění tohoto cíle musela být optimalizovaná analytická metoda, která byla založena na izolaci analytu (2 - methylnaftalenu) z matrice, tj. z jehličí, pomocí extrakce prováděné v ultrazvukové lázni a v následném stanovení tohoto analytu metodou plynové chromatografie s hmotnostním detektorem.

V rámci splnění cílů předložené bakalářské práce bylo dosaženo těchto výsledků:

- Byla vypracována rešerše na téma posouzení vhodnosti rostlinných bioindikátorů pro posouzení zátěže životního prostředí; v rámci zpracované teoretické části byly rovněž popsány základní vlastnosti PAHs, včetně substituovaných PAHs.
- V experimentální části byla zaměřena pozornost na alkyl – deriváty, konkrétně na jednoho zástupce z této skupiny, tj. 2 - methylnaftalen.
- Byla vypracována preanalytická a analytická metoda pro jeho stanovení, která zahrnuje tyto základní kroky analytického postupu: odběr vzorku a jeho úpravu na laboratorní a analytický vzorek, izolace analytu z matrice, přečištění extraktu pomocí sloupcové chromatografie a vlastní stanovení metodou plynové chromatografie s detekcí hmotnostním spektrometrem.
- Tato metoda byla poté optimalizována pomocí standardního roztoku 2 – methylnaftalenu.
- Optimalizovaná metoda byla použita pro stanovení 2 - methylnaftalenu u dvou druhů jehličí, a to u jehlic smrku ztepilého a jehlic borovice lesní.
- Koncentrace tohoto substituovaného PAH se téměř u všech vzorků pohybovala pod mezí detekce, případně kvantifikace.
- Proto lze předpokládat, že by bylo vhodné v navazující diplomové práci ověřit vhodnost i dalších extrakčních postupů. Měly by být vyzkoušeny i další účinnější extrakční metody (např. PSE, MAE), jejichž použití by mohlo mít za následek snížení meze detekce.

9. LITERÁRNÍ ZDROJE

- [1] Senate Department for Urban Development and the Environment: Berlin Environmental Atlas. *Berlin.de: Das Offizielle Hauptstadtportal*. Dostupné z: http://www.stadtentwicklung.berlin.de/umwelt/umweltatlas/ed307_01.htm
- [2] SOJÁK, L., E. CHMIELEWSKÁ, J. KRIŠTÍN, R. KUBINEC a J. MÁTEL. Monitoring kontaminácie životného prostredia. 2002, s. 144. Dostupné z: http://www.fns.uniba.sk/uploads/media/Monitoring_kontaminacie_zivotneho_prostredia.pdf
- [3] Bioindikátory. *Fakultní web FLE*. Dostupné z: http://fle.czu.cz/~ulbrichova/Skripta_HIO/kapitoly/Metody/bioindikatory.htm
- [4] VÁVROVÁ, M. Využití bioindikátorů při hodnocení starých zátěží terestrického ekosystému. Brno, 2004. 104 s. Dostupné z: <http://www.phytosanitary.org/old/projekty/2004/vvf-12-04.pdf>
- [5] HUI, Yin, Tan QING a Chen YONG. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) pollution recorded in annual rings of ginkgo (*Gingko biloba* L.): Determination of PAHs by GC/MS after accelerated solvent extraction. *Microchemical Journal*. 2011, roč. 97, č. 2, s. 138-143. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X1000158X>
- [6] RATOLA, Nuno, LACORTE, ALVES a BARCELO. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in pine needles by gas chromatography–mass spectrometry Comparison of different extraction and clean-up procedures. *Journal of Chromatography*. 2006, roč. 1114, 198 – 204. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967306007382>
- [7] Bioindicators. *Science Learning Hub*. 2009. Dostupné z: <http://www.sciencelearn.org.nz/Contexts/Enviro-imprints/Science-Ideas-and-Concepts/Bioindicators>
- [8] IUHUA, Zhu, Gerd PFISTER, Bernhard HENKELMANN, Jarmila KOTALIK a Silke BERNHÖFT. Simultaneous monitoring of profiles of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated air with semipermeable membrane devices and spruce needles. *Environmental Pollution*. 2008, roč. 156, s. 461-466. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749108000535>
- [9] Ovzduší. In: *České vysoké učení technické v Praze*. Dostupné z: http://aldebaran.feld.cvut.cz/vyuka/ekologie_a_ekotechnika/prednasky/pr4w6.doc

- [10] TURCOTTE, Dominique. *TOXICITY AND METABOLISM OF ALKYL-POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN FISH*. Kingston, Ontario, Canada, 2008. Dostupné z: http://qspace.library.queensu.ca/bitstream/1974/1382/1/Turcotte_Dominique_200808_PhD.pdf. Dizertační práce. Queen's University.
- [11] Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). *Agency for Toxic Substances & Disease Registry: Toxic Substances Portal – Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)*. 1995. vyd. Dostupné z: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=122&tid=25>
- [12] Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH). MINISTERSTVO ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ. *Integrovaný registr znečišťování*. Dostupné z: <http://www.irz.cz/node/86>
- [13] BARRADO, Ana Isabel, Susana GARCÍA, Yolanda CASTRILLEJO a Enrique BARRADO. Exploratory data analysis of PAH, nitro-PAH and hydroxy-PAH concentrations in atmospheric PM10-bound aerosol particles. Correlations with physical and chemical factors. 2013, č. 67, s. 385-393. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1352231012009946>
- [14] TOMASHUK, Timothy A., Triet M. TRUONG, Madhavi MANTHA a Audrey E. MCGOWIN. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbon profiles and sources in pine needles and particulate matter in Dayton, Ohio, USA. *Atmospheric Environment*. 2012, roč. 51, s. 196-202. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1352231012000490>
- [15] LI, Y. S., P. P. FU a J. S. CHURCH. The conformation of some nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal of Molecular Structure*. 2000, s. 217-223 Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022286000005196>
- [16] Kocourek, Vladimír. Nitrované polycyklické uhlovodíky (nitroPAH): environmentální karcinogeny. 2004. 42 s. Dostupné z: www.phytosanitary.org/projekty/2004/vvf-09-04.pdf
- [17] KARAVALAKIS, George, George DEVES, Georgios FONTARAS, Stamoulis STOURNAS, Zissis SAMARAS a Evangelos BAKEAS. The impact of soy-based biodiesel on PAH, nitro-PAH and oxy-PAH emissions from a passenger car operated over regulated and nonregulated driving cycles. *Fuel*. 2010, č. 89, 3876 - 3883. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236110003492>
- [18] Čáslavský J.: *Analytické metody technické praxe*. (přednáška) Brno: VUT FCH.

- [19] CCME (CANADIAN COUNCIL OF MINISTERS OF THE ENVIRONMENT). *CARCINOGENIC AND OTHER POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS (PAHs)*. 2010. ISBN 978-1-896997-94-0. Dostupné z: http://www.ccme.ca/assets/pdf/pah_soqg_scd_1445.pdf
- [20] Smrk ztepilý (Picea Abies). *Herbář Wendys*. Dostupné z: <http://botanika.wendys.cz/kytky/K632.php>
- [21] Borovice lesní (Pinus sylvestris). *Herbář Wendys*. Dostupné z: <http://botanika.wendys.cz/kytky/K539.php>
- [22] Smrk ztepilý (Picea abies L., Karst.). *Masarykova univerzita*. Dostupné z: http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps10/biogeogr/web/index_Pic_abi.html
- [23] Borovice lesní (Pinus sylvestris L.). *Masarykova univerzita*. Dostupné z: http://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps10/biogeogr/web/index_Pic_abi.html
- [24] CHURÁČEK, Jaroslav a Stanislav KOTRLÝ. *Analytická chemie II*. 1. vyd. Pardubice, 1983. ISBN 55-714-82.
- [25] Zýka J. a kolektiv: *Analytická příručka (I a II díl)*, SNTL/ALFA, Praha/Bratislava, 1988. ISBN 04-611-88
- [26] Plynová chromatografie (GC). *Masarykova univerzita*. Dostupné z: http://cheminfo.chemi.muni.cz/chem_sekce/predmety/C7300/GC/uvod.pdf
- [27] Čáslavský J.: *Analytická chemie II*. (přednáška) Brno: VUT FCH.
- [28] ŠTULÍK, Karel. *Analytické separační metody*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2004, 264 s. ISBN 80-246-0852-9
- [29] IUPAC: *Compendium of Chemical Terminology*, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997).
- [30] KOTLAŘÍKOVÁ, Pavla. *Vzorkování organických polutantů v životním prostředí pomocí SPMDs*. Dizertační práce. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2004. 132 s., 7 příloh. Vedoucí práce Ing. Josef Čáslavský, CSc.
- [31] HLAVÁČKOVÁ, Ilona. *Zhodnocení obsahu PCB a PBDE v rostlinných bioindikátorech*. Diplomová práce. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2009. 96 s. Vedoucí práce prof. RNDr. Milada Vávrová, CSc.

10. ZKRATKY

| | |
|---------|---|
| DCM | dichlormethan |
| ECD | detektor elektronového záchytu |
| FID | plamenově ionizační detektor |
| GC | plynová chromatografie |
| GC – MS | plynová chromatografie s hmotnostním spektrometrem |
| HPAHs | polycyklické aromatické uhlovodíky s vyšší molekulovou hmotností |
| LC – MS | kapalinová chromatografie s hmotnostním spektrometrem |
| LPAHs | polycyklické aromatické uhlovodíky s nízkou molekulovou hmotností |
| 2 – MN | 2 –methylnaftalen |
| MS | hmotnostní spektrometr |
| n | směrnice kalibrační přímky |
| PAH | polycyklické aromatické uhlovodíky |
| PCB | polychlorované bifenyly |
| POPs | perzistentními organickými polutanty |
| PSE | extrakce za zvýšeného tlaku |
| s_n | šum na základní linii |
| SPMD | vzorkovací trubice z polopropustné membrány |
| TCD | tepelně vodivostní detektor |
| TOF | analyzátor doby letu |
| USE | extrakce ultrazvukem |

11. SEZNAM OBRÁZKŮ:

Obrázek 1: Polycyklické aromatické uhlovodíky

Obrázek 2: Smrk ztepilý

Obrázek 3: Borovice lesní

Obrázek 4: Jehlice borovice lesní

Obrázek 5: Jehlice smrku ztepilého

Obrázek 6: Schéma plynového chromatografu

Obrázek 7: Mapa výskytu smrku ztepilého s vyznačenými místy odběru vzorků

Obrázek 8: Mapa výskytu borovice lesní s vyznačenými místy odběru vzorků

Obrázek 9: Baňky s jehličím připravené na extrakci

Obrázek 10: Chromatografické kolony s reálnými vzorky

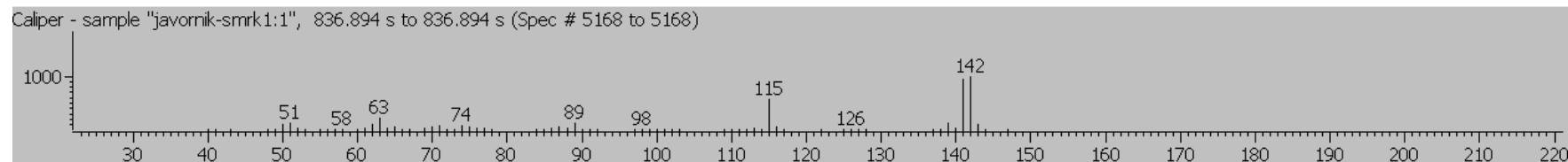
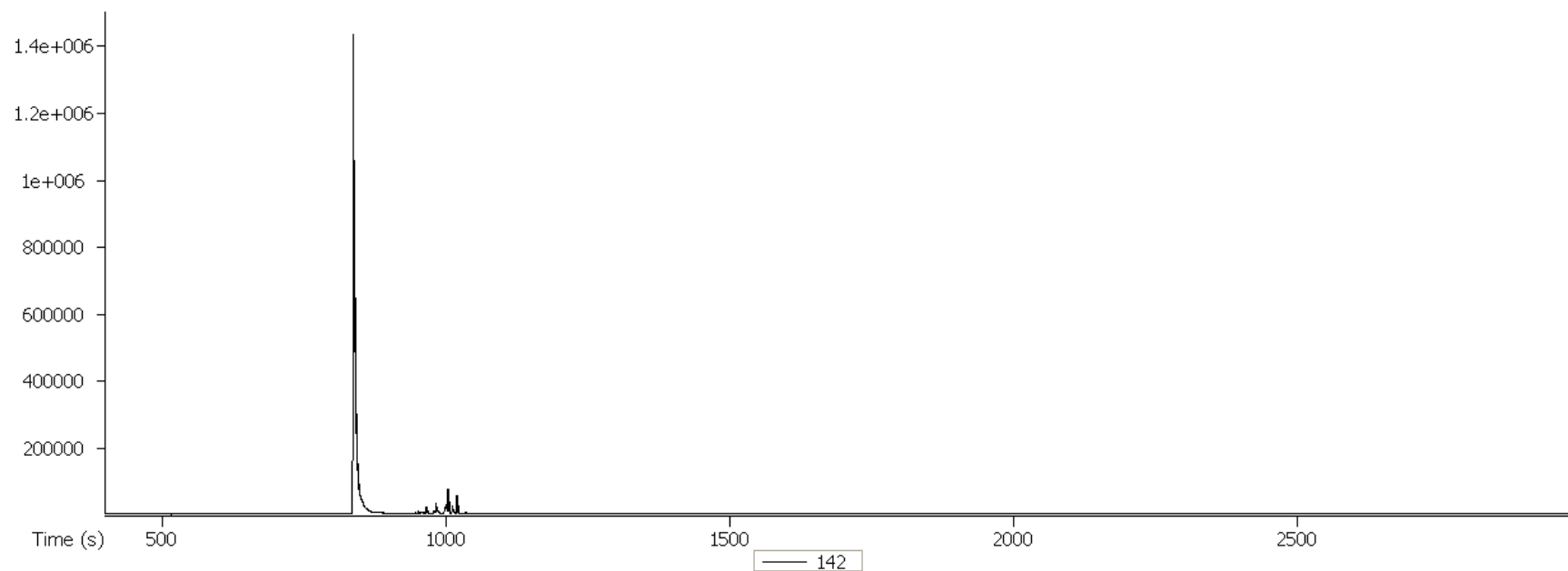
Obrázek 11: GC x GC – TOF MS system Pegassus 4D

12. SEZNAM PŘÍLOH:

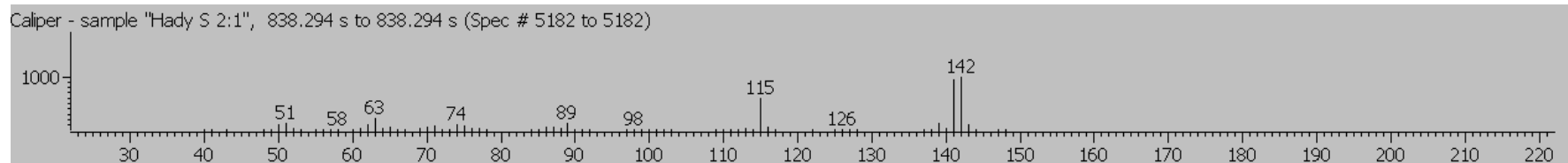
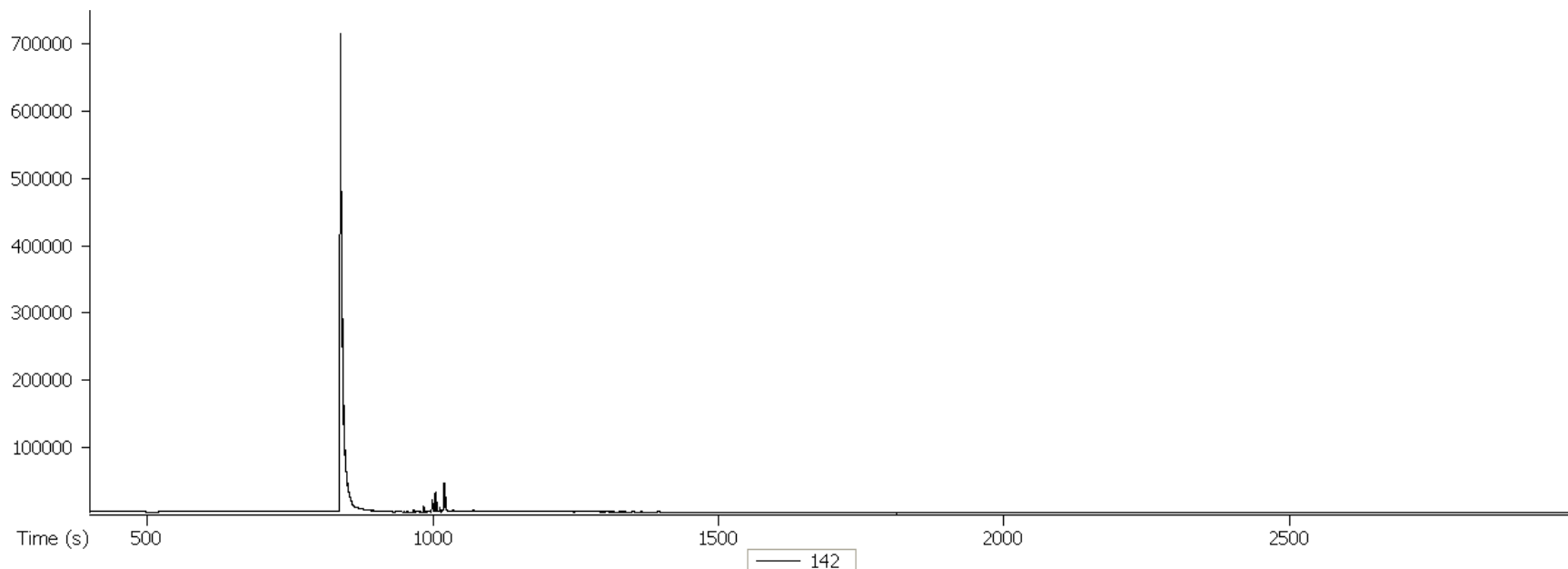
- Příloha č. 1: Chromatogram a záznam spektra Smrku ztepilého, lokalita Javorník
- Příloha č. 2: Chromatogram a záznam spektra Smrku ztepilého, lokalita Brno (Hády)
- Příloha č. 3: Chromatogram a záznam spektra Smrku ztepilého, lokalita Troubsko
- Příloha č. 4: Chromatogram a záznam spektra Smrku ztepilého, lokalita Růžďka
- Příloha č. 5: Chromatogram a záznam spektra Smrku ztepilého, lokalita Mikulovice
- Příloha č. 6: Chromatogram a záznam spektra Smrku ztepilého, lokalita Česká Třebová
- Příloha č. 7: Chromatogram a záznam spektra Borovice lesní, lokalita Javorník
- Příloha č. 8: Chromatogram a záznam spektra Borovice lesní, lokalita Brno (Židenice)
- Příloha č. 9: Chromatogram a záznam spektra Borovice lesní, lokalita Brno (Lesná)
- Příloha č. 10: Chromatogram a záznam spektra Borovice lesní, lokalita Svratka
- Příloha č. 11: Chromatogram a záznam spektra Borovice lesní, lokalita Růžďka
- Příloha č. 12: Chromatogram a záznam spektra Borovice lesní, lokalita Havlovice

PŘÍLOHY:

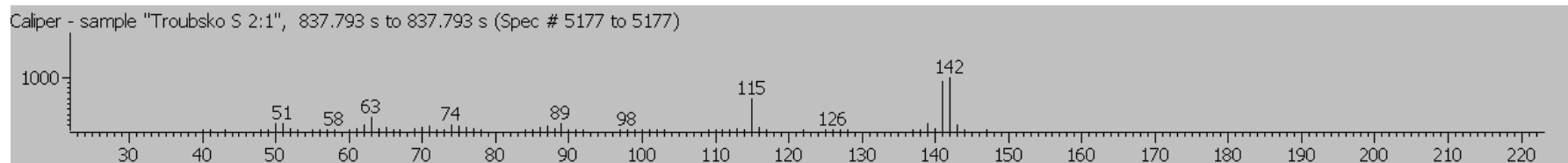
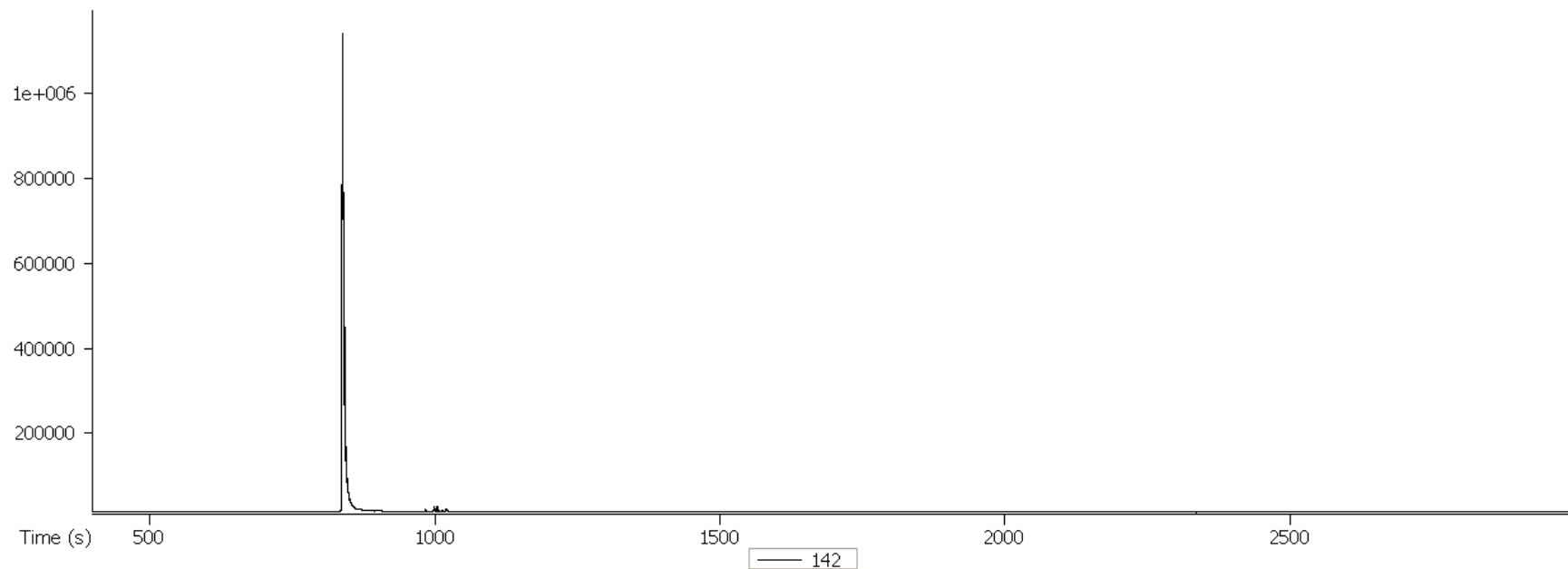
Příloha č. 1: Chromatogram Smrku ztepilého, lokalita – Javorník



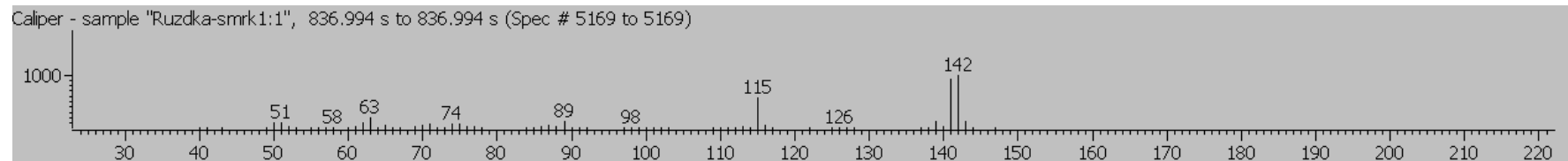
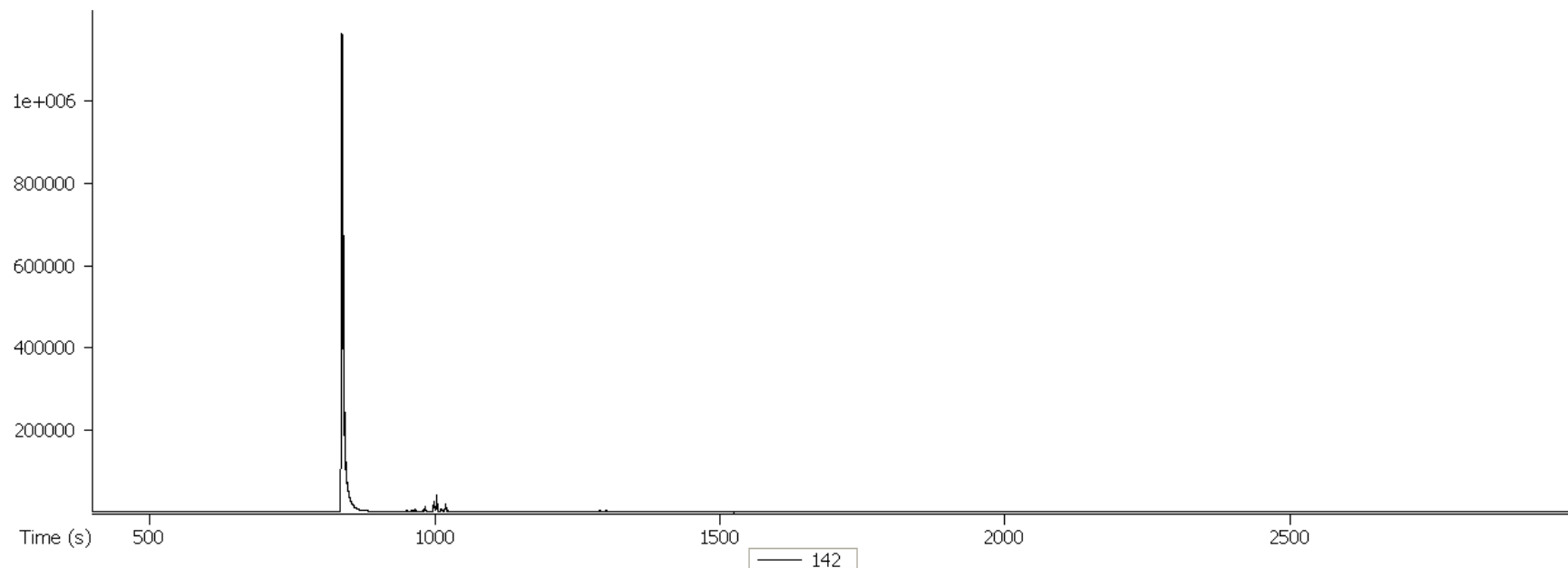
Příloha č. 2: Chromatogram Smrku ztepilého, lokalita – Brno (Hády)



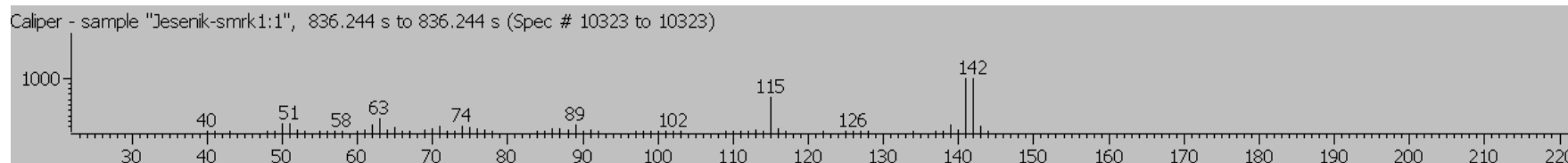
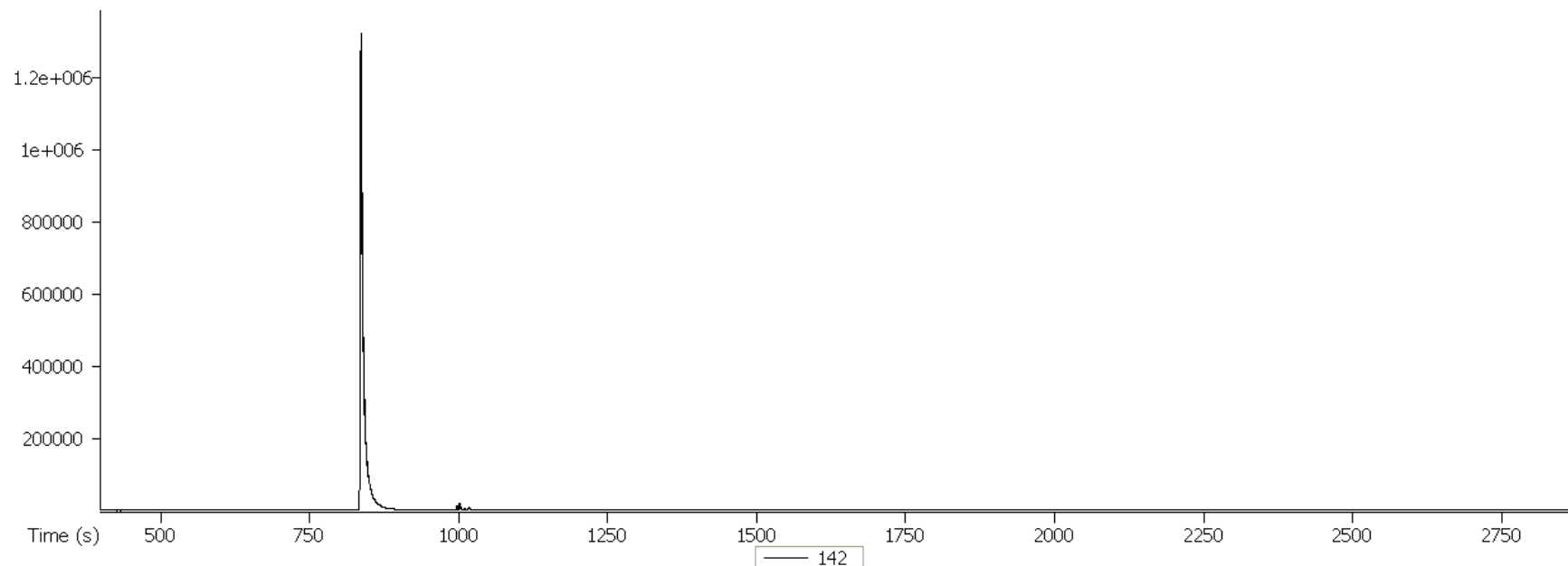
Příloha č. 3: Chromatogram Smrku ztepilého, lokalita – Troubsko



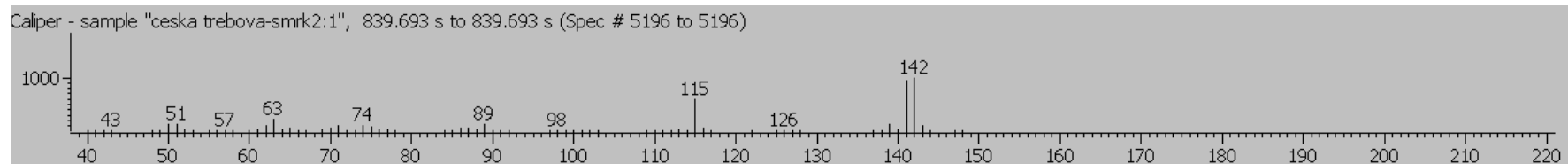
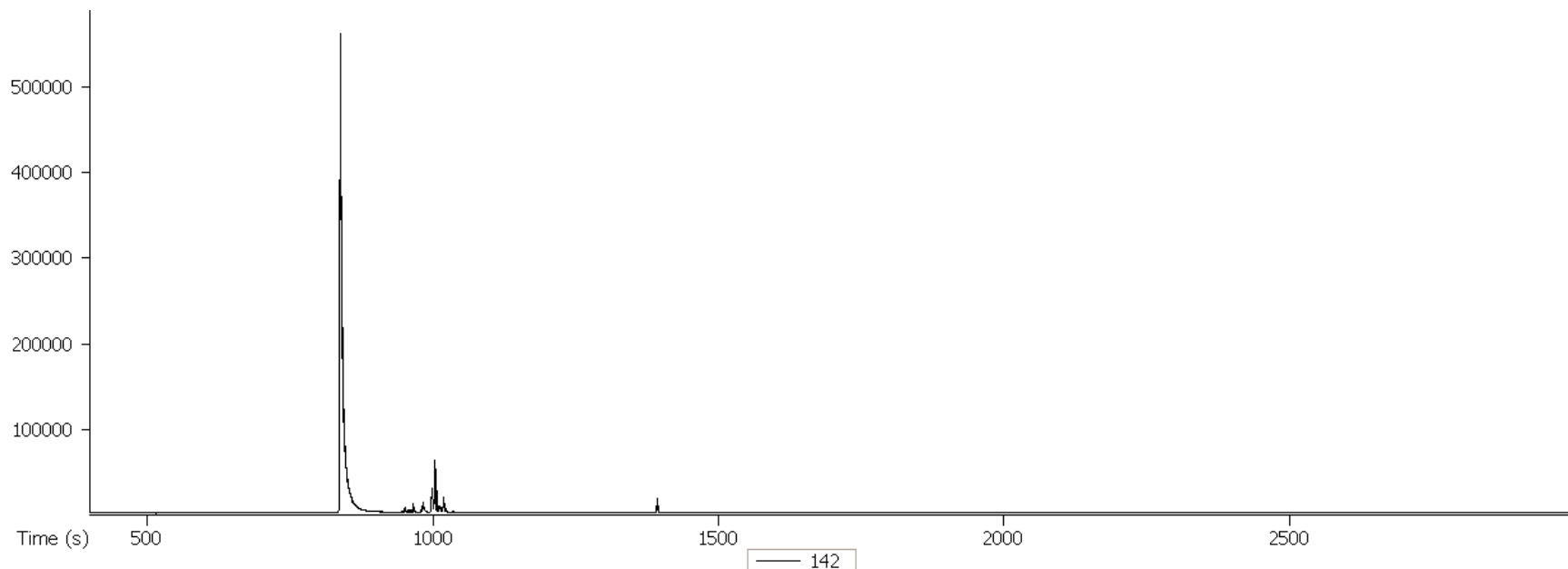
Příloha č. 4: Chromatogram Smrku ztepilého, lokalita – Růžďka



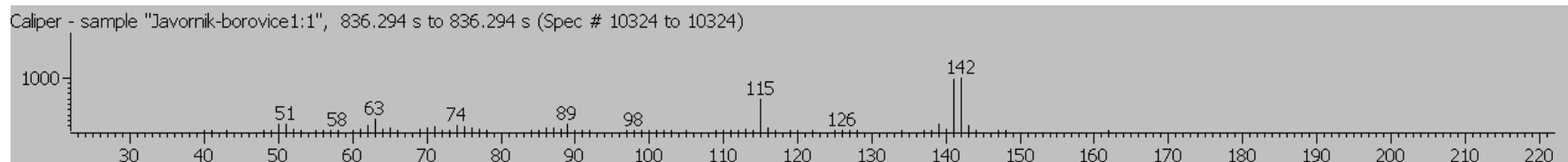
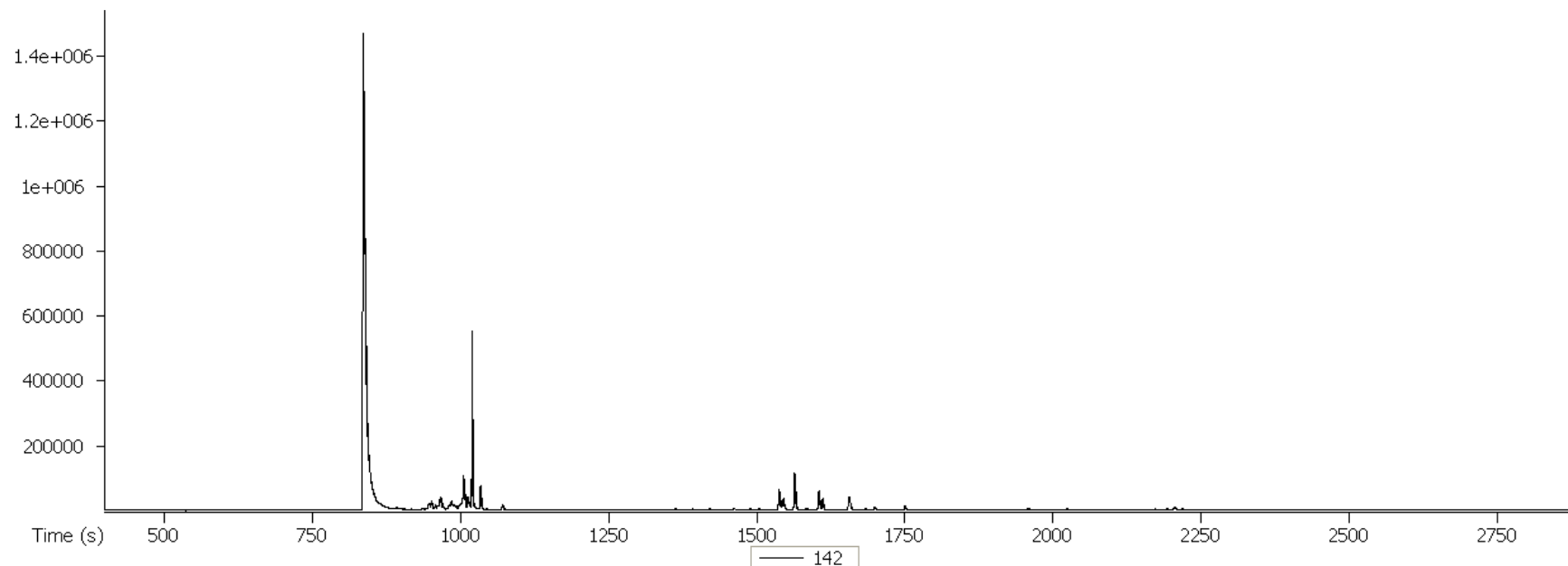
Příloha č. 5: Chromatogram Smrku ztepilého, lokalita – Mikulovice



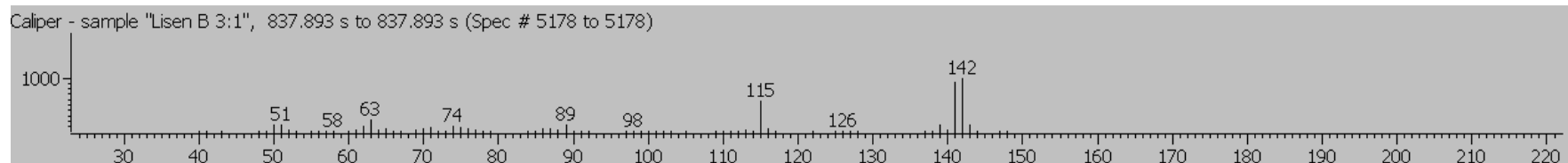
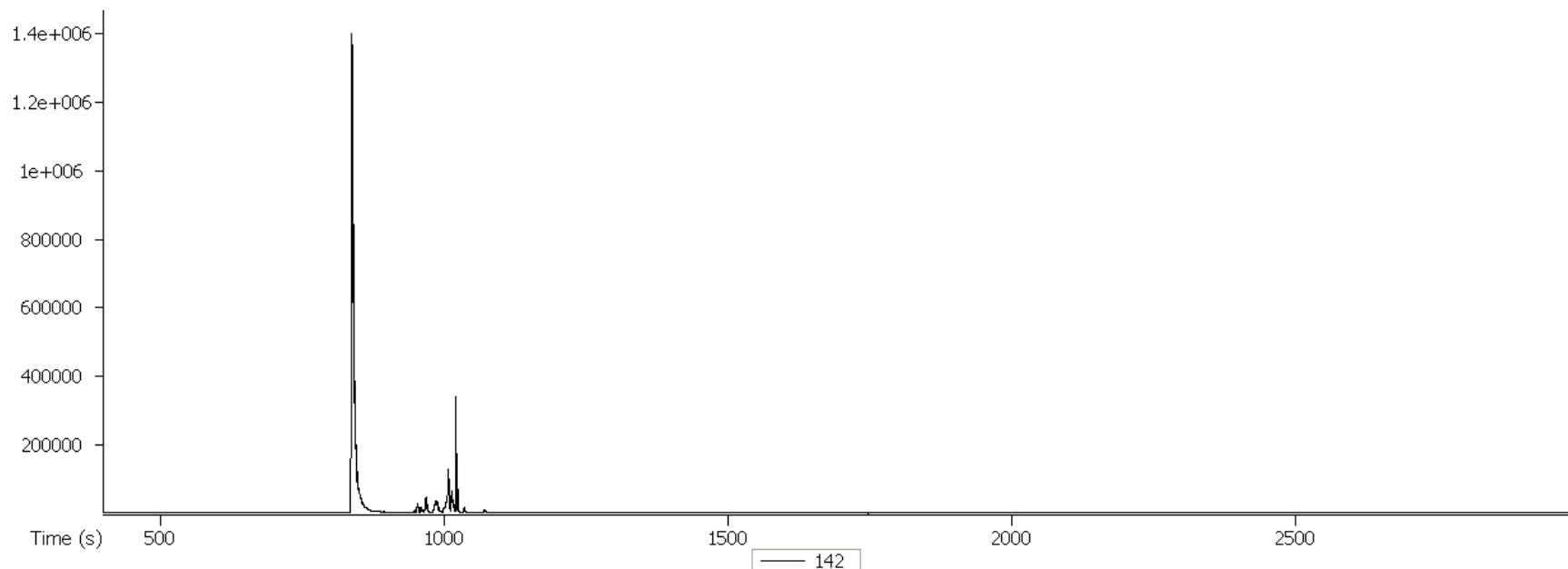
Příloha č. 6: Chromatogram Smrku ztepilého, lokalita – Česká Třebová



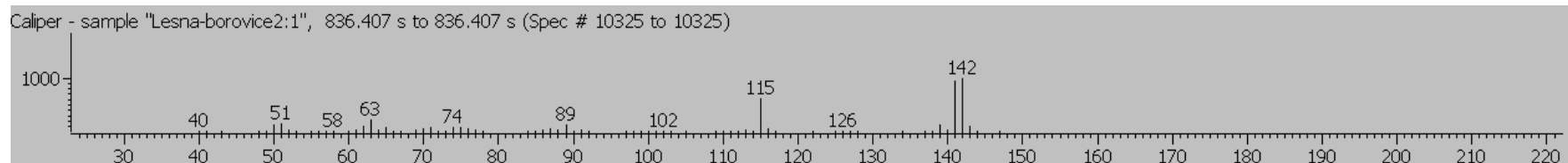
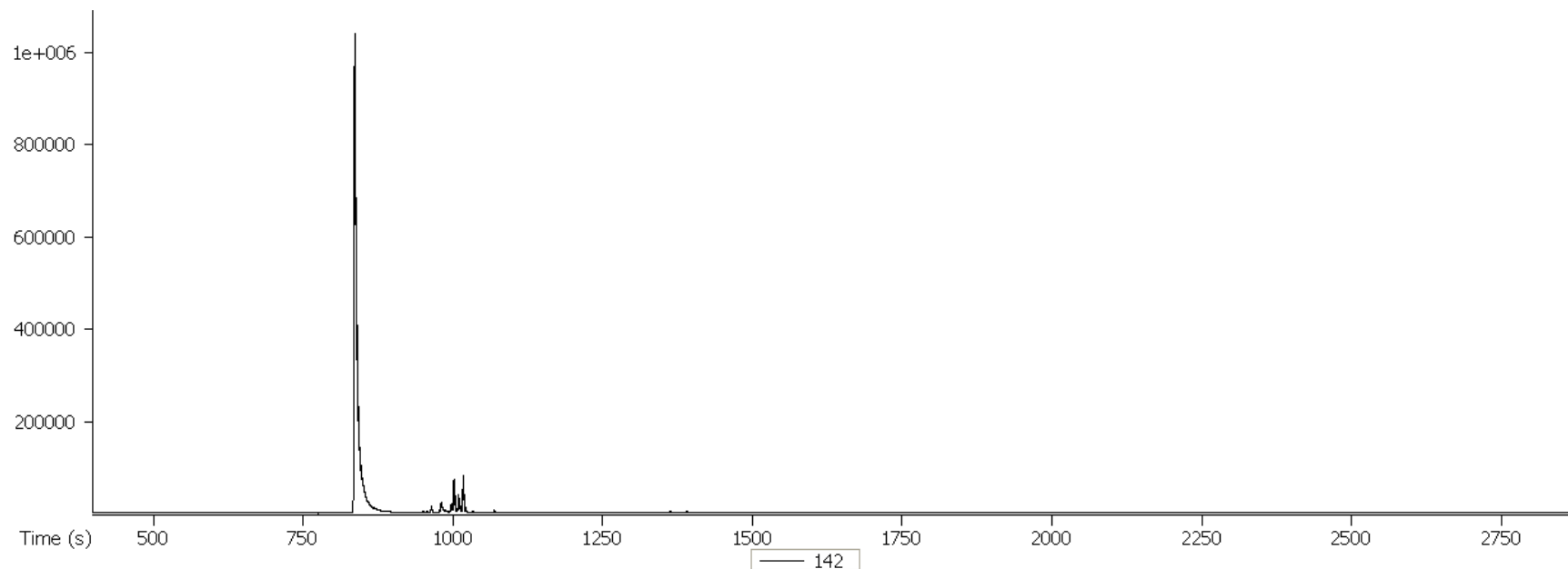
Příloha č. 7: Chromatogram Borovice lesní, lokalita – Javorník



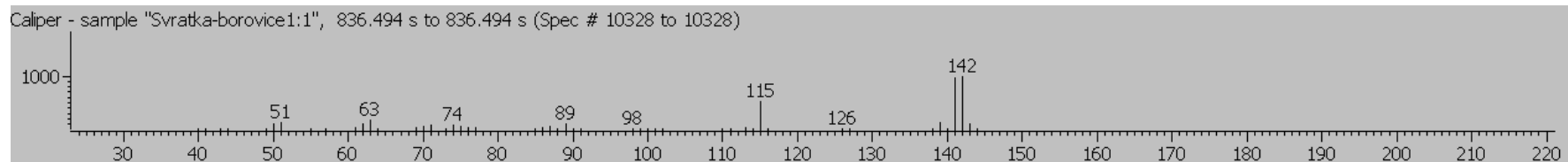
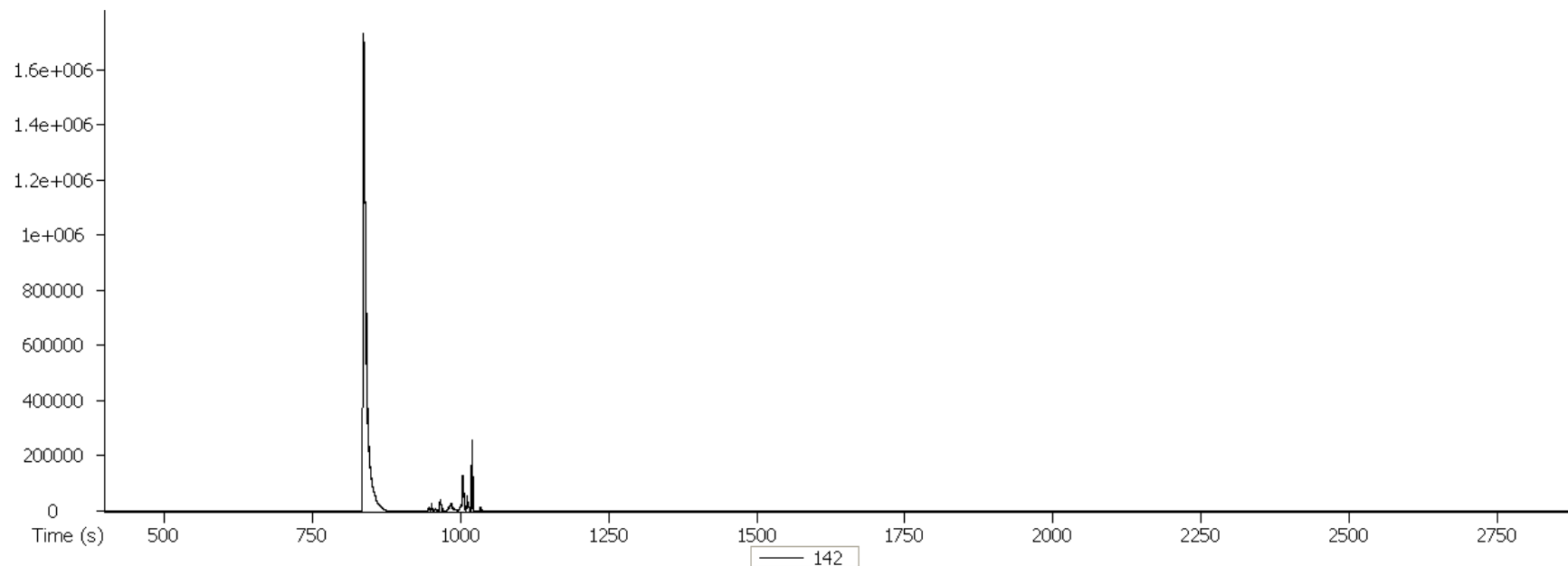
Příloha č. 8: Chromatogram Borovice lesní, lokalita – Brno (Židenice)



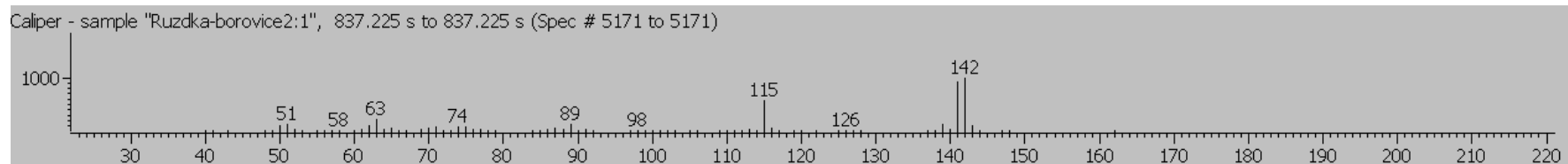
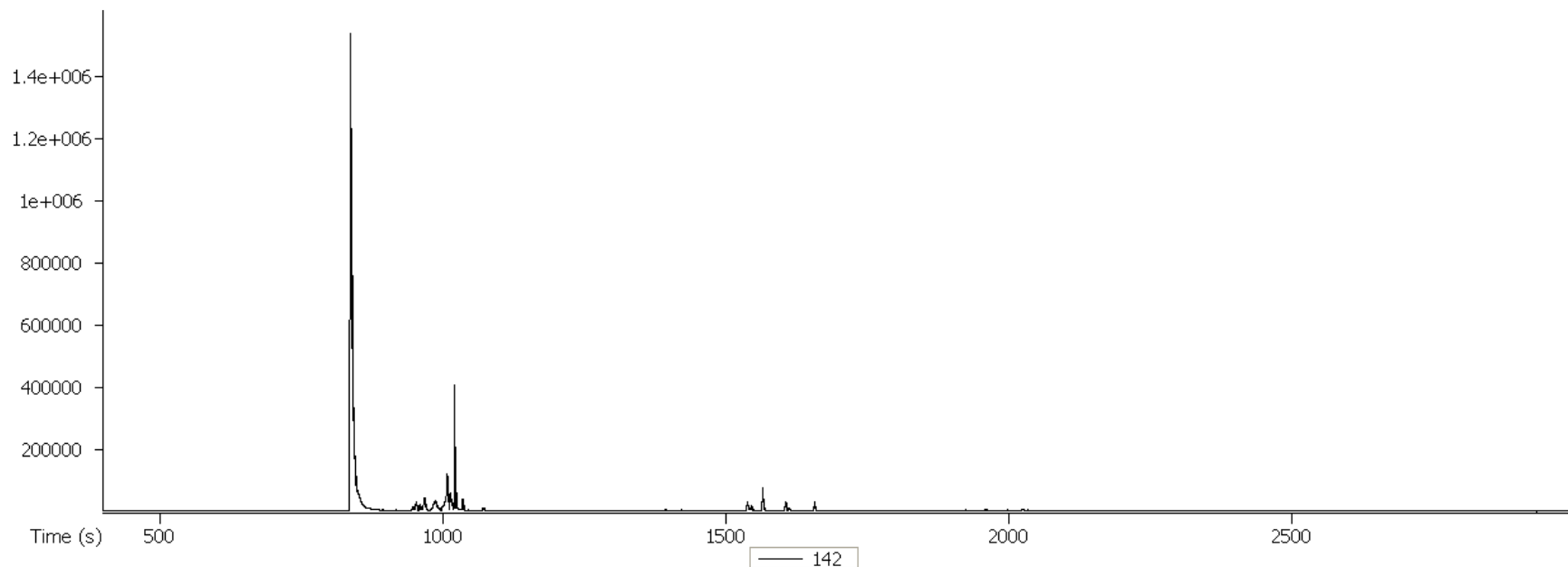
Příloha č. 9: Chromatogram Borovice lesní, lokalita – Brno (Lesná)



Příloha č. 10: Chromatogram Borovice lesní, lokalita – Svratka



Příloha č. 11: Chromatogram Borovice lesní, lokalita – Růžďka



Příloha č. 12: Chromatogram Borovice lesní, lokalita – Havlovce

