

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

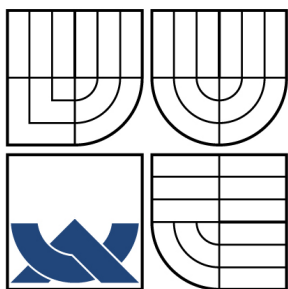
BENZEN V BENZINECH Z HLEDISKA OCHRANY ZDRAVÍ

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

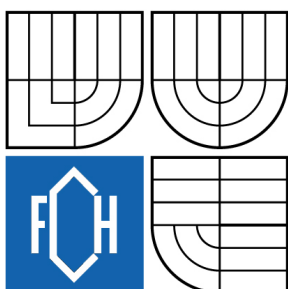
Bc. KAROLINA BÍLKOVÁ

BRNO 2008



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

BENZEN V BENZINECH Z HLEDISKA OCHRANY ZDRAVÍ

BENZENE IN PETROLEUM-DERIVED PRODUCTS AND HEALTH PROTECTION

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

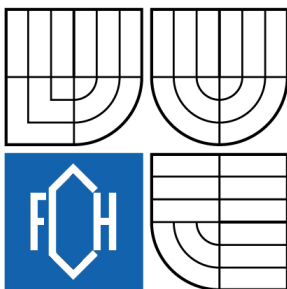
Bc. KAROLINA BÍLKOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

ING. VLADIMÍR STRÁNSKÝ, CSC.

BRNO 2008



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce	FCH-DIP0235/2007	Akademický rok: 2007/2008
Ústav	Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí	
Student(ka)	Bílková Karolína Bc.	
Studijní program	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (N2805)	
Studijní obor	Chemie a technologie ochrany životního prostředí (2805T002)	
Vedoucí diplomové práce		
Konzultanti diplomové práce	doc. Ing. Josef Čáslavský, CSc.	

Název diplomové práce:

Benzen v benzínech z hlediska ochrany zdraví

Zadání diplomové práce:

Benzen (CAS 71-43-2, EINECS 200-753-7, Indexové číslo EU 601-020-00-8) je hygienicky velmi významnou sloučeninou, která má prokázané karcinogenní a mutagenní vlastnosti. To se potom odráží jak ve výrazném omezení jeho používání a používání látek, případně směsí, které jej obsahují, tak v jeho velmi nízkém hygienickém limitu jak pro pracovní, tak pro životní prostředí. PEL pro pracovní prostředí je 3 mg/m³ (nařízení vlády č. 178/2001 Sb., kterým se stanoví podmínky ochrany zdraví zaměstnanců při práci v platném znění). Cílem práce bude zmapovat potenciální profesionální expozice benzenu na základě stanovení benzenu v technických benzínech, solventní naftě popř. dalších rozpouštědlech.

Termín odevzdání diplomové práce: 16.5.2008

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

Bc. Karolína Bílková
student(ka)

Vedoucí práce

Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.9.2007

doc. Ing. Jaromír Havlica, CSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Benzen je vysoce toxická sloučenina, která má karcinogenní i mutagenní účinky. Důsledkem těchto účinků je výrazné omezení jeho používání a odráží je i nízké hygienické limity v pracovním i životním prostředí.

Cílem diplomové práce je zmapování zdrojů možné expozice benzenu a posouzení správnosti klasifikace palivových benzínů, technických benzínů a ředidel.

Stanovení benzenu bylo provedeno metodou plynové chromatografie, po separaci na kapilárních kolonách, s plamenově - ionizačním detektorem (GC/FID) a metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detektorem diodového pole (HPLC/DAD).

Okrajově se práce zaměřuje také na stanovení toluenu (v červnu 2007 vstoupila v platnost vyhláška č. 284/2006 Sb., která zakazuje, aby byly malospotřebitelům prodávány přípravky, které obsahují více než 0,1 hm. % toluenu). Toluenu byl stanoven stejnými metodami jako benzen.

ABSTRACT

Benzene is very toxic compound, which has carcinogenic and mutagenic effects. Result of these effects is significant reduction of its use and are also reflected by low hygienic limits in occupational environment and environment.

The aim of this diploma thesis is to map out possible exposure to benzene and checking of classification correctness of motor gasoline, benzines and thinners.

Determination of benzene was carried out by gas chromatography, after separation on capillary columns, with flame ionisation detector (GC/FID) and high performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC/DAD).

Marginally, the diploma thesis is focused on determination of toluene (in June 2007 the ordinance no. 284/2006 SB. became effective, which forbid to sell products that contain more than 0,1 % of toluene to small-consumers). Toluene was determined using same methods as benzene.

KLÍČOVÁ SLOVA

benzen, toluen, palivový benzín, technický benzín, ředidlo, plynová chromatografie, kapalinová chromatografie

KEYWORDS

benzene, toluene, motor gasoline, benzine, thinner, gas chromatography, liquid chromatography

BÍLKOVÁ, K. *Benzen v benzinech z hlediska ochrany zdraví*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2008. 71 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Vladimír Stránský, CSc..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího magisterské práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

OBSAH

1. ÚVOD.....	7
2. TEORETICKÁ ČÁST	8
2.1 Benzen	8
2.1.1 Identifikace, fyzikální a chemické vlastnosti benzenu	8
2.1.2 Zdroje benzenu.....	9
2.1.2.1 Přírodní zdroje.....	9
2.1.2.2 Antropogenní zdroje	9
2.1.3 Použití benzenu.....	9
2.1.4 Expozice benzenu	9
2.1.5 Kinetika a metabolismus benzenu	10
2.1.5.1 Absorpce	10
2.1.5.2 Distribuce	10
2.1.5.3 Metabolismus	10
2.1.5.4 Vylučování	12
2.1.6 Účinky benzenu na organismus.....	12
2.1.6.1 Efekty vyvolané krátkodobou expozicí	12
2.1.6.2 Efekty vyvolané dlouhodobou expozicí	13
2.1.7 Legislativa	13
2.2 Toluén	14
2.2.1 Identifikace, fyzikální a chemické vlastnosti toluenu	14
2.2.2 Zdroje toluenu	15
2.2.3 Použití toluenu.....	15
2.2.4 Expozice toluenu	16
2.2.5 Kinetika a metabolismus toluenu	16
2.2.5.1 Absorpce	16
2.2.5.2 Distribuce	16
2.2.5.3 Metabolismus	16
2.2.5.4 Vylučování	17
2.2.6 Účinky toluenu na organismus.....	17
2.2.6.1 Efekty vyvolané krátkodobou expozicí	17
2.2.6.2 Efekty vyvolané dlouhodobou expozicí	18
2.2.7 Legislativa	18
2.3 Analytické metody stanovení benzenu v benzénech.....	19
2.3.1 Plynová chromatografie (GC)	19
2.3.1.1 Separační systém.....	20
2.3.1.2 Detektory	21
2.3.1.3 Flow techniky.....	21
2.3.1.4 Metody stanovení benzenu – užití GC/FID	22
2.3.1.5 Metody stanovení benzenu – užití GC/MS.....	23
2.3.2 Kapalinová chromatografie (LC)	24
2.3.2.1 Metody stanovení benzenu – užití HPLC/DAD.....	26
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
3.1 Používané přístroje,zařízení a software.....	28
3.1.1 Plynový chromatograf.....	28
3.1.2 Kapalinový chromatograf	28
3.1.3 Software	29

3.2 Chemikálie a standardy	30
3.3 Analyzované vzorky.....	30
3.3.1 Automobilové benzíny	30
3.3.2 „Ostatní“ benzíny a další ředidla, rozpouštědla a čističe	30
3.4 Pracovní postupy.....	31
3.4.2 Úprava vzorků	31
3.4.3 Příprava kalibračních roztoků	31
3.4.4 Podmínky analýzy	32
3.4.4.1 Plynová chromatografie	32
3.4.4.2 Kapalinová chromatografie	32
3.4.5 Identifikace a kvantifikace benzenu a toluenu.....	32
4. VÝSLEDKY A DISKUZE	33
4.1 Volba chromatografických podmínek.....	33
4.1.1 Plynová chromatografie	33
4.1.2 Kapalinová chromatografie	34
4.1.2.1 Výběr mobilní fáze	34
4.1.2.2 Výběr vhodné vlnové délky	37
4.2 Analýza kalibračních roztoků	39
4.2.1 Kalibrační křivky	39
4.2.2 Opakovatelnost.....	43
4.2.3 Mez detekce a mez stanovitelnosti	44
4.3 Analýza reálných vzorků.....	45
4.3.1 Automobilové (palivové) benzíny	46
4.3.2 „Ostatní“ benzíny	52
4.3.3 Další ředidla, rozpouštědla a čističe.....	60
5 .ZÁVĚR	64
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	65
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A LITERATURY.....	68
8. SEZNAM PŘÍLOH.....	69
9. PŘÍLOHY.....	70

1. ÚVOD

Benzen je vysoce nebezpečnou, toxickou sloučeninou, která má prokázané karcinogenní a mutagenní účinky. Tyto jeho závažné negativní vlastnosti mají za následek výrazné omezení jeho používání a také velmi nízké hygienické limity v pracovním i životním prostředí. Diplomová práce je zaměřena na zmapování možné expozice benzenu a to jak v profesionálním, tak v běžném životě (v domácnosti, při používání automobilů). Toto bude provedeno pomocí analýzy odebraných vzorků automobilových benzínů i „ostatních“ benzínů (ředidla, čisticí prostředky).

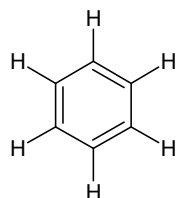
Podnětem pro tuto práci byl článek *Potencial uses of petrochemical products can result in significant benzene exposures : MSDSs must list benzene as an ingredient.*¹ Článek poukazuje na to, že bezpečnostní listy jen zřídka obsahují údaj o množství benzenu v rozpouštědlech, zřídka je uvedeno, zda přípravek obsahuje více nebo méně než 0,1 hm. % benzenu, což má vliv na označení přípravku a také na výši rizika, kterému jsou vystaveni uživatelé přípravku. Obsah benzenu přitom může být až o dva řády vyšší než je stanovená hladina, což autor článku ukazuje na příkladech různých rozpouštědel. Důvodů chybějících nebo špatných informací může být několik, například špatně vedené informace o přípravcích s obsahem benzenu, úmyslné zkreslování informací výrobcem z důvodu finančních nákladů spojených s eliminací benzenu z výrobku nebo to, když se dovozci a distributoři spoléhají na informace výrobců, kteří často uvádějí jen obecný název jako solventní nafta nebo benzínová frakce a neuvádějí přesné složení přípravku a obsah benzenu v něm.

Získaná data o koncentraci benzenu ve vzorcích budou použita k posouzení možné expozice benzenu a také k posouzení správnosti klasifikace benzínů a technických rozpouštědel.

Okrajově se také zaměřím na stanovení toluenu, které nebylo přímo tématem diplomové práce, ale během jejího zpracování (červen 2007) vstoupila v platnost novela vyhlášky č. 221/2004 Sb., již je vyhláška č. 284/2006 Sb.², ve které je uvedeno, že přípravky, které obsahují více než 0,1 hm. % toluenu se nesmí uvádět na trh pro prodej spotřebitelům. Toluén bude stanovován současně s benzenem a následně bude také vyhodnocena možná expozice toluenu.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Benzen



2.1.1 Identifikace, fyzikální a chemické vlastnosti benzenu

Celosvětově je pro benzen vyhrazeno číslo CAS[†]: 71-43-2. V Evropské unii má kromě toho číslo ES 200-753-7 a protože je i závazně klasifikovanou nebezpečnou látkou i indexové číslo 601-020-00-8.

Benzen (také nazývaný benzol - především v německy mluvících zemích, anulen, pyrobenzol atd.) je bezbarvá kapalina s charakteristickým nasládlým zápachem, ve vodě málo rozpustná, těkává a vysoce hořlavá. Vyskytuje se (ve velmi malém množství) i v ovzduší, vodě i půdě.³

Tabulka 1: Fyzikální a chemické vlastnosti benzenu³

Relativní molekulová hmotnost	78,11
Bod vzplanutí	-11,1 °C
Teplota tání	- 5,5 °C
Teplota varu	80,1 °C
Hustota	0,878 g/cm ³
Relativní hustota par (vzduch = 1)	2,7
Tlak par (26 °C)	13,3 kPa
Rozpustnost: Ve vodě	1800 mg/l (při teplotě 25 °C)
V nepolárních rozpouštědlech	Mísitelný s většinou
Dolní mez identifikace čichem	4,8 – 15,0 mg/m ³
Dolní mez identifikace chutí (ve vodě)	0,5 – 4,5 mg/m ³

Nebezpečnost benzenu je možné charakterizovat jeho závaznou klasifikací, podle které je vysoce hořlavý s větou R11, je karcinogenem 1. kategorie s větou R45, je mutagenem 2. kategorie s větou R46, je toxický s větou R48/23/24/25, je zdraví škodlivý s větou R65 a je dráždivý s větou R36/38.

[†]Číslo CAS (Chemical Abstract Service) – jednoznačný numerický identifikátor používaný pro chemické látky, polymery, sloučeniny, slitiny a biologické sekvence, bylo zavedeno redakcí časopisu Chemical abstract

2.1.2 Zdroje benzenu

Zdrojem benzenu jsou přírodní procesy a antropogenní činnost (majoritní zdroj emisí benzenu).

2.1.2.1 Přírodní zdroje

Přírodním zdrojem benzenu je vulkanická činnost a lesní požáry. Je také součástí ropy (1 - 4 %) a můžeme ho nalézt v mořské vodě (0,8 µg/l) v blízkosti přírodních úložišť ropy a zemního plynu.

2.1.2.2 Antropogenní zdroje

Nejvýznamnějším antropogenním zdrojem benzenu jsou výfukové plyny z automobilové dopravy a operace spojené s doplňováním paliva v automobilech. Další významné úniky pocházejí z chemického průmyslu, rafinérií ropy a plynu a také ze spalování paliv (uhlí, oleje). Uvolňuje se při procesech v koksárenských pecích, těžbě a zpracování neželezných rud, zpracování dřeva, těžbě uhlí a výrobě textilu.⁴ Benzen se také do prostředí dostává z průmyslových odpadních vod a při haváriích. Koncentraci benzenu v ovzduší zvyšuje také cigaretový kouř.

2.1.3 Použití benzenu

Samotný benzen jako finální produkt se dnes prakticky nevyužívá, uplatňuje se však jako výchozí surovina pro výrobu velkého množství chemických látek (anilin, nitrobenzen, nitrotoluen apod. a následně zejména pro barviva, detergenty, syntetická vlákna a tkaniny, pryskyřice, plasty, výbušniny, léčiva, insekticidy, a některé typy pryže). Dříve se ve velké míře používal také jako rozpouštědlo pro tuky, vosky, pryskyřice, inkousty, nátěrové hmoty, lepidla, plasty a pryž. Dále sloužil jako odmašťovací prostředek, využíval se v tiskařství a litografii, v obuvnickém průmyslu a při výrobě pneumatik. Dnes je jeho použití prakticky ve všech těchto odvětvích resp. při těchto činnostech v EU i v ČR zakázáno; a jeho obsah v dalších produktech je přísně omezen. Limitní povolená koncentrace benzenu v rozpouštědlech (technických benzínech) je v ČR 0,1 hm. % a v automobilových benzínech 1 hm. %.

2.1.4 Expozice benzenu

Vzhledem k faktu, že je benzen v životním prostředí všudypřítomný, působí v malém množství na každého z nás.

Hlavním zdrojem expozice benzenu v celé populaci je vdechování kontaminovaného vzduchu. Vzduch může být kontaminován cigaretovým kouřem (u kuřáků se expozice pohybuje kolem 1800 µg/den na rozdíl od nekuřáků s 50 µg/den)³, emisemi z čerpacích stanic (během tankování pohonných hmot dosahují koncentrace benzenu krátkodobě až 10 mg/m³), výfukovými plyny z automobilové dopravy, průmyslovými emisemi ale také výpary z produktů, které benzen obsahují, jako jsou lepidla, barvy, průmyslové vosky, detergenty a další látky, i když, jak je výše uvedeno, v současné době jen ve velmi malém

množství (do 0,1 %). Vyšší hladina benzenu v ovzduší je také v blízkosti skládek nebezpečných odpadů.

K expozici benzenu může dojít také prostřednictvím potravy nebo vody, ale tyto zdroje jsou ve srovnání se vzduchem zanedbatelné.

Obyvatelé žijící v průmyslových oblastech a větších městech s vysokou hustotou automobilové dopravy jsou vystaveni (inhalační cestou) účinku většího množství benzenu (až 349 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) než obyvatelé žijící ve venkovských oblastech (0,2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$).

K významné profesionální expozici benzenu může docházet také v pracovním prostředí během produkce, skladování nebo používání výrobků, které benzen obsahují. Tato expozice se ovšem týká jen velmi omezené části populace – zaměstnanců v těchto odvětvích.

2.1.5 Kinetika a metabolismus benzenu

2.1.5.1 Absorpce

Je-li organismus vystaven vysoké koncentraci benzenu ve vzduchu, přibližně polovina vdechovaného benzenu prochází stěnami plicních sklípků a vstřebává se do krve.

Studie prováděné na potkanech ukázaly, že absorpce benzenu plicemi je nelineární v závislosti na množství (koncentraci) benzenu, kterému byl živočich vystaven. Čím nižší je koncentrace, tím vyšší je absorpce. Absorpce je nejvyšší prvních pět minut a po následném poklesu se ustálí na konstantní hodnotě.³

Při expozici benzenu obsaženému v jídle nebo pití dochází ke vstřebání do krve prostřednictvím gastrointestinálního traktu. K malému vstřebávání může také dojít při kontaktu kůže s benzenem nebo produkty, které ho obsahují.

2.1.5.2 Distribuce

Benzen je v organismu distribuován krví a díky své nízké rozpustnosti ve vodě a vysoké lipofilítě se ukládá především v tucích a tukových tkáních (u myší, které byly po dobu 6 hodin vystaveny koncentraci benzenu 1600 mg/m^3 byla nalezená koncentrace 11,5 mg/kg v krvi, 37,7 mg/kg v kostní dřeni a 164 mg/kg v tucích). Většina znalostí týkajících se distribuce benzenu u lidí pochází z případových studiíⁱⁱ (např. při pitvě člověka, který byl vystaven působení benzenu bylo nalezeno 20 mg/l benzenu v krvi, 390 mg/kg v mozku, 16 mg/kg v játrech a 22 mg/kg v břišním tuku).³ Benzen může procházet lidskou placentou a byl nalezen v pupečnickové krvi ve stejném nebo dokonce i vyšším množství než u matky.

2.1.5.3 Metabolismus

Hlavním rizikem metabolismu benzenu je vznik podstatně nebezpečnějších metabolitů, které mají velmi silné především karcinogenní (a též mutagenní) účinky. K metabolismu benzenu dochází především v játrech a kostní dřeni.

ⁱⁱ případová studie – konkrétních případy, které se vyskytly v praxi

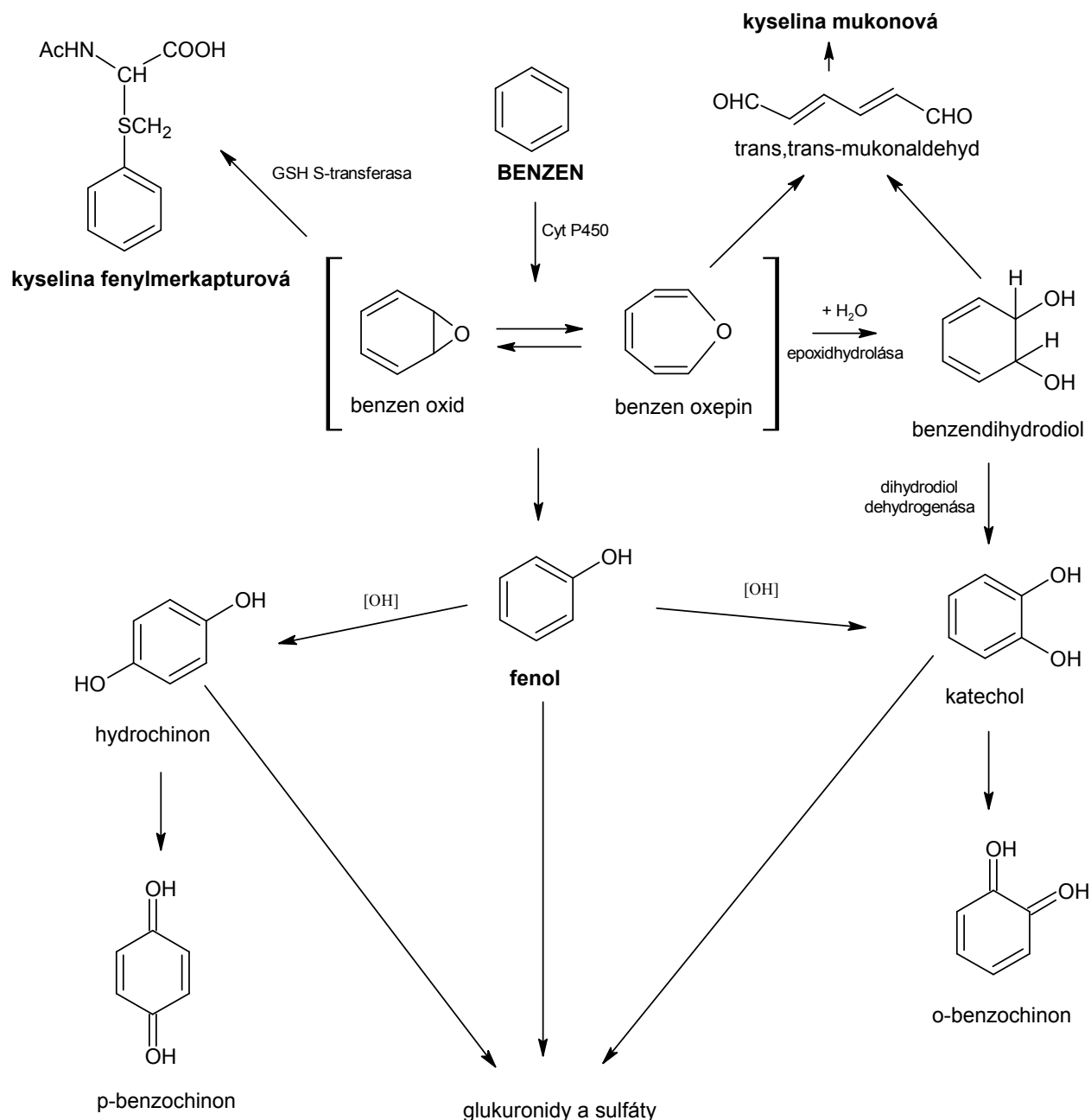


Schéma 1: Metabolismus benzenu ^{3,5, 6}

V prvním kroku dochází k oxidaci, která může probíhat dvěma způsoby.⁷ Prvním způsobem dochází k hydroxylaci benzenu na fenol. Druhým způsobem dochází ke vzniku vyváženého komplexu benzen-oxepinu a benzen-oxidu. Z tohoto komplexu vzniká opět fenol a také benzendihydrodiol. Z benzendihydrodiolu vzniká dehydrogenací katechol. Hydroxylací fenolu vzniká opět katechol a hydrochinon. Z katecholu dále vzniká *o*-benzochinon. Dalšími reakcemi hydrochinonu vznikají meziproducty s kyslíkovými radikálovými skupinami. Reakce směřují ke vzniku *p*-benzochinonu. Další sloučeninou, která vzniká z benzen-epoxidu nebo benzen-dihydrodiolu otevřením aromatického kruhu je *trans,trans*-mukonaldehyd, jehož koncové skupiny reagují za vzniku 1,6-dihydroxy-2,4-*t,t*-hexadienu, kyseliny mukonové nebo 6-hydroxy-2,4-*t,t*-hexadienové kyseliny. Dalším procesem je konjugace, při které vznikají konjugáty zejména s kyselinou glukuronovou, sírovou a glutathionem, které se dále odbourávají na merkapturové kyseliny.

V současné době patří k hlavním sledovaným metabolitům u osob exponovaných benzenu fenol, kyselina mukonová a kyselina S-fenylmerkapturová v moči. V důsledku snižování limitů pro koncentraci benzenu v ovzduší dochází k tomu, že fenol díky své přirozené přítomnosti v moči, přestává být měřitelným ukazatelem pro stanovení expozice benzenu. Za nejcitlivější biomarker expozice benzenu se pokládá kyselina S-fenylmerkapturová, jejíž limitní hodnota v moči je také obsažena v dnes platném předpisu pro provádění biologických expozičních testů (vyhláška č. 432/2003 Sb.⁸).

2.1.5.4 Vylučování

Hlavní cestou vylučování nezemetabolizovaného benzenu je vydechovaný vzduch (přibližně 30 % absorbovaného benzenu je vydechováno v nezměněné formě⁹). Hlavní cestou vylučování metabolitů benzenu je moč.

2.1.6 Účinky benzenu na organismus

2.1.6.1 Efekty vyvolané krátkodobou expozicí

Krátkodobá expozice benzenu je obvykle výsledkem nehody a nesprávného použití benzenu nebo úmyslného vystavení většímu množství (větší koncentraci) benzenu.

Projevy akutní otravy benzenem závisí na koncentraci a délce expozice (viz. tabulka 2). Projevuje se v první řadě jako narkóza.¹⁰ Dochází k útlumu centrální nervové soustavy (CNS), křečím a následně může dojít až ke smrti. Doba mezi narkózou, křečemi a smrtí u těžké akutní otravy je poměrně krátká. Účinkem benzenu dochází k uvolňování adrenalinu z kůry nadledvin, což může mít za následek fibrilaci srdečních komor. Může také docházet k selhání dýchání a následně k zadušení.³

Mírné symptomy projevující se poruchami CNS po skončení expozice rychle vymizí a nejsou důkazy, které by svědčily pro trvalé poškození mozku.⁷

Tabulka 2 : Účinky benzenu na organismus v závislosti na dávce a době expozice³

Množství benzenu (mg/m ³)	Doba expozice	Účinek
64000	5 – 10 min	může způsobit smrt (srdeční selhání, útlum CNS)
24000	30 min	ohrožení životních funkcí
4800	60 min	vážné symptomy
1600	60 min	symptomy nemoci
160-480	5 h	bolest hlavy, slabost a malátnost
80	8 h	bez příznaků

Při požití dochází ke ztrátě orientace, vrávorání, blouznění a útlumu CNS. Značným nebezpečím v takovém případě je vdechnutí požitého benzenu, protože „zaplaví“ plicní sklípky a vyvolá léčebně těžko zvládnutelné nedostatečné okysličování krve a tedy dušení.

Vysoká dávka, která ale nezpůsobí smrt může vyvolat závratě, poruchy zraku, euforii, podráždění, bledost, zarudlost, dušnost, pocit tíže na hrudi (dušení) bolesti hlavy, vyčerpání, a ospalost. Bylo také zjištěno (při pitvě), že po požití benzenu vznikly defekty sliznice (vředy) v zažívacím traktu.

Smrtelná dávka benzenu při požití je odhadnuta na 10 ml (8,8 g).³ Člověk je k požití benzenu citlivější než zvířata (příznaky otravy u člověka jsou závažnější než u zvířat).

2.1.6.2 Efekty vyvolané dlouhodobou expozicí

Nejvýznamnějšími nežádoucími účinky, které vyvolává dlouhodobá expozice benzenu je účinek na krvetvorbu (hematotoxicita), účinek na nervovou soustavu (neurotoxita) a vznik nádorů (karcinogenita).

První stádium chronické otravy se projevuje bolestmi hlavy, slabostí a podrážděností. Postupně se objevují poruchy trávení, hubnutí, krvácení ze sliznic a také do kůže. V dalším stádiu benzen poškozuje tvorbu krvinek a to jak červených, tak bílých a také tvorbu krevních destiček. Pokud není účinek dostatečně brzo objeven, může být poškozena kostní dřeň do té míry, že otrava vede ke smrti, která nastává nejčastěji jako důsledek snížení obranné schopnosti těla proti infekci.¹⁰

Benzen je prokázaným lidský karcinogenem, který kromě poškození funkce kostní dřeně - úbytku červených a bílých krvinek a krevních destiček, má za následek zvýšení počtu krvinek (hlavně na počátku chronické otravy) s následnou změnou normální krvetvorby na produkci nádorových krevních buněk (leukemie tj „rakovina krve“). Zvýšené riziko vzniku leukémie bylo zjištěno u obuvníků, pracovníků chemických výroby, pracovníků v rafinériích na výrobu olejů a také pracovníků dalších průmyslových odvětví (v době, kdy se benzen v těchto odvětvích používal).

Dlouhodobá expozice benzenu vyvolává u lidí také neurologické potíže jako časté bolesti hlavy, poruchy spánku a poruchy paměti.¹¹

2.1.7 Legislativa

Benzen je podle vyhlášky 232/2004 Sb.¹² (kterou se provádějí některá ustanovení zákona o chemických látkách a chemických přípravcích a o změně některých zákonů, týkající se klasifikace, balení a označování nebezpečných chemických látek a chemických přípravků) klasifikován jako karcinogen, což platí i pro přípravky (výrobky) které obsahují více než 0,1 hm. % benzenu.

Výše uvedené závažné negativní účinky benzenu jsou důvodem pro nízké hygienické limity - jak pokud jde o koncentrace v ovzduší, tak pokud jde o povolené množství benzenu v látkách a přípravcích.

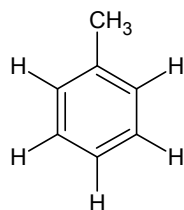
Přípustný expoziční limit v pracovním prostředí (3 mg/m^3) upravuje nařízení vlády č. 361/2007 Sb.¹³, kterým se stanoví podmínky ochrany zdraví při práci. Limit ve venkovním ovzduší ($5 \text{ } \mu\text{g/m}^3$) upravovalo nařízení vlády 350/2002 Sb. kterým se stanoví imisní limity a podmínky a způsob sledování, posuzování, hodnocení a řízení kvality ovzduší, v platném znění. V současné době je nahrazeno nařízením vlády ze dne 12. prosince 2006 č. 597/2006 Sb.¹⁴, o sledování a vyhodnocování kvality ovzduší, kde je stanoven klesající trend přípustných koncentrací pro benzen ve venkovním ovzduší : $4 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ v r. 2006; $3 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ v r. 2007; $2 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ v r. 2008 a $1 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ v r. 2009.

Používání benzenu upravuje vyhláška č. 221/2004 Sb.¹⁵, kterou se stanoví seznamy nebezpečných chemických látek a nebezpečných chemických přípravků, jejichž uvádění na trh je zakázáno nebo jejichž uvádění na trh, do oběhu nebo používání je omezeno, v platném znění. Podle této vyhlášky se v látkách nebo přípravcích, které jsou uváděny na trh nesmí vyskytovat 0,1 hm. % benzenu a více. Výjimkou jsou benzíny používané jako motorová paliva (podle vyhlášky č. 229/2004 Sb.¹⁶ smí obsahovat až 1 hm. % benzenu), odpady a látky používané v průmyslových výrobcích, při kterých nejsou překročeny povolené imisní limity. Ještě přísnější je vyhláška v případě dětských hraček, které nesmí obsahovat více než 5 mg/kg benzenu.

Dalším právním předpisem, který se týká benzenu je výše uvedená Vyhláška č. 432/2003 Sb.⁸, kterou se stanoví podmínky pro zařazování prací do kategorií, limitní hodnoty ukazatelů biologických expozičních testů, podmínky odběru biologického materiálu pro provádění biologických expozičních testů a náležitosti hlášení prací s azbestem a biologickými činiteli). Tato vyhláška udává limitní hodnoty kyseliny S-fenylmercapturové v moči jako nejcitlivějšího biomarkeru benzenu.

Pokud jde o benzen v životním prostředí musím zmínit i vyhlášku č. 252/2004 Sb.¹⁷, kterou se stanoví požadavky na pitnou a teplou vodu a rozsah a četnost její kontroly. Touto vyhláškou se stanovuje přípustné množství benzenu v pitné vodě a to na hodnotu 1 µg/l (nejvyšší mezní hodnota - NMH).

2.2 Toluén



2.2.1 Identifikace, fyzikální a chemické vlastnosti toluenu

Celosvětově je pro toluen vyhrazeno číslo CAS: 108-88-3. V Evropské unii má kromě toho číslo ES 203-625-9 a protože je i závazně klasifikovanou nebezpečnou látkou i indexové číslo 601-021-00-3.

Toluén (toluol - především v německy mluvících zemích, toluol, methylbenzen, fenylmethan) je bezbarvá, těkavá a hořlavá kapalina s aromatickým zápachem. Může se rozpouštět v tucích a dobře se rozpouští v organických rozpouštědlech.¹⁸

Tabulka 3: Fyzikální a chemické vlastnosti toluenu¹⁹

Relativní molekulová hmotnost	92
Bod vzplanutí	4,4 °C
Teplota tání	- 95 °C
Teplota varu	110,6 °C
Hustota	0,8669 g/cm ³
Relativní hustota par (vzduch = 1)	3,2
Tlak par (26 °C)	4,0 kPa
Rozpustnost ve vodě	535 mg/l (při teplotě 25 °C)

Toluen nereaguje s kyselinami ani zásadami a není korozivní. V atmosféře rychle reaguje s hydroxylovými radikály za vzniku oxidačních produktů. Podílí se na vzniku fotochemického smogu.

Nebezpečnost toluenu je možné charakterizovat jeho závaznou klasifikací, podle které je vysoce hořlavý s větou R11, je toxický pro reprodukci 3. kategorie s větou R63, zdraví škodlivý při vdechování s rizikem vážného poškození zdraví při dlouhodobé expozici s větou R 48/20 a také zdraví škodlivý při požití s rizikem vážného poškození plic při vdechnutí zvratků s větou R 65 , dále dráždivý pro kůži s větou R 38 a s rizikem možného narkotického účinku s větou R 67.

2.2.2 Zdroje toluenu

Majoritním zdrojem toluenu je antropogenní činnost. Toluen se do životního prostředí dostává různými cestami. Tvrdí se, že nejvíce toluenu se do životního prostředí dostává z benzínů. Uvolňuje se během jejich výroby, spalování i nakládání s nimi. Uvolňuje se i při výrobě a zejména při používání, ale i zneškodňování průmyslových i domácích výrobků (přípravků), které toluen obsahují, jako jsou nátěrové hmoty, laky, lepidla, ředidla v nich obsažená, a podobně. Vzniká také při výrobě koksu, styrenu a dalších chemických látek. Dalším zdrojem jsou procesy, při kterých je toluen používán (ať už jako rozpouštědlo nebo jako surovina pro výrobu dalších látek). Unikát může také při nehodách, ze zásobních tanků nebo ze skládek odpadů. Je obsažen v cigaretovém kouři, takže, stejně jako u benzenu, je jeho zdrojem kouření.

2.2.3 Použití toluenu

Toluen se donedávna používal ve velmi širokém rozsahu, např. jako průmyslové rozpouštědlo (náhrada toxičtějšího benzenu), v nátěrových hmotách, lepidlech, inkoustech a čistících prostředcích, ale i v syntetických vůních. Používal se také při tiskařských pracích, barvení kůže, býval součástí barviv a laků na nehty apod. Je surovinou při výrobě dalších chemických látek (např. nitrotoluenů, halogenovaných derivátů apod.) Toluen je také výchozí surovinou při výrobě některých polymerů, např.: polyuretanů. Další využití je při výrobě léčiv. Přidává se do benzínu pro zvýšení oktanového čísla.

2.2.4 Expozice toluenu

Hlavním zdrojem expozice toluenu v celé populaci, stejně jako u benzenu, je vdechování kontaminovaného vzduchu (vstřebává se 50 % vdechovaného toluenu¹⁸). Koncentrace v městském ovzduší byla naměřena 37-188 µg/m³.⁷ Minoritním zdrojem je kontaminovaná pitná voda a potrava. Toluenu se neakumuluje v potravních řetězcích.

2.2.5 Kinetika a metabolismus toluenu

2.2.5.1 Absorpce

Podle studií je 50 % toluenu rychle absorbováno z dýchacího traktu a vstřebává se do krve. Kapalný toluen se také rychle vstřebává pokožkou (14-23 mg/cm² za hodinu). Vstřebávání z gastrointestinálního traktu (při náhodném požití toluenu) je pomalejší.¹⁹

2.2.5.2 Distribuce

Poté co se toluen absorbuje do organismu dochází k jeho rychlé distribuci především do tukové tkáně (která je jeho zásobárnou), kostní dřeni, ledvin, jater, mozku a do krve. Poměr koncentrací v krvi a v mozku byl podle testů na potkanech po tříhodinové expozici 1,56.¹⁹

2.2.5.3 Metabolismus

Metabolismus toluenu probíhá v játrech. Největší podíl absorbovaného toluenu (60-75 %) je metabolizováno na benzoovou kyselinu, která je konjugována s glycinem za vzniku kyseliny hippurové. Kyselina hippurová je následně ledvinami vylučována. 10-20 % absorbovaného toluenu je vylučováno ve formě benzoylglukuronidu, který vzniká konjugací kyseliny benzoové s kyselinou glukuronidovou. Malé množství toluenu podléhá hydroxylaci aromatického kruhu za vzniku *o*-, *m*- a *p*-kresolu, který je vylučován močí.

K hlavním sledovaným metabolitům u osob exponovaných toluenu patří kyseliny hippurová a *o*-kresol v moči, jejichž limitní hodnoty jsou obsaženy v platném předpisu pro provádění biologických expozičních testů (vyhláška č. 432/2003 Sb.⁸).

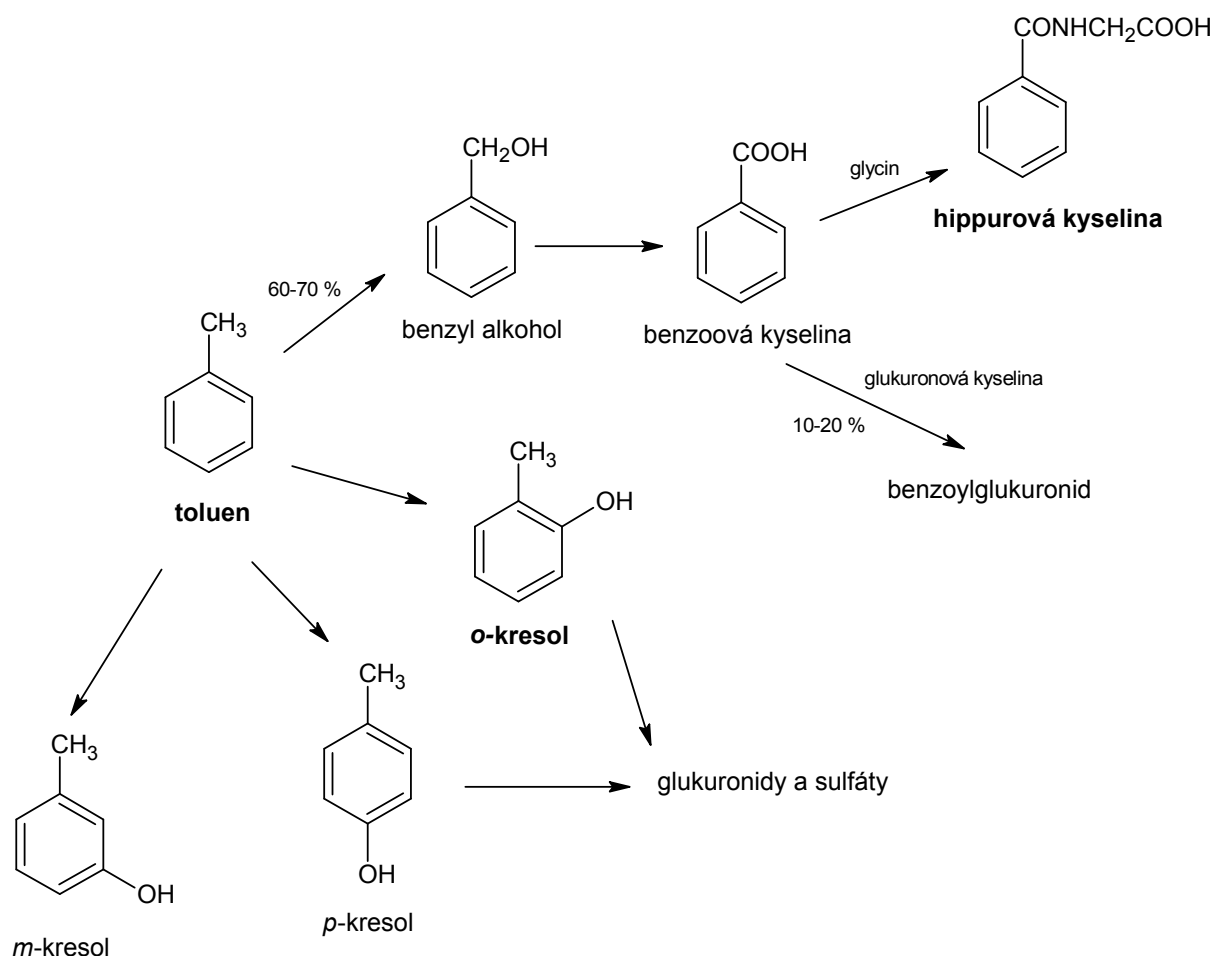


Schéma 2: Metabolismus toluenu¹⁹

2.2.5.4 Vylučování

Hlavní cestou vylučování nemetabolizovaného toluenu je vydechovaný vzduch (přibližně 20-40 % absorbovaného toluenu je vydechováno v nezměněné formě¹⁹). Hlavní cestou vylučování metabolitů toluenu je moč.

Při jednorázové expozici toluenu dochází k vyloučení nemetabolizovaného toluenu i jeho metabolitů z těla do 24 hodin. Poločas odbourávání toluenu v podkožní tukové tkáni je odhadován na 0,5 - 2,7 dne.

2.2.6 Účinky toluenu na organismus

2.2.6.1 Efekty vyvolané krátkodobou expozicí

Při krátkodobé expozici toluenu se objevuje podráždění očí a nosní sliznice, bolesti hlavy, závratě, ospalost, únava, snížení manuální zručnosti, a to vždy v závislosti na výši expozice. Akutní expozice vysokým koncentracím toluenu po dobu několika minut (při nehodách) má excitativní vliv na CNS (rozveselení, euforie, halucinace) a následně dochází ke zhoršení vědomí, v nejhorším případě může dojít až ke kómatu a smrti.¹⁰

2.2.6.2 Efekty vyvolané dlouhodobou expozicí

Dříve se myslelo, že dlouhodobá expozice vysokým koncentracím toluenu v pracovním prostředí jen vyvolává nevratná neurologická poškození jako jsou encefalopatieⁱⁱⁱ, vzácně i poškození zřetelného nervu a potíže s rovnováhou.

U „čičačů“^{iv} toluenu byla popsána poškození ledvin a krátkodobé přechodné změny aktivity jaterních enzymů. Trvalé a nezvratné poškození jater nebylo prokázáno.

Ve zcela nedávné době se ale u toluenu prokázal jeho toxický účinek na reprodukci, tzn. riziko vývoje malformovaných^v plodů.

Bylo také sledováno, zda toluen, stejně jako benzen, nevyvolává poškození krvetvorby. Uvádí se, že toluen na krvetvorbu neúčinkuje a pokud při intoxikaci toluenem dochází k poškození krvetvorby, tak se toto přisuzuje znečištění toluenu benzenem.¹⁰

2.2.7 Legislativa

U toluenu, na rozdíl od benzenu není podle vyhlášky 232/2004 Sb.¹² (kterou se provádějí některá ustanovení zákona o chemických látkách a chemických přípravcích a o změně některých zákonů, týkající se klasifikace, balení a označování nebezpečných chemických látek a chemických přípravků) klasifikace závislá na tak nízkém obsahu v přípravku, jako je tomu u benzenu. Protože jde o látku toxickou pro reprodukci 3. kategorie, platí podle této vyhlášky obecná hranice 5 %, nad níž i přípravky musí být klasifikovány/označeny jako toxické pro reprodukci 3. kategorie.

Přípustný expoziční limit v pracovním prostředí pro toluen (200 mg/m³) upravuje nařízení vlády č. 361/2007 Sb.¹³, kterým se stanoví podmínky ochrany zdraví při práci. Limit ve venkovním ovzduší pro toluen neupravovalo ani nařízení vlády 350/2002 Sb. (které je dnes již zrušené), kterým se stanoví imisní limity a podmínky a způsob sledování, posuzování, hodnocení a řízení kvality ovzduší, v platném znění, ani dnes platné nařízení vlády č. 597/2006 Sb.¹⁴, o sledování a vyhodnocování kvality ovzduší.

Podobný vývoj jako postupné zpřísnění klasifikace toluenu má i jeho obsah v přípravcích (výrobcích). Vyhláška 221/2004 Sb.¹⁵, kterou se stanoví seznamy nebezpečných chemických látek a nebezpečných chemických přípravků, jejichž uvádění na trh je zakázáno nebo jejichž uvádění na trh, do oběhu nebo používání je omezeno používání toluenu prakticky neupravovala. Ale podle její novely, kterou je vyhláška č. 284/2006 Sb.², byla doplněna položka č. 48 v části I, v níž je uvedeno: Přípravky (výrobky), které obsahují více než 0,1 hm. % toluenu se nesmí uvádět na trh pro prodej spotřebitelům. Toto omezení se nevztahuje na podnikatelskou sféru.

Dalším právním předpisem, který se týká toluenu je výše uvedená Vyhláška č. 432/2003 Sb.⁸, kterou se stanoví podmínky pro zařazování prací do kategorií, limitní hodnoty ukazatelů biologických expozičních testů, podmínky odběru biologického materiálu pro provádění biologických expozičních testů a náležitosti hlášení prací s azbestem a biologickými činiteli). Tato vyhláška udává limitní hodnoty kyseliny hippurové a o-kresolu - biomarkerů toluenu.

ⁱⁱⁱ encefalopatie – poškození mozkové tkáně

^{iv} čičač – narkoman čichající buď přímo toluen a nebo například lepidla, která ho obsahují

^v malformace – vrozená vývojová vada tvaru

2.3 Analytické metody stanovení benzenu v benzínech

Benzíny jsou kapalné směsi uhlovodíků (především alkanů, cykloalkanů, aromatických uhlovodíků a alkenů s 5 až 12 uhlíky v jedné molekule).²⁰ Surovinou pro jejich výrobu je ropa, která je různorodou směsí látek zastoupených v proměnlivých poměrech v závislosti na nalezišti.⁷ Benzíny proto představují složitou směs uhlovodíků, která má do značné míry variabilní složení. Ze složek obsažených v benzínech je zdaleka nejnebezpečnější sloučeninou benzen.

Stanovení benzenu na úrovni jednotek a desetin procenta ve vzorcích benzínů je poměrně komplikovaným úkolem – problémem je jeho spolehlivá identifikace. Pro stanovení benzenu je proto nutné používat separační techniky - plynovou chromatografii, která má v této oblasti hlavní postavení (nejčastěji se používá ve spojení s plamenově ionizačním detektorem FID nebo s hmotnostním detektorem MS) a také i kapalinovou chromatografii (nejčastěji s UV detektorem).

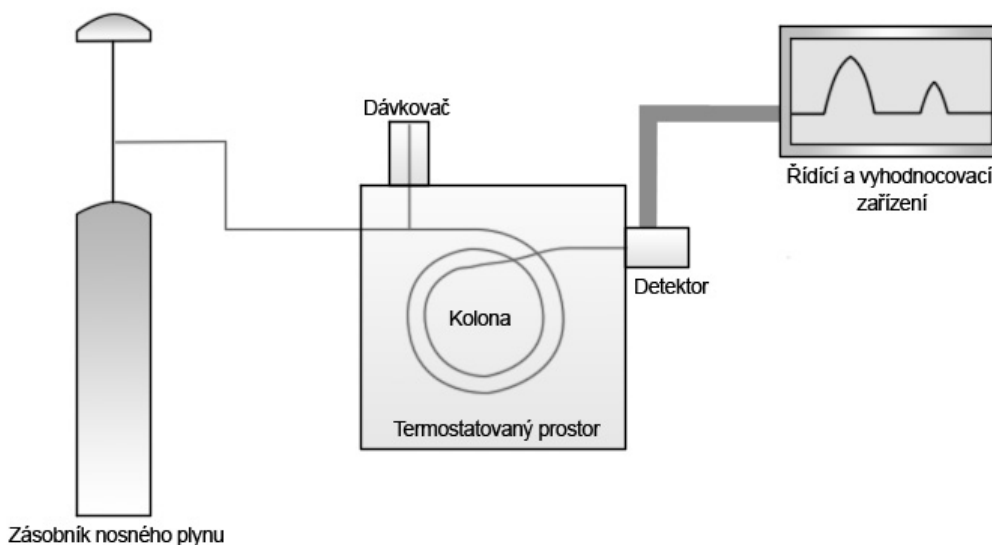
Dalšími metodami, které se využívají pro stanovení benzenu v benzínech jsou hmotnostní spektrometrie (MS)²¹ a infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací (FTIR)²².

2.3.1 Plynová chromatografie (GC)

Plynová chromatografie je metoda, která pro separaci složek směsi v plynné stavu využívá jejich rozdílnou distribuci mezi stacionární fází (umístěnou v koloně) a mobilní fází (nosný plyn, eluent - procházející kolonou).

Vzorek je dávkován do proudu nosného plynu (nejčastěji dusík nebo helium) pomocí injektoru (dávkovače) a po okamžitém zplynění je jím unášen kolonou (podrobněji o kolonách v kapitole 2.3.1.1). V koloně (která je zahřívána na určitou teplotu) dochází k separaci složek vzorku na základě různé schopnosti zachycovat se na stacionární fází. Následně složky v pořadí od nejméně se zachycující po nejvíce se zachycující opouštějí kolonu a jsou zaznamenány detektorem (podrobněji o používaných detektorech v kapitole 2.3.1.2). Signál z detektoru je následně vyhodnocen a poskytnete informaci o kvalitativním složení (retenční čas) a kvantitativním složení (plocha píku) vzorku.

Plynový chromatograf se skládá (viz. obrázek 1) ze zásobníku nosného plynu, dávkače vzorku, kolony, která je umístěna v termostátované peci, detektoru a řídicího a vyhodnocovacího zařízení.



Obrázek 1: Schéma plynového chromatografu

Pro metodu plynové chromatografie je charakteristická především účinná a rychlá separace složitých směsí a práce s malými množstvími vzorku za použití relativně jednoduché aparatury.

Při stanovení benzenu metodou plynové chromatografie jsou hlavními interferujícími sloučeninami alifatické uhlovodíky popř. aditiva přidávaná do benzínů. Aromatické uhlovodíky (toluen a vyšší) mají na všech stacionárních fázích při běžných chromatografických podmínkách vyšší retenční časy.

Na výsledek chromatografické analýzy mají vliv 3 důležité parametry – separační systém, detektor a flow technika.

2.3.1.1 Separační systém

Separačním systémem rozumíme chromatografické kolony a také parametry analýzy.

Kolona je část chromatografu, ve které je umístěna stacionární fáze. Kolona je uchycena v termostatované peci, která je vyhřívána na teplotu podle parametrů analýzy. V plynové chromatografii se používají náplňové nebo kapilární separační kolony (ty se v současné době používají pro stanovení benzenu a jiných aromátů v benzínech převážně).

Náplňové kolony jsou trubice zhotovené ze skla, nerezové oceli, a pod., které mají průměr 1 až 6 mm a délku 0,5 až 5 m. Tyto kolony jsou naplněné adsorbentem (například silikagel, alumina, uhlíkaté sorbenty – Carboxpack apod.) nebo mají kapalnou stacionární fázi na inertním nosiči. Oproti kapilárním kolonám mají tyto vyšší kapacitu, ale nevýhodou je jejich nižší separační účinnost. Moderní variantou náplňových kolon jsou tzv. mikronáplňové kolony. Mají malý průměr, obsahují velmi malé částice náplně (10 μm i méně) a při stejné délce jako u běžné náplňové kolony je dosahováno vyšší účinnosti separace.²³

Kapilární kolony jsou trubice, dříve skleněné nebo z oceli, ale dnes výhradně z křemene, o vnitřním průměru obvykle 0,2 – 0,75 mm a délce cca 5 až 200 m (pro zrychlení analýzy se zmenšuje délka i průměr kapiláry – např. 2m x 0,05 mm²³). Kapilára je pro zvýšení mechanické odolnosti potažená vrstvou polymeru (polyimidu). Na její vnitřní stěně je zakotvena stacionární fáze. Používají se různé druhy stacionárních fází

od nepolárních (např. dimethylpolysiloxan, [5 %-fenyl]-methylpolysiloxan) přes středně polární (např. [50 %-fenyl]-methylpolysiloxan) až po polární (např. polyethylenglykol, nitrotereftalová kyselina modifikovaná polyethylenglykolem).²⁴ Kapilární kolony mají ve srovnání s kolonami náplňovými vysokou separační účinnost (až několik tisíc teoretických pater), ale jsou zatížitelné pouze velmi malým množstvím dávkovaného vzorku.

Pro plynovou chromatografii je velmi důležitá volba teplotního programu při analýze. Analýza může být prováděna za konstantní teploty (izotermická analýza), což se využívá převážně pro separaci jednodušších směsí. Pro separaci složitějších směsí se využívá teplotního gradientu, který umožňuje úplnou separaci složek v kratším čase než pokud by byla analýza prováděna za konstantní teploty. Počáteční fáze analýzy probíhá většinou izotermicky, pak dochází k vzestupu teploty a následuje opět izotermická fáze při teplotě, která se blíží provoznímu maximu kolony (dojde k úplnému vymytí i málo těkavých složek z kolony).²⁵

Pro stanovení benzenu (a aromátů) v benzínech se používá teplotní gradient. Námí používaný gradient je blíže popsán v experimentální části práce (kapitola 3.4.4.1).

Méně významný je výběr nosného plynu, který se řídí především typem použitého detektoru (pro plamenově ionizační detektor se používá dusík, pro MS detektor se používá výhradně helium).²⁵

2.3.1.2 Detektory

Složky směsi, které jsou na koloně rozděleny ji opouštějí a procházejí detektorem, který je propojen s vyhodnocovacím zařízením.

Pro plynovou chromatografii existuje více různých typů detektorů. Volba detektoru závisí na aplikaci a na cíli analýzy. Jednotlivé typy se liší jak principem a konstrukcí tak i selektivitou, citlivostí, mezí detekce a lineárním dynamickým rozsahem.

Nejstarším a universálním detektorem je tepelně vodivostní detektor (TCD), který se používá jen pro speciální analýzy (např. plyny). Dalšími detektory používanými v plynové chromatografii jsou plamenový ionizační detektor (FID - nejrozšířenější), detektor elektronového záchytu (ECD), fotoionizační detektor (PID), hmotnostní detektor (MS), plamenový fotometrický (FPD) a infračervený detektor (IRD).

Pro analýzu benzínů se používá plamenový ionizační detektor (FID), který byl použit i při naší analýze. Výhodné je také spojení plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC/MS metoda). Některé metody využívají také spojení plynové chromatografie s detektory FTIR a NMR²⁶, které jsou pro benzen (resp. pro všechny aromáty) selektivnější než detektor FID.

Detektory nejčastěji používané pro analýzu benzínů jsou blíže popsány v kapitolách 2.3.1.4 a 2.3.1.5.

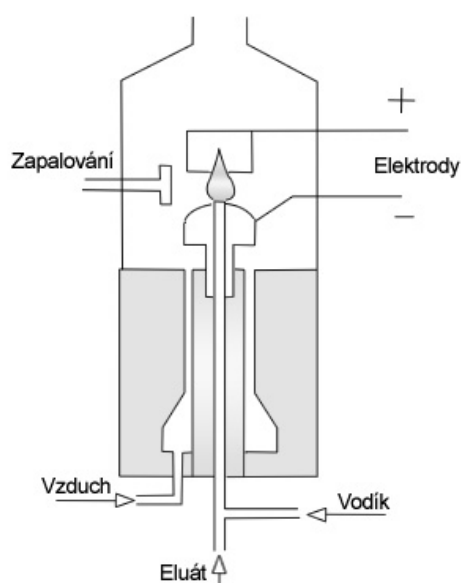
2.3.1.3 Flow techniky

Pod tímto pojmem rozumíme systémy, které zlepšující chromatografickou separaci, zrychlující analýzu apod., např. zapojení 2 kolon s různými fázemi za sebou, zpětný tok („back flush“). Nejnověji se začínají používat multidimensionální techniky (GC x GC).²⁷

2.3.1.4 Metody stanovení benzenu – užití GC/FID

Spojení plynové chromatografu s plamenovým ionizačním detektorem je v analýze benzínů nejpoužívanější metoda. Tento typ detektoru je ve srovnání s detektorem tepelně vodivostním podstatně citlivější, pro jeho činnost je nutné zajistit zdroje vodíku a vzduchu. Pro analýzu benzínů je mírnou nevýhodou jeho universálnost - detekuje nejen aromáty, ale všechny uhlovodíky.

V plamenově ionizačním detektoru je nosný plyn z kolony zaváděn do kyslíko-vodíkového plamene, kde dochází k ionizaci jeho molekul. V detektoru jsou umístěny dvě elektrody. Pokud do detektoru vstupuje pouze nosný plyn, je proud procházející mezi elektrodami po ionizaci plynu minimální, ale pokud do detektoru vstupují i molekuly analytu dochází ke zvýšení ionizace a procházející elektrický proud se zvětší. Velikost signálu detektoru závisí na typu a koncentraci analytu.²⁵



Obrázek 2: Schéma plamenově ionizačního detektoru

U starších metod, na kterých jsou založeny např. i postupy ASTM (American Society for Testing and Materials) se používá FID detektor ve spojení s náplňovými kolonami. Např. metoda ASTM D3606-99, která se týká měření benzenu a toluenu v motorových a leteckých benzínech, používá 2 do série zapojené náplňové kolony (nebo mikronáplňové kolony). První kolona je nepolární a separuje složky směsi podle bodu varu, takto se oddělí uhlovodíky do C8. Poté je kolona zpětně propláchnuta (back flush technika), aby se zabránilo těžším sloučeninám proniknout do druhé, hlavní analytické kolony. Lehčí sloučeniny procházejí druhou kolonou, která je polární a dochází k separaci aromátů od alifatických uhlovodíků. Po separaci složky vstupují do FID detektoru.²⁸

Další metoda ASTM D-5580 doporučuje kombinaci polární předkolony (oddělení benzenu, vyšších aromátů a uhlovodíků C9 od těkavých alifatických uhlovodíků) a po zpětném výplachu předkolony následuje separace na nepolární koloně a detekce FID.²⁹

V současné době se pro analýzu benzínů používají převážně kolony kapilární. Příkladem je použití kapilární kolony s vysoce polární fází 1,2,3-tris(2-kyanoetoxy)propanem (TCEP) o rozměrech 50 m x 0,25 mm x 0,4 μm. Pro analýzu byly zvoleny tyto parametry: teplota detektoru 275°C, teplota injektoru 250°C, počáteční teplota kolony 50°C držena 10 minut

a následně vzrůst $10^{\circ}/\text{minutu}$ až na finální teplotu 115°C , která je držena 10 minut. Jako nosný plyn byl zvolen vodík s průtokem $1 \text{ ml}/\text{min}$ a splitovací poměr $1:60$.³⁰ Následuje detekce FID detektorem.

2.3.1.5 Metody stanovení benzenu – užití GC/MS

Spojení plynové chromatografie s hmotnostní detekcí má tu výhodu, že umožňuje stanovení benzenu i v přítomnosti (při nedokonalé separaci) uhlovodíků.

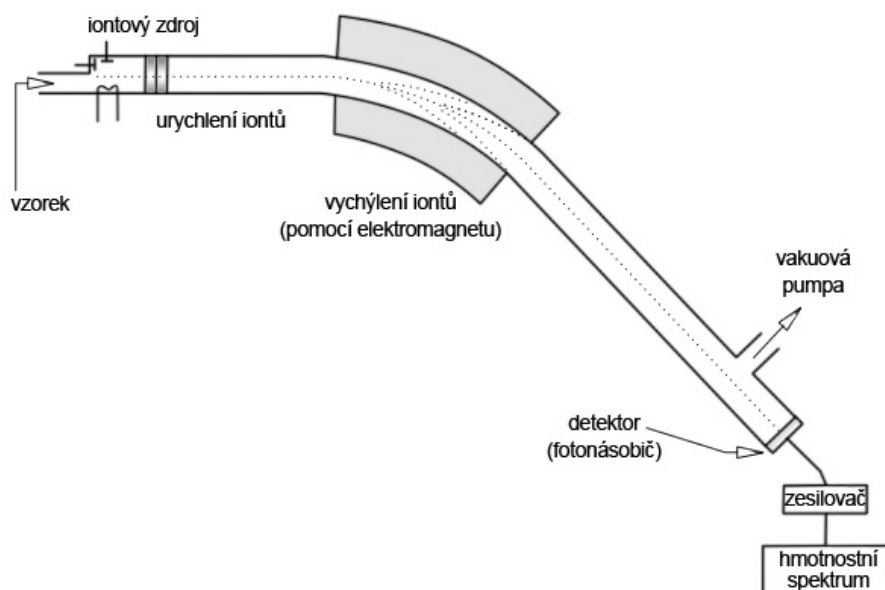
Jednotlivé složky směsi postupně vycházejí z kolony GC a vstupují do hmotnostního spektrometru, který zde má funkci detektoru. Kapilární kolona je přímo připojena k iontovému zdroji hmotnostního spektrometru (ten produkuje ionty). V současné době je při spojení plynové chromatografie a hmotnostního detektoru nejvíce používána elektronová ionizace (EI) - jedná se o techniku vhodnou pro těkavé organické látky. Páry vzorku jsou zavedeny do ionizační komory, do které vstupují elektrony (jejich zdrojem je nejčastěji elektricky žhavené rheniové nebo wolframové vlákno) a dochází k ionizaci. Ionty jsou následně pomocí elektrody (tzv. repelleru) vytahovány z komory a přicházejí do urychlovací čočky, ve které dochází k jejich urychlení a fokusaci (vše probíhá ve slabém magnetickém poli, aby nedošlo k rozptylu elektronů).

Vzniklé ionty vstupují do analyzátoru, kde jsou separovány podle poměru hmotnost/náboj (m/z) - nejčastěji se používá kvadrupol nebo iontová past.

Kvadrupol je složen ze 4 kovových tyčí kruhového průřezu umístěných ve vakuu, které jsou připojeny na zdroje stejnosměrného a střídavého napětí. Ionty vlétnou do prostoru mezi tyčemi, dostanou se do střídavého pole a začnou oscilovat. Při vhodném poměru stejnosměrné a střídavé složky napětí projdou kvadrupolem pouze ionty o určitém poměru m/z (ostatní končí srážkami s tyčemi). Zařízení se chová jako filtr nastavený na určitou hodnotu m/z . Změnou vkládaných napětí je možné nechat projít filtrem postupně ionty v celém rozsahu hodnot m/z .

Iontová past se skládá ze vstupní a výstupní elektrody kruhového průřezu a z prstencové střední elektrody. Krajiní elektrody jsou uzemněny a na středovou elektrodu je vkládáno vysokofrekvenční napětí s proměnnou amplitudou. Ionty jsou nuceny pohybovat se v iontové pasti po uzavřených kruhových drahách. S rostoucí amplitudou napětí se ionty s rostoucím m/z dostávají na nestabilní dráhy a opouštějí prostor iontové pasti směrem do detektoru.

K detekci iontů se používá elektronový násobič nebo fotonásobič.



Obrázek 3: Schéma hmotnostního spektrometru

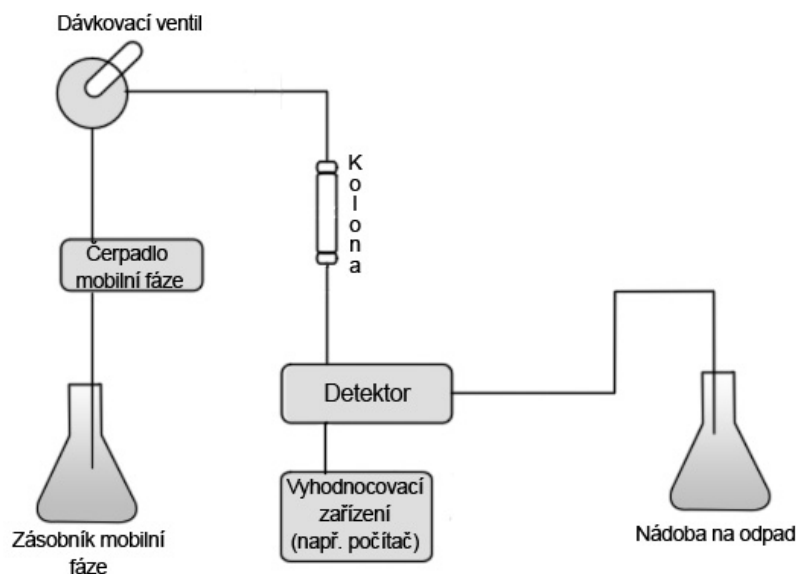
Spojení plynové chromatografie a hmotnostního detektoru je využíváno například v metodě ASTM D5769-04, která je vypracována pro rychlou separaci, identifikaci a kvantifikaci benzenu, toluenu a ostatních aromátů v benzínu od 0,1 do 42 hmotnostních procent. Tato metoda využívá např. kapilární nepolární kolonu HP-1 vhodnou pro aromatické uhlovodíky (o rozměrech 60 m x 0,25 mm x 1 μm, stacionární fáze 100% dimethylpolysiloxan), jako nosný plyn helium, teplota nástřiku 250 °C, splitovací poměr 1:250. Teplotní program začíná na teplotě 60°C, teplota roste rychlostí 3°C/min do 120°C a následně 10 °C/min na konečných 250 °C. Analyzátozem v hmotnostním detektoru je kvadrupol.³¹

2.3.2 Kapalinová chromatografie (LC)

Kapalinová chromatografie je separační technika, která využívá jako mobilní fázi kapalinu. Existují tři varianty LC - nízkotlaká kolonová kapalinová chromatografie (používá se převážně při čištění směsí látek), planární chromatografie (instrumentálně jednoduchá) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), která má v současnosti dominantní postavení.²⁵

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) se používá pro separaci složitých směsí látek. Díky použití stacionární fáze, která obsahuje malé částice pravidelného tvaru a velikosti se dosahuje vysoké účinnosti separačního procesu (tisíce teoretických pater). Separační kolony se vyznačují vysokou homogenitou a hustotou náplně stacionární fáze a tedy i velkým hydrodynamickým odporem. Průtok mobilní fáze je proto nutné podpořit vysokým tlakem, což je realizováno použitím čerpadla.²⁵

Kapalinový chromatograf se skládá ze zásobníků mobilní fáze, směšovacího zařízení, odplyňovače, čerpadla, dávkovacího ventilu, kolony a detektoru.



Obrázek 4: Schéma kapalinového chromatografu

Mobilní fáze může být používána jednosložková a nebo vícesložková (až 4 složky, tzv. gradientová eluce, mísí se ve směšovacím zařízení). Složení mobilní fáze je pro separaci složek velmi významné (narozdíl od plynové chromatografie, ve které se nosný plyn separace neúčastní). Pořadí, v jakém budou složky vzorku z kolony vymývány je určeno vzájemným vztahem polaritu separovaných látek, mobilní fáze a stacionární fáze. Polaritu mobilní fáze je možné ovlivnit volbou zastoupení jednotlivých rozpouštědel. Mobilní fáze nesmí obsahovat bubliny, proto se provádí odplynění probubláváním heliem nebo vakuové odplynění.

Čerpadlo zajišťuje dostatečný průtok mobilní fáze kolonou (a celým zařízením). Používají se pístová čerpadla. Čerpadlo nesmí být narušováno mobilní fází a nesmí se z něj do mobilní fáze uvolňovat žádné složky.

Mobilní fáze je ze směšovacího zařízení vytlačována pomocí čerpadla k dávkovacímu ventilu, kde se do ní dávkuje vzorek. K dávkování se používá většinou šesticečný ventil s dávkovací smyčkou.

Vzorek je mobilní fází unášen do kolony. V HPLC se používají náplňové kolony vyrobené z ocelové nebo tlustostěnné skleněné trubice o vnitřním průměru většinou 2 – 5 mm a délce nejčastěji 30 - 300 mm.²⁵ Kolony jsou naplněny stacionární fází, kterou bývá obvykle oxid křemičitý o různých zrnitostech, který je modifikovaný navázáním vhodných funkčních skupin (navázaná funkční skupina určuje polaritu stacionární fáze). Před samotnou analytickou kolonu je možné zařadit tzv. předkolonku, obvykle se stejnou náplní která slouží k zachycování pevných nečistot a sloučenin, které mohou analytickou kolonu znečišťovat.

Po separaci vzorku na koloně vstupují jednotlivé složky do detektoru. V kapalinové chromatografii se nejčastěji používá UV-VIS detektor. Dále se používá refraktometrický detektor, fluorescenční detektor, detektor rozptylu světla, hmotnostní detektor atd.

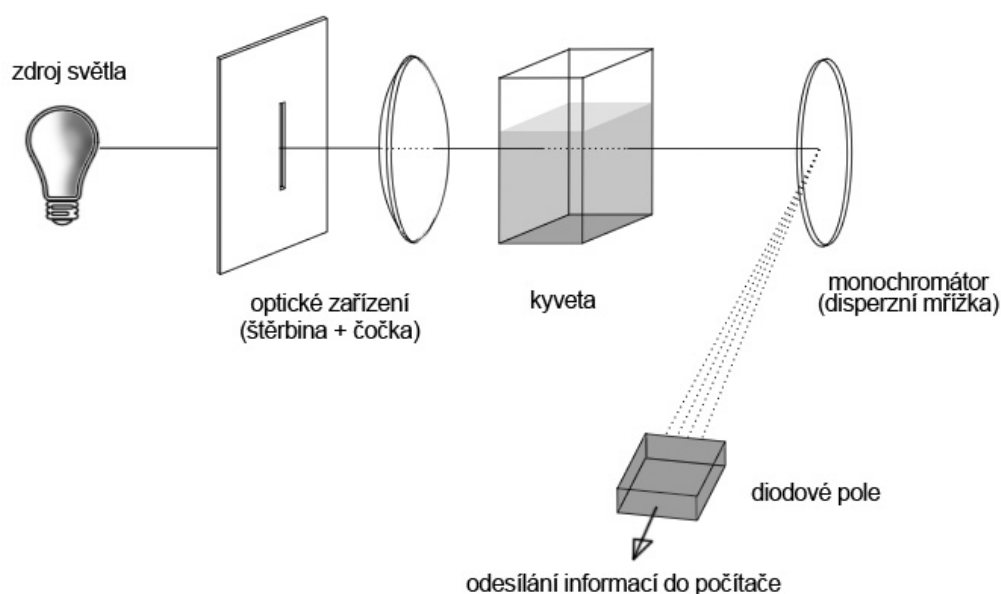
Pro stanovení benzínů metodou HPLC se používá nejčastěji UV-VIS detektor s diodovým polem (DAD), který je speciálním případem UV detektoru.

2.3.2.1 Metody stanovení benzenu – užití HPLC/DAD

Výhodou spojení kapalinové chromatografie a UV-VIS resp. DAD detektoru³² je jeho selektivita pro sloučeniny s chromofory^{vi}, což jsou v případě analýzy benzínů aromáty, resp. různě konjugované alkeny a alkyiny.

UV detektor měří absorpenci mobilní fáze vycházející z kolony. Detektor se skládá z průtočné křemenné měrné cely, která je spojená s výstupem z kolony. Stěnou této kyvety prochází světelný paprsek, který přichází ze zdroje přes fokusační čočku a štěrbinu. Za měrnou celou je umístěna disperzní mřížka a detektor dopadajícího záření.²⁵ Jednodušší přístroje měří při jedné vlnové délce, složitější umožňují nastavení vlnové délky pomocí monochromátoru.

Speciálním případem UV-VIS detektoru je detektor s diodovým polem (DAD), jehož výhodou je možnost okamžitého záznamu spektra ve zvolené oblasti vlnových délek.

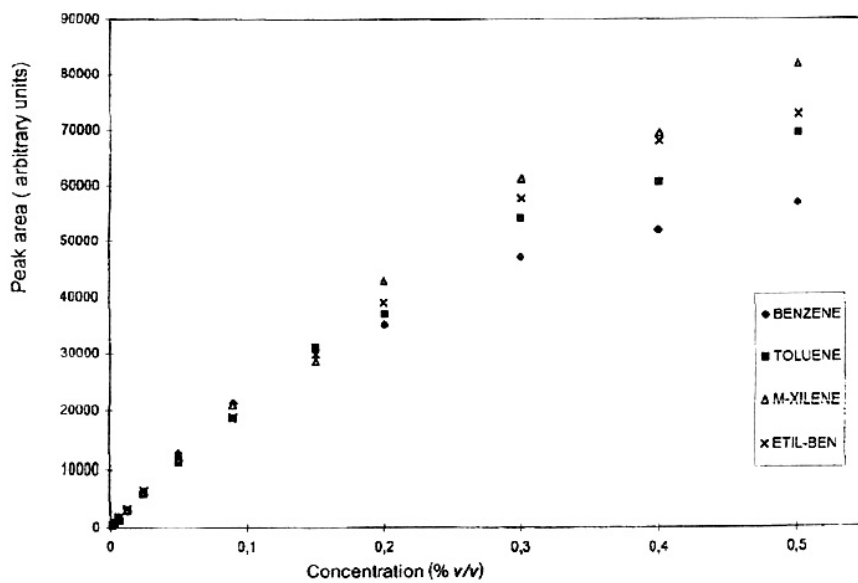


Obrázek 5: Detektor diodového pole

Při stanovení aromatických uhlovodíků v benzínech je pro detekci možné používat vlnové délky, při kterých je absorpance maximální. Je to vlnová délka okolo 205 nm, kde je absorpance maximální (nejvyšší absorpční koeficient), a vlnová délka okolo 254 nm. Použití vlnové délky 205 nm umožňuje daleko citlivější analýzy - benzen a jeho homology absorbují při 205 nm 40krát více než při 254 nm. Použití 205 nm dovoluje stanovovat benzen při velmi nízkých koncentracích (0,002 objemových %) – při vlnové délce 254 nm je mez detekce 0,1 % (v/v).³³ Odpověď detektoru pro benzen (a další aromáty) má při 205 nm nižší standardní odchylku než při 254 nm. Stanovení při 254 nm je ale specifičtější.

Bylo také pozorováno, že od koncentrace 0,2 % (v/v) je odezva detektoru nelineární (viz.obrázek 6) a proto je před analýzou nutné vzorky ředit v poměru 1:100.³³

^{vi} chromofor – látka, která absorbuje elektromagnetické záření, častěji část molekuly odpovědná za absorpci záření



Obrázek 6: Kalibrační křivka benzenu, toluenu, m-xylenu a ethylbenzenu³³

Tato metoda byla aplikována na benzíny se známým množstvím aromatických sloučenin a byla shledána jako citlivá a přesná.

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Používané přístroje,zařízení a software

3.1.1 Plynový chromatograf

Agilent 6890 (Agilent Technologies, Waldbronn Německo), injektor split/splitless, plamenionizační detektor (FID), autosampler Agilent 7683

Kapilární kolony:

DB-WAX (J&W Scientific), délka 30 m, průměr 0,25 mm, tloušťka filmu 0,25 μm , stacionární fáze polyethylenglykol

DB5-MS (J&W Scientific), délka 30 m, průměr 0,25 mm, tloušťka filmu 0,25 μm , stacionární fáze 5 % fenyl – 95 % dimethylpolysiloxan



Obrázek 7: Plynový chromatograf Agilent 6890



Obrázek 8: Autosampler Agilent 7683

3.1.2 Kapalinový chromatograf

Agilent 1100 (Agilent Technologies), kvartérní čerpadlo, autosampler, termostat kolon, DAD detektor

Kolona:

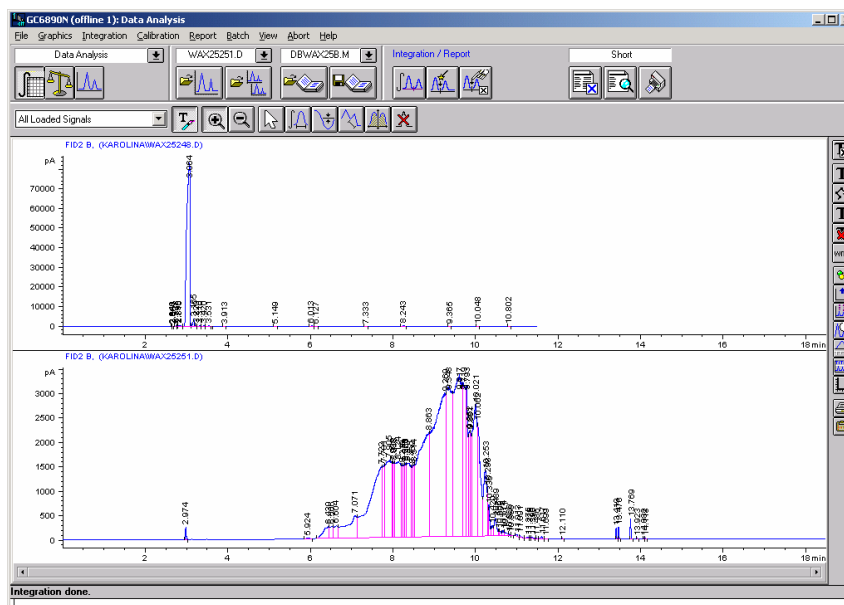
Zorbax Eclipse XDB-C8 (Agilent), průměr 4,6 mm, délka 150 mm, zrnění 5 μm



Obrázek 9: Kapalinový chromatograf Agilent 1100

3.1.3 Software

Agilent ChemStation



Obrázek 10: HP ChemStation

Microsoft Office Excel 2000 a 2003 (Microsoft Corporation)
 Microsoft Office Word 2000 a 2003 (Microsoft Corporation)
 ACD ChemSketch Freeware verze 10.0 (Advanced chemistry development Inc.)
 Open office Draw 2.3

3.2 Chemikálie a standardy

n-Oktan, p.a. (Lachema Brno)
isooktan, p.a. (Lachema Brno)
Benzen p.a. (Lachema Brno)
Toluen p.a. (Lach-Ner Neratovice)
Methylalkohol Lichrosolv (Merck)
DEMI voda
Dusík (Linde)
Technický vzduch (Linde)
Vodík (Linde)

3.3 Analyzované vzorky

Analyzované vzorky (jejichž úplný seznam je v příloze č.1) je možné rozdělit do dvou skupin. První skupinou jsou automobilové benzíny (pohonné hmoty) a druhou skupinou jsou „ostatní“ benzíny (rozpouštědla, čisticí prostředky apod.) a další ředidla, rozpouštědla a čističe. Toto rozdělení vyplývá zejména z maximálního povoleného obsahu benzenu stanoveného právním předpisem, který se pro automobilové benzíny a ostatní benzíny liší.

3.3.1 Automobilové benzíny

- čiré, s vodou nemísitelné, nažloutlé (resp. narůžovělé - benzín Speciál) kapaliny charakteristického zápachu (barva nemusí být přírodní, mohou být přibarvovány)
- hustota v rozmezí 0,65 – 0,9 g/cm³
- odběr vzorků při tankování benzínu na čerpacích stanicích (např. Benzina, Agip, OMW apod.) do skleněných vzorkovnic o objemu 20 ml
- odběr v období od září 2007 do února 2008
- vzorky skladovány v digestoři při teplotě 21 °C - 23 °C
- obsah benzenu povolen do 1 hm. % (podle vyhlášky č. 229/2004 Sb.¹⁶), obsah toluenu není omezen

3.3.2 „Ostatní“ benzíny a další ředidla, rozpouštědla a čističe

- rozpouštědla, ředidla, čističe apod., které obsahují benzínové frakce a mohou proto obsahovat také benzen a toluen
- bezbarvé kapaliny
- hustota v rozmezí 0,65 – 0,9 g/cm³
- odběr vzorků byl prováděn ve spolupráci s výrobcí (Barvy a Laky Praha, Total) a spotřebiteli (domácnosti, autoservis, mycí linka, Synpo Pardubice)
- odběr v období září 2007 – únor 2008
- odběr do skleněných vialek o objemu 4 ml a skleněných vzorkovnic o objemu 20 ml
- vzorky skladovány v digestoři při teplotě 21 °C - 23 °C
- obsah benzenu povolen do 0,1 hm. % (podle vyhlášky č. 221/2004 Sb.¹⁵), obsah toluenu pro spotřebitele povolen do 0,1 hm. % (podle vyhlášky č. 284/2006 Sb.²)

3.4 Pracovní postupy

3.4.2 Úprava vzorků

Vzorky nebyly před samotnou analýzou na plynovém chromatografu upravovány. Dávkovány byly neředěné.

Pro analýzu na kapalinovém chromatografu byly vzorky stokrát ředěny – do 1 ml methanolu bylo přidáno 10 μ l vzorku. Ředění bylo prováděno z důvodu získání lineární odezvy detektoru pro předpokládané rozsahy koncentrace benzenu a toluenu.

3.4.3 Příprava kalibračních roztoků

Kalibrační roztoky pro plynovou chromatografii byly připravovány v isooktanu přidáním příslušného množství benzenu a toluenu do 1 ml isooktanu (viz. tabulka 4). Dávkování bylo prováděno Hamiltonovými mikropipetami N701 (objem 10 μ l) a N7001 (objem 1 μ l).

Tabulka 4: Kalibrační roztoky pro plynovou chromatografii (uvedené objemy doplněny do 1 ml isooktanem)

Benzen (μ l)	Toluen (μ l)	Koncentrace (obj. %)
0,1	0,1	0,01
0,2	0,2	0,02
0,5	0,5	0,05
1	1	0,1
2	2	0,2
5	5	0,5
10	10	1
20	20	2

Kalibrační roztoky pro kapalinovou chromatografii byly připravovány v methanolu přidáním příslušného množství základního roztoku (viz. tabulka 5).

Základní roztok byl připraven přidáním 1 μ l benzenu a 1 μ l toluenu do 10 ml methanolu (0,01 % roztok benzenu a toluenu v methanolu).

Tabulka 5: Kalibrační roztoky pro kapalinovou chromatografii

Základní roztok (ml)	MeOH (ml)	Koncentrace (obj. %)
0	1	0
0,02	0,98	0,0002
0,05	0,95	0,0005
0,1	0,9	0,001
0,2	0,8	0,002
0,5	0,5	0,005
1	0	0,01

3.4.4 Podmínky analýzy

3.4.4.1 Plynová chromatografie

Pro analýzu na plynovém chromatografu byl jako nosný plyn používán dusík.

Tabulka 6: Parametry analýz na plynovém chromatografu

Kolona	Teplotní program	Teploty		Nástřik		Průtok (cm/s)
		Injektor (°C)	FID (°C)	Objem (μl)	Split	
DB - WAX	40 °C/ 5 min 10 °C/min do 70 °C/0 min 20 °C/min do 180 °C/5 min	250	250	1	50 : 1	20
DB - 5MS	35 °C/ 5 min 20 °C/min do 180 °C/4 min	250	250	1	50 : 1	20

3.4.4.2 Kapalinová chromatografie

Pro analýzu na kapalinovém chromatografu byla jako mobilní fáze používána směs methanolu a vody (popř. samotný methanol) v gradientovém programu, v poměrech které jsou uvedeny v tabulce 7.

Tabulka 7: Parametry analýzy na kapalinovém chromatografu

Kolona	Zorbax Eclipse XDB – C8	
Průtok	0,5 ml/min	
Dávkování	10 μl	
Teplota	25 °C	
Gradient	čas (min)	CH ₃ OH : H ₂ O
	0	70 : 30
	10	70 : 30
	15	100 : 0
	20	100 : 0
	25	70 : 30

3.4.5 Identifikace a kvantifikace benzenu a toluenu

Identifikace benzenu a toluenu byla prováděna na základě porovnání retenčních časů, získaných analýzou roztoků standardů benzenu a toluenu v isooktanu (pro plynovou chromatografii) a v methanolu (pro kapalinovou chromatografii). Kontrola retenčních časů byla prováděna průběžně během analýz nástřikem kalibračních roztoků.

Kvantitativní stanovení bylo prováděno na základě ploch píků. Plochy píků byly měřeny pomocí ChemStation, integrace ploch byla prováděna manuálně.

Vnitřní standard nebyl používán vzhledem k rozmanitému složení analyzovaných vzorků.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

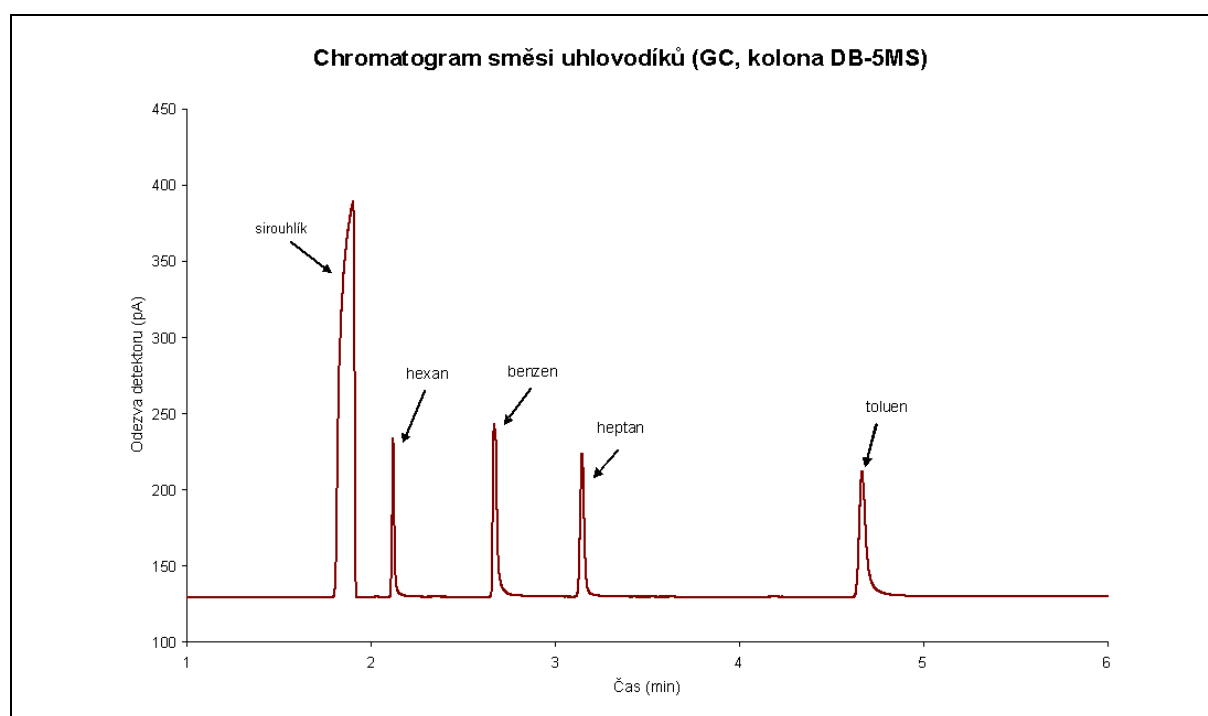
4.1 Volba chromatografických podmínek

4.1.1 Plynová chromatografie

Testovány byly kolony s různě polárními stacionárními fázemi – nepolární DB5-MS (stacionární fáze 5% fenyl - 95 % dimethylpolysiloxan), středně polární ZB-35 (35 % fenyl 65 % dimethylpolysiloxan), ZB-50 (50 % fenyl 50 % dimethylpolysiloxan) a polární DB-WAX (polyethylenglykol).

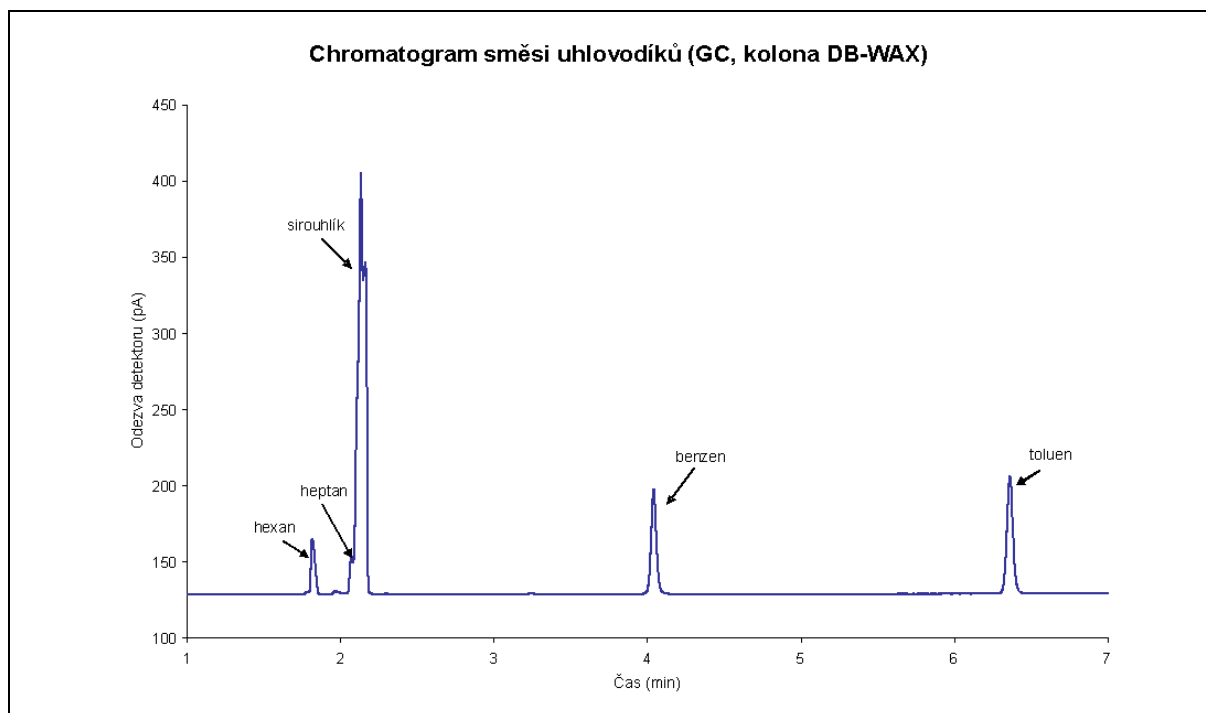
V následujících dvou chromatogramech (obr. 11 a obr. 12) jsou ukázány analýzy standardní směsi hexanu, heptanu, benzenu a toluenu v sirouhlíku.

Na koloně DB5-MS (nepolární) probíhá separace na základě bodů varu analyzovaných sloučenin. Pík benzenu (b.v. 80,1 °C) je mezi píky hexanu (b.v. 68,7 °C) a heptanu (b.v. 98,4 °C). Pík toluenu (b.v. 110,6 °C) je až za těmito třemi píky.



Obrázek 11: Ukázka separace uhlovodíků na nepolární koloně DB5-MS

V případě separace na DB-WAX (polární) hraje velkou roli i polarita analyzovaných sloučenin. Retenční čas píku benzenu i toluenu je ve srovnání s DB5-MS daleko vyšší než u hexanu a heptanu.



Obrázek 12: Ukázka separace uhlovodíků na koloně polární koloně DB-WAX

Na středně polárních fázích (ZB-35 a ZB-50) docházelo také k posunutí retenčních časů aromatických uhlovodíků v porovnání s alkany, ale posunutí nebylo tak výrazné jako u kolony DB-WAX.

Pro analýzu benzínů na plynovém chromatografu byly vybrány 2 kapilární kolony, 30 m dlouhé, vnitřního průměru 0,25 mm se zakotvenou nepolární fází (DB-5MS) a polární fází (DB-WAX) analogicky jako u postupu, který je uveden v literatuře³⁰.

Chromatografické podmínky analýzy byly voleny tak, aby při zachování účinnosti separace proběhla analýza v přijatelné době (teplotní program je blíže popsán v kapitole 3.4.4.1).

K optimalizaci metod byl použit 0,1 % roztok benzenu a toluenu v isooktanu. Byly testovány různé počáteční teploty analýzy (35 °C, 40 °C a 50 °C) a jako optimální se ukázala pro kolonu DB-WAX teplota 40 °C a pro kolonu DB5-MS teplota 35 °C.

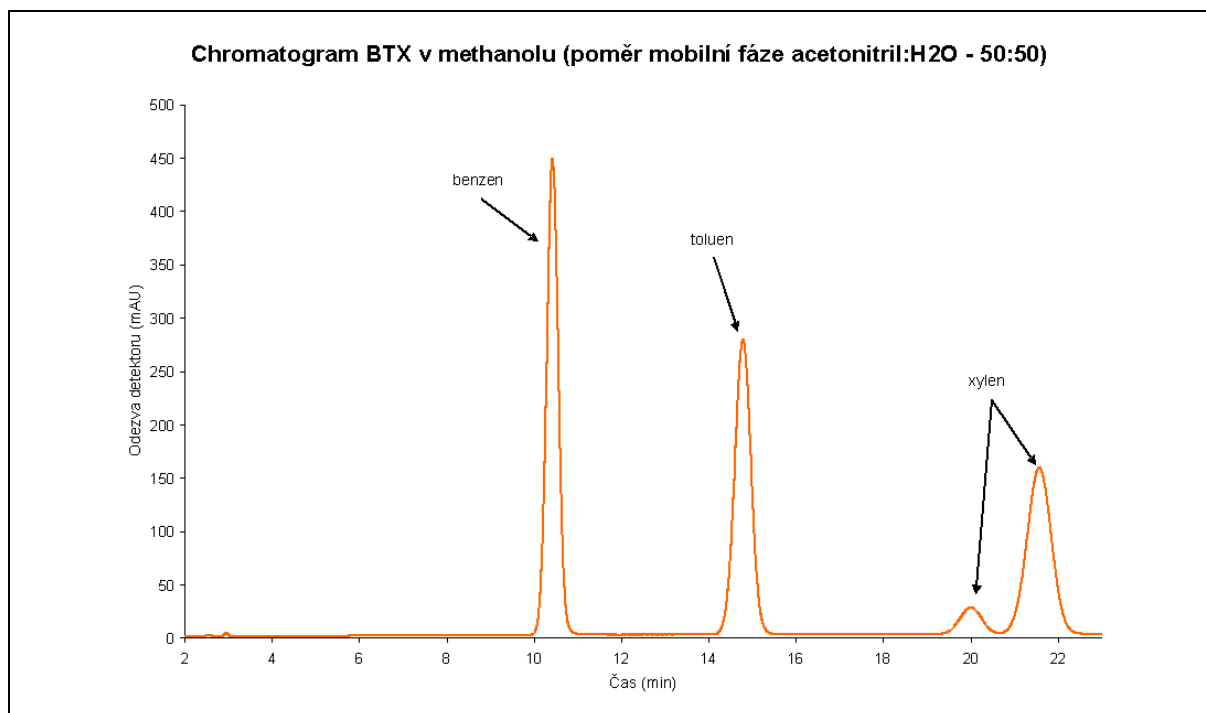
4.1.2 Kapalinová chromatografie

Separace probíhala na koloně Zorbax Eclipse XDB – C8 s reversní fází.

4.1.2.1 Výběr mobilní fáze

Jako testovací roztok byl používán 0,01 % benzen, toluen a technický xylen (BTX) v acetonitrilu (mobilní fáze acetonitril : voda), resp. methanolu (mobilní fáze methanol : voda).

Nejprve byla jako mobilní fáze testována směs acetonitrilu a vody v poměru 50 : 50 (při isokratických podmínkách). Separace byla dobrá a délka analýzy byla také příznivá (viz. obrázek 13).

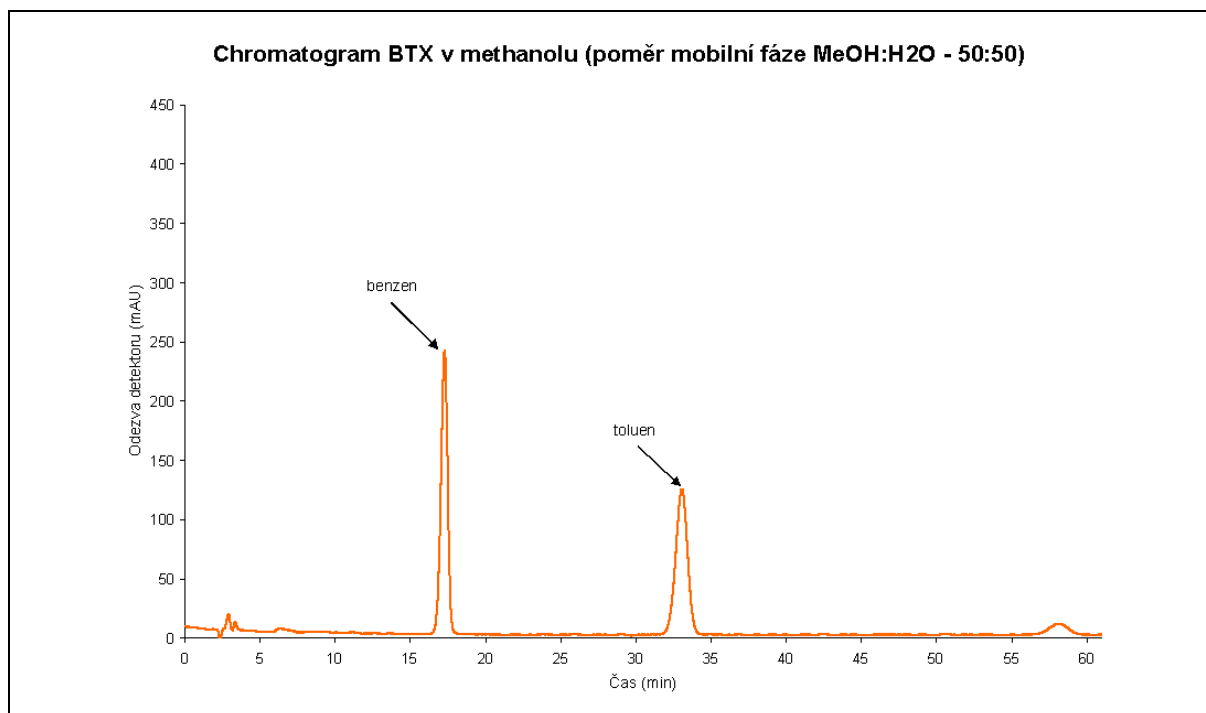


Obrázek 13: Ukázka separace benzenu, toluenu a xylenu při použití mobilní fáze acetonitril : voda v poměru 50 : 50

Druhá testovaná mobilní fáze byla směs methanolu a vody, která byla následně pro analýzu použita. Vybrána byla hlavně proto, že analýza je při použití methanolu méně finančně náročná.

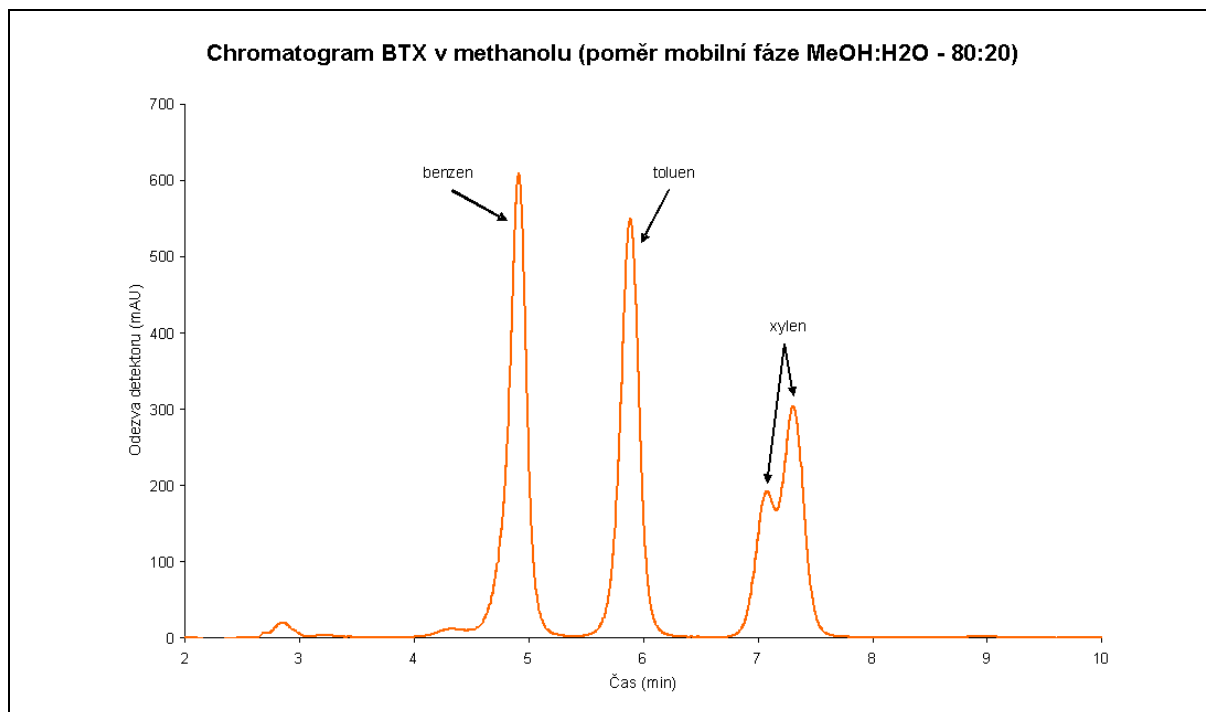
Zkoušeny byly různé poměry těchto dvou složek mobilní fáze (při isokratické eluci) a za optimální byl vybrán poměr 70 : 30 (methanol : voda).

Pokud mobilní fáze obsahovala methanol a vodu v poměru 50 : 50 docházelo k dobré separaci složek směsi, ale analýza byla příliš dlouhá (viz. obrázek 14)



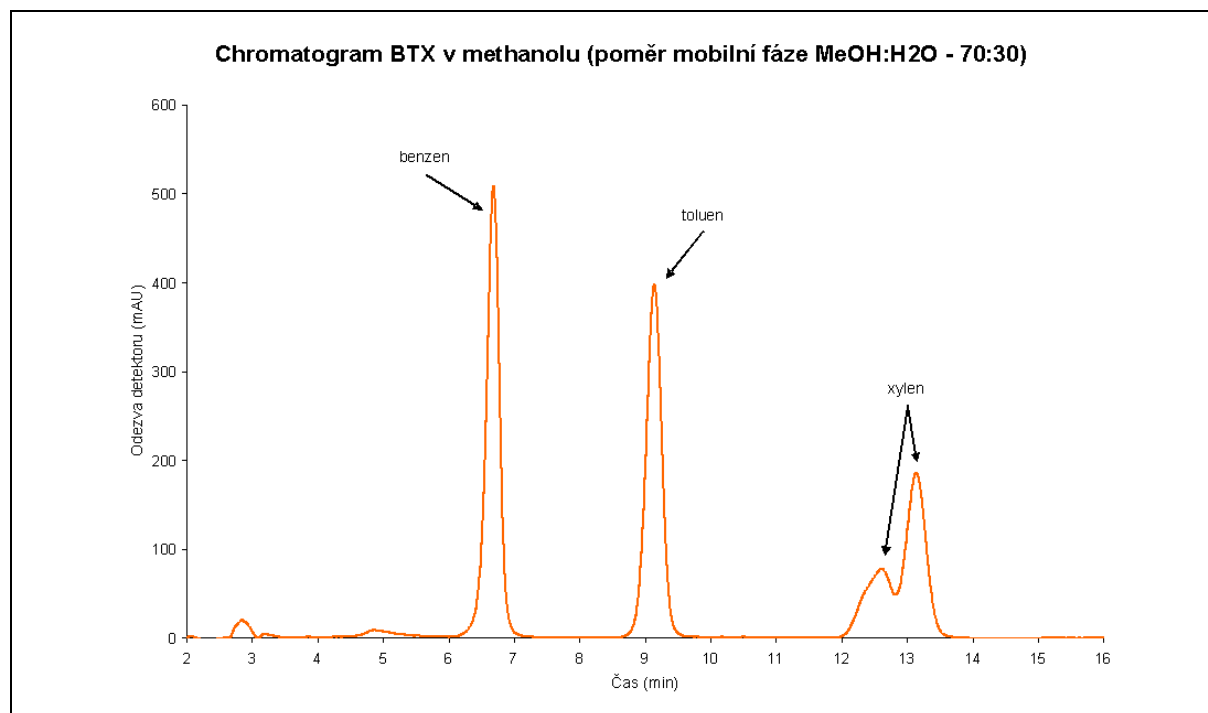
Obrázek 14: Ukázka separace benzenu a toluenu při použití mobilní fáze methanol : voda v poměru 50 : 50

Při složení mobilní fáze 80 : 20 (methanol : voda) byla délka analýzy přijatelná ale separace nebyla dostačující (viz. obrázek 15).



Obrázek 15: Ukázka separace benzenu, toluenu a xylenu (BTX) při použití mobilní fáze methanol : voda v poměru 80 : 20

Optimální se ukázalo složení 70 : 30 (methanol : voda), při kterém byla dobrá separace a doba trvání analýzy byla také příznivá (viz. obrázek 16).



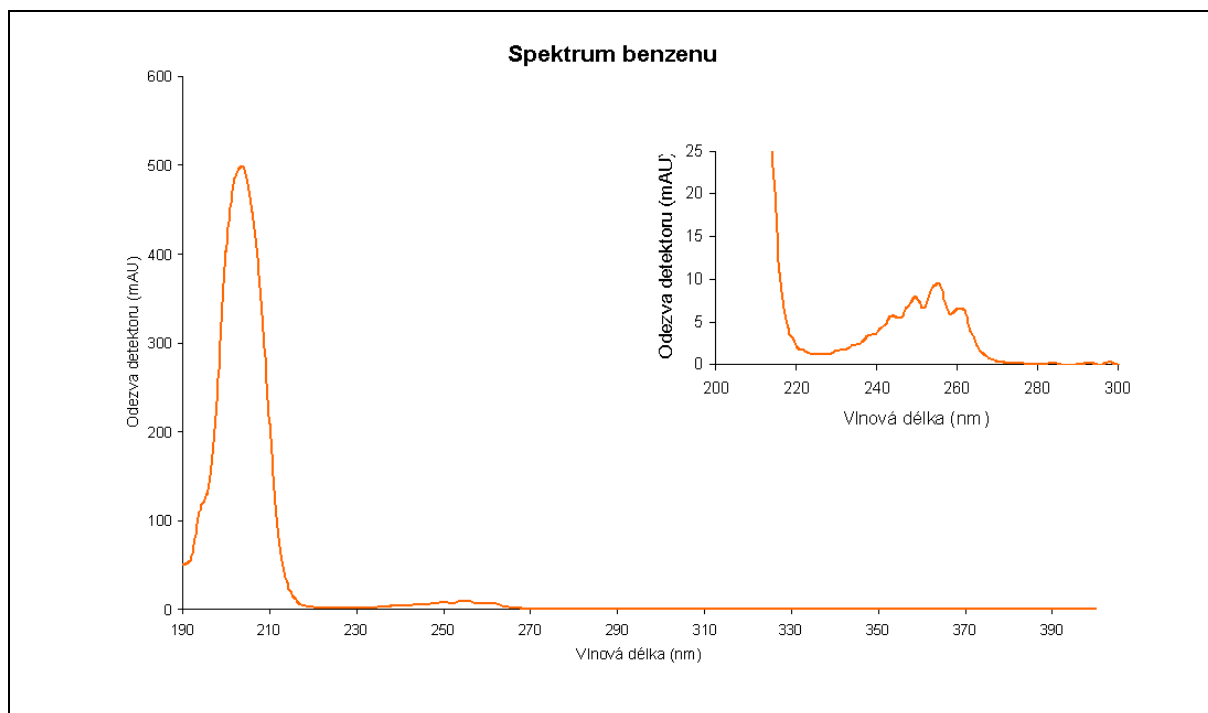
Obrázek 16: Ukázka separace benzenu, toluenu a xylenu (BTX) při použití mobilní fáze methanol : voda v poměru 80 : 20

Pro urychlení analýzy (vymytí všech nastříknutých sloučenin) byla pro vlastní analýzu reálných vzorků použita gradientová eluce (viz. gradient popsáný v kapitole 3.4.4.2).

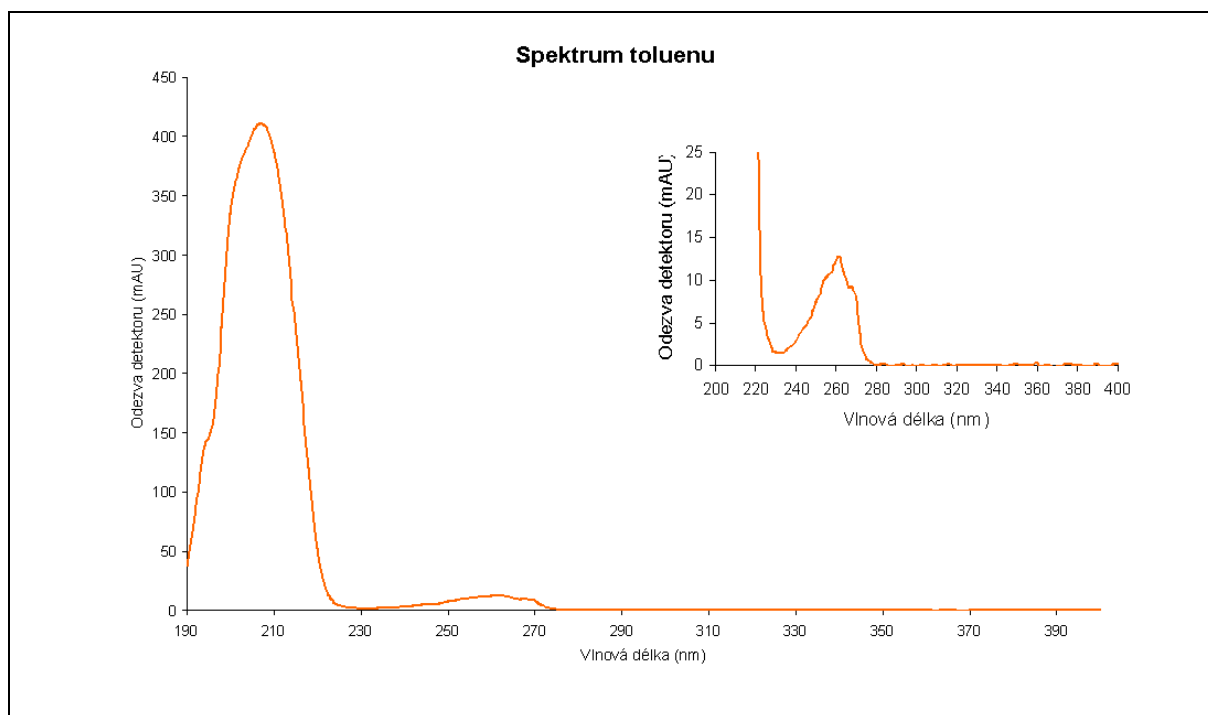
4.1.2.2 Výběr vhodné vlnové délky

Benzen a toluen, stejně jako ostatní aromatické uhlovodíky mají nejvyšší absorpční koeficienty při vlnových délkách blízkých se 200 nm. Díky konjugovanému aromatickému jádru absorbují i při vlnových délkách okolo 254 nm (zde je stanovení daleko specifitější, protože v této oblasti alkeny a alkyne neabsorbují).

Spektra benzenu a toluenu ukazují, že při 254 nm je absorpční koeficient daleko nižší než při 205 nm. Měření při 254 nm neumožňuje stanovit tak nízké koncentrace jako při měření při 205 nm a proto, ačkoliv byl při našem měření zaznamenávám signál při obou vlnových délkách, následné výpočty byly prováděny pouze s hodnotami získanými z měření při 205 nm.



Obrázek 17: Spektrum benzenu



Obrázek 18: Spektrum toluenu

4.2 Analýza kalibračních roztoků

4.2.1 Kalibrační křivky

Kalibrační křivky byly získány měřením závislosti plochy píku na koncentraci kalibračních roztoků standardů (jejich příprava a složení jsou popsány v kapitole 3.4.3) a byly použity pro kvantifikaci benzenu a toluenu v reálných vzorcích.

Kalibrační roztoky byly měřeny každý den před analýzou, aby byly ověřeny retenční časy benzenu a toluenu.

Při vyhodnocování kalibračních křivek metodou lineární regrese byly získány rovnice ve tvaru $y = a \cdot x + b$. Konstantu b je možné v rovnici kalibrační křivky zanedbat a to v případě, že není statisticky významně odlišná od nuly. Kalibrační vztah pak získáváme ve zjednodušené podobě $y = k \cdot x$. To, zda je konstanta významná je možné zjistit tzv. Studentovým t-testem. Tento test jsem použila pro zjištění významnosti konstant b u ukázkových kalibračních křivek pro měření prováděná na plynovém chromatografu (na koloně DB-WAX i DB5-MS) i na kapalinovém chromatografu.

Výpočtem podle vztahu (1) se stanoví hodnota charakteristiky t , která se následně porovná s kritickou hodnotou Studentova t-rozdělení pro $n-2$ stupně volnosti $t_k(n-2; 0,05)$, kde n je počet kalibračních bodů. Pokud je $t \geq t_k(n-2; 0,05)$, pak je hodnota posunutí b statisticky významně odlišná od nuly a není možné ji zanedbat (musí být pro výpočty použit vztah $y = a \cdot x + b$). Pokud je ale hodnota $t < t_k(n-2; 0,05)$, pak je možné posunutí b zanedbat a pro výpočty je možné použít rovnici kalibrační křivky ve tvaru $y = k \cdot x$. Hodnota $t_k(n-2; 0,05)$ byla získána z tabulek.

$$t = \frac{|b|}{s_b} \quad (1)$$

t ... charakteristika Studentova t-testu

b ... posunutí kalibračního vztahu

s_b ... směrodatná odchylka posunutí (b) kalibračního vztahu

$$s_{xy} = \left[\frac{\sum_{i=1}^n (y_i)^2 - b \cdot \sum_{i=1}^n (y_i) - a \cdot \sum_{i=1}^n (x_i \cdot y_i)}{n - 2} \right]^{1/2} \quad (2)$$

$$s_b = s_{xy} \cdot \left[\frac{\sum_{i=1}^n (x_i^2)}{n \cdot \sum_{i=1}^n (x_i^2) - \left[\sum_{i=1}^n (x_i) \right]^2} \right]^{1/2} \quad (3)$$

s_{xy} ... směrodatná odchylka rozptýlení kalibračního vztahu

y_i ... hodnota měřené veličiny pro i -tý vzorek

x_i ... koncentrace hledané složky v i -tém vzorku

Přesnost stanovení konstant a,b nebo K se vyjadřuje hodnotami směrodatných odchylek s_a , s_b a s_K , které jsem vypočítala podle vztahů (3), (4) a (5).

$$s_a = s_{xy} \cdot \left[\frac{n}{n \cdot \sum_{i=1}^n (x_i^2) - \left[\sum_{i=1}^n x_i \right]^2} \right]^{1/2} \quad (4)$$

s_a ... směrodatná odchylka regresního koeficientu (a) kalibrační křivky

$$s_K = s_{xyK} \cdot \left[\frac{n}{n \cdot \sum_{i=1}^n (x_i^2) - \left[\sum_{i=1}^n x_i \right]^2} \right]^{1/2} \quad (5)$$

s_K ... směrodatná odchylka analytické konstanty (K) kalibračního vztahu

$$s_{xyK} = \left[\frac{\sum_{i=1}^n (y_i^2) - K \cdot \sum_{i=1}^n (x_i \cdot y_i)}{n-1} \right]^{1/2} \quad (6)$$

s_{xyK} ... směrodatná odchylka rozptýlení kalibračního vztahu, vyjádřeného analytickou konstantou K

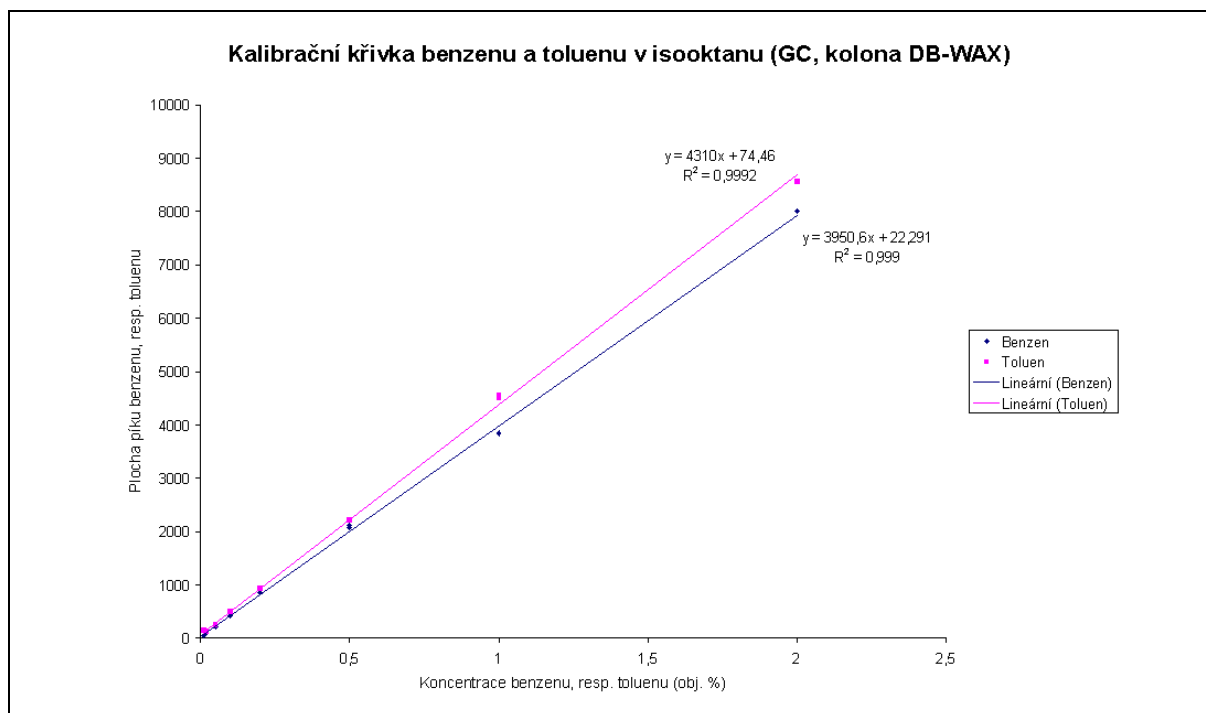
Správnost stanovení konstant a, b nebo K se vyjadřuje intervaly spolehlivosti L_a , L_b a L_K , které jsem vypočítala podle vztahů (7), (8) a (9).

$$L_a = a \pm t_k(n-2;0,5) \cdot s_a \quad (7)$$

$$L_b = b \pm t_k(n-2;0,5) \cdot s_b \quad (8)$$

$$L_K = K \pm t_k(n-1;0,5) \cdot s_k \quad (9)$$

t_k ... kritická tabelovaná hodnota studentova t-rozdělení pro n-2 stupně volnosti



Obrázek 19: Vzorová kalibrační křivka benzenu a toluenu měřená GC na koloně DB-WAX

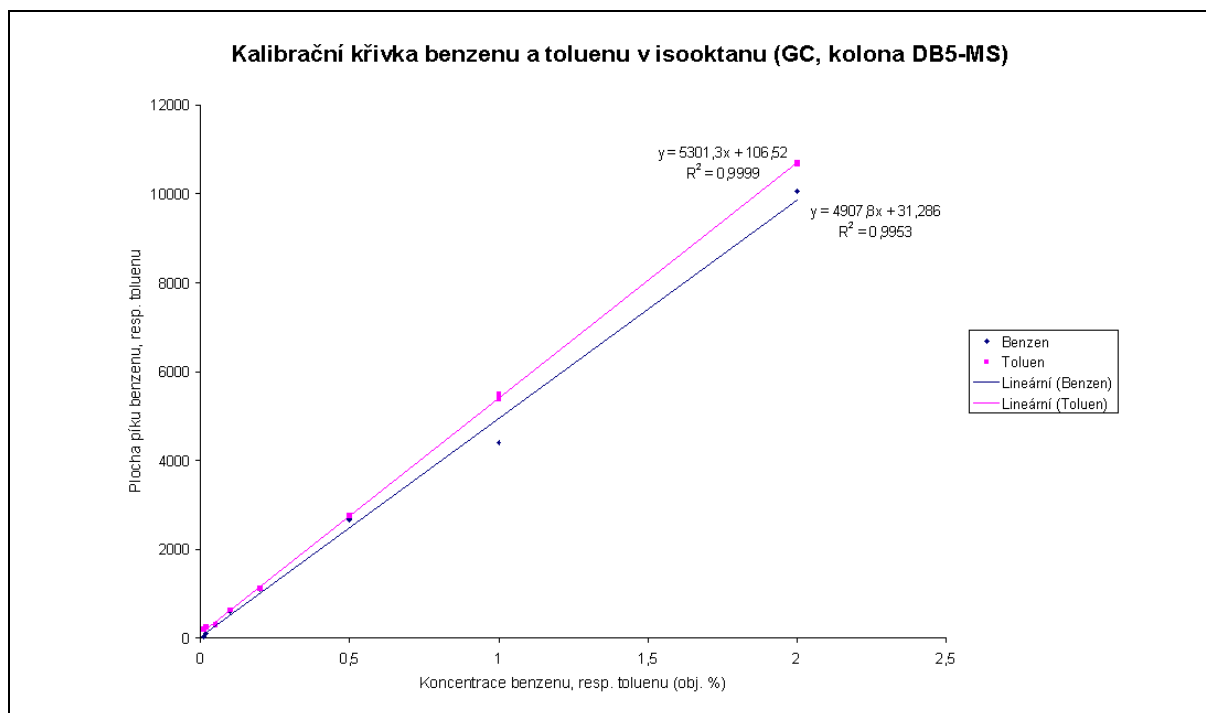
Tabulka 8: Statistické parametry kalibračních křivek měřených na koloně DB-WAX

	Rovnice kal. křivky	s_{xy}	s_b	t	t_k
Benzen	$y = 3950,6x + 22,291$	238,199	104,850	0,213	2,447
Toluen	$y = 4310x + 74,46$	95,387	46,679	1,628	2,571

Pomocí Studentova t-testu bylo zjištěno, že pro kalibrační křivky benzenu i toluenu měřené na koloně DB-WAX není hodnota posunutí b statisticky významně odlišná od nuly ($t < t_k(n-2; 0,05)$) a proto je možné posunutí zanedbat. Rovnici kalibrační křivky pro benzen má pak tvar $y = 3970,1x$ a pro toluen $y = 4339,8x$.

Tabulka 9: Hodnoty směrodatných odchylek a intervalů spolehlivosti parametrů kalibračních křivek měřených na koloně DB-WAX

	s_{xyk}	s_k	L_k
Benzen	198,292	107,205	<3716,6;4223,6>
Toluen	101,153	56,873	<4193,6;4486,0>



Obrázek 20: Vzorová kalibrační křivka benzenu a toluenu měřená GC na koloně DB5-MS

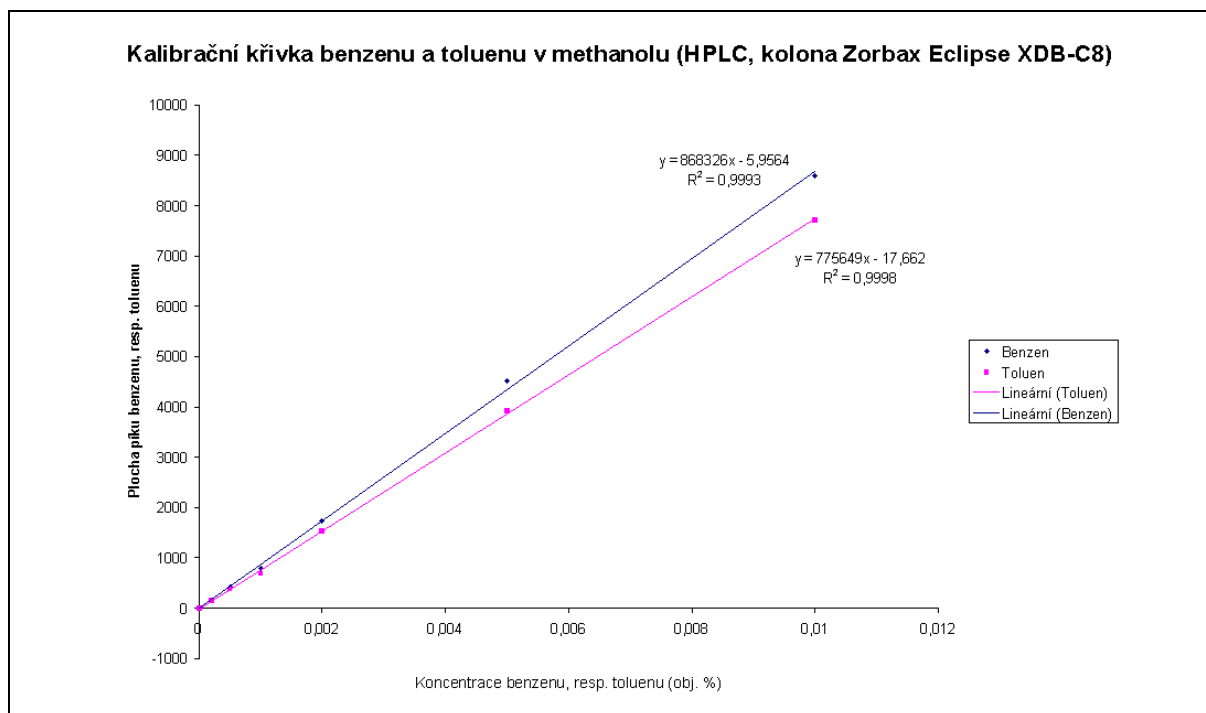
Tabulka 10: Statistické parametry kalibračních křivek měřených na koloně DB5-MS

	Rovnice kal. křivky	s_{xy}	s_b	t	t_k
Benzen	$y = 4907,8x + 31,286$	254,926	124,971	0,250	2,447
Toluen	$y = 5301x + 106,52$	42,862	18,867	5,645	2,447

Pomocí Studentova t-testu bylo zjištěno, že pro kalibrační křivku benzenu měřenou na koloně DB5-MS je možné posunutí b zanedbat ($t < t_k(n-2; 0,05)$) a rovnici křivky můžeme zapsat ve tvaru $y = 4930,0x$. Pro kalibrační křivku toluenu bylo zjištěno, že hodnota posunutí je statisticky významně odlišná od nuly ($t \geq t_k(n-2; 0,05)$) a proto není možné posunutí b zanedbat a rovnice kalibrační křivky musí mít tvar $y = 5301,3x + 106,5$.

Tabulka 11: Hodnoty směrodatných odchylek a intervalu spolehlivosti parametrů kalibračních křivek měřených na koloně DB5 MS

	s_{xyk}	s_k	L_k	-
Benzen	199,051	107,616	<4619,5;5240,5 >	-
	s_a	s_b	L_a	L_b
Toluen	23,173	18,867	<5244,6;5358,0>	<60,4;152,7>



Obrázek 21: Vzorová kalibrační křivka benzenu a toluenu měřená HPLC

Tabulka 12: Statistické parametry kalibračních křivek měřených HPLC

	Rovnice kal. křivky	s_{xy}	s_b	t	t_k
Benzen	$y = 868326x - 5,956$	90,973	43,789	0,136	2,571
Toluen	$y = 775649x - 17,662$	42,858	20,630	0,856	2,571

Pro kalibrační křivky benzenu i toluenu je možné posunout b zanedbat ($t < t_k(n-2; 0,05)$) a rovnice křivek mohou být zapsány ve tvaru $y = 867471x$ pro benzen a $y = 773114x$ pro toluen.

Tabulka 13: Hodnoty směrodatných odchylek a intervalů spolehlivosti parametrů kalibračních křivek měřených HPLC

	s_{xyk}	s_k	L_k
Benzen	83,211	9283,923	<843606;891336>
Toluen	41,903	4675,079	<761096;785132>

4.2.2 Opakovatelnost

Při měření kalibračních roztoků byly také testovány opakovatelnosti metody, které byly vyjádřeny relativní směrodatnou odchylkou plochy píku. Relativní směrodatná odchylka byla počítána podle vztahu (10).

$$s = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (10)$$

V případě analýzy na plynovém chromatografu byla spočítána směrodatná odchylka nástřiku – kalibrační roztoky byly dávkovány pomocí autosampleru. Pro 6krát nastříknuté kalibrační roztoky (každý kalibrační roztok byl připraven pouze jednou) se hodnota relativní směrodatné odchylky pohybovala v rozmezí od 0,771 % do 1,066 %. Z těchto hodnot směrodatných odchylek vyplývá, že opakovatelnost nástřiku je vysoká.

V případě kapalinového chromatografu byla spočítána relativní směrodatná odchylka analýzy z pokaždé nově připravených kalibračních roztoků, které byly analyzovány 1x za den šest dnů za sebou. Relativní směrodatná odchylka se pohybovala v rozmezí od 3,076% do 10,145%. Opakovatelnost analýzy je dobrá.

4.2.3 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Pro každou kolonu byly stanoveny meze detekce a meze stanovitelnosti benzenu a toluenu. Mez detekce se vyjadřuje jako trojnásobek šumu základní linie a mez stanovitelnosti jako desetinasobek šumu základní linie.

$$LOD = \frac{3 \cdot h_n}{m}$$

$$LOQ = \frac{10 \cdot h_n}{m}$$

LOD mez detekce

LOQ mez stanovitelnosti

h_n šum na základní linii

m směrnice kalibrační křivky závislosti výšky píku na koncentraci

Tabulka 14: Hodnoty mezí stanovitelnosti a mezí detekce benzenu a toluenu

Metoda	Mez detekce (obj. %)		Mez stanovitelnosti (obj. %)	
	Benzen	Toluen	Benzen	Toluen
GC (DB-WAX)	0,00010	0,00006	0,00033	0,00019
GC (DB5-MS)	0,00006	0,00021	0,00002	0,00008
HPLC	0,00004	0,00005	0,00013	0,00017

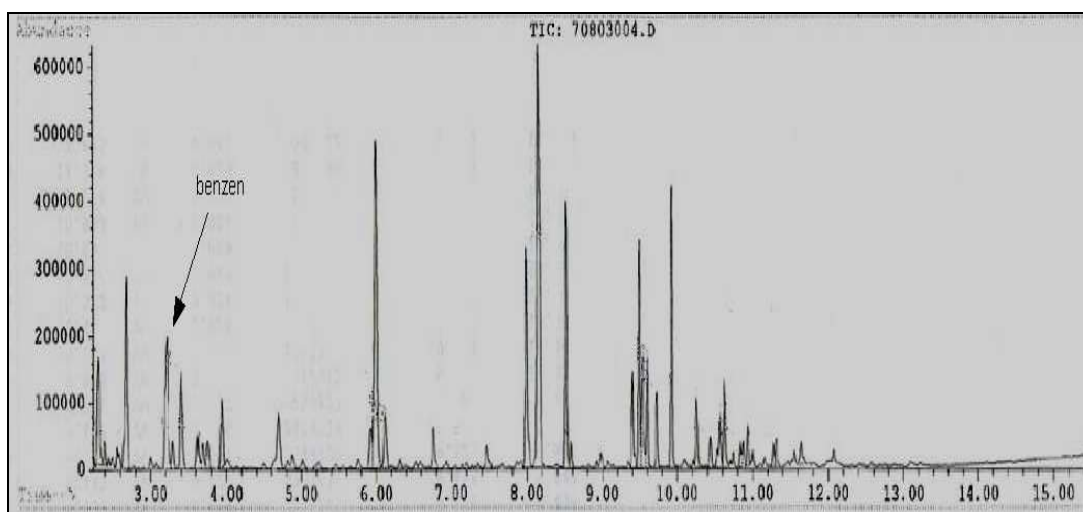
Uvedené meze detekce byly spočítány na základě analýz kalibračních roztoků. Vzhledem ke zkušenostem, které jsme získali analýzou reálných vzorků (značná variabilita ve složení) považujeme za správnější kvantifikovat koncentrace vyšší než nejnižší kalibrační bod, tj. 0,01 % pro GC analýzy a 0,02 % pro HPLC analýzy.

4.3 Analýza reálných vzorků

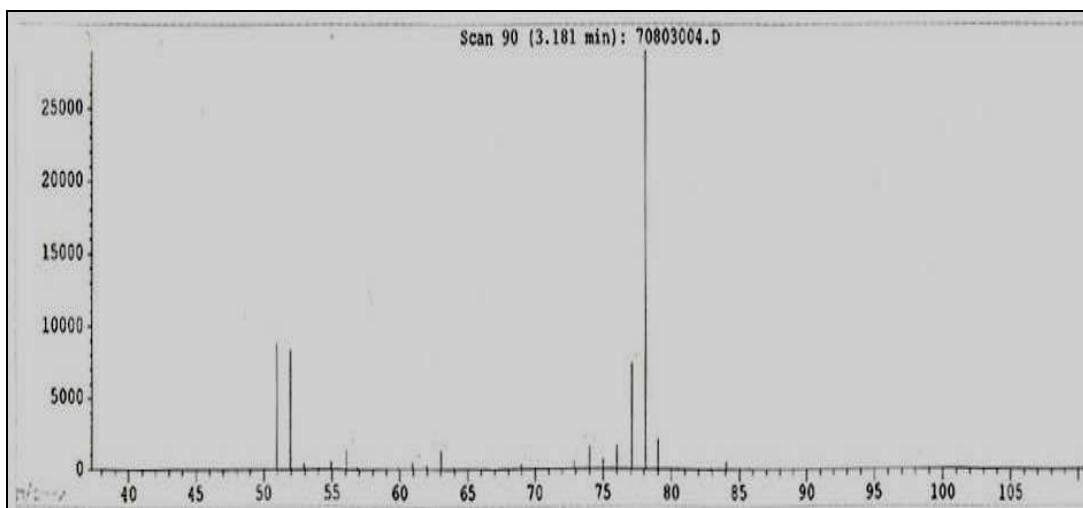
Analýzované vzorky (motorové benzíny, technické benzíny, ředidla, čističe apod.) mají různorodou povahu – je to dáno různými použitím, nestálým složením surovin, různými technologiemi zpracování, přítomností aditiv apod. Identifikace sloučenin při analýze plynovým chromatografem (je používán neselektivní FID detektor) představuje značné nejistoty.

Pro identifikaci a stanovení benzenu, který je ve vzorcích v poměrně nízkých koncentracích, by bylo nejlepší použití hmotnostního detektoru. Identifikaci je možné provést pomocí MS spektra a retenčního času, stanovení pomocí záznamu monitorování selektivního iontu.

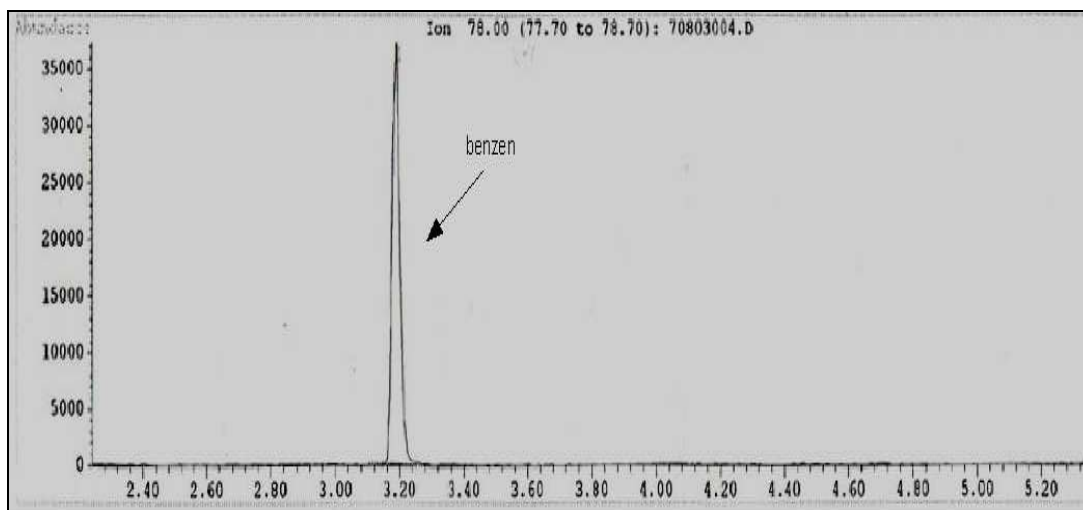
Příklad stanovení metodou GC/MS (použit plynový chromatograf HP 5890 s detektorem HP5971) je ukázán na níže uvedených obrázcích 22 – 24.



Obrázek 22: Chromatogram stanovení benzínu Natural 95 metodou GC/MS, separace na koloně DB-5MS, záznam TIC



Obrázek 23: MS spektrum benzenu



Obrázek 24: Chromatogram stanovení benzínu Natural 95 metodou GC/MS, separace na koloně DB-5MS, monitorování iontu m/z 78

Pokud zaznamenáváme celkový proud iontů (obr. 22) získáváme signál analogický FID detektoru a můžeme provést identifikaci jen na základě retenčního času. MS detektor ale umožňuje monitorovat signál selektivního iontu, který můžeme vybrat z MS spektra benzenu (obr. 23).

Pokud např. v případě benzenu zvolíme monitorování hmoty m/z 78 (molekulární iont), plocha píku v daném retenčním čase potom odpovídá množství benzenu (obr. 24).

MS systém jsme neměli běžně k dispozici a proto jsme analýzy prováděly postupy, které byly popsány dříve.

Nejčastěji se v současné době pro stanovení benzenu v motorových palivech, technických benzínech a rozpouštědlech používá metoda plynové chromatografie. Pro uvedené koncentrační rozsahy se retenční časy se stoupajícím množstvím benzenu, resp. toluenu neměnily (relativní směrodatná odchylka retenčních časů benzenu byla od 0,007 % do 0,014 % a toluenu od 0,021 % do 0,026 %). K posunům a deformaci píků (nesymetrický tvar) docházelo až při koncentraci nad 2 obj. %. (v těchto případech je nutné zvýšit hodnotu splitovacího poměru).

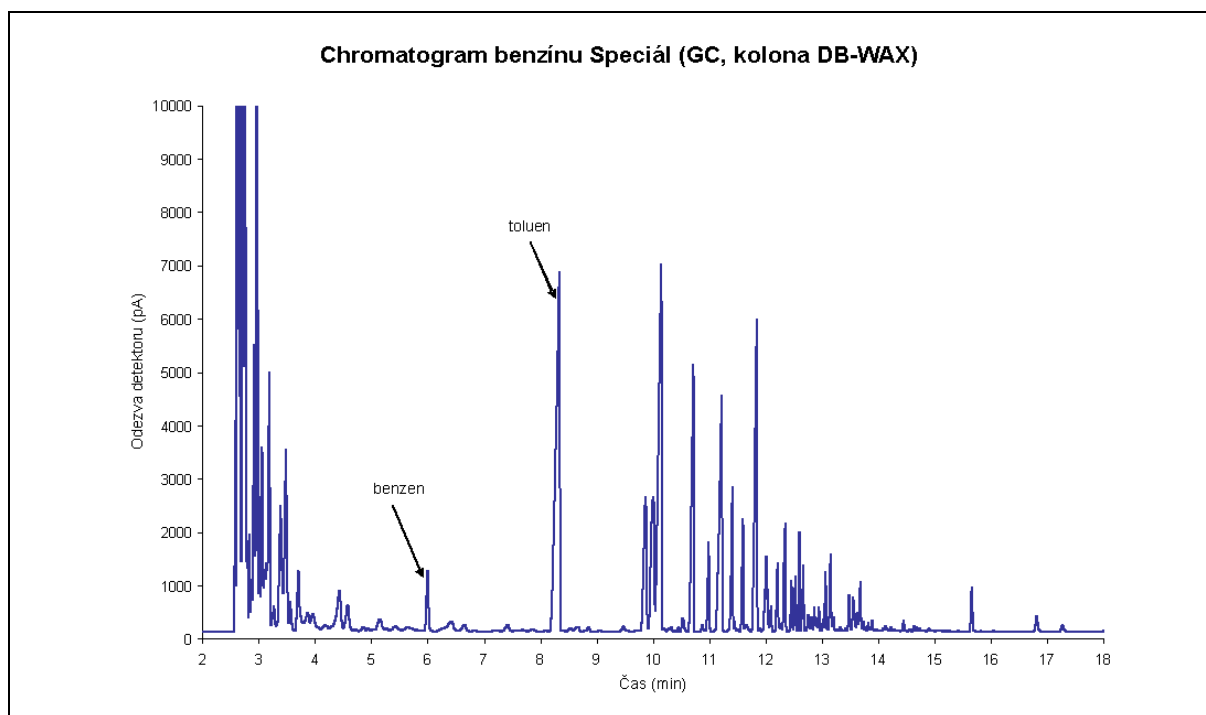
Pro stanovení benzenu a toluenu jsme použili také metodu HPLC, která se v této oblasti analýz příliš nepoužívá, ale nám se osvědčila. Pro naše koncentrační rozmezí byly kalibrační křivky lineární, narozdíl od údajů uvedených v literatuře.³³ Stanovení při vlnové délce 205 nm je značně specifické, protože benzen a toluen jsou polárnější než potenciálně interferující alkeny a alky. U nich můžeme předpokládat, že budou na nepolární koloně Zorbax s C8 více zadržovány a budou vymývány později.

4.3.1 Automobilové (palivové) benzíny

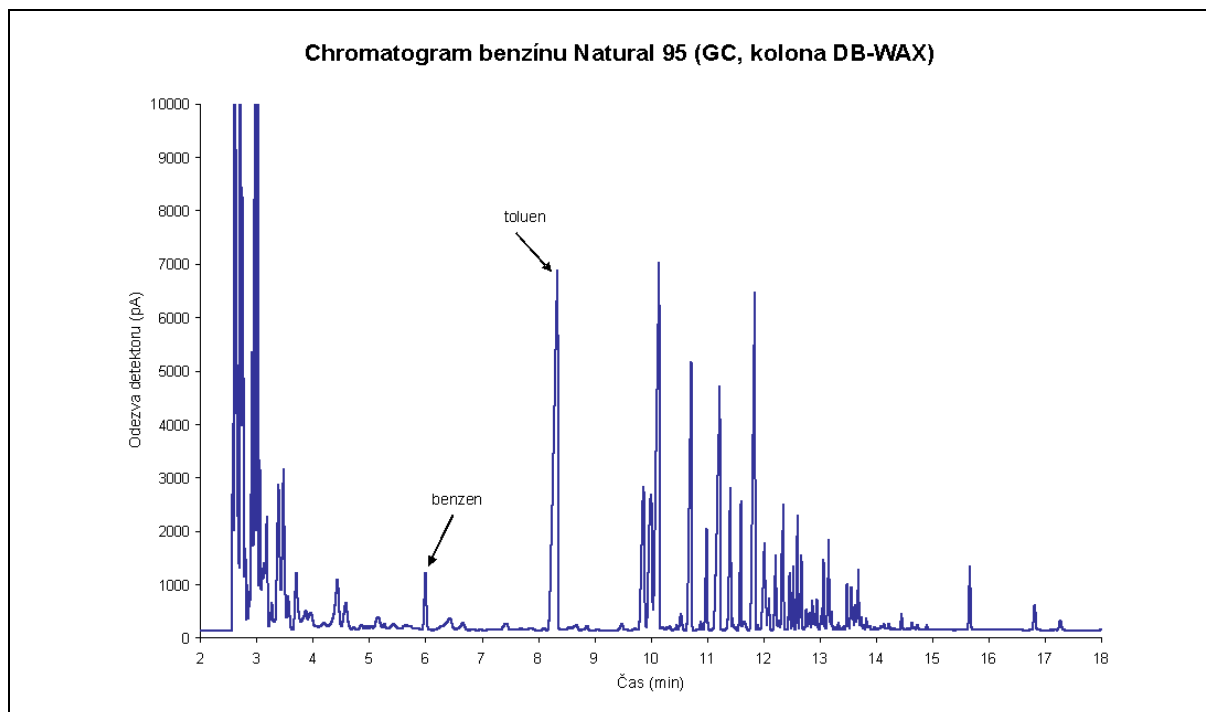
Palivové benzíny mohou obsahovat relativně vysoké koncentrace benzenu (do 1 hmot.%). Stanovován byl pouze benzen, protože množství toluenu v nich není legislativou limitováno. Při analýze plynovou chromatografií mohou při stejných retenčních časech eluovat alkeny, alky, alky i cykloalkany.

Potvrdily se údaje z odborné literatury, že polární kolona (v našem případě DB-WAX) je pro stanovení benzenu vhodnější. Separace na koloně DB-WAX poskytovala symetrické píky v retenčním čase benzenu a toluenu, což je základní informace o správném oddělení od

dalších sloučenin. Na obrázku 25 a 26 je vidět, že separace na DB-WAX umožňuje oddělit majoritní nepolární uhlovodíky (retenční čas do 5 minut) od aromátů, resp. polárních aditiv (retenční čas nad 9 minut).

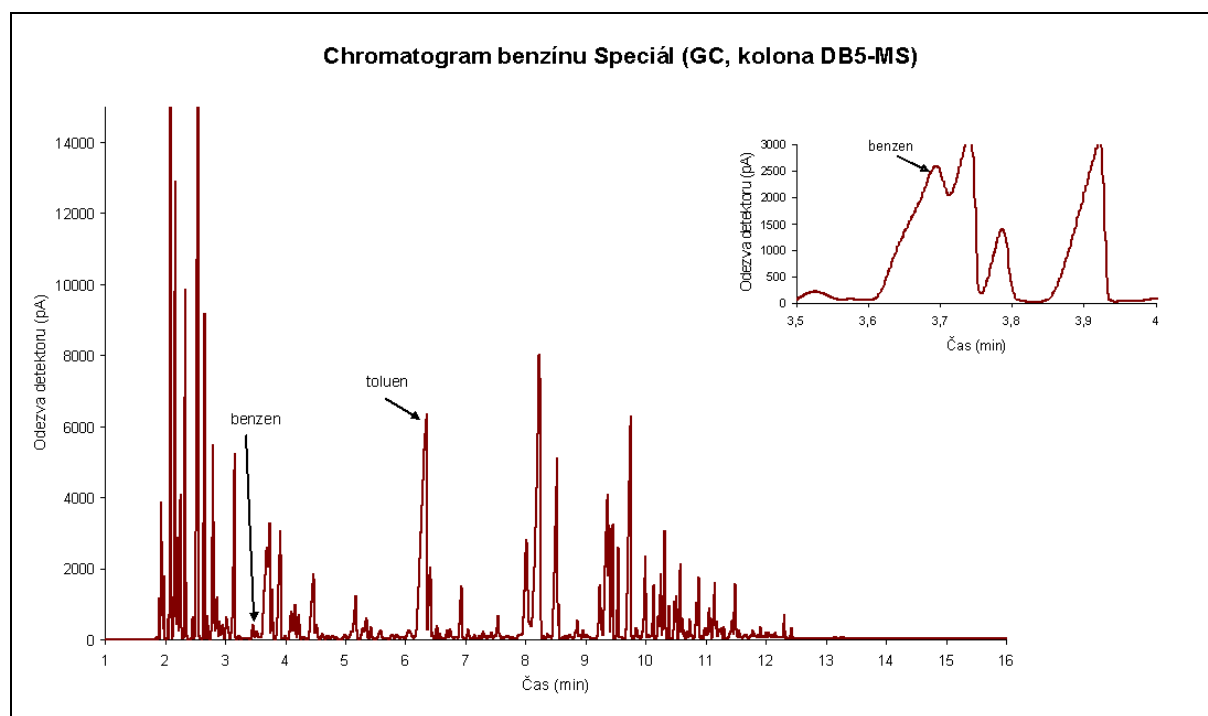


Obrázek 25: Chromatogram benzínu Speciál (měřeno metodou GC, kolona DB-WAX)

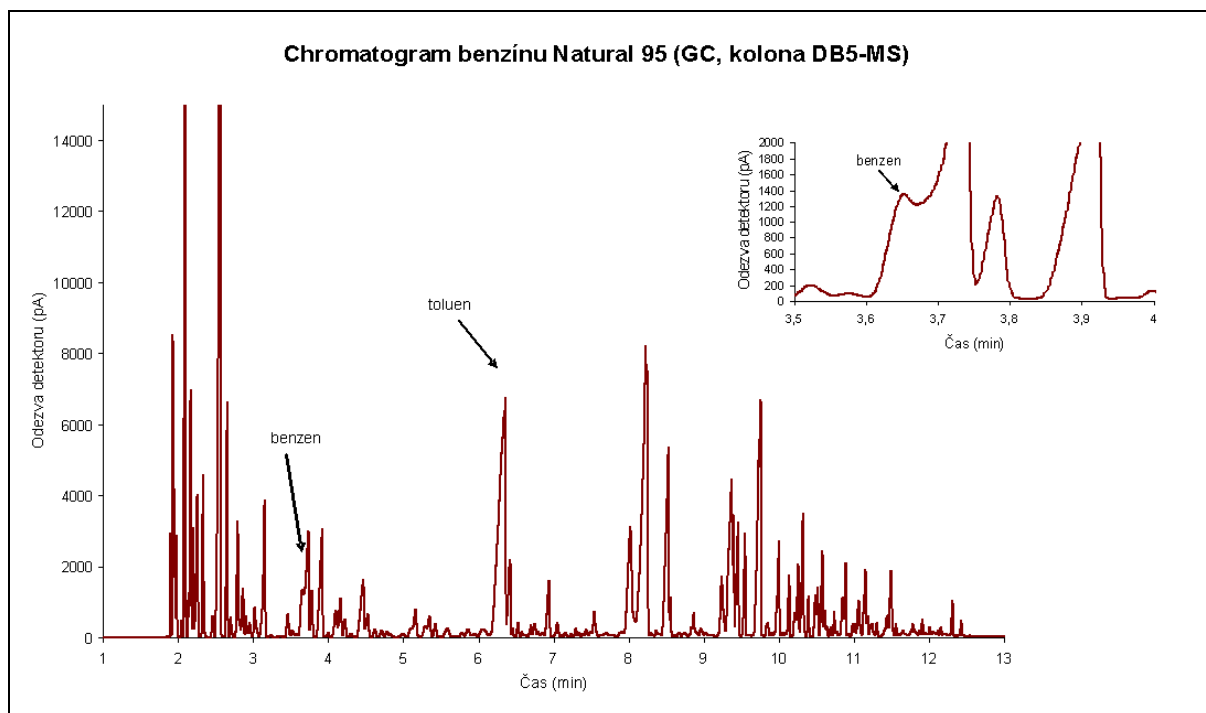


Obrázek 26: Chromatogram benzínu Natural 95 (měřeno metodou GC, kolona DB-WAX)

Při použití nepolární kolony (v našem případě DB5-MS) separace již není tak úspěšná. Na následujících chromatogramech (obr. 27 a 28) je vidět, že v retenčním čase benzenu nebyly nacházeny dobře oddělené a symetrické píky – docházelo k nedostatečné separaci. I přes to by ale bylo možné takovouto analýzu použít pro kontrolu dodržení limitů benzenu v palivových benzínech – pokud by plocha píku (i nesymetrického) v retenčním čase benzenu ukazovala, že je limit dodržen, nemusel by být výsledek již potvrzován. Naopak pokud bychom našli zvýšené množství benzenu museli bychom toto potvrdit analýzou na polární koloně.

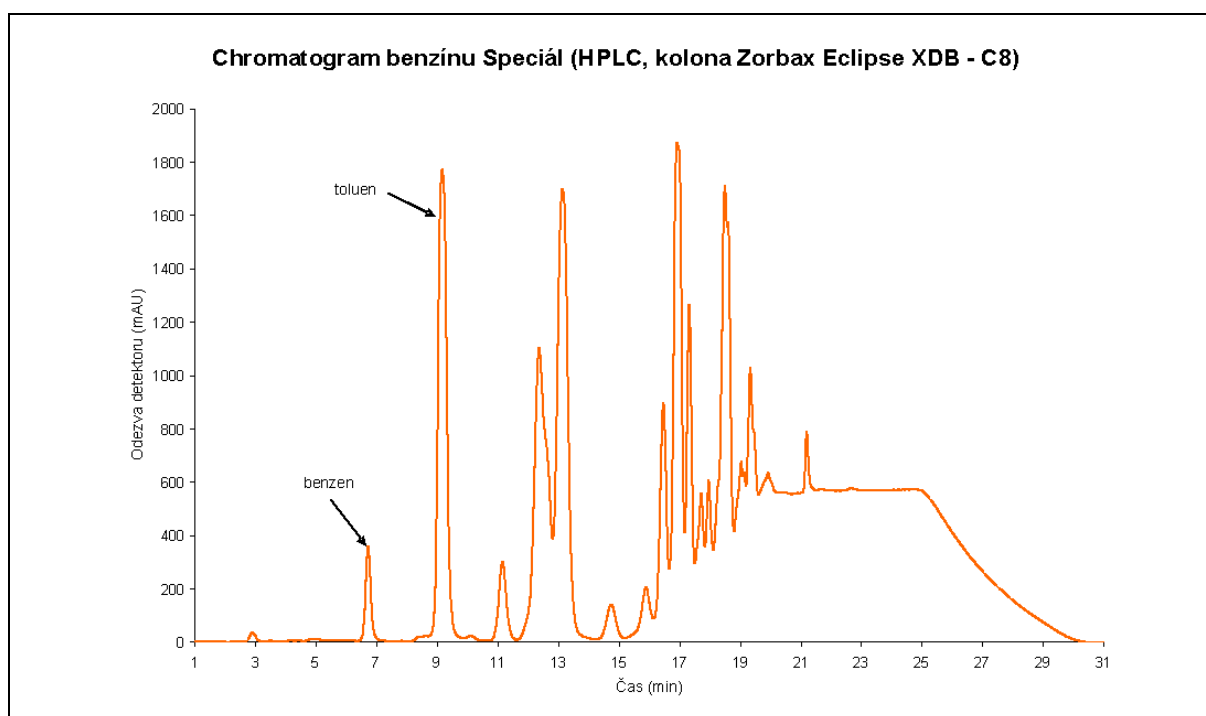


Obrázek 27: Chromatogram benzínu Speciál (měřeno metodou GC, kolona DB5-MS)

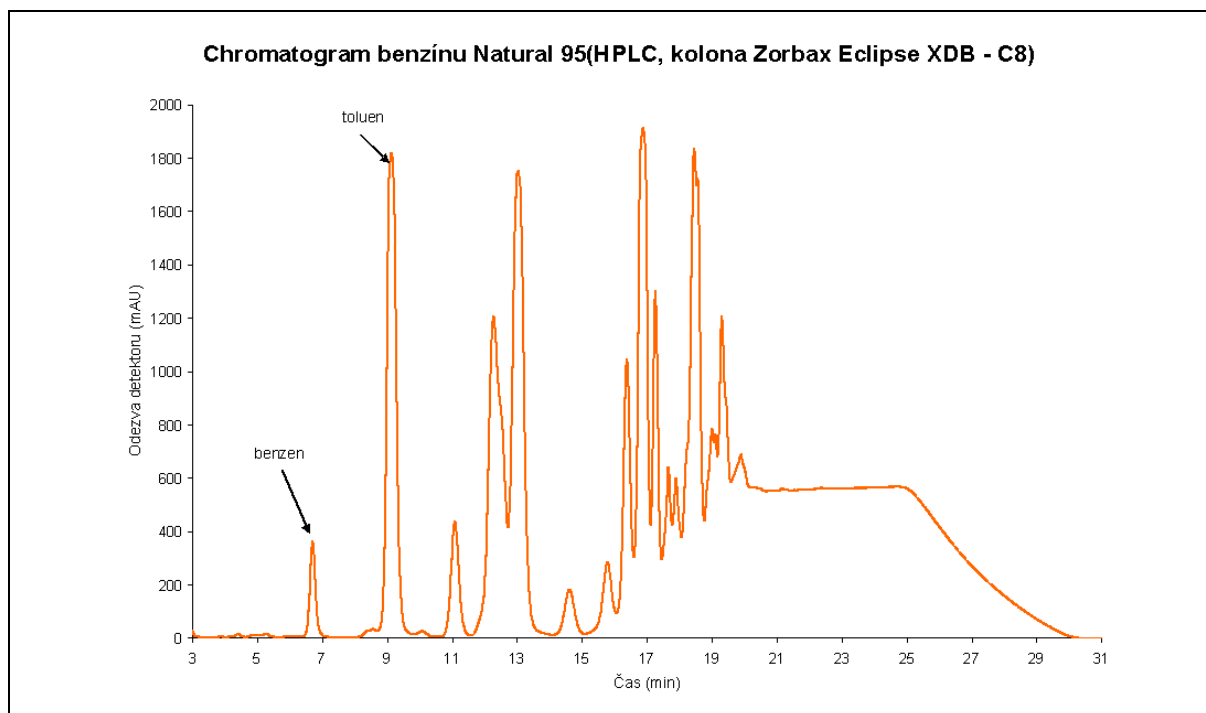


Obrázek 28: Chromatogram benzínu Natural 95 (měřeno metodou GC, kolona DB5-MS)

Příklad stanovení benzenu HPLC (obr. 29 a 30) ukazuje, že tato metoda je pro stanovení benzenu v palivových benzínech výhodná. V případě této separace jsou retenční časy také vysoce reprodukovatelné (relativní směrodatné odchylky retenčních časů benzenu byly od 0,623 % do 1,043 % a toluenu od 0,604 % do 0,940 %) i pro gradientovou eluci.

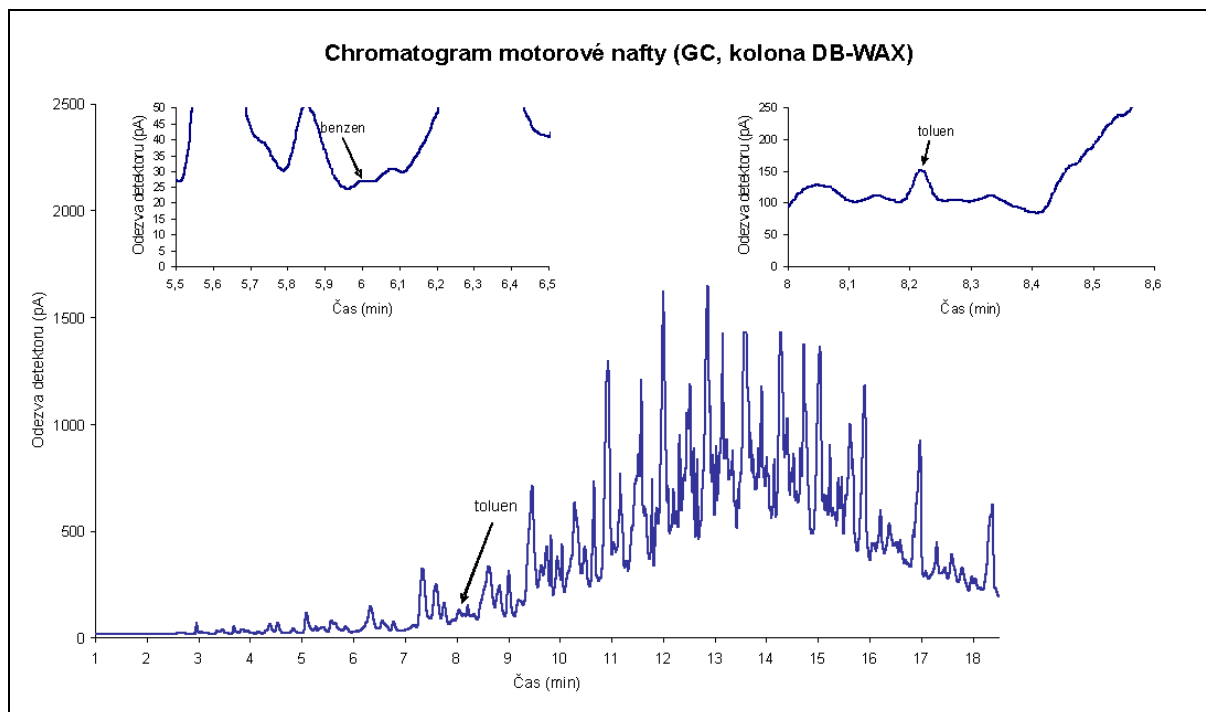


Obrázek 29: Chromatogram benzínu Speciál (měřeno metodou HPLC)



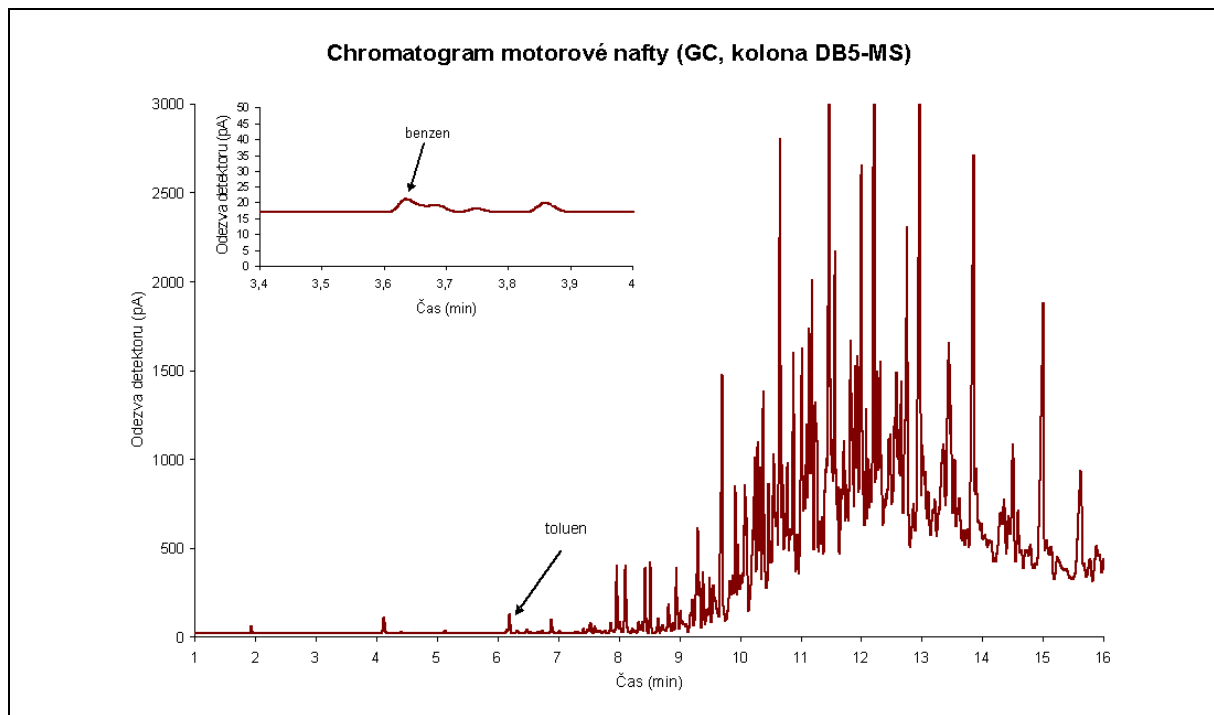
Obrázek 30: Chromatogram benzínu Natural 95 (měřeno metodou HPLC)

U jiných pohonných hmot (např. motorové nafty) je analýza komplikovanější, protože nafta obsahuje vyšší uhlovodíky, které mohou interferovat s benzenem, což zhoršuje možnost stanovení na koloně DB-WAX (viz. obr. 31).



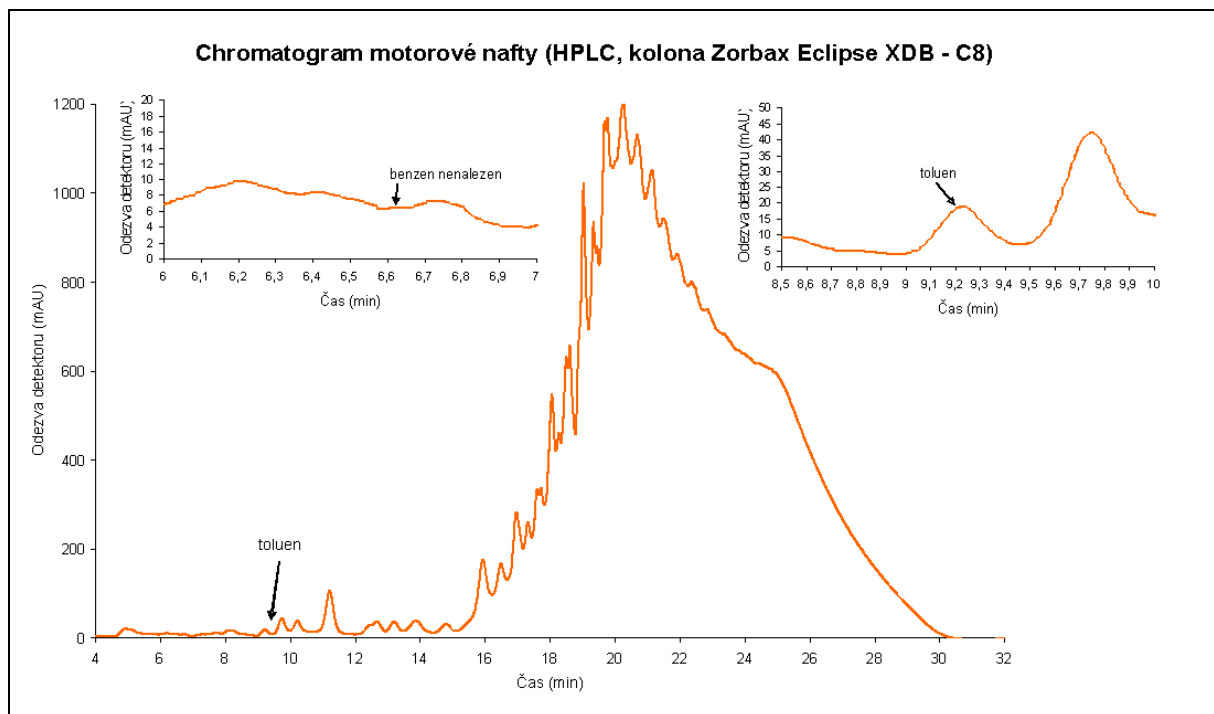
Obrázek 31: Chromatogram motorové nafty (měřeno metodou GC, kolona DB-WAX)

Naopak separace na koloně DB5-MS je velmi dobrá (viz. obr. 32)



Obrázek 32: Chromatogram motorové nafty (měřeno metodou GC, kolona DB-WAX)

Stanovení metodou HPLC je také velmi výhodné (viz. obr. 33)



Obrázek 33: Chromatogram motorové nafty (měřeno metodou HPLC)

Přehled výsledků stanovení benzenu v automobilových benzínech je uveden v tabulce 15.

Tabulka 15: Koncentrace benzenu v palivových benzínech získané měřením na GC (kolony DB-WAX a DB5-MS) a HPLC

Název vzorku	Koncentrace benzenu (hm. %)		
	DB-WAX	DB5-MS	HPLC
Speciál Kvoera	0,470	x	0,395
Natural 95 Shell	0,336	x	0,285
Speciál Shell Náchod	0,378	0,449	0,346
Speciál Shell Vysokov	0,449	x	0,405
Motorová nafta	<0,010	<0,010	<0,020
Natural 95 Globus Čakovice	0,356	0,409	0,352
Natural 95 Makro Černá Most	0,351	0,406	-
Natural 95 Agip Černá Most	0,346	x	-
Natural 95 Benzina Horní Počernice	0,335	0,284	-
Shell V-power Prosek	0,350	0,352	-
Natural 95 OMW Kbely	0,339	0,359	-
Speciál OMW Kbely	0,475	0,520	-
Natural 95 Hronov	0,402	x	-
Natural 95 Náchod	0,389	x	-

Pozn.:

x z důvodu nedostatečné separace nebylo možné odečíst hodnotu plochy píku benzenu
 - analýza nebyla prováděna

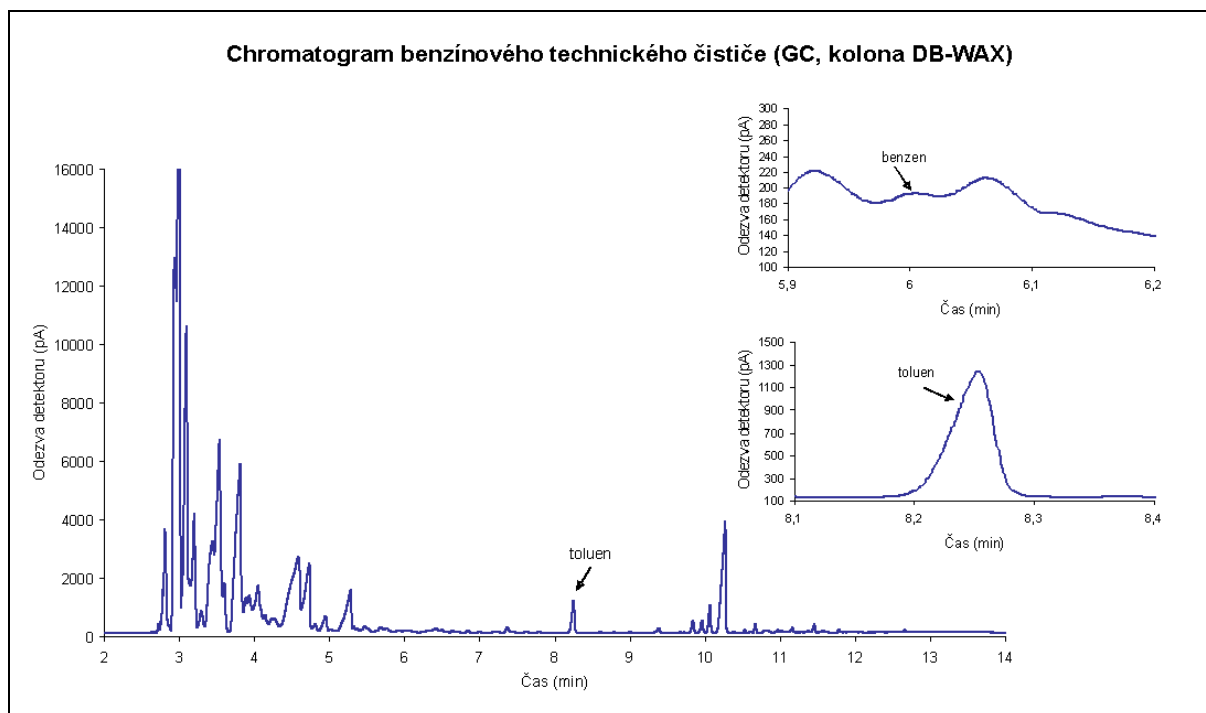
Výsledky v tabulce ukazují dobrou shodu mezi naměřenými koncentracemi benzenu metodou plynové chromatografie s využitím kolony DB-WAX a metodou HPLC. Také koncentrace získané metodou GC po separaci na DB-WAX a DB5-MS (pokud byla separace dobrá a bylo možné odečíst hodnotu plochy píku) jsou v dobré shodě.

4.3.2 „Ostatní“ benzíny

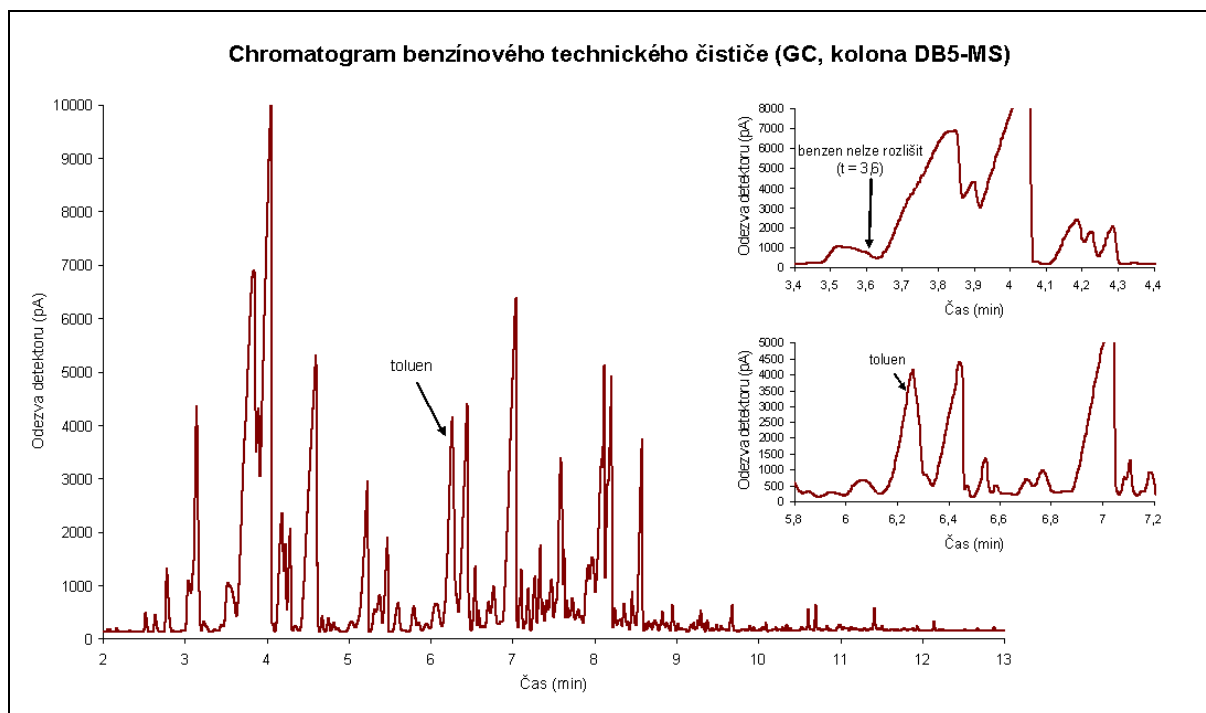
„Benzíny“ ve smyslu ředidel a čistících prostředků představují širokou škálu směsí uhlovodíků, které se získávají destilací ropy a následně jsou upravovány (např. dearomatizací apod.). Stanovení benzenu a toluenu v koncentracích okolo 0,1 % je komplikovaný problém a není možné používat nějaký „universální“ postup. Podmínky GC analýz (volba kolon, podmínek separace) musí být upravovány individuálně podle druhu materiálu, nálezy by měly být potvrzovány analýzou na kolonách různé polarity.

Na 4 případech různých druhů benzínů (benzínový čistič, lékařský benzín, lakový benzín a technický benzín) je ukázána složitost analýz – na obrázcích č. 34 až 45 jsou ukázány chromatogramy GC separací na DB5-MS a DB-WAX a HPLC separací.

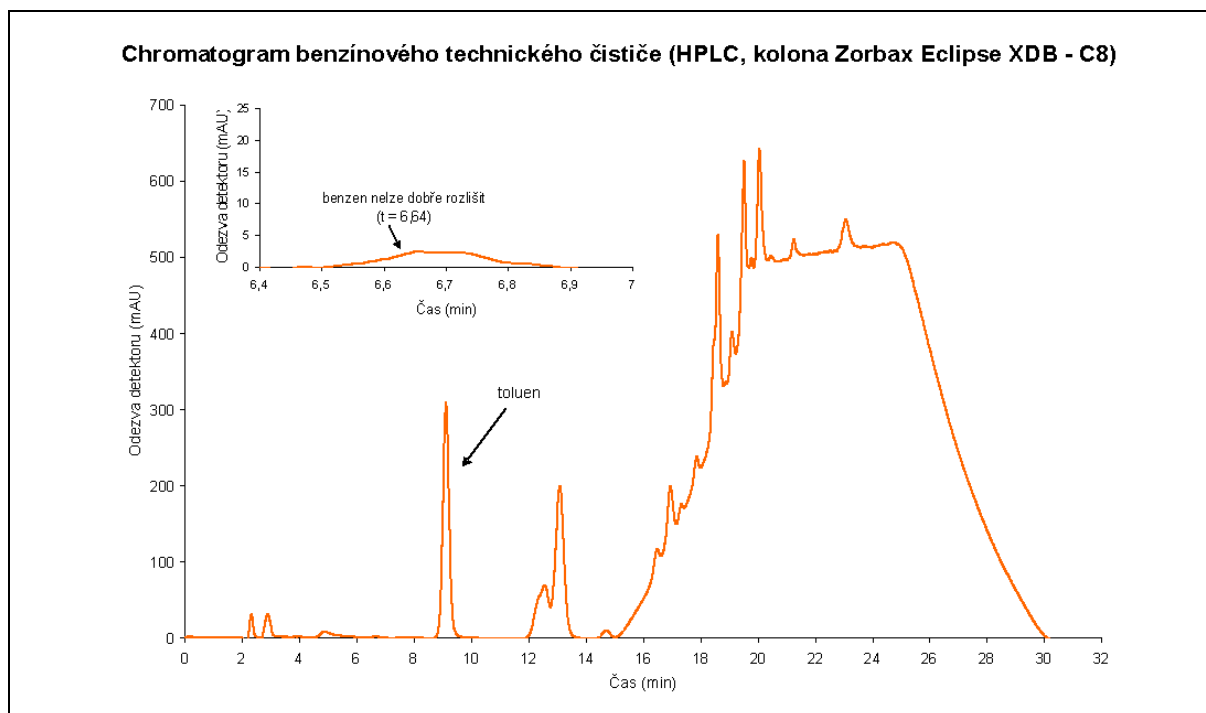
Separace na DB-5MS ukazují, že skutečně jde o různé uhlovodíkové frakce a zkušenost získaná analýzou pohonných hmot – že nejvhodnější GC separace je na DB-WAX zde neplatí. Ukázalo se, že metoda HPLC může v této oblasti nalézt široké uplatnění.



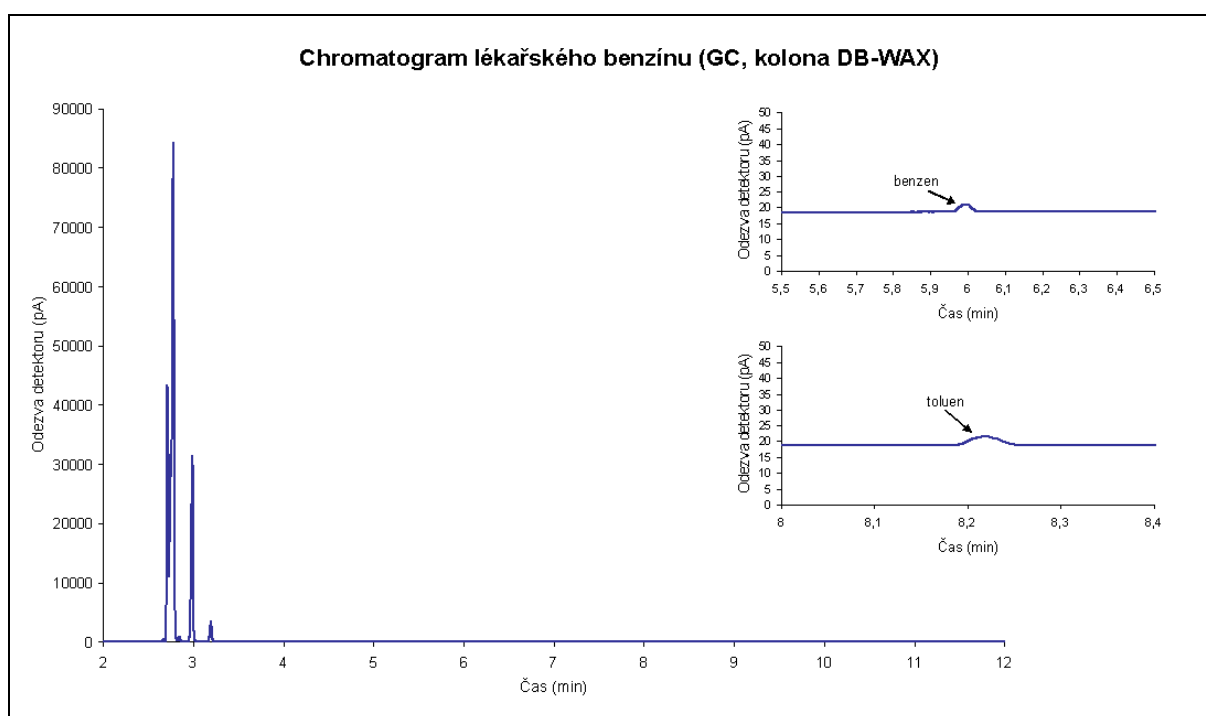
Obrázek 34: Chromatogram benzínového technického čističe (měřeno metodou GC, kolona DB-WAX)



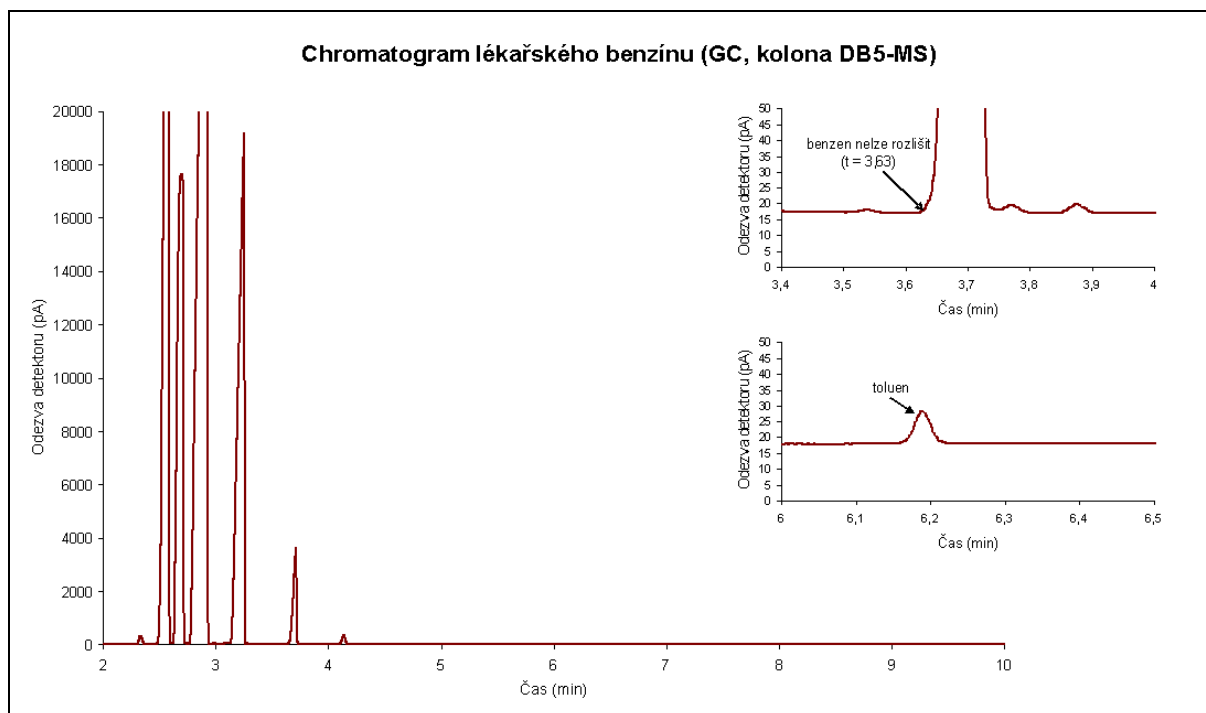
Obrázek 35: Chromatogram benzínového technického čističe (měřeno metodou GC, kolona DB5-MS)



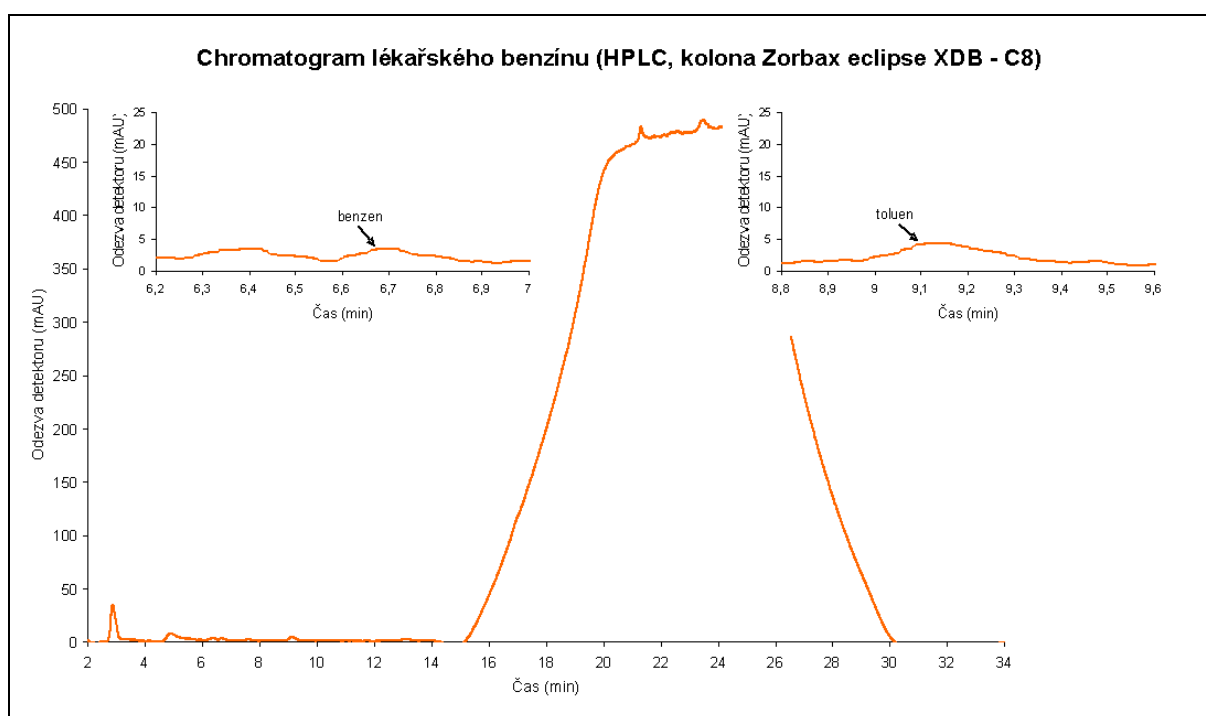
Obrázek 36: Chromatogram benzínového technického čistíče (měřeno metodou HPLC)



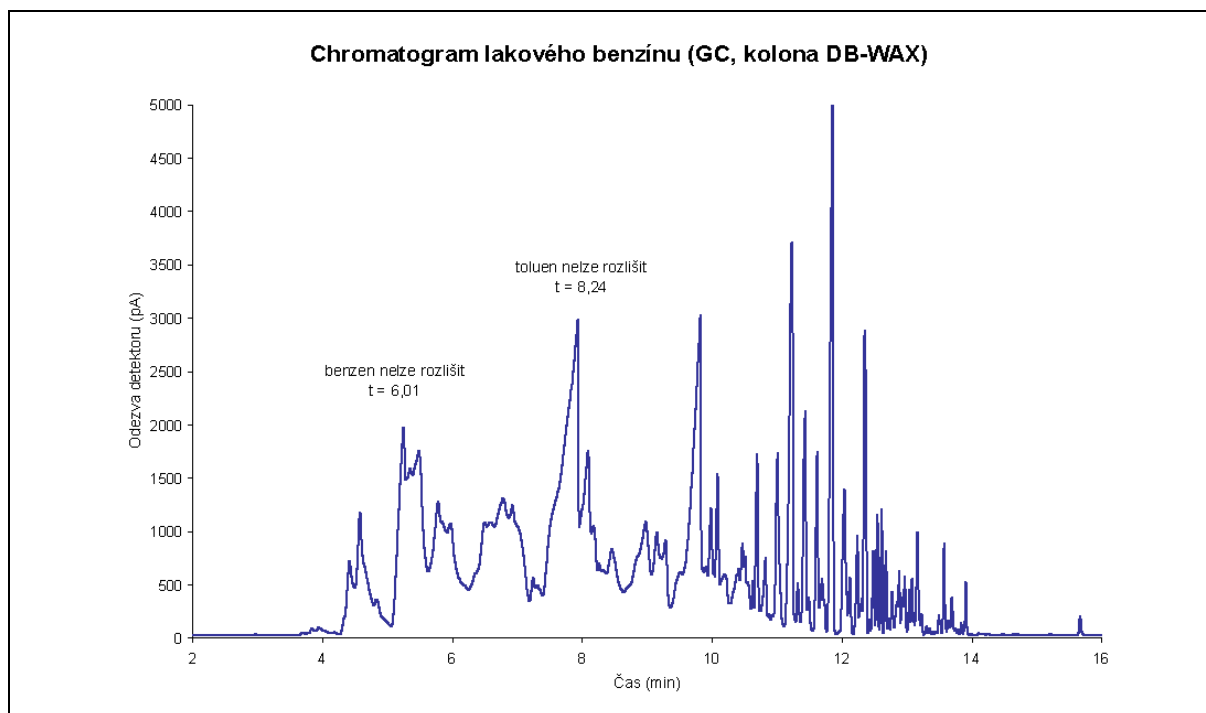
Obrázek 37: Chromatogram lékařského benzínu (měřeno metodou GC, kolona DB-WAX)



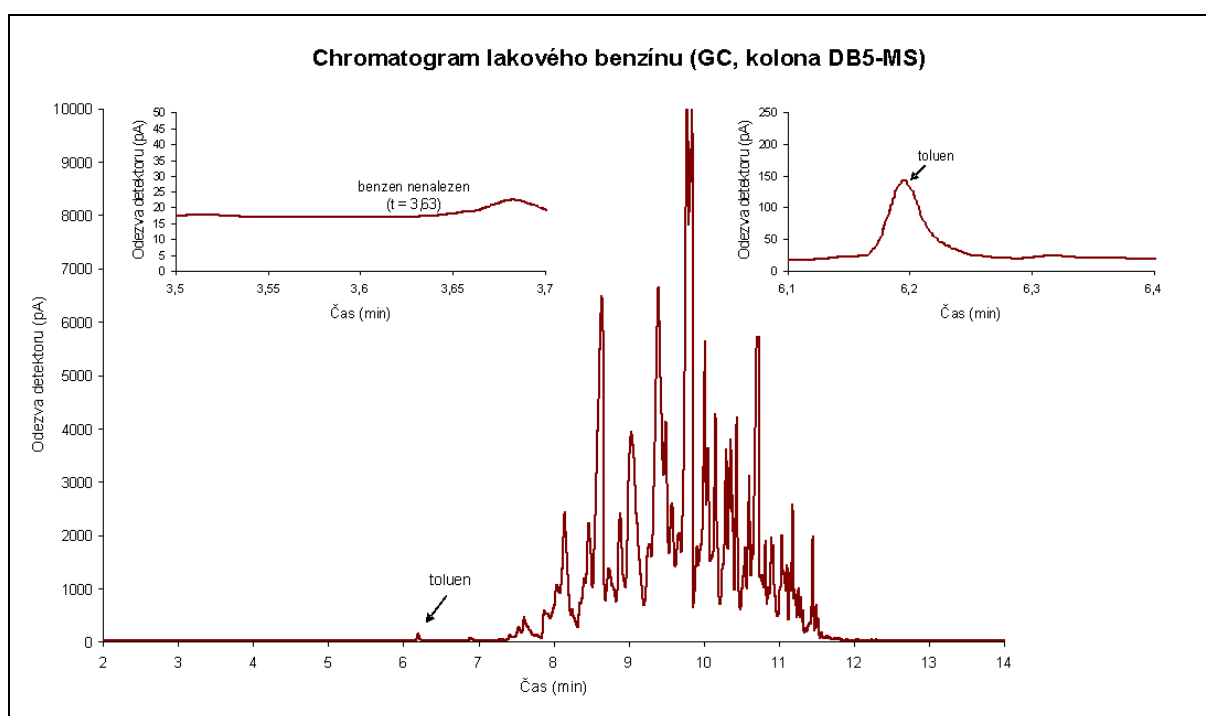
Obrázek 38: Chromatogram lékařského benzínu (měřeno metodou GC, kolona DB5-MS)



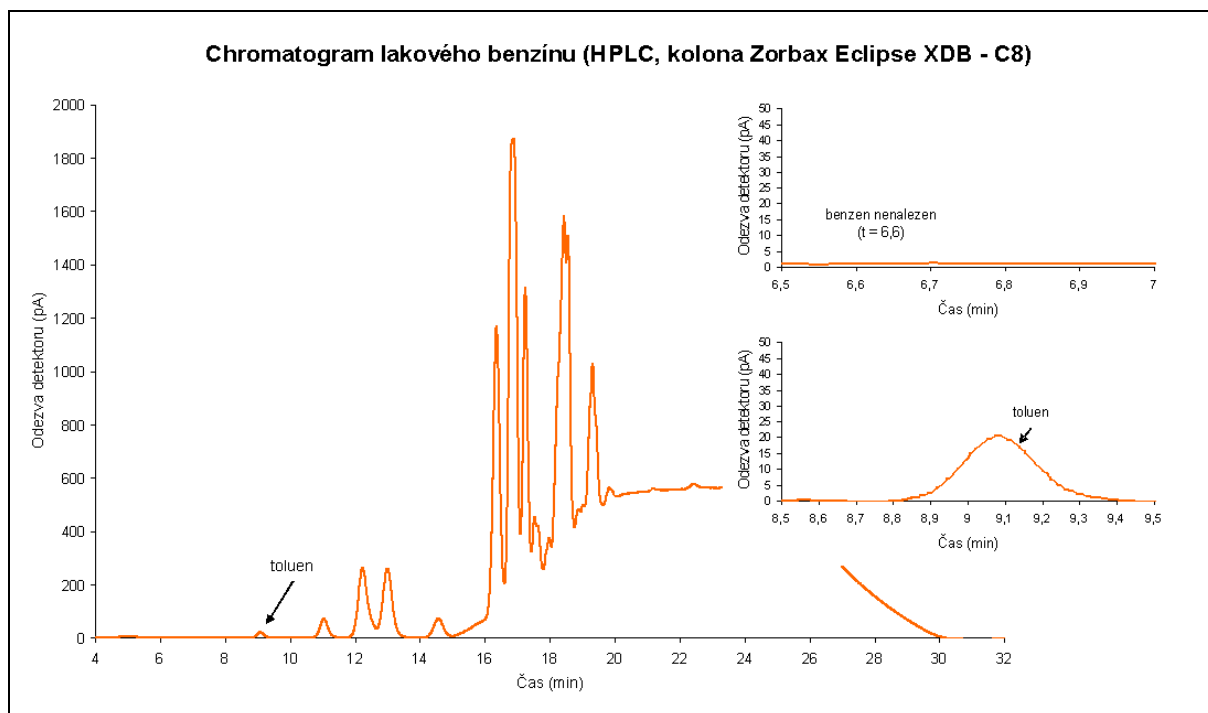
Obrázek 39: Chromatogram lékařského benzínu (měřeno metodou HPLC)



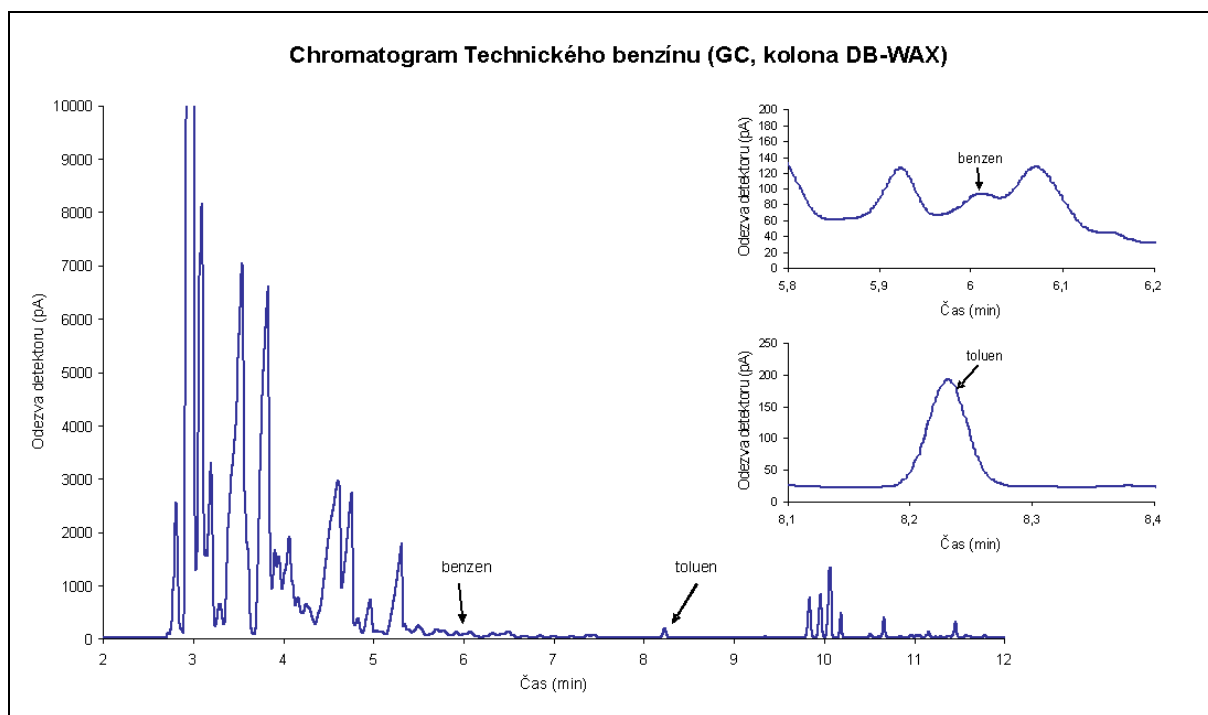
Obrázek 40: Chromatogram lakového benzínu (měřeno metodou GC, kolona DB-WAX)



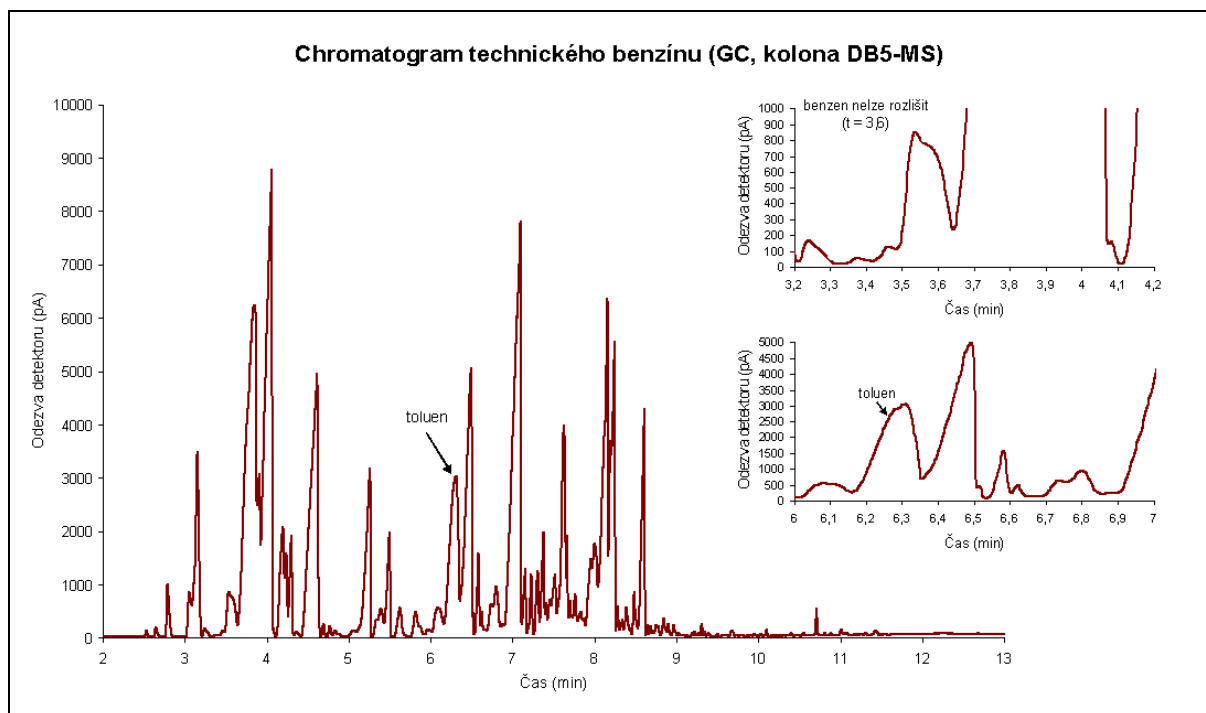
Obrázek 41: Chromatogram lakového benzínu (měřeno metodou GC, kolona DB5-MS)



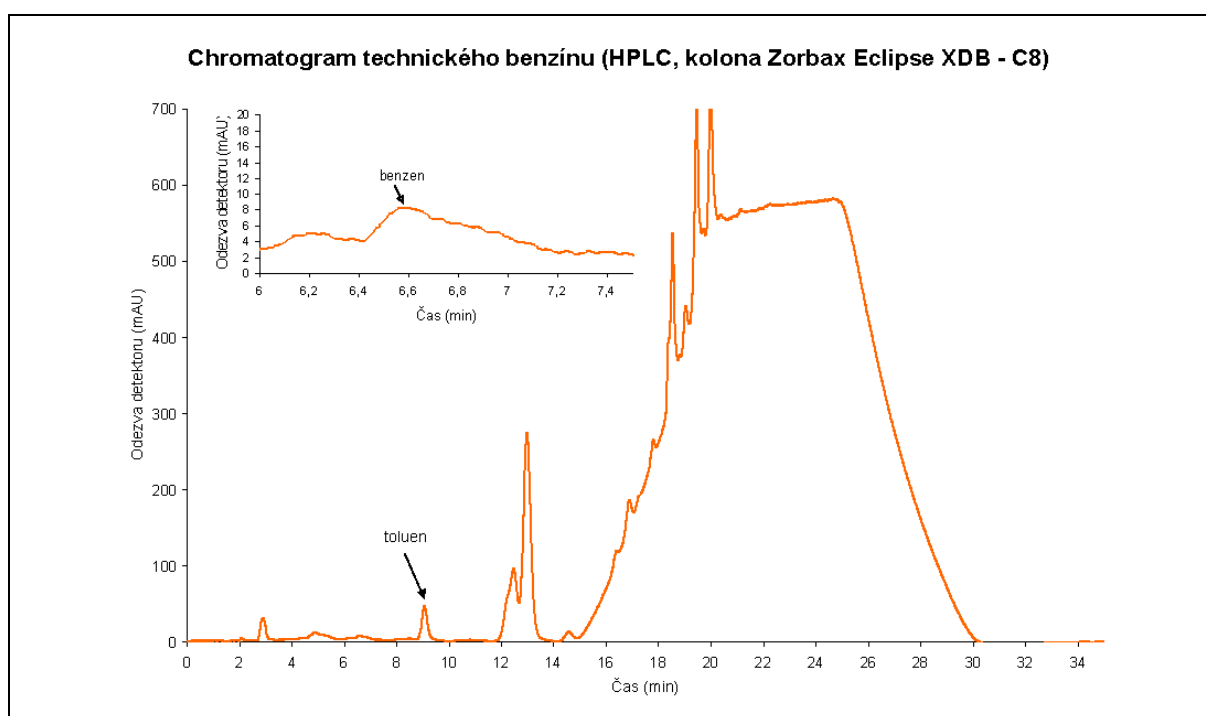
Obrázek 42: Chromatogram lakového benzínu (měřeno metodou HPLC)



Obrázek 43: Chromatogram technického benzínu (měřeno metodou GC, kolona DB-WAX)



Obrázek 44: Chromatogram technického benzínu (měřeno metodou GC, kolona DB5-MS)



Obrázek 45: Chromatogram technického benzínu (měřeno metodou HPLC)

V tabulce 16 je uveden přehled výsledků stanovení benzenu v „ostatních“ benzínech.

Tabulka 16: Koncentrace benzenu v „ostatních“ benzínech získané měřením na GC (kolony DB-WAX a DB5-MS) a HPLC

Název vzorku	Koncentrace benzenu (hm. %)		
	DB-WAX	DB5-MS	HPLC
Benzínový čistič	<0,010	x	<0,020
Benzín technický 90/150	0,015	x	<0,020
Benzín lékařský	<0,010	x	<0,020
Technický benzín Severochema	<0,010	x	<0,020
Lakový benzín	x	0,016	<0,020
Líh s benzínem Lékárna Holešovice	x	<0,01	<0,020
Lakový benzín Barvy a Laky	x	<0,01	<0,020
Technický benzín	0,013	0,057	0,017
Benzín lakový 140/120 Slovnaft	x	x	<0,020
Benzínový čistič Severochema	0,017	x	-
Benzínový technický čistič Colorlak	0,011	x	-

Pozn.:

x z důvodu nedostatečné separace nebylo možné odečíst hodnotu plochy píku benzenu

- analýza nebyla prováděna

Koncentrace benzenu byly vesměs velmi nízké. Výsledků stanovení měřitelných koncentrací benzenu různými postupy je velmi málo, za nejspolehlivější považují HPLC stanovení.

V tabulce 17 je uveden přehled výsledků stanovení toluenu v „ostatních“ benzínech.

Tabulka 17: Koncentrace toluenu v ostatních benzínech získané měřením na GC (kolony DB-WAX a DB5-MS) a HPLC

Název vzorku	Koncentrace toluenu (hm. %)		
	DB-WAX	DB5-MS	HPLC
Benzínový čistič	0,432	x	0,391
Benzín technický 90/150	0,055	x	0,052
Benzín lékařský	<0,010	<0,010	<0,020
Technický benzín Severochema	1,061	x	0,751
Lakový benzín Barvy a laky	1,241	x	0,807
Líh s benzínem Lékárna Holešovice	<0,010	<0,010	<0,020
Lakový benzín Barvy a Laky	x	0,012	0,031
Technický benzín	x	x	0,064
Benzín lakový 140/120 Slovnaft	0,657	1,734	-
Benzínový čistič Severochema	0,365	x	-
Benzínový technický čistič Colorlak	>2	1,303	-

Pozn.:

x z důvodu nedostatečné separace nebylo možné odečíst hodnotu plochy píku toluenu

- analýza nebyla prováděna

Koncentrace toluenu v některých případech překračovaly povolený limit 0,1 hm. %. Jednalo se jednak o vzorky staršího data, které byly uvedeny na trh před zavedením limitu 0,1 hm %

(Lakový benzín Barvy a Laky, Technický benzín Severochema a Benzín lakový 140/120 Slovnaft), ale také o vzorky, jejichž datum výroby je po zavedení výše uvedeného limitu (Benzínový čistič Severochema a Benzínový technický čistič Colorlak).

V případech, kdy metody dávaly rozdílné výsledky považujeme za nejspornější nejvyšší naměřenou koncentraci – vyšší koncentrace svědčí o nedokonalé separaci analyzované směsi.

4.3.3 Další ředidla, rozpouštědla a čističe

Problémy spojené se stanovením benzenu a toluenu v benzínových ředidlech, rozpouštědlech a čističích uvedených v předchozí kapitole (4.3.2 Ostatní benzíny) jsou zde daleko významnější. Ředidla vedle uhlovodíků obsahují podle jejich použití řadu dalších sloučenin - těkavé alkoholy, ketony, estery, alkoholethery a jejich estery aj.

Výsledky stanovení benzenu jsou uvedeny v tabulce 18 a toluenu v tabulce č. 19

Tabulka 18: Koncentrace benzenu v ředidlech a čističích získané měřením na GC (kolony DB-WAX a DB5-MS) a HPLC

Název vzorku	Koncentrace benzenu (hm. %)		
	DB-WAX	DB5-MS	HPLC
Fomastatik NDF-2 FOMA	x	<0,010	<0,020
Varsol 40 Spolechemie	x	x	<0,020
Čistič skvrn Hlubna	x	x	<0,020
Petrolej PS-2	0,012	x	<0,020
Toluen Eurošarm	0,020	x	<0,020
Nitroředidlo C 6000 Severochema	<0,010	x	<0,020
Exxsol D 60 Neuer Brentag	<0,010	<0,010	<0,020
S 6006 Colorlak	x	0,011	<0,020
Exxsol 80/110 DSP Brentag	<0,010	x	<0,020
Ředidlo pro emaily Hammerite	x	<0,010	<0,020
Exxsol D 40 Brentag	x	<0,010	<0,020
S6006 Barvy a Laky	x	<0,010	<0,020
Varsol 60 Spolchemie	<0,010	<0,010	<0,020
IBS Speciál čistič	<0,010	<0,010	<0,020
S 6006 Siga pro	x	x	<0,020
Ředidlo pro nátěry Barvy a laky	x	<0,010	<0,020
P 6413 Barvy a Laky	x	<0,010	<0,020
Varsol 40 Barvy a Laky	x	<0,010	<0,020
Exxsol D 30 Barvy a Laky	<0,010	x	<0,020
S 6904 Barvy a Laky	<0,010	x	<0,020
S 6001 Barvy a Laky	x	<0,010	<0,020
C 6600 Barvy a Laky	<0,010	<0,010	<0,020
P 6414 Barvy a Laky	x	<0,010	<0,020
S 6003 Barvy a Laky	<0,010	x	<0,020
Xylen ropný Barvy a Laky	<0,010	<0,010	<0,020
Toluen Barvy a Laky	<0,010	<0,010	<0,020

Tabulka 19: Koncentrace benzenu v ředidlech a čističích získané měřením na GC (kolony DB-WAX a DB5-MS) a HPLC – pokračování

Název vzorku	Koncentrace benzenu (hm. %)		
	DB-WAX	DB5-MS	HPLC
Spirdane D 60 Barvy a Laky	<0,010	<0,010	<0,020
C6000 Barvy a Laky	0,038	0,032	0,034
Exxsol D 40 Barvy a Laky	x	0,045	<0,020
S 6012 Barvy a Laky	<0,010	<0,010	<0,020
Manpower red	<0,010	<0,010	<0,020
Zippo premium lighter Fivid	<0,010	<0,010	<0,020
Spirdane D 40 Total	x	<0,010	<0,020
Isane IP 185 22/906 Total	<0,010	x	<0,020
Ketrul D 70 Total	<0,010	<0,010	<0,020
Hydrosol essence 80/110 Total	<0,010	x	<0,020
S 6006	x	<0,010	<0,020
Xylen petrochemický Chemap	x	x	<0,020
Čistič nátěrů a skel KGaA	<0,010	x	-
Voltex	<0,010	<0,010	-
Solvana	<0,010	<0,010	-
D-SOL	<0,010	<0,010	-
CT02	<0,010	<0,010	-
Clean Spray S	x	<0,010	-
Solv GC	<0,010	<0,010	-
Sika čistič	<0,010	x	-

Pozn.:

x z důvodu nedostatečné separace nebylo možné odečíst hodnotu plochy píku benzenu
 - analýza nebyla prováděna

Naměřené koncentrace byly velmi nízké; v několika málo měřitelných koncentracích je dobrá shoda mezi výsledky analýz jednotlivými postupy.

Tabulka 19: Koncentrace toluenu v ředidlech a čističích získané měřením na GC (kolony DB-WAX a DB5-MS) a HPLC

Název vzorku	Koncentrace toluenu (hm. %)		
	DB-WAX	DB5-MS	HPLC
Fomastatik NDF-2 FOMA	x	<0,010	<0,020
Varsol 40 Spolechemie	1,294	1,083	1,074
Čistič skvrn Hlubna	0,068	0,052	0,071
Petrolej PS-2	0,034	0,026	0,034
Nitroředidlo C 6000 Severochema	>2	>2	>2
Exxsol D 60 Neuer Brentag	0,634	0,431	0,477
S 6006 Colorlak	0,274	0,587	0,228
Exxsol 80/110 DSP Brentag	1,226	x	0,835
Ředidlo pro emaily Hammerite	x	<0,010	<0,020
Exxsol D 40 Brentag	x	0,254	0,273
S6006 Barvy a Laky	x	0,019	0,019

Tabulka19: Koncentrace toluenu v ředidlech a čističích získané měřením na GC (kolony DB-WAX a DB5-MS) a HPLC - pokračování

Název vzorku	Koncentrace toluenu (hm. %)		
	DB-WAX	DB5-MS	HPLC
Varsol 60 Spolchemie	0,604	0,442	0,494
IBS Speciál čistič	x	<0,010	<0,020
S 6006 Siga Pro	0,725	x	0,552
Ředidlo pro nátěry Barvy a laky	0,230	0,151	0,083
P 6413 Barvy a Laky	0,04809	0,01981	0,00621
Varsol 40 Barvy a Laky	x	<0,010	<0,020
Exxsol D 30 Barvy a Laky	<0,010	<0,010	<0,020
S 6904 Barvy a Laky	<0,010	x	0,040
S 6001 Barvy a Laky	x	>2	>2
C 6600 Barvy a Laky	>2	>2	>2
P 6414 Barvy a Laky	<0,010	<0,010	<0,020
S 6003 Barvy a Laky	0,115	<0,010	0,081
Xylen ropný Barvy a Laky	0,064	<0,010	<0,020
Spirdane D 60 Barvy a Laky	x	<0,010	<0,020
C6000 Barvy a Laky	>2	x	>2
Exxsol D 40 Barvy a Laky	0,165	0,029	0,034
S 6012 Barvy a Laky	x	<0,010	<0,020
Manpower red	x	<0,010	0,037
Zippo premium lighter Fivid	<0,010	x	<0,020
Spirdane D 40 Total	x	x	<0,020
Isane IP 185 22/906 Total	<0,010	<0,010	<0,020
Ketrol D 70 Total	<0,010	<0,010	<0,020
Hydrosol essence 80/110 Total	<0,010	x	<0,020
S 6006	x	>2	>2
Čistič nátěrů a skel KGaA	0,037	x	-
Voltex	<0,010	<0,010	-
Solvana	<0,010	<0,010	-
D-SOL	x	<0,010	-
CT02	<0,010	<0,010	-
Clean Spray S	<0,010	<0,010	-
Solv GC	<0,010	<0,010	-
Sika čistič	<0,010	<0,010	-

Pozn.:

x z důvodu nedostatečné separace nebylo možné odečíst hodnotu plochy píku toluenu
 - analýza nebyla prováděna

Řada analyzovaných rozpouštědel (ředidla řady C6....) deklaruje vysoký obsah toluenu, a z toho důvodu v nich nebyl toluen stanovován (byly nacházeny vysoké koncentrace - v tabulce označeno >2%). V ostatních ředidlech byl často toluen nacházen v měřitelných koncentracích.

Obsah toluenu v některých vzorcích byl překročen, v mnoha případech se jednalo o vzorky data výroby před zavedením limitu 0,1 hm. % pro obsah toluenu (Varsol 40 Spolchemie, Nitroředidlo C 6000 Severochema, Exxsol D 60 Neuer Brentag, S 6006 Colorlak,

Exxsol D 80/110 DSP Brentag, Exxsol D 40 Brentag, Varsol Spolchemie, S 6006 Siga Pro a C 6000 Barvy a Laky). Obsah toluenu byl překročen také v některých vzorcích, které byly vyrobeny po zavedení limitu 0,1 hm. % (S 6001 Barvy a laky, C 6600 Barvy a Laky a C 6000 Barvy a laky).

V případech, kdy metody dávaly rozdílné výsledky doporučuji brát jako nejsprávnější nejnížší naměřenou koncentraci – vyšší koncentrace svědčí o nedokonalé separaci analyzované směsi.

5.ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo přispět k řešení závažného hygienického problému, zda při používání tzv. světlých ropných produktů (benzínů) nedochází k významné expozici benzenu, který je pokládán za karcinogen stejně jako benzíny, které ho obsahují více než 0,1 hm. % .

Obsah benzenu v těchto benzínech většinou není deklarován (označen) a literární zdroje, které jsme měli k dispozici naznačovaly, že je povolený obsah benzenu překračován.

Platné předpisy, které byly do českého právního řádu převedeny z Evropské unie, nařizují, aby obsah benzenu v benzínech byl viditelně deklarován a každý přípravek, který ho obsahuje více než 0,1 hm. % byl označen jako karcinogen.

Pokusili jsme se ověřit i další problém, a to maximální povolený obsah benzenu v motorových palivech, který je předpisem stanoven na 1 hm. % (tato paliva jsou v souladu s platnými předpisy karcinogeny).

V průběhu řešení diplomové práce jsme problematiku rozšířili o stanovení obsahu toluenu, protože byl vydán další předpis, který stanovuje, že rozpouštědla, která obsahují více než 0,1 hm. % toluenu nesmí být prodávána malospotřebitelům (omezení se netýká průmyslového použití).

Provedli jsme analýzy automobilových benzínů, technických benzínů a dalších přípravků (rozpouštědla, čističe apod.), jejichž vzorky jsme náhodně odebírali z čerpacích stanic, v domácnostech i ve spolupráci s některými výrobci (Total, Barvy a Laky). Vzorky byly analyzovány plynovou a kapalinovou chromatografií.

Žádný z odebraných vzorků neobsahoval vyšší obsah benzenu než 0,1 hm. % pokud jde o technické benzíny, rozpouštědla apod. a 1 hm. % pokud jde o benzíny používané jako motorová paliva.

Pokud jde o toluen, bylo zjištěno, že jeho povolený obsah byl překročen u některých vzorků, které jsou zcela jistě určeny malospotřebitelům . Šlo ale o vzorky, které byly staršího data výroby (Lakový benzín, Technický benzín Severochema, Benzín lakový 140/120 Slovnaft, Varsol 40 Spolchemie, Nitroředidlo C 6000 Severochema, Exxsol D 60 Neuer Brentag, S 6006 Colorlak, Exxsol D 40 Brentag, Varsol 60 Spolchemie, S 6006 Siga Pro a S 6006), zřejmě dané do oběhu ještě před červnem 2007, kdy vstoupilo v platnost výše uvedené omezení. Toluén byl ale také překročen u některých vzorků jejichž datum výroby bylo po červnu 2007, tedy již v době, kdy bylo výše zmíněné omezení v platnosti (C 6600 Barvy a Laky, C 6000 Barvy a Laky, S 6001 Barvy a Laky, Benzínový čistič Severochema a Benzínový technický čistič Colorlak).

Z tohoto vyplývá, že situace na trhu benzínů v České republice je z hlediska obsahu benzenu příznivější, než se očekávalo vzhledem k literárním informacím. Tyto výsledky ale není možné úplně zobecnit, protože nelze vyloučit, že se na trhu vyskytnou i benzíny dovezené ze zemí mimo Evropskou unii, ve kterých limity pro obsah benzenu nemusí platit.

Pokud jde o toluen, je situace hroší než u benzenu. Na trhu se vyskytují i přípravky, které jsou prodávány malospotřebitelům v rozporu s platným zákazem.

Přes příznivé výsledky u benzenu a nejednoznačné výsledky u toluenu, pokládáme za důležité dále sledovat obsahy obou látek v rozpouštědlech a to hlavně tam, kde by byly zjištěny vyšší koncentrace těchto látek v ovzduší nebo byly neobvykle vysoké biologické expoziční testy u zaměstnanců.

6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- 1 KOPSTEIN, Melvyn. Potencial uses of petrochemical products can result in significant benzene exposures : MSDSs must list benzene as an ingredient. Journal of Occupational and Environmental Hygiene. 2006, no. 3, s. 1-8.
- 2 Vyhláška č. 284/2006 Sb., kterou se mění vyhláška č. 221/2004 Sb., kterou se stanoví seznamy nebezpečných chemických látek a nebezpečných chemických přípravků, jejichž uvádění na trh je zakázáno nebo jejichž uvádění na trh, do oběhu nebo používání je omezeno, v platném znění
- 3 McCONNELL, E.E. Benzene. Geneva : [s.n.], 1993. 156 s. Environmental Health Criteria 150. ISBN 92-4-157150-0
- 4 Integrovaný registr znečištění: Benzen [online]. [cit. 2008-02-12]. Dostupný z : <http://www.irz.cz/repository/latky/benzen.pdf>
- 5 SNYDER, Robert, HEDLI, Christine C. An Overview of Benzene Metabolism. Environmental Health Perspectives. 1996, vol. 104, Supplement 6, s. 1165-1171.
- 6 Státní zdravotní ústav: GUT, Ivan. Toxikologie benzenu [online]. 2007 [cit. 2008-03-23]. Dostupný z : http://www.szu.cz/chpnp/pages/education/16toxikologie_benzenu.pdf
- 7 ČERNÝ, Jakub. Pracovně lékařská problematika bezolovnatého benzínu. Praha, 2001. 28 s. 3. LF UK v Praze. Vedoucí diplomové práce Doc. MUDr. Monika Kneidlová CSc. Dostupný z http://sweb.cz/jak.cerny/texty/diplomka.html#_Toc517258019
- 8 Vyhláška č. 432/2003 Sb., kterou se stanoví podmínky pro zařazování prací do kategorií, limitní hodnoty ukazatelů biologických expozičních testů, podmínky odběru biologického materiálu pro provádění biologických expozičních testů a náležitosti hlášení prací s azbestem a biologickými činiteli v platném znění
- 9 Ekologické centrum most: Směrnice pro kvalitu ovzduší v Evropě [online]. 2001 [cit. 2008-2-20]. Dostupný z : http://www.ecmost.cz/ver_cz/ovzdusi/smernice/smernice6.htm
- 10 MARHOLD, Josef. Přehled průmyslové toxikologie : Organické látky. [s.l.] : Avicenum, 1986. 2 sv. (760, 937 s.).
- 11 Toxicological profile for benzene. [s.l.] : Department of health and human service, 2007. 438 s.
- 12 Vyhláška č. 232/2004 Sb., kterou se provádějí některá ustanovení zákona o chemických látkách a chemických přípravcích a o změně některých zákonů, týkající se klasifikace, balení a označování nebezpečných chemických látek a chemických přípravků v platném znění
- 13 Nařízení vlády č. 361/2007 Sb., kterým se stanoví podmínky ochrany zdraví při práci v platném znění

-
- 14** Nařízení vlády č. 597/2006 Sb. o sledování a vyhodnocování kvality ovzduší v platném znění
- 15** Vyhláška č. 221/2004 Sb., kterou se stanoví seznamy nebezpečných chemických látek a nebezpečných chemických přípravků, jejichž uvádění na trh je zakázáno nebo jejichž uvádění na trh, do oběhu nebo používání je omezeno
- 16** Vyhláška č. 229/2004 Sb., kterou se stanoví požadavky na pohonné hmoty pro provoz vozidel na pozemních komunikacích a způsob sledování a monitorování jejich jakosti
- 17** Vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody v platném znění
- 18** Integrovaný registr znečištění: Toluén [online]. [cit. 2008-03-18]. Dostupný z: <http://www.irz.cz/repository/latky/toluen.pdf>
- 19** Toluene Geneva : [s.n.], 1985. 146 s. Environmental Health Criteria 52. ISBN 92-4-154192 X
- 20** Wikipedie: Otevřená encyklopedie: Benzín [online]. [cit. 29.03.2008]. Dostupný z: <http://cs.wikipedia.org/w/index.php?title=Benz%C3%ADn&oldid=2345488>
- 21** PÉREZ PAVÓN, José Luis, et al. Determination of benzene in gasoline using direct injection-mass spectrometry. *Analytica chimica acta*. 2006, vol. 576, s. 156-162.
- 22** GALLIGNANI, Máximo, GARRIGUES, Salvador, DE LA GUARDIA, Miguel. Direct determination of benzene in gasoline by flow-injection Fourier transform infrared spectrometry. *Analytica chimica acta*. 1993, vol. 274, s. 267-274.
- 23** PERTILE, Eva, ČABLÍK, Vladimír. *Instrumentální metody analýzy*. Ostrava : VŠB - Technická univerzita Ostrava, 2006. 238 s. ISBN 80-248-1049-2.
- 24** Labicom: Agilent technologies a J&W [online]. [cit.30.3.2008]. Dostupný z <http://www.labicom.cz/default.aspx?server=1&article=113§ion=22>
- 25** OPEKAR, František, a kol. *Základní analytická chemie*. Praha : Nakladatelství Karolinum, 2007. 201 s. ISBN 978-80-246-0553-1
- 26** SINGH, A.P., et al. Determination of benzene and total aromatics in commercial gasolines using packed column GC and NMR techniques. *Fuel*. 2003, vol. 82, s. 23-33.
- 27** FRYSSINGER, Glenn S., GAINES, Richard B., LEDFORD, Edward B., Jr. Quantitative determination of BTEX and total aromatic compounds in gasoline by comprehensive two-dimensional gas chromatography (GcxGC). *J. High Resol. Chromatography*. 1999, vol. 4, no. 22, s. 195-200.
- 28** Restek Corporation: Rapidly Determine Benzene and Toluene in Gasoline [online]. [cit. 30.3.2008]. Dostupný z: http://www.restek.com/advantage/adv_2005_03_04.pdf

-
- 29** ASTM D 5580 : Standard Test Method for Determination of benzene, toluene, ethylbenzene, p/m-xylene, o-xylene. C9 and heavier total aromatics in finished gasoline by gas chromatography [online]. [cit.31.3.2008].
Dostupný z: http://www.pti.com.br/view/norma_detalhe.php?id=44483
- 30** PAVLOVA, A., IVANOVA, R. GC method for quantitative determination of benzene in gasoline. *Acta chromatographica*. 2003, No. 13, s. 215-225.
- 31** Youngin: Improved performance for the analysis of aromatics in gasoline by ASTM method D5769 using the Agilent 5973 inert gas chromatography/Mass spectrometry system [online]. [cit.5.4.2008] Dostupný z <http://www.youngin.com/application/0412-0078EN-E.pdf>
- 32** LINDSAY, Sandie. High performance liquid chromatography. [s.l.] : [s.n.], 1992. 337 s. ISBN 0-471-93180-2.
- 33** ZOCCOLILLO, L., ALESSANDRELLI, M., FELLI, M. Simultaneous determination of benzene and total aromatic fraction of gasoline by HPLC-DAD. *Chromatographia*. 2001, vol. 54, no. 9/10, s. 659-663.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

GC	plynová chromatografie (plynový chromatograf)
EU	Evropská unie
ČR	Česká republika
hm. %	hmotnostní procenta
obj. %	objemová procenta
MS	hmotnostní spektrometr
FTIR	infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací
FID	plamenově ionizační detektor
TCD	tepelně vodivostní detektor
PID	fotoionizační detektor
FPD	plamenově fotometrický detektor
IR	infračervený detektor
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostním detektorem
ASTM	American Society For Testing and Materials
TCEP	1,2,3-tris(2-kyanoetoxy)propan
EI	elektronová ionizace
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
DAD	detektor s diodovým polem
BTX	benzen, toluen a technický xylen
LOD	mez detekce
LOQ	mez stanovitelnosti
s	směrodatná odchylka
t	charakteristika Studentova t-testu
b	posunutí kalibrační křivky
a	regresní koeficient
K	analytická konstanta
L	interval spolehlivosti
t_k	kritická tabelovaná hodnota studentova t-rozdělení pro n-2 stupně volnosti
CNS	centrální nervová soustava
apod.	a podobně
atd.	a tak dále

8. SEZNAM PŘÍLOH

Příloha č. 1 : Seznam a popis analyzovaných vzorků

9. PŘÍLOHY

Příloha č. 1: Seznam a popis analyzovaných vzorků

Číslo vzorku	Název	Výrobce (popř. odběrové místo)	Datum výroby (popř. odběru u paliv)
1	Fomastatik NDF-2	FOMA	-
2	Benzínový čistič	-	-
3	Varsol 40	Spolchemie	-
4	Čistič skvrn	Hlubna Brno	-
5	Petrolej PS-2	-	1990
6	Toluen	Eurošarm	-
7	Benzín Speciál	Kvoera	Srpen 07
8	Benzín technický 90/150	-	-
9	Benzín lékařský	-	Listopad 2005
10	Technický benzín	Severochema	Duben 2006
11	Benzín Natural 95	Shell	Červenec 2007
12	Nitroředidlo C 6000	Severochema	2006
13	Exxsol D60	Neuer Brentag	Květen 2007
14	S 6006	Colorlak	Březen 2005
15	Exxsol 80/110 DSP	Brentag	Červenec 2006
16	Ředidlo pro emaily Hammerite	Dovozce Commenda	-
17	Exxsol D 40	Brentag	Květen 2007
18	S 6006	Barvy a Laky	2002
19	Lakový benzín	Barvy a laky	Srpen 2006
20	Varsol 60	Spolchemie	Duben 2002
21	IBS speciál čistič	-	-
22	Benzín Speciál	Shell Náchod	Srpen 2007
23	Benzín Speciál	Shell Vysokov	Srpen 2007
24	Ředidlo S 6006	Siga Pro	Červen 2005
25	Benzín Speciál	-	Červen 2007
26	Motorová nafta	-	Leden 2007
27	Ředidlo pro nátěrové hmoty	Barvy a Laky	Únor 2007
28	Motorová nafta	-	Leden 2007
29	P 6413	Barvy a Laky	Říjen 2007
30	Varsol 40	Barvy a Laky	Říjen 2007
31	Exxsol D 30	Barvy a Laky	Říjen 2007
32	S 6904	Barvy a Laky	Říjen 2007
33	S 6001	Barvy a Laky	Říjen 2007
34	C 6600	Barvy a Laky	Říjen 2007
35	P 6414	Barvy a Laky	Říjen 2007
36	S 6003	Barvy a Laky	Říjen 2007
37	Benzín Natural 95	Globus Čakovice	Únor 2008
38	Láh s benzínem	Lékárna u Anděla strážce	Květen 2006

39	Xylen ropný	Barvy a Laky	Říjen 2007
40	Lakový benzín	Barvy a Laky	Říjen 2007
41	Toluen	Barvy a Laky	Říjen 2007
42	Spirdane D 60	Barvy a Laky	Říjen 2007
43	Technický benzín	Barvy a laky	Říjen 2007
44	C 6000	Barvy a Laky	Říjen 2007
45	Exxsol D 40	Barvy a laky	Říjen 2007
46	S 6012	Barvy a Laky	Říjen 2007
47	Manpower Red	-	-
48	Zippo premium lighter	Fivid	-
49	Spirdane D 40	Total	Únor 2007
50	Isane IP 185 22/906	Total	Září 2006
51	Ketrul D 70	Total	Leden 2007
52	Hydrosol Essence 80/110	Total	Březen 2007
53	S 6006	-	-
54	Xylen petrochemický	Chemap	Červen 2007
55	Benzín lakový 140/120	Slovnaft	-
56	Benzín Natural 95	Makro Černá most	Březen 2008
57	Benzín Natural 95	Agip Černý most	Březen 2008
58	Benzín Natural 95	Benzina Horní Počernice	Březen 2008
59	Benzín Shell V-power	Shell Prosek	Březen 2008
60	Benzín Natural 95	OMW Kbely	Březen 2008
61	Benzín Speciál	OMW Kbely	Březen 2008
62	Benzínový čistič	Severochema	Říjen 2007
63	Benzínový technický čistič	Colorlak	Leden 2008
64	Čistič nátěrů a skel	Henkel KGaA	-
65	Benzín Natural 95	Hronov	Únor 2008
66	Benzín Natural 95	Náchod	Únor 2008
67	Voltex	-	-
68	Solvana	-	-
69	D-SOL	-	-
70	CT 02	-	-
71	Clean Spray S	-	-
72	Solv GC	-	-
73	Sika čistič	-	-