

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

KINETIKA FOTODEGRADACE BENZO[A]PYRENU
A IDENTIFIKACE JEHO PRODUKTŮ

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

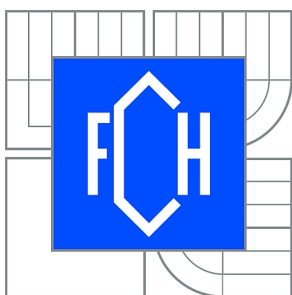
Bc. JAN RYŠAVÝ

BRNO 2010



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

KINETIKA FOTODEGRADACE BENZO[A]PYRENU A IDENTIFIKACE JEHO PRODUKTŮ

KINETICS OF BENZO[A]PYRENE DESTRUCTION
AND IDENTIFICATION OF ITS PRODUCTS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. JAN RYŠAVÝ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

prof. Ing. PETER ŠIMKO, DrSc.

BRNO 2010



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

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0413/2009	Akademický rok: 2009/2010
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Jan Ryšavý	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	prof. Ing. Peter Šimko, DrSc.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Kinetika fotodegradace benzo[a]pyrenu
a identifikace jeho produktů

Zadání diplomové práce:

Studium fotodegradace benzo[a]pyrenu při různých podmínkách
Vliv aditivních látek na rychlost odbourání benzo[a]pyrenu
Identifikace produktů fotodegradace benzo[a]pyrenu

Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2010

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

Bc. Jan Ryšavý
Student(ka)

prof. Ing. Peter Šimko, DrSc.
Vedoucí práce

doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Tato diplomová práce je zaměřena na studium podmínek fotodegradace benzo[*a*]pyrénu (rozpouštědla s různou polaritou, zdroj světla, přítomnost antioxidantů), jednoho z hlavních kontaminantů potravin. V další části práce byl studován degradační proces benzo[*a*]pyrénu při různých koncentracích, s cílem charakterizovat kinetické aspekty fotodegradace. Identifikace fotodegradačních produktů benzo[*a*]pyrénu byla provedena pomocí metod plynové chromatografie a vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostním detektorem.

ABSTRACT

This diploma thesis is focused on the study of conditions of benzo[*a*]pyrene, one of the major contaminant of foods, photodegradation under different conditions (solvents with different polarity, light sources, presence of antioxidants). In another part of the thesis, the degradation process of benzo[*a*]pyrene at various concentrations was studied, in order to characterise the kinetic aspects of photoinduced degradation. The attempt to identify the products of benzo[*a*]pyrene photodegradation was performed involving methods of gas chromatography and high performance liquid chromatography coupled with mass detectors, as well.

KLÍČOVÁ SLOVA

benzo[*a*]pyrén, polycyklické aromatické uhlovodíky, oxidace, plynová chromatografie, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

KEYWORDS

benzo[*a*]pyrene, polycyclic aromatic hydrocarbons, oxidation, gas chromatography, high pressure liquid chromatography

RYŠAVÝ, J. *Kinetika fotodegradace benzo[a]pyrénu a identifikace jeho produktů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 66 s. Vedoucí diplomové práce prof. Ing. Peter Šimko, DrSc.

PROHLÁŠENÍ

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

.....

podpis studenta

Poděkování:

Na tomto místě bych velmi rád poděkoval prof. Ing. Peteru Šimkovi, DrSc. za rady, kritiku a vedení při zpracování této diplomové práce, dále pak Ing. Aleně Bednárikové, PhD. za poskytnutí nespočtu informací a velkou pomoc při zpracování výsledků této práce, Ing. Boženě Skláršové za vedení a konzultace při experimentální části a i dalším pracovníkům Výskumného ústavu potravinářského v Bratislavě za ochotu a pomoc při problémech, a v neposlední řadě také nejbližší rodině za vytvoření ideálních podmínek pro práci.

OBSAH

1. ÚVOD.....	7
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1 Polycyklické aromatické uhlovodíky, benzo[<i>a</i>]pyrén	8
2.2 Vyjádření efektů působení polycyklických aromatických uhlovodíků.....	10
2.2.1 Výskyt polycyklických aromatických uhlovodíků	12
2.3 Toxicita polycyklických aromatických uhlovodíků.....	16
2.4 Reaktivita polycyklických aromatických uhlovodíků	18
2.5 Produkty degradace polycyklických aromatických uhlovodíků.....	19
2.6 Vznik derivátů polycyklických aromatických uhlovodíků.....	20
2.7 Degradční procesy benzo[<i>a</i>]pyrénu	21
2.7.1 Fotodegradace.....	21
2.7.2 Biologická degradace	23
2.7.3 Mikrobiální degradace	23
2.7.4 Chemická degradace.....	26
2.8 Analytické metody pro stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků.....	26
3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	30
4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
4.1 Přístroje a zařízení	31
4.2 Použité chemikálie.....	31
4.3 Pracovní postupy	32
4.3.1 Příprava roztoků standardů a kalibračních roztoků	32
4.3.2 Fotodegradace BaP	32
4.3.2.1 v roztoku ozařovaném pomocí UV lampy.....	32
4.3.2.2 na tenké vrstvě (na filmu).....	33
4.3.3 Příprava vzorků BaP na identifikaci rozkladných produktů.....	33
4.3.4 Identifikace pomocí HPLC-PDA-FLD-MS	33
4.3.5 Identifikace pomocí GC-MS	34
4.3.6 Měření kinetiky - HPLC analýza.....	34
4.4 Statistické metody zpracování	34
5. VÝSLEDKY A DISKUZE	36
5.1 Výběr vhodných podmínek pro separaci oxidovaných forem BaP	36
5.2 Identifikace produktů oxidace BaP metodami GC/MS aHPLC/MS/MS	40

5.2.1 GC/MS analýza	40
5.2.2 HPLC analýza oxidovaných forem benzo[<i>a</i>]pyrénu	42
5.2.2.1 Ověření vhodnosti chromatografických podmínek pro separaci degradačních produktů benzo[<i>a</i>]pyrénu	43
5.3 Kinetika fotooxidace BaP v modelovém systému	49
5.3.1 Kinetika fotooxidacie benzo[<i>a</i>]pyrénu v roztoku	51
5.3.1.1 Izotermické podmínky	51
5.3.1.2 Neizotermické podmínky	54
5.3.2 Kinetika fotooxidacie benzo[<i>a</i>]pyrénu na tenké vrstvě (filmu).....	57
5.4 Studium vlivu látek s antioxidačním účinkem na rychlost oxidace benzo[<i>a</i>]pyrénu	59
6. ZÁVĚR.....	61
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	63
8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	65

1. ÚVOD

Za určitých podmínek mohou v potravinách vznikat nebo do nich z vnějšího prostředí pronikat látky, které mohou působit negativně na zdraví člověka. Pro látky, které se do potravy dostaly neúmyslně v zemědělské prvovýrobě, při skladování, dopravě, prodeji, ale i během technologického nebo kulinárního zpracování, případně v důsledku znečištění životního prostředí, se vymezuje pojem látky znečišťující, látky kontaminující nebo potravinové kontaminanty. Ty se často rozlišují na kontaminanty primární čili exogenní, pocházející z vnějších zdrojů, a kontaminanty sekundární neboli endogenní, vznikající v potravine vlivem různých fyzikálních a chemických vlivů.

V zásadě lze okolnosti, za kterých dochází k primární (exogenní) či sekundární kontaminaci potravního řetězce člověka organickými a anorganickými škodlivinami, shrnout do následujících bodů:

- zemědělská produkce
 - používání pesticidních přísadků (tzv. moderní pesticidy)
 - hnojení (toxické kovy, zvláště Cd)
 - imisní zátěž, tj. dálkový transport (perzistentní organochlorové sloučeniny jako PCB, PAU, aj., estery ftalové kyseliny, toxické kovy)
 - napadení mikroorganismy, zejména plísněmi (mykotoxiny)
 - veterinární ošetření (léčiva, pesticidy aj.)
- skladování a zpracování
 - posklizňová aplikace pesticidů (hlavně organofosfáty a pyrethroidy)
 - vznik toxických degeneračních produktů z relativně netoxických pesticidů (ethylthiomocovina, *N,N*-dimethylhydrazin)
 - napadení mikroorganismy (mykotoxiny, bakteriální toxiny)
 - některé technologické či kulinární úpravy (např. PAU, *N*-nitrosaminy)
 - penetrace aditiv z plastů (např. estery ftalové kyseliny, bisfenol A). [1]

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Polycyklické aromatické uhlovodíky, benzo[*a*]pyrén

PAU představují největší skupinu známých karcinogenů. Některé, jenž nejsou karcinogenní, mohou mít vzájemně zesilující efekt. PAU můžeme najít ve vodě, vzduchu, zemi a především v potravinách, kam se dostávají z různých zdrojů jako je tabákový kouř, spalovací motory, destiláty ropy a produktů uhelného původu a produkty jejich termické degradace. PAU se také mohou objevovat při použití konzervace kouřem, spalování dřevěného uhlí, potravinářských aditiv, při balení, stejně jako při průmyslovém znečištění. [2]

Ne všechny PAU vykazují biologickou aktivitu a často existuje významná rozdílnost jen mezi izomery. Obecně platí, že všechny karcinogenní sloučeniny jsou mutagenní, avšak neplatí, že všechny mutagenní látky nutně musí být karcinogeny. Některé menší složky PAU, jako např. alkylderiváty, mohou velmi přispívat ke karcinogenní aktivitě celkové směsi. [2]

PAU se zařazují mezi enviromentální polutanty nacházející se ve vzduchu, vodě a půdě ve stopových množstvích. PAU byly detekované v celé řadě potravinářských surovin a potravin jako jsou zelenina, ovoce, rostlinné oleje připravované za tepla, obilí, mořské produkty, maso, uzené maso, káva, čaj aj. Je dokázáno, že PAU, i když jen v malém množství, vznikají v termických zásazích při technologickém zpracování potravin, uzením, sušením a pražením. Jejich přítomnost může být zapříčiněna i použitím organických rozpouštědel při extrakci, např. při získávání oleje ze semen. BaP může migrovat do potravin i z obalových materiálů jako jsou parafínové pohárky na mléko, obaly na maso aj. Typickým příkladem průniku PAU do potravin je uzení jako možný způsob konzervace a aromatizace potravin. Klasické uzení dřevěným dýmem, který obsahuje toxické kondenzační produkty se v dnešních podmínkách reguluje tak, že se minimalizuje konečný obsah PAU ve výrobcích. Pro některé výrobky se zavádějí syntetické udící aditiva s velmi nízkým obsahem PAU. Pokud se jedná o povrchovou úpravu potravin, 60 – 70 % PAU se nachází v obalové vrstvě. [2]

Z toxikologického hlediska jsou PAU považované za kancerogeny s mutagenním a teratogenním účinkem. Toxické účinky akutní a chronické expozice PAU vyvolávají destrukci hematopoetických a lymfoidních buněk a kostní dřeně s následným krvácením a zvýšenou citlivostí k infekcím. Kromě vnějších vlivů životního prostředí, ve kterém se pohybujeme, se riziko nádorových onemocnění znásobuje i konzumováním kontaminované potravy. Kromě jiných faktorů, konzervace potravin uzením je toho též přímým důsledkem. Několik studií bylo věnováno důkazům korelace mezi střevními nádory a konzumací uzených výrobků. Přitom se zjistilo, že jako karcinogenní látky tu spolupůsobí s PAU i alifatické uhlovodíky s

C11 a alkoholy s C12. Z těchto důvodů vyplynula potřeba kontroly hladiny karcinogenních PAU v udících aditivách, která v některých zemích funguje jako nepřímá kontrola obsahu PAU v uzených výrobcích. Mnohé epidemiologické studie pojednávají o frekvencích výskytu rakoviny kůže a plic po 20 roční a delší expozici, o karcinomech močového měchýře u lidí, kteří byli profesionálně exponováni. [2]

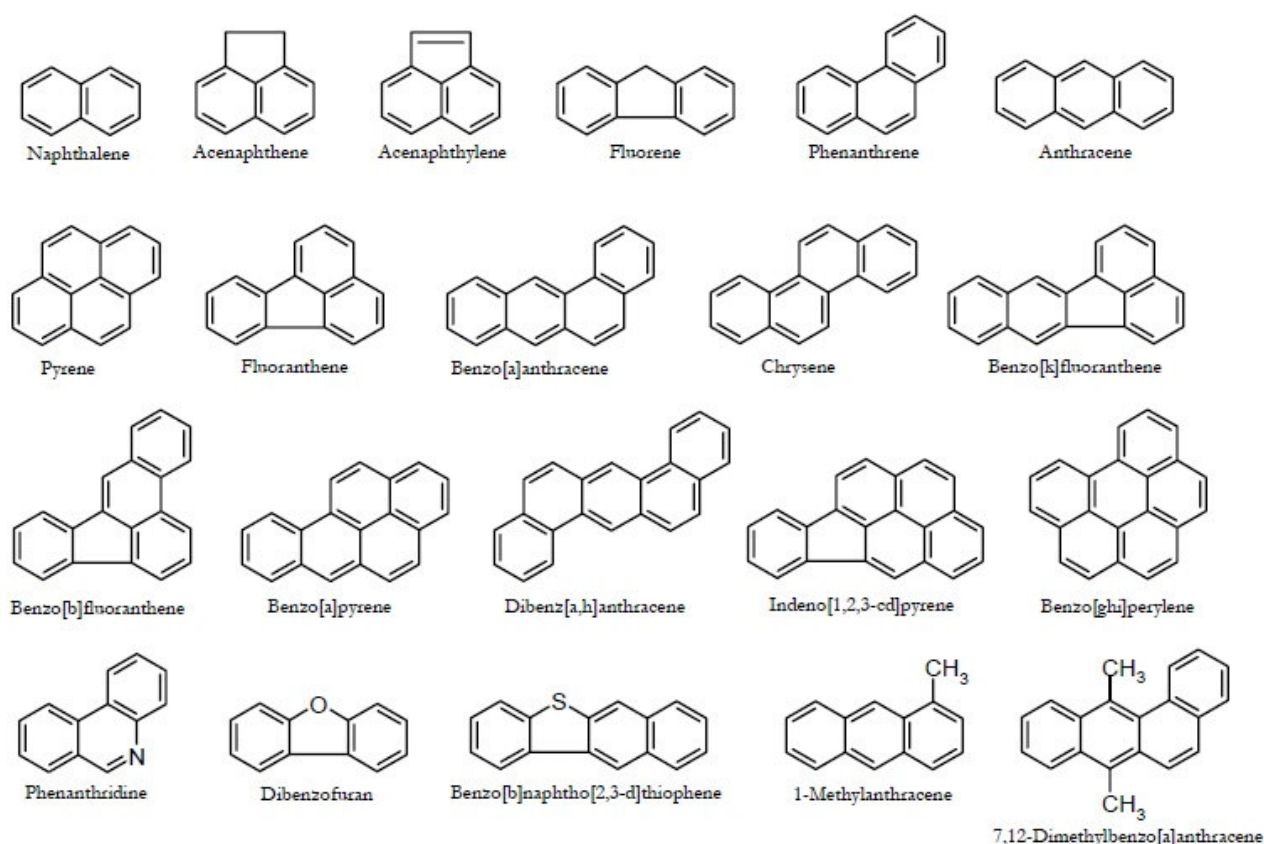
Tab. č.1: Karcinogenita některých PAU [16]

Název PAU podle IUPAC	Zkratka PAU	Karcinogenita
Pyrén	P	inaktivní
Benzo[a]pyren	BaP	vysoká
Benzo[e]pyrén	BeP	inaktivní
Perylén	Per	inaktivní
Benzo[ghi]perylén	BghiPer	mírná
Dibenzo[ah]pyrén	DBahP	vysoká
Dibenzo[ai]pyrén	DBaiP	vysoká
Benzo[c]chrysen	BcC	mírná
Benzo[b]fluoranten	BbF	vysoká
Benzo[k]fluoranten	BkF	inaktivní
Benzo[a]antracén	BaA	mírná
Dibenzo[ah]antracén	DBahA	vysoká
Indeno[123-cd]pyrén	I123-cdP	mírná

Jak bylo uvedeno dříve, PAU zahrnují velkou a různorodou skupinu organických kontaminujících látek, které byly vytvořeny v důsledku nedokonalého spalování organického materiálu. Antropogenní zdroje jako např. silniční doprava a spalování fosilních paliv sice převládají, avšak mezi zdroje spadají také přírodní zdroje, např. sopečné výbuchy a lesní požáry.[3] Lidé mohou být vystaveni PAU prostřednictvím různých cest. Pro nekuřáky je hlavní cestou expozice z potravin s malým příspěvkem z vdechnutí vzduchu. U kuřáků cigaret je příspěvek od kouření a jídla téměř stejný. PAU sloučeniny tedy vznikají při zpracování uhlí, ropy, benzínu a zemního plynu, z výroby hliníku, železa a oceli, z vytápění v elektrárnách a domovů (ropa, zemní plyn, kamna na uhlí, kamna na dřevo), spalování odpadu, dřeva, ohně, a z výfuků motorových vozidel (SCF, 2002). Potraviny mohou být kontaminovány od

environmentálních zdrojů, průmyslové výroby, zpracování potravin a z domácí přípravy potravin. [4]

PAU se skládají ze spojených benzenových jader v lineárních, hranatých či seskupených uspořádáních (*obr. 1*), a obsahují jen uhlíkové a vodíkové atomy. Nicméně ty mohou být nahrazeny atomy dusíku, síry či kyslíkových atomů a mohou vést k tvorbě heterocyklických aromatických sloučenin, které se obvykle vyskytují s PAU. PAU s alkyl skupinami byly nalezeny společně s PAU v životním prostředí. Celá skupina PAU a příbuzné sloučeniny se někdy označují jako vícecyklické aromatické sloučeniny. PAU byly studovány kvůli jejich



toxicitě, odolnosti a environmentálnímu výskytu [3].

Obr.1: Struktury 16 PAU dle US-EPA a vybrané alkyl-PAU a heterocyklické sloučeniny [3]

2.2 Vyjádření efektů působení polycyklických aromatických uhlovodíků

Existují některé nejasnosti ve vztahu k vhodnosti BaP jako obecného ukazatele pro celkové množství PAU a výběr skupin potravin stanovených v nařízení.[4]

Evropská komise proto vydala nařízení 2005/108/EC, ve kterém žádá členské státy, aby

sledovaly úroveň PAU v potravinách, a požaduje, aby Evropský úřad pro bezpečnost potravin shromáždil a vyhodnotil získané informace. Sedmnáct členských států předložilo užitečné výsledky z testování 9714 vzorků potravin, které náleží do jedné z 95 kategorií potravin tzv. Codex kategorií, na přítomnost až 25 různých PAU, včetně 16 nominovaných sloučenin. Maximální koncentrace zaznamenaná pro kterýkoli prioritní PAU byla 1,064 µg/kg BaA v konzervovaných šprotech v oleji, zatímco 31,8 % vzorků bylo testováno s negativním výsledkem pro všechny PAU. BaP byl v průběhu detekce nalezen v 72 kategoriích z 95 „Codex kategorií potravin“ neboli v 47 % vzorků.[4]

Pouze 36 kategorií potravin neboli 13,4 % vzorků mělo koncentrace vyšší než 1 µg/kg a 16 kategorií potravin neboli 2,3 % vzorků vykazovalo koncentrace vyšší než 10 µg/kg. [4]

Vzorky, které patří do kategorie potravin, na něž se vztahuje nařízení (ES) 1881/2006 překročily příslušné limity pro BaP ve více než 7,3 % případů (faktory zpracování pro konzervované rybí výrobky nelze vypočítat). Nicméně, některé jiné PAU byly přítomny ve vyšších koncentracích. Testování některých jiných kategorií potravin odhalilo poměrně vysoké koncentrace několika PAU v kakaovém másle, konzervách uzených ryb a v potravinových doplncích, zatímco sušené ovoce vykazovalo výrazně nižší koncentrace. [4]

Existuje však nedostatek zpráv o výrobních podmínkách spojených s různými vzorky. Bylo poukázáno na fakt, že kouř v kombinaci s vyšší teplotou má významný vliv na vznik PAU, konkrétně tedy v případě, že vyšší teploty byly spojeny s vyšším obsahem PAU. [4]

Předpoklad, že BaP je dobrým ukazatelem kontaminace PAU, se však ukázal jako mylný. U vzorků testovaných pro všech 15 prioritních PAU dle SCF, se u 33 % ukázala koncentrace jednoho nebo více PAU nad mezí detekce a s koncentrací BaP pod mezí detekce. Výsledky byly různé napříč všemi kategoriemi potravin a různými PAU. Chry byl nejproblematictější sloučeninou, o 38 % přesahoval limit detekce, a koncentrace až do 343 µg/kg nalezené ve vzorcích obsahujících BaP se pohybovaly pod mezí detekce. BcF dle JECFA poukázal, že druhé nejvyšší maximum s téměř 27 µg/kg ve vzorku testování byl negativní pro BaP. [4]

Je třeba pečlivě vyhodnotit spolu s dalšími možnostmi řízení rizik s ohledem na tato zjištění, zda je vhodné i nadále brát BaP jako indikátor. Výsledky také poukazují na problém s vysokou hladinou PAU nalezenou v kakaovém másle, konzervách uzených ryby a potravinových doplncích, které by možná mohly vyžadovat samostatné legislativní opatření, přičemž se zdá, že je možné vyrábět sušené ovoce bez zvýšených hladin PAU. [4]

Řada PAU se ukázala být genotoxickými karcinogeny. V roce 2002 Vědecký Výbor pro potraviny (SCF) přezkoumal toxicitu PAU (SCF, 2002). Pro 15 látek se došlo k závěru, že

existuje jasný důkaz o jejich toxicitě. S ohledem na podprahové účinky genotoxických látek Výbor doporučil, aby množství PAU v potravinách bylo sníženo na co nejnižší, rozumně dosažitelnou úroveň. [4]

Řada PAU se ukázala jako genotoxické karcinogeny (IARC, 1973, 1983, 1984, 1985, 1987, 1989, US EPA, 1984; Montizaan *a kol.*, 1989; IPCS, 1998). Vycházejíc ze studií PAU dle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC) v roce 1987 se dospělo k závěru, že BaP, že je pravděpodobným lidským karcinogenem (IARC, 1987).[4]

2.2.1 Výskyt polycyklických aromatických uhlovodíků

PAU byly zjištěny v různých potravinách, zejména v zelenině, jako výsledek vzdušné depozice PAU, v rybách a mušlích z kontaminovaných vod (Edwards, 1983; Nielsen *a kol.*, 1996). Na voskovém povrchu ovoce a zeleniny se mohou soustředit PAU s nízkou molekulovou hmotností pomocí povrchové adsorpce a částice spojené s vysokou molekulovou hmotností PAU mohou zase kontaminovat povrch v důsledku atmosférického spádu. PAU mohou kontaminovat potraviny během průmyslových zakouření, zahřívání nebo sušení, což ve všeobecnosti umožňuje spalování produktů, které přišly do přímého styku s potravinami. Ke kontaminaci obilovin a rostlinných olejů PAU obvykle dochází v průběhu technologických procesů jako je vystavení přímému ohni nebo sušení, kde spalovací produkty mohou přijít do přímého styku s obilím, olejnatými semeny a oleji samotnými (Speer *a kol.*, 1990; SCFS, 2001). [4]

PAU také vznikají jako výsledek určitých způsobů přípravy potravin jako je např. grilování, pečení a uzení. Nejvyšší koncentrace PAU se obvykle nachází při grilování pomocí dřevěného uhlí/grilování potravin (zejména masa a masných výrobků), potravin uzených tradičními technikami (zejména ryby), a slávek a dalších plodů moře ze znečištěných vod (Guillen *a kol.*, 1997, Phillips, 1999). Uzené a grilované potraviny mohou výrazně přispět k příjmu PAU z takovýchto potravin, které v některých případech tvoří velkou část běžné stravy. Například grilované maso bylo vyhodnoceno jako druhý nejvyšší „dodavatel“ PAU po chlebu, obilovinách a obilí v rámci studie v USA (Butler *a kol.*, 1993). Nicméně, hlavními zdroji příjmu PAU v běžné stravě jsou oleje a tuky, obiloviny, ovoce a zelenina. [4]

Vědecký výbor pro potraviny (SCF) zkoumal výskyt a toxicitu PAU v jídle a 4. prosince 2002 vydal stanovisko (SCF, 2002). Zkoumáním patnácti sloučenin (BaA, BbF, BjF, BkF,

BghiP, BaP, Chry, CpcdP, DBahA, DbaeP, DBahP, DBaiP, DBalP, I123cdP a MCH) došel k závěru, že existuje jasný důkaz mutagenity/genotoxicity v somatických buňkách při pokusech na zvířat *in vivo*. S výjimkou BghiP byly také prokázány karcinogenní účinky různých druhů sloučenin na pokusných zvířatech. I když pouze BaP byl adekvátně testován pomocí kontrolovaného příjmu, SCF konstatoval, že tyto sloučeniny mohou být považovány za genotoxické a karcinogenní pro člověka a představují nejvýznamnější skupinu při posuzování rizika dlouhodobých nepříznivých účinků na zdraví po konzumaci PAU. [12] U šesti dalších sloučenin (Ant, BghiF, BcF, 1-methylFe, Per a trifenylen) byl důkaz genotoxicity omezen, především na základě výsledků získaných ze studií *in vitro*. Další studie, zejména *in vivo*, doporučily objasnit genotoxický potenciál těchto PAU. Dvojznačné či rozporuplné údaje byly k dispozici pro dalších osm sloučenin (acenaften, acenaphthylene, BbF, BeP, Kor, Flu, Fluo, F), které nemohou být řádně vyhodnoceny pro svou genotoxicitu. [4]

A nakonec čtyři sloučeniny (Ant, BaF, Naf a Pyr) vykazovaly zcela nebo povětšinou negativní výsledky v různých krátkodobých testech. [4]

Odhaduje se, že maximální denní příjem BaP z potravin je přibližně 6 až 8 ng/kg tělesné hmotnosti/den pro osobu o hmotnosti 70 kg. Takto odhadovaný maximální denní příjem je přibližně o 5 až 6 řádů nižší než je denní dávka, jenž vyvolá vznik nádorů u pokusných zvířat. SCF dospěl k závěru, že na těchto úrovních příjmu jsou nekarcinogenní účinky v souladu s očekáváním, a že riziko dědičných vlivů z dietární expozice PAU je nízké. Nicméně, s ohledem na podprahové účinky genotoxických látek by hladiny PAU v potravinách měly být sníženy na co nejnižší, dosažitelnou úroveň. [4]

SCF rovněž dospěl k závěru, že BaP může být použit jako indikátor výskytu a účinku karcinogenních PAU v potravinách, na základě vyšetření profilů PAU v potravinách a výsledků nedávné studie karcinogenity dehtů prováděné na myších. Konzervativní hodnocení by znamenalo, že karcinogenní potenciál celkových PAU v potravinách by musel být 10 krát vyšší, aby se dosáhlo úrovně BaP. Výbor však zdůraznil, že i když bere BaP jako indikátor karcinogenních PAU v potravinářském průmyslu, chemické analýzy by měly i nadále shromažďovat údaje o celém profilu PAU, aby bylo možné vyhodnotit kontaminace potravin a jakékoli budoucí změny v tomto profilu. [4]

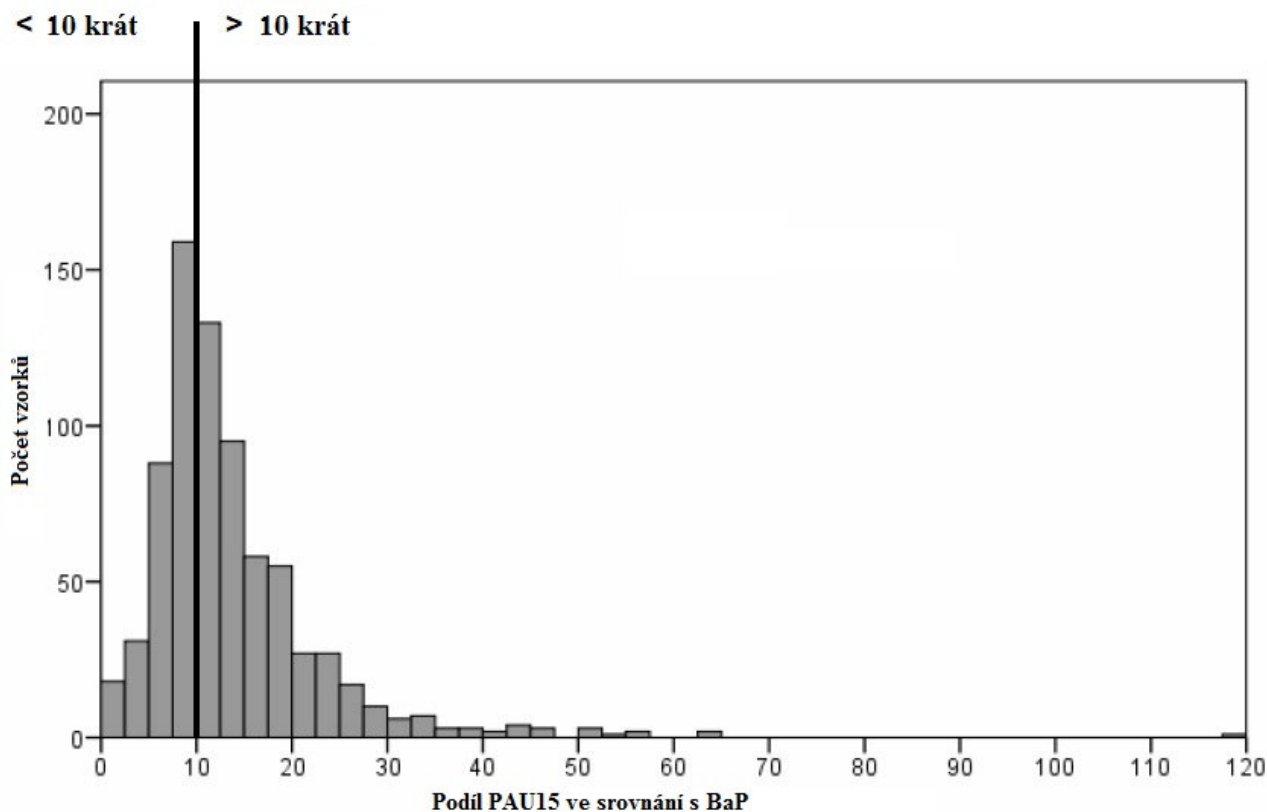
Společný výbor odborníků FAO/WHO pro potravinářské přídatné látky (JECFA) v roce 2005 provedl posouzení rizika PAU a odhadovaného rozpětí expozice (MOE) jako základ pro poradenství v oblasti sloučenin, které jsou genotoxické i karcinogenní (JECFA, 2005). Na základě MOE došla JECFA k závěru, že odhadovaný příjem PAU neznámá nebezpečí pro lidské zdraví. Výbor doporučil, aby budoucí monitorování zahrnovalo, avšak nebylo omezeno

jen na analýzy dříve zkoumaných 13 PAU, které byly původně identifikované jako genotoxické a karcinogenní, s výjimkou CPcdP. JECFA také doporučil, aby BcF byl zahrnut do dalších analýz potravin, které by měly napomoci budoucímu hodnocení aduktů odvozených od BcF. [4]

V provedených studiích byla zkoumána úroveň kontaminace potravin BaP v 95 “Codex kategoriích potravin”. Podíl výrobků s vyššími než stanovenými limity (úroveň odrážející maximum) byla vypočtena pro všechny kategorie potravin, bez ohledu na legislativu. Vzorky byly rozděleny do několika možných úrovní a pouze vzorky, které se nehodily do žádné podkategorie, byly umístěny na vrchní agregované úrovni. [4]

Úrovně BaP přesahující detekční limity byly nalezeny v potravinách náležících do jedné z 71 kategorií z 95 možných, tzv. “Codex kategorií potravin” neboli u 47 % vzorků. U 95 % kategorií potravin se koncentrace pohybovala okolo 3,6 µg/kg. Pouze 36 kategorií potravin neboli 13,4 % vzorků, vykazovaly koncentrace vyšší než 1 µg/kg a 219 vzorků (2,3 %) vyšší než 10 µg/kg. Do této skupiny spadaly převážně konzervy z ryb či vzorků mořských živočichů (84 vzorků) s koncentrací vyšší než 10 µg/kg, 43 vzorků rostlinného oleje, 31 vzorků masa, 22 vzorků kávy a čaje, 18 doplňků stravy, 12 vzorků bylin a koření a 9 vzorků mušlí (z nichž některé byly sklizeny v průmyslové oblasti). [4]

Vztah k využití BaP jako indikátoru pro 15 PAU označených VVP a extra bezpečnostní faktor o 10 PAU doporučených SCF se obstarává pro možné variace v úrovních a karcinogenitách, u kterých však není jisté, zda souvisí s celkovou úrovní pro skupiny nebo pro jednotlivé PAU. Srovnání bude tedy pro obě kombinované skupiny a pro jednotlivé PAU. [12] Byla posouzena úroveň samotného BaP ve srovnání s kombinovanou úrovní všech 15 PAU včetně BaP u 1 375 vzorků pro všechny PAU15. Z těchto vzorků bylo 164 výsledků pod LOD, zatímco 456 zaznamenaných výsledků nad hodnotou LOD pro jeden nebo více PAU a zároveň s BaP pod LOD. Histogram na obr. 2 znázorňuje poměr PAU15 nad BaP pro zbývajících 755 vzorků, u nichž byly obě hodnoty zaznamenány nad hodnotou LOD. Za předpokladu, že je faktor 10, pak všechny hodnoty pod hodnotou 10 na osách X, která značí celkové PAU, jsou méně než 10násobkem úrovně BaP. Pouze 296 analyzovaných vzorků pro všech 15 PAU, či pokud bereme také vzorky se všemi výsledky pod LOD jako vyhovující, získáme celkem 33,5 %. Tento výpočet není faktorem rozdílů v úrovních karcinogenity. [4]



Obr. 2: Histogram podílu všech 15 PAU ve vztahu k BaP v 1 375 vzorcích [4]

Srovnání bylo provedeno rovněž pro jednotlivé PAU ve vztahu k úrovním BaP. Popisné statistiky pro každý PAU jsou uvedeny v tabulce 22 spolu s regresním koeficientem (b) a koeficientem determinace (R²) pro lineární regresi mezi jednotlivými PAU a BaP s BaP jako nezávislou proměnnou. Hodnoty b nad 1 ukazují, že celkové úrovně BaP jsou nižší než příslušné PAU. Tři z prioritních PAU mají regresní koeficient vyšší než 1 s nejvyšším rozporem u Chry s hodnotami v průměru 2,4krát vyššími než BaP. U sedmi prioritních PAU se ukazují R² hodnoty vyšší než 0,5, což dokazuje, že existuje vhodnost proložení lineární regrese. Nicméně, pro DBaHP neexistuje žádná korelace na všech úrovních, aby spojil BaP s náhodnou distribucí. Maximální zjištěná koncentrace DBaHP byla pouze 3 µg/kg. Situace je stejně problematická pro DBaeP, DBaiP a MCH a s MCH dosahujícím maximální hodnoty 18,5 µg/kg. [4]

Tab. 2: Popisná statistika pro koncentrace v $\mu\text{g/kg}$ až 16 PAU v 6908 potravinových produktech, lineární regresní koeficient (b) mezi jednotlivými PAU a BaP, odhad koeficient determinace (R^2) a jsou zaznamenány i maximální koncentrace. [4]

PAH	N	>LOD	b	R^2	Maximum ($\mu\text{g/kg}$)
BaA	5706	2818	1.761	0.750	1064
BbFA	6728	3192	1.605	0.803	690
BjFA	2184	847	0.682	0.665	57.2
BkFA	6630	2750	0.495	0.817	150
CHR	5421	3294	2.355	0.548	590
DBahA	6119	855	0.082	0.295	36.9
DBaeP	2538	314	0.118	0.168	26.9
DBahP	2341	51	0.001	0.000	2.50
DBaiP	2471	121	0.020	0.073	4.00
DBalP	2702	219	0.060	0.250	14.1
IP	6908	1715	0.454	0.721	100
MCH	2227	153	0.022	0.009	18.5
BghiP	6406	2292	0.691	0.745	220
CPP	1641	657	0.846	0.215	112
BcFL	1148	534	0.704	0.037	231

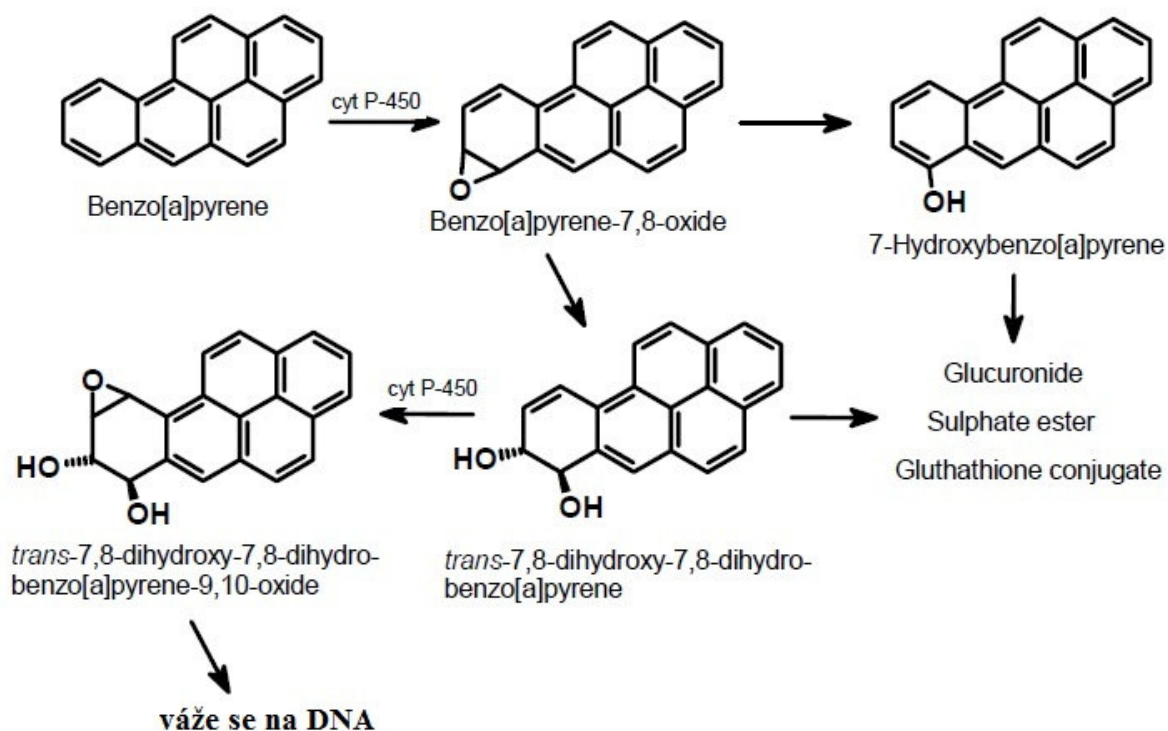
2.3 Toxicita polycyklických aromatických uhlovodíků

Široký okruh PAU ekotoxikologicky napadá různorodé bioty, včetně mikroorganismů, pozemních rostlin, vodních organismů, obojživelníků, plazů, ptáků i pozemní savce. Účinky byly doloženy na přežití, růstu, metabolismu a tvorbě nádorů, tj. akutní toxicita, vývojová a reprodukční toxicita, škodlivost pro buňky, toxicita pro genetický materiál a kancerogenita. Každopádně toxikologický výzkum PAU poukázal na toxicitu a kancerogenitu těchto sloučenin na genetický materiál. [3]

Některé studie prokázaly, že několik PAU bylo schopno poškodit DNA a způsobit změny, které v některých případech mohou vést ke vzniku rakoviny. Nicméně nesubstituované PAU nejsou sloučeninami, která reagují s DNA. Metabolická aktivace a konverze PAU je nutná k tomu, aby se tyto látky pro genetický materiál chovaly jako toxické, a aby se prokázaly jejich kancerogenní vlastnosti. K tomuto dojde tehdy, jsou-li PAU metabolizovány vyššími organismy. PAU se nehromadí stejným způsobem jako jiné lipofilní organické sloučeniny, např. PCB. Místo toho jsou převedeny na více vbe vodě rozpustných forem, které usnadňují jejich následné vyměšování z organismu. To však může také vést k vytvoření reaktivních intermediátů schopných reagovat s DNA a tvořit adiční sloučeniny, které zabraňují běžnému fungování genů. Poškozená DNA může být opravena, avšak pokud oprava selže, tj. dojde k

nenapravitelnému genetickému poškození, změny se projeví. Změny mohou ovlivnit mnoho dalších funkcí buňky, ale především mohou vést ke vzniku rakoviny [3]

Na **obr. 3** je zobrazena metabolická aktivace BaP. Tato sloučenina je pravděpodobně nejlépe prostudovaným PAU, a také je jednou z nejvíce kancerogenních sloučenin doposud známých. Úvodní krok v metabolismu PAU zahrnuje víceúčelový P - 450 enzymový systém formující epoxidy přidáním jednoho atomu kyslíku napříč dvojnou vazbou. Epoxidy jsou přechodné sloučeniny a mohou se samovolně přeměnit na fenoly či podstoupit hydrolýzu dihydrodiolů. Tyto produkty pak mohou konjugovat s glutathionem, kyselinou glukuronovou či kyselinou sírovou a tvořit produkty, které mohou být vylučované organismem. Tento proces konjugace je proto považovaný za detoxifikaci a proces vyměšování. Každopádně dihydrodioly mohou také ještě sloužit jako substrát pro cytochrom P - 450 a tvořit nové dihydrodiol epoxidy, např. *trans*-7,8-dihydroxy-7,8-dihydroBaP-9,10-oxid, který je však nevhodný substrát pro další hydrolýzu. Tyto dihydrodirolepoxidy mohou místo toho reagovat s proteiny, RNA a co je nejzávažnější problém, také s DNA, čímž způsobují změny, příp. rakovinu. [3]



Obr. 3: Metabolická aktivace BaP dle IARC 1983 [3]

BaP má velmi nízkou rozpustnost ve vodě (3,8 µg/l), tlak par ($5,0 \times 10^{-7}$ mm Hg při 20°C) a vysoký dělicí koeficient oktanol/voda (6,04), což naznačuje jeho upřednostnění nevodných

fází. BaP je jedním z nejúčinnějších karcinogenů z řad PAU, a jako takový je nejvíce studovanou sloučeninou třídy PAU. Několik článků bylo napsáno o posouzení rizika BaP stejně jako o jeho metabolismu a aktivaci BaP v systémech savců. Četné studie ukázaly, že jedno-, dvou- a třícyklické sloučeniny jsou akutně toxické, zatímco sloučeniny s vyšší molekulovou hmotností z řad PAU, včetně BaP, jsou považovány za genotoxické. [5]

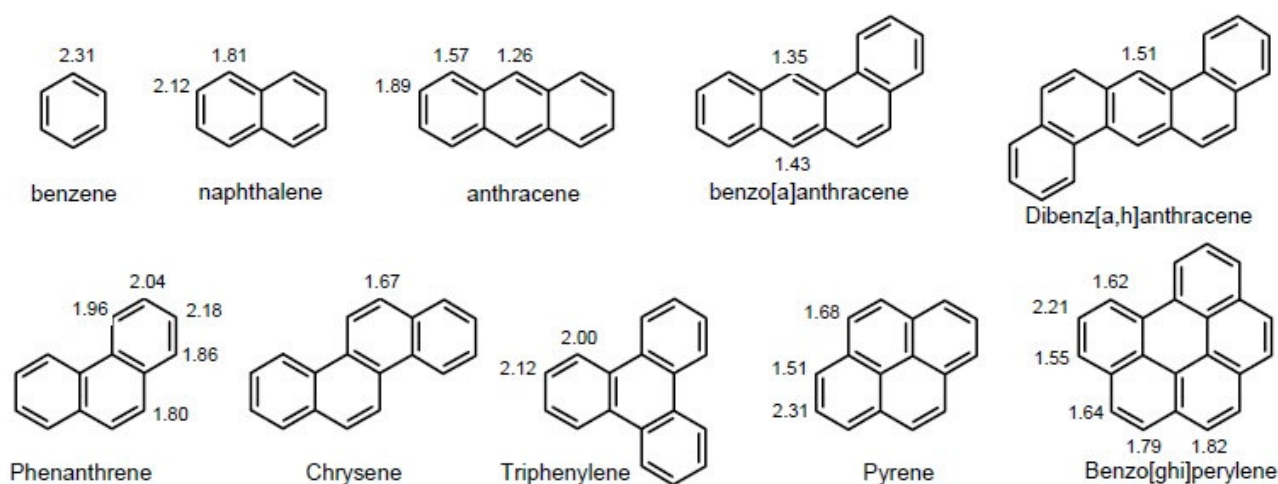
Dominantní postupy pro úspěšné odstranění PAU z prostředí, s výjimkou odpařování, fotooxidace, chemické oxidace, bioakumulace a adsorpce na sedimentující částice, jsou mikrobiologické transformace a degradace. Ačkoli mikrobiální rozklad je považován za hlavní eliminační proces v oblasti životního prostředí, fotochemické reakce jsou rovněž odpovědné za odstraňování PAU z vody a vzduchu. Fotolýza je důležitá transformační cesta pro většinu PAU v životním prostředí. Fotolýza vybraných PAU u přírodních vodních těles je relativně rychlá. Bylo také zjištěno, že v organických rozpouštědlech je fotolýza PAU taktéž rychlá a oxidační produkty PAU produkované fotooxidací a mikrobiálním rozkladem, jsou více rozpustné ve vodě než původní PAU. [5]

PAU a jejich metabolity v odlehlých kontinentálních prostorách byly v podstatě zkoumány v sedimentech; jejich přítomnost ve vodách si zasloužila podstatně méně pozornosti. Relativně málo je známo o rozkladu PAU v organických rozpouštědlech. Mnoho prací se věnovalo rozpoznání míry degradace BaP v různých médiích, a byl rovněž zkoumán vliv různých parametrů zodpovědných za fotodegradaci, včetně světla, teploty, času a přirozeně se vyskytující bakteriální flóry, taktéž byla zkoumána stabilita BaP v různých rozpouštědlech a vodě. [5]

2.4 Reaktivita polycyklických aromatických uhlovodíků

Během chemických reakcí PAU jsou velkou měrou transformovány na jiné polycyklické aromatické sloučeniny, tj. neztrácí svůj aromatický charakter. Aromatický charakter je zachován do té doby než nearomatické uhlovodíky mají výrazně vyšší energii. Z čehož vyplývá, že je tedy požadováno velké množství energie, aby se aromatická sloučenina změnila na nearomatickou. Elektron rozloží molekulu PAU tak, že se určí pozice v molekule, které jsou nejvíce reaktivní. Pro adiční reakce se ukázal vhodným Whelandsův koncept lokalizační energie. Lokalizační energie (Lu) je energie požadovaná k tomu, aby izolovala π -elektron ve středu PAU ze zbývajících systému. V tomto procesu mohou být atakujícími druhy nukleofil, elektrofil či radikál. Byla vyvinuta řada rejstříků reaktivity odrážející

lokalizační energii, z nichž jeden parametr je Dewarovo číslo reaktivity, Nu. Velikost Nu odráží lokalizační energii a reaktivitu v jisté pozici aromatické sloučeniny. Menší hodnota Nu, nižší aktivační energie a většího reakčního poměru ve středu u. Nu hodnoty pro řadu aromatických sloučenin jsou ukázány na **obr. 4**. Hodnoty zobrazené na tomto obrázku signalizují, že benzen by měl být nejméně reaktivní formou. Pro Naf je vyšší reaktivita očekávána na pozici 1 než na pozici 2. Podobně Ant a Phe by měl raději reagovat v 9,10-pozici, ačkoli reaktivita Phe by měla být značně nižší než u Ant. Tudíž lokalizační energetický koncept může být užitečný v objasňujících mechanismech degradace PAU a vzniku odvozených PAU. [3]



Obr. 4: Elektronová lokalizace energie pro benzen a vybrané PAU, založeno na práci Zandera, 1979. [3]

2.5 Produkty degradace polycyklických aromatických uhlovodíků

Konečný výsledek procesu degradace je celková mineralizace organických kontaminujících látek vedoucí ke vzniku oxidu uhličitého, vody a jiných anorganických sloučenin. Oba procesy biologické a chemické degradace mohou produkovat různorodé sloučeniny, mezi které také můžeme zahrnout dočasné meziprodkuty a sloučeniny, které jsou odolné proti další degradaci. Takové produkty se potencionálně mohou nahromadit během dalšího procesu v případě, že žádný mechanismus pro další degradaci není k dispozici. Toto se může stát pokud např. originální kontaminující látka je transformovaná spolu kometabolicky a nejsou přítomny žádné mikroorganismy, které by mohly metabolizovat

produkt přetvoření nebo pokud je chemické okysličovadlo přidáno v nedostatečné kvantitě či síle. [3]

Z dostupné literatury je zřejmé, že konečnými produkty jsou v první řadě karbonylové sloučeniny jako ketony, chinony, anhydridy karboxylových kyselin a kumariny, zatímco karboxylové kyseliny a fenoly se zdají být snadněji degradované či transformované. Vyšší stabilita karbonylových sloučenin je také určena skutečností, že tyto sloučeniny jsou nalezeny častěji než hydroxylované a karboxylované sloučeniny ve vzorcích životního prostředí, včetně kontaminované půdy. [3]

Tohoto předpokladu může být využíváno k omezení některých využívaných analytických metod, od té doby, co hydroxylované a karboxylované sloučeniny díky své vyšší polaritě byly vhodnější k analýze. Každopádně podobné výsledky byly získané s metodami pečlivě vyvinutými pro všechny tyto třídy sloučenin. Následné studie těchto tezí se zakládají na studiu karbonylových derivátů PAU, dále pak derivátů, které jsou označovány jako oxidované PAU (oxyPAU) v následující sekcích. [3]

Dalším důvodem pro studia oxyPAU je fakt, že mnohé z těchto sloučenin jsou toxické a mutagenní. Některé jsou ještě více toxické než jejich původní PAU. Např. u Ant-9,10-dion a Phe-9,10-dion bylo dokázáno zpomalení růstu okřehek, *Lemna gibba*, a mořské bakterie *Photobacterium phosphoreum*. Navíc 7H-benzyliden[de]antracen-7-on, 4-oxapyren-5-on a několik benzofluorenonů, BaPChin a PyrChin vykazují mutagenní aktivity v biologických drahách jako tzv. Ames test. Na rozdíl od nesubstituovaných PAU, žádný z těchto oxyPAU nevyžaduje metabolickou aktivaci k tomu, aby se ukázala jejich mutagenní povaha, ale mohou reagovat s DNA přímo (srov. sekce 2.3). Dále jsou oxyPAU také identifikovány jako převládající třída sloučenin v nejvíce mutagenních zlomcích získaných během biologické zkoušky založené na chemickém rozdělení na díly různých vzorků prostředí. [3]

2.6 Vznik derivátů polycyklických aromatických uhlovodíků

Při hodnocení reaktivity PAU jsou zajímavé především procesy, ke kterým dochází v atmosféře, neboť vznikající produkty mohou posléze kontaminovat zemědělské plodiny. Rozsah a charakter probíhajících reakcí závisí na teplotě, intenzitě slunečního záření a na koncentraci látek, jež jsou schopné elektrofilní substituce aromatického jádra. Popsány byly reakce PAU s ozónem, singletovým kyslíkem, oxidy dusíku či síry. S ohledem na vysokou toxicitu vznikajících produktů si zvláštní zmínku zasluhují reakce vedoucí k nitroderivátům

PAU. Určité množství těchto kontaminantů je do atmosféry emitováno přímo z příslušných zdrojů, ve kterých se tvoří při spalování. K jejich vzniku může docházet též radikálovými reakcemi v plynné fázi. [3]

2.7 Degradační procesy benzo[*a*]pyrénu

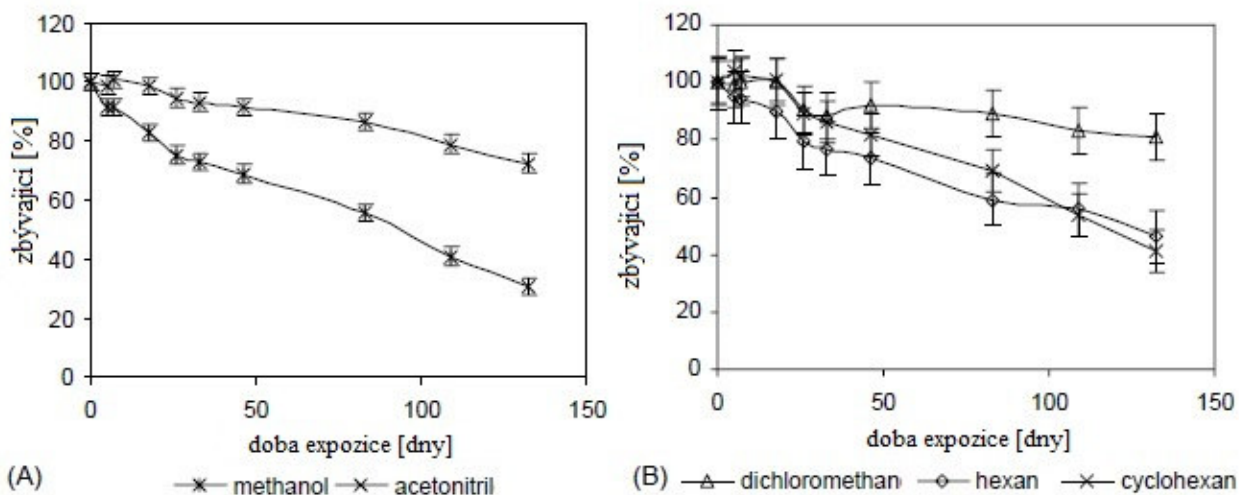
2.7.1 Fotodegradace

Mnohé studie byly provedeny na základě fotolýzy jednotlivých PAU v přírodních vodách pod ozařováním. Zepp a Schlotzhauer zjistili, že fotolýza vybraných PAU v přírodní vodní nádrži probíhá docela rychle a poločasy rozpadu PAU se pohybovaly v rozmezí od několika minut až po několik hodin. Mill určil, že poločasy rozpadu pro BaP a BaA ve vodě při ozařování na slunci odpovídaly 0,69, resp. 5,0 hodinám. Nicméně je známo relativně málo fotodegradací PAU, při kterých PAU nejsou ozářeny a nacházejí se v čistých rozpouštědlech. Degradace BaP ve vybraných organických rozpouštědlech byla sledována po dobu delší než 3 měsíce. **Obr. 5** ukazuje závislost koncentrace nedegradovaných BaP v organických rozpouštědlech. Za první měsíc koncentrace BaP zůstala konstantní ve všech používaných rozpouštědlech. Po této době degradace začala: v dichlormethanu a acetonitrilu je degradace nejpomalejší. Po 100 dnech expozice, 60% BaP bylo degradováno v methanolu, zatímco 50% v hexanu a cyklohexanu. [5]

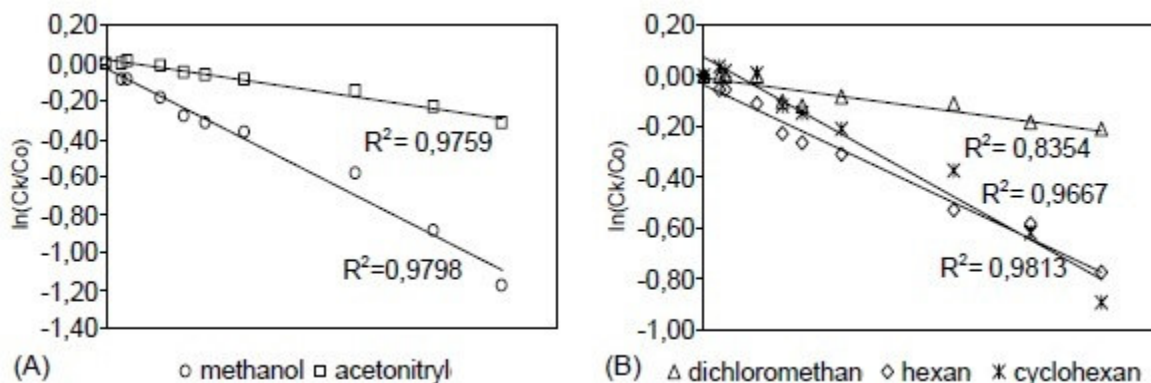
Rozklad (%) se snížil v následujícím pořadí:

dichlormethan > acetonitril > hexan \geq cyklohexan > methanol. [5]

Toto pořadí může úzce souviset s rozpustností kyslíku v rozpouštědle, a obecně měřené hodnoty mohou souviset s obsahem kyslíku v dichlormethanu, kde je největší a klesá v pořadí acetonitril, methanol a voda. To nepřímou znamená, že rozpustnost kyslíku klesá s rostoucí reaktivitou zvoleného rozpouštědla. Koncentrace BaP se snížila s časem (obr. 5A a 5B). [5]



Obr. 5: Fotodegradace BaP v různých rozpouštědlech: (A) methanol a acetonitril; (B) dichloromethan, hexan and cyclohexan [5]



Obr. 6: První řád reakce kinetiky pro fotodegradaci BaP v rozdílných rozpouštědlech [5]

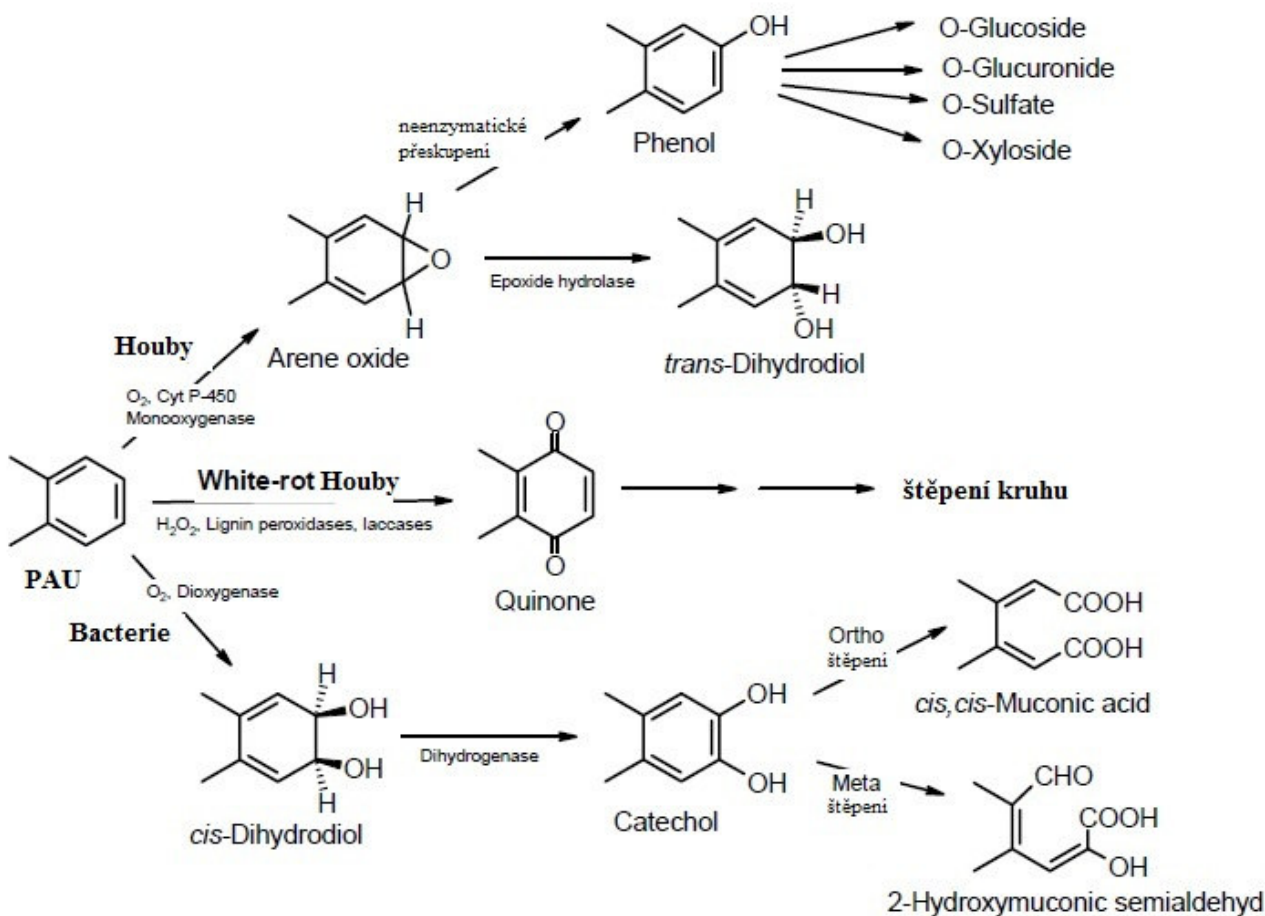
Degradace PAU v životním prostředí nastává při biologických, chemických a fotochemických procesech. Ať tak či onak, degradace může mít za následek různorodost některého z produktů, který se mohl potenciálně nahromadit. Následující části se budou zabývat degradací PAU. Navíc bude vysvětleno, proč jsou oxidované PAU považovány za nejdůležitější skupinu produktů.[3]

2.7.2 Biologická degradace

Co se týče biologické degradace, tak je to hlavní proces zodpovědný za výskyt PAU v půdě. Mikroorganismy jako např. bakterie a houby mohou transformovat PAU na další organické sloučeniny až ke konečným produktům jako jsou oxid uhličitý a voda. Pozdější proces je označován jako mineralizace. Některé PAU degradující mikroorganismy, v první řadě bakterie, jsou schopny použít PAU jako zdroj uhlíku a také energie, a mohou tak transformovat kontaminující látky do molekul odkud mohou vstoupit do středních metabolických cest organismů. Jiné mikroorganismy mají vybavení k tomu, aby degradovaly PAU na hojně se vyskytujících substrátech. Tento kometabolismus však ne vždy rezultuje v růst mikroorganismu, a někdy kosubstrátu, tj. PAU jsou jen transformovány na jiné sloučeniny bez jakéhokoliv zjevných výhod pro organismus. Toto může vést k částečné degradaci v případě, že není k dispozici žádný enzym schopný transformace metabolitu. U PAU příspěvek kometabolických procesů degradace zvyšuje jak počet kruhů v molekule PAU, tak svou roli také hrají mikroorganismy, které jsou schopné používání PAU s velkou molekulovou hmotností jako uhlíkového a energetického zdroje. [3]

2.7.3 Mikrobiální degradace

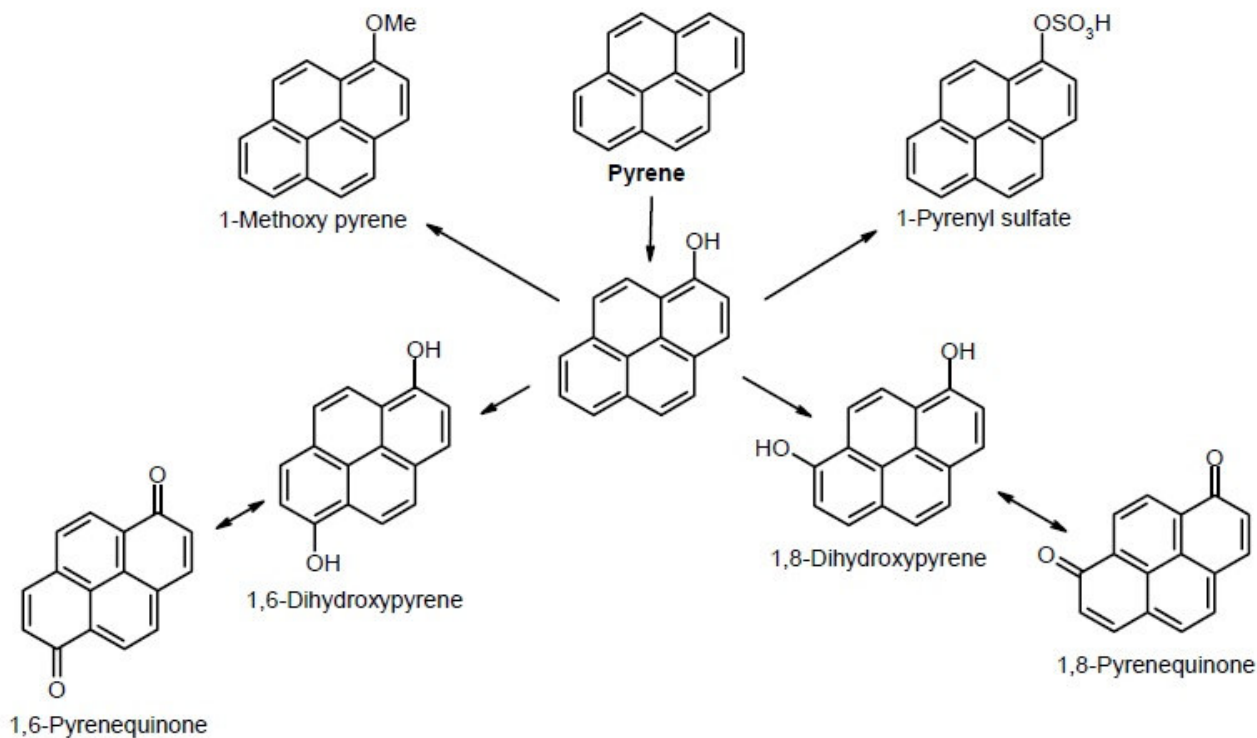
Bakterie rozkládající PAU obecně užívají PAU jako zdroj uhlíku a energie, zatímco houby metabolizující PAU využívají PAU k tvorbě více ve vodě rozpustných sloučenin, čímž usnadňují jejich následné vyměšování. Bakterie a houby proto mají jiné metabolické cesty (**obr. 7**). Hlavní degradační cesta PAU u hub je docela podobná degradační cestě nalezené u lidí a u jiných savců. Z **obr. 7** je zřejmé, že houby oxidují PAU přes enzymový systém cytochrom P-450 s následnou tvorbou fenolů a *trans*-dihydrodiolů, které mohou být konjugovány a vylučovány z organismu. Bakteriální degradace PAU obecně začíná dioxygenasou a útokem na jeden z aromatických kruhů k tvorbě *cis*-dihydrodiolů, které jsou následně dehydrované pyrokatechinem. Pyrokatechin je klíčovým mezirproduktem, který se může vyskytovat při tomto štěpení. Aromatický kruh je štěpen mezi hydroxyly (*ortho* štěpení) či přiléhá jednomu z hydroxylů (*meta* štěpení). Následná degradace kruhu se pak může projevit tak, že struktura je nakonec degradována a molekuly tak mohou vstoupit do střední metabolické cesty bakterií. [3]



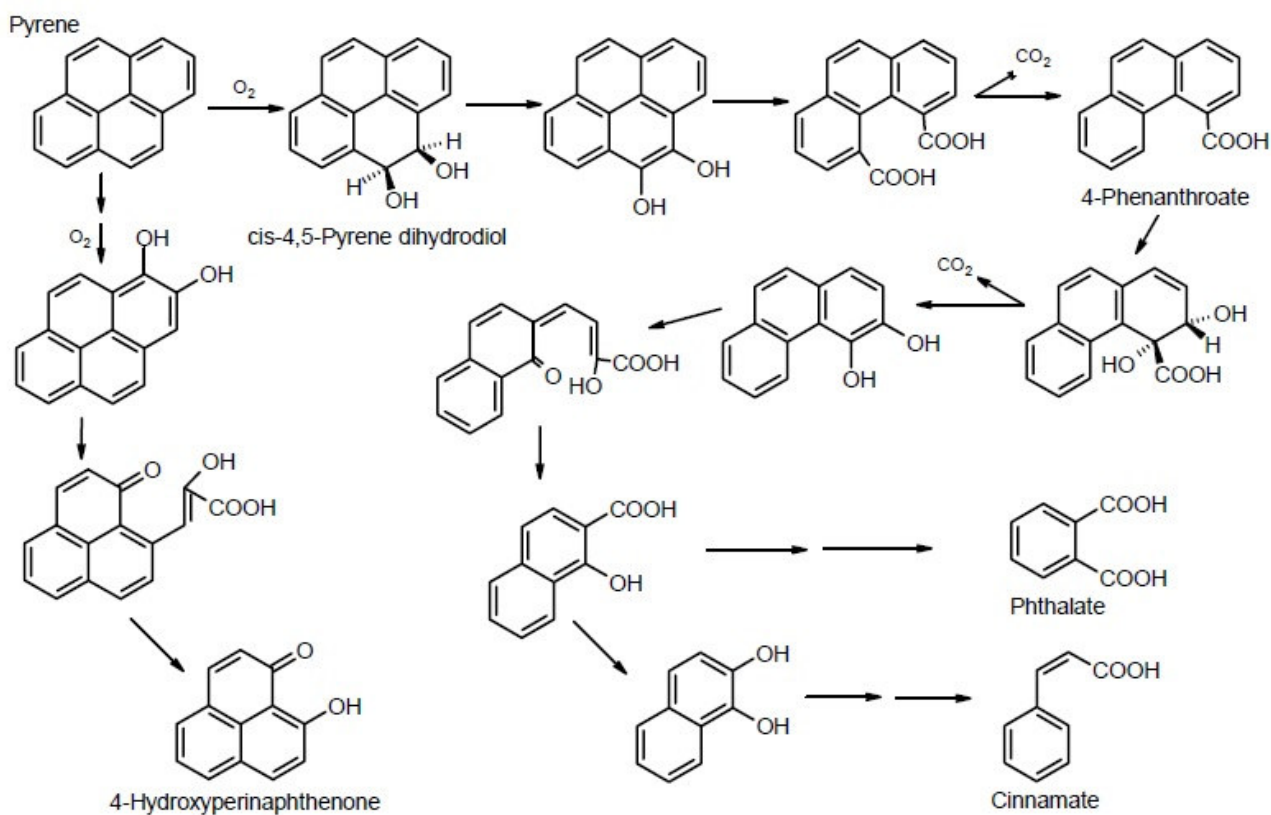
Obr. 7: Všeobecné cesty pro mikrobiální degradaci PAU, získáno od Cerniglia 1992 [3]

Tyto hlavní metabolické cesty byly ověřeny pro velké množství bakterií a hub, v čistých kulturách během degradace a určení různorodosti individuálních PAU zhodnocených od Cerniglia, Sutherland *a kol.* a Kanaly a Harayama. Vše je zobrazeno na **obr. 8** a **obr. 9**, které ukazují houbovitě a bakteriální metabolické cesty navrhované pro Pyr. [3]

Ať tak nebo onak, tyto a jiné navrhované cesty také ukazují, že se mnoho jiných reakcí může vyskytovat paralelně, zvláště během kometabolické degradace PAU. Např. jak je ukázáno na **obr. 8** a **obr. 9**, Pyr, Chin a 4-hydroxyperinafenon mohou být vytvořeny jako konečné produkty v podobnosti s hlavními cestami degradace užívané výše zmíněnými mikroorganismy. [3]



Obr. 8: Možné cesty metabolismu hub pro Pyr u *Penicillium glabrum*, získáno od Wunder a kol. 1997 [3]



Obr. 9: Možné cesty bakteriálního metabolismu Pyr u *Mycobacterium, sp. PYR-1*, založeno na práci Cerniglia 1992 [3]

2.7.4 Chemická degradace

PAU v půdě jsou také degradovány skrz neživé procesy. Oxidační reakce jsou nejdůležitější v této souvislosti, ačkoli fotochemické reakce mohou také výrazně přispívat do degradace na povrchu půd. Navíc většiny oksylichovadel obvykle umožní oxidační reakce v životním prostředí, tj. singletní kyslík ($^1\text{O}_2$), organické peroxidy, peroxid vodíku, ozón a radikálové jako jsou alkoxylové radikály ($\text{RO}\cdot$), peroxy radikály ($\text{RO}_2\cdot$) a hydroxyl radikály ($\text{HO}\cdot$) jsou buď přímo anebo nepřímo produkovány příslušnými fotochemickými procesy. Ať tak nebo onak, některé mohou také vznikat z anorganických solí a oxidů, zvláště pak železa a manganu. Chemické oxidační reakce zahrnující hydroxylové radikály, které jsou vygenerovány z peroxidu vodíku a ozónu, byly nejvíce studovány. Hydroxylové radikály jsou silné, relativně nespecifikované oksylichovadla, která reagují s aromatickými sloučeninami, jako např. PAU, při reakci odstraní vodíkové atomy a naváží se k dvojným vazbám. Ozónová molekula může napadnout dvojnou vazbu přímo, což ovšem může mít za následek tvorbu reaktivních hydroxyl radikálů rozkládající se vody. Reakční cesta, která následuje, je velice komplexní a dochází k tvorbě četných meziproduktů. Finální reakční produkt obsahuje pro obě oksylichovadla, směs ketonů, chinonů, aldehydů, fenolů a karboxylových kyselin. [3]

Fotochemická degradace PAU často zahrnuje stejné oxidační produkty, které jsou vyprodukované během čisté chemické oxidace PAU, tj. kyslík a hydroxylové aj. radikály. Co se týče komplexního produktu, tak se jedná o komplexní směs ketonů, chinonů, aldehydů, fenolů a karboxylových kyselin. [3]

2.8 Analytické metody pro stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků

Oficiální analytické metody jsou k dispozici pro některé z příslušných PAU v některých potravinových matricích, ale obecně je nedostatek úředně schválených metod, a ty zejména nezahrnují mnoho stanovení dibenzopyrenů či MCH. Jiné metody byly používány pro kvantifikaci druhé skupiny, což by mělo být bráno v úvahu při posuzování hlášení výsledků. Po homogenizaci potraviny jsou PAU získány pomocí různých technik před vyčištěním a měřením. PAU jsou nejčastěji identifikovány a kvantifikovány pomocí buď plynové chromatografie (GC) s detektorem plamenioionizačním (FID) nebo ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS) nebo HPLC s UV detekcí nebo fluorescenčním detektorem nebo ve spojení s MS. Použití FID již však nepatří mezi nejmodernější. Postrádá dostatečnou

selektivitu a neumožňuje použití izotopu k označení interní normy. [4]

V odpovědi na otázku týkající se analytické metody použité ke stanovení PAU 4 % laboratoří uvedla, že používají GC-FID, 28 %, že používá HPLC-FL, 26 %, že používá HPLC-UV/FL a 43 % uvedlo užívání GC-MS. Kromě možných ztrát PAU během homogenizace, extrakce a čištění, se vyskytuje řada dalších faktorů, které mohou vést k chybným výsledkům. Během odběru vzorků a skladování je důležité, aby vzorek nebyl vystaven tabákovému kouři a vysoké teplotě (což vede k vypařování anebo k chemické konverzi). I skladování po delší dobu před analýzou může vést k reakci některých PAU s komponenty potravinové matrice. [4]

Podrobnosti o přípravě vzorku byly uvedeny v podání, z nichž k nejčastějším metodám patřila extrakce kapalina/kapalina a zmýdelnění ve třepací vodní lázni při 60°C. Pozornost by měla být věnována možným koelucím některých PAU. Např. v rámci chromatografických podmínek obecně používaných, Chry + trifenylen, benzo [b + j +k] Flu, a dibenzo [a, h + a, c]Ant PAU se mohou spoluvyvíjet a vedou pouze ke vzniku jednoho píku. Při HPLC se používá oddělení BbF + Per, BkF + DBacA a BjF + BeP, což může být kritické. [4]

PAU jsou obvykle zastoupeny v potravinách v řádech $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Proto je postup analýzy následující: extrakce/hydrolýza, rozdělení fáze kapalina/kapalina, čistící proces, zakoncentrování, chromatografická separace a samozřejmě samotné stanovení. Ačkoliv jsou všechny kroky velmi důležité, chromatografická separace je nejdůležitější pro přesné vyhodnocení skutečných rizik, a to z důvodu, že např. BaP je velmi silná karcinogenní látka, avšak karcinogenní aktivita jeho izomeru BeP je naopak nízká. Metodika stanovení PAU byla silně ovlivněna stupněm vývoje chromatografických metod. Na počátku byla separace izomerů BaP pomocí papírové či kolonové chromatografie prakticky nemožná. S ohledem na komplex směsí PAU, přítomnost různých rušivých látek a potřebu vyhodnotit opravdu skutečné koncentrace nebezpečných látek, bylo nutné předejít problémům týkajících se tzv. „benzopyrenových frakcí“, jež se v této době skládaly z BaP a jeho izomerů BeP, BkF, BbF aj. [6]

V roce 1968 na společném zasedání IUCC a IUPAC společně pracující skupina specifikovala určité přípustné analytické metody, kterými mohou být separovány alespoň BaA, BaP, BeP, BghiP, Pyr, BkF a Kor. Studia specifických metod pro BaP a hlavní postup pro stanovení PAU byla určena pod záštitou AOAC a IUPAC. Proces spočíval v počátečním zmýdelnění vzorku v ethanolovém roztoku hydroxidu sodného, následoval částečný krok

mezi DMSO a alifatickým rozpouštědlem a kolonová chromatografie na deaktivovaném Florisilu. [6]

Tato metoda byla přijata AOAC oficiální první činností metody v roce 1973 a byla uznána jako doporučená metoda IUPAC. Statistické vyhodnocení dat získaných laboratorními testy, v nichž vzorky šunky byly obohaceny o BaP, BeP, BaA, BghiP na úroveň $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ a analyzovány pomocí zmíněné metody, vykazovaly chybu mezi 7,4 a 12 %. Na základě tohoto výsledku se stala tato metoda oficiální metodou AOAC. [6]

Výběr vhodné analytické metody pro finální stanovení PAU je ovlivněn především komplexností a koncentračními proporcemi analyzovaného vzorku. Nezahrnuje-li vzorek příliš široké spektrum PAU, lze obsah jednotlivých komponent stanovit přímo bez nutnosti separace s využitím vysoce citlivých fluorimetrických spektrálních metod. Většinou jsou však analyzované vzorky natolik složité, že je nezbytné před vlastní identifikační a kvantifikační krok předřadit účinnou separační techniku, nejčastěji plynovou nebo kapalinovou chromatografii. Analýza PAU pomocí plynové chromatografie je v současnosti v převážné míře prováděna na vysoce účinných křemenných kolonách s chemicky vázanou, zpravidla středně polární polysiloxanovou, stacionární fází. Z detekčních technik nachází kromě univerzální plamenoionizační detekce (FID) stále širší uplatnění přímé spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC-MS). Vysoce perspektivní pro identifikaci izomerních PAU se ukazuje spojení plynové chromatografie s UV detektorem, schopným měřit UV absorpční spektra separovaných složek v plynné fázi. [7]

Významné místo v analytice PAU zaujímá kapalinová chromatografie, v současnosti provozovaná výhradně ve vysokoúčinné modifikaci na kolonových náplních s velikostí částic pod $10 \mu\text{m}$ nepolárního charakteru (RP-HPLC), nejčastěji silikagelu s chemicky vázanými C18 řetězci, v kombinaci s vodnou polární mobilní fází (metanol-voda, acetonitril-voda). Podstatný význam pro úspěch analytické operace má rovněž volba selektivní a citlivé detekční koncovky. Z kapalinově chromatografických detektorů v případě PAU přicházejí do úvahy především ty, které pracují na principu absorpce UV záření a fluorescence. Nejmodernější a nejvýkonnější kapalinově chromatografickou identifikační techniku představují detektory schopné měřit UV absorpční nebo fluorescenční spektra separovaných složek "on-line" na výstupu z kolony, tzv. "diode array" detektory a detektory s rychle pohybujícím se monochromátorem. [7]

PAU v potravinách představují jen částečný problém z hlediska znečištění PAU v celém životním prostředí. Mnoho sloučenin PAU – zhruba 100 jich bylo izolováno a stanoveno v potravinách i životním prostředí – představuje skutečnou výzvu pro moderní analytické

metody. [8]

Různé chromatografické postupy, včetně kolonové, papírové a TLC, byly použity na izolování těchto látek z kontaminovaných vzorků. Některé z těchto metod se osvědčily pro získání přijatelných výsledků, obzvláště při stanovení jednotlivých PAU (např. BaP). Jelikož se tyto kontaminanty vyskytují jakožto komplexní směs PAU, analytické metody jsou potřeba k oddělení a určení různých typů PAU. Spolehlivé určení kontaminace potravin a ostatních složek životního prostředí vyžaduje stanovení různých PAU hlavně z pohledu významných rozdílů v jejich mutagenním a karcinogenním potenciálu jednotlivých sloučenin. GC a HPLC jsou nejčastěji používanými technikami ke splnění analytických požadavků. Problémy vznikají při odebírání vzorků, jejich přípravě a určení chromatografických podmínek. Analytické procesy na stanovení PAU v potravinách byly přezkoumávány a rozsáhle diskutovány. [8]

3. CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Studium procesů fotodegradace PAU je důležité pro optimalizaci podmínek výroby a zpracování potravinářských produktů. Při navrhování cílů diplomové práce jsme vycházeli ze skutečnosti, že se této problematice nevěnuje náležitá pozornost a existující studie nepopisují procesy tvorby a degradace BaP v potravinách na náležité úrovni.

Cíle práce byly navrženy následovně:

- Výběr vhodných metod pro studium procesů fotoindukované degradace BaP v různých modelových systémech využitím moderní instrumentální techniky, zejména GC-MS a HPLC-MS-MS
- Identifikace sloučenin vznikajících v procesu fotooxidace BaP v modelových systémech
- Studium vlivu experimentálních podmínek (rozpouštědla s různou polaritou, různé zdroje osvětlení a vlnové délky použitého záření) na rychlost eliminace BaP
- Sledování vlivu vybraných antioxidantů na rychlost fotooxidace BaP

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Přístroje a zařízení

- Skleněný reaktor (Photochemical Reactors LTD, Berkshire RG4 9PA UK)
- Rtuťová výbojka (Photochemical Reactors LTD, Berkshire RG4 9PA UK)
- Xenonová výbojka (UV Protective Eyewear, UVC-503, Upland, CA 91786)
- Luxmetr (Pancontrol, PAN LX 1308, Wien, Rakousko)
- HPLC sestava 1 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko) skládající se z pumpy LC-20AD, autosampleru SCL-20A, termostatu kolon oven CTO-20A, detektoru s diódovým polem PDA(DAO) SPD-M20A a fluorescenčního detektoru RF-10AXL
- HPLC sestava 2 (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) Agilent Technologies 1200 Series skládající se z pumpy, degasseru, autosampleru, termostatu kolon, spektrofotometrického detektoru a MS detektoru Agilent Technologies 6410 (Triple Quad) s možností připojení následujících typu iontových zdroju ESI, APCI, APPI
- GC sestava (Agilent Technologies GC 6890N, Palo Alto, California, USA) s hmotnostním spektrometrem 5973 inert mass selective Spectrometer.

4.2 Použité chemikálie

- Methanol, pro HPLC (J.T.Baker, Deventer, Holandsko)
- Acetonitril, pro HPLC (J.T.Baker, Deventer, Holandsko)
- *n*-hexan (Merck, Darmstadt, Německo)
- tricaprylin (glyceryltrioktanoat) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Benzo[*a*]pyrén, p.a. (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
- Benzo[*a*]pyrén-6,12-dion (National Cancer Institute's Chemical Carcinogen Repository, Midwest Research Institute, Kansas City, MO, USA)
- Benzo[*a*]pyrén-9,10-dihydrodiol (National Cancer Institute's Chemical Carcinogen Repository, Midwest Research Institute, Kansas City, MO, USA)
- 9,10-dihydrobenzo[*a*]pyrén-7(8H)-on (Chiron Ltd, Trondheim, Norsko)
- 3-hydroxybenzo[*a*]pyrén (IRMM, Geel, Belgie)

4.3 Pracovní postupy

4.3.1 Příprava roztoků standardů a kalibračních roztoků

Bylo odváženo přibližně přesně 0,010 g BaP do 100 ml odměrné baňky a byl doplněn methanolem po značku.

Takto byl získán zásobní roztok A, ze kterého bylo odpipetován 1 ml do 10 ml odměrné baňky a po doplnění byl získán pracovní roztok B. Z pracovního roztoku B bylo vzato 10; 20; 30; 40 a 50 μl do 10 ml odměrných baněk a zase doplněno methanolem po značku. Byly tedy připraveny roztoky o koncentraci 10; 20; 50; 100 a 200 $\mu\text{g/L}$. Stejným způsobem byly připraveny kalibrační roztoky v směsích rozpouštědel, jen 10 ml odměrné baňky byly doplněny po značku směsí n-hexan-metanol (1:9, v:v) resp. tricaprylin-metanol (1:9, v:v)

4.3.2 Fotodegradace BaP

4.3.2.1 v roztoku ozařovaném pomocí UV lampy

a) izotermické podmínky

Byly připraveny roztoky BaP o koncentraci 50, 100 a 150 $\mu\text{g/L}$ ve vybraných rozpouštědlech (methanol, n-hexán, tricaprylin). Následně bylo provedeno ozařování pomocí UV lamp, tj. rtuťové ($\lambda = 254 \text{ nm}$) anebo xenonové vybojky ($\lambda = 365 \text{ nm}$) a odebrání vzorku v časových intervalech (n-hexan časy: 0; 15; 30; 45; 60; 75; 90; 105; 120; 150 a 180 min, methanol časy: 0; 5; 10; 15; 25; 35; 45; 55; 65 a 75 min, tricaprylin časy 0; 15; 30; 45; 60; 75; 90; 105; 120; 150 a 180 min), přičemž během celé doby ozařování byl roztok temperován na požadovanou teplotu. K odebranému vzorku (100 μl roztoku) bylo přidáno 900 μl methanolu a byla provedena HPLC analýza. Při každých podmínkách byly vykonané paralelní měření.

b) neizotermické podmínky

Postup při neizotermických podmínkách byl stejný, jen se lišilo programovaným zvyšováním teploty během celé doby ozařování.

c) izotermické podmínky v přítomnosti aditivních látek

Byly připraveny roztoky BaP o koncentraci 100 $\mu\text{g/L}$ v tricaprylinu, který obsahoval 100 mg/L BHT resp. guaiakolu. Následně bylo provedeno ozařování pomocí xenonové vybojky ($\lambda = 365 \text{ nm}$) a odebrání vzorku v časových intervalech 0; 15; 30; 45; 60; 75; 90; 105; 120 a 150 min, přičemž během celé doby ozařování byl roztok temperován na

požadovanou teplotu. K odebranému vzorku (100 µl roztoku) bylo přidáno 900 µl methanolu a byla provedena HPLC analýza. Při každých podmínkách byly vykonané paralelní měření.

4.3.2.2 na tenké vrstvě (na filmu)

a) UV lampou

Byly připraveny roztoky BaP o koncentraci 50, 100, 150 a 200 µg/L, do skleněné patrony byl napipetován 1 ml daného vzorku a pomocí plynného N₂ došlo k vysušení. Následně bylo provedeno ozařování pomocí UV lampy (xenonové vybojky, $\lambda = 365$ nm) a odebírání vzorku v časových intervalech (1; 2; 3; 4; 5; 10; 20 a 30 min), přičemž byly vykonány měření v triplicátech. Po ozáření se přidal 1 ml methanolu a po rozpuštění se odebralo 100 µl roztoku. Bylo přidáno 900 µl methanolu a byla provedena HPLC analýza.

Pomocí Luxmetru byla změřena intenzita záření UV lampy: 11,55 kLux.

b) denním světlem (slunečním zářením)

Postup při reálných podmínkách byl stejný, jen se lišil zdroj ozařování, to bylo prováděno pomocí slunečního záření, časové intervaly byly prodlouženy na 30; 60; 90; 120 a 180 min. Každých 30 min byla měřena intenzita záření v kLux pomocí Luxmetru. Po ukončení záření byl přidán 1 ml methanolu, po rozpuštění se odebralo 100 µl roztoku, bylo přidáno 900 µl methanolu a byla provedena analýza HPLC.

4.3.3 Příprava vzorků BaP na identifikaci rozkladných produktů

Rozklad BaP ($c = 20$ mg/L) byl proveden v polárním rozpouštědle (methanolu) a v nepolárním rozpouštědle (*n*-hexanu) v 75 ml skleněném reaktoru s UV lampou ($\lambda = 254$ nm). Doba fotooxidace byla 24 h. Vzorky byly analyzované GC-MS i HPLC-MS.

4.3.4 Identifikace pomocí HPLC-PDA-FLD-MS

HPLC zařízení s fluorescenčním, dioda-array a třípolový kvadrupól MS-MS detektory byly použity pro detekci výrobků, které vznikají při kontrole fotolýzy. Použitá zařízení byla od firmy Agilent Technologies (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Separace byla provedena při 35°C na Zorbax Eclipse XDB-C18 (50 mm x 4,6 mm, 1,8 µm) koloně a gradientové eluci methanolem a vody při průtoku 0,5 ml/min. Parametry pro použití fluorescenčního detektoru

($\lambda_{\text{Ex}} = 300 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 410 \text{ nm}$), byly stanoveny pro BaP detekci a UV/VIS chromatografické údaje byly shromážděny v rozmezí od 220 nm do 550 nm detektorem s diodovým polem. Následující instrumentální parametry byly použity pro LC-MS analýzu produktů rozkladu BaP: zdroj iontů APCI v pozitivním režimu skenování: sušení plynu (N_2), průtok 6 l/min., Teplota plynu 350° C, odpařovač o teplotě 250° C, rozprašovač tlaku 20 psi, kapilární napětí 2,5 kV, fragmentor energie 140 V, scanovací čas 500 ms, scan range ($m/z \sim 100$ do 600), v pozitivním produktu ion režimu (pro měření fragmentace modelu): stejné jako předchozí a kolize energie 40 eV, doba prodlevy 100 ms. To je optimální nastavení pro standardní materiály použité při analýze.

4.3.5 Identifikace pomocí GC-MS

Analýza byla realizována na plynovém chromatogramu 6890N ve spojení s hmotnostním spektrometrem 5973 inert mass selective Spectrometer (Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA). Pracovali jsme s J & W 123-5731 DB-5HT o rozměrech 30m x 0,32 mm x 0,1 μm a teplotním programem 60 ° C, 10 / min do 350 ° C při průtoku helia jako nosného plynu 1,9 ml / min. Vzorek se dávkované v režimu pulzní splitless při teplotě 280 ° C. Rozsah sledovaných hmotností byl 29 -500 daltonů.

4.3.6 Měření kinetiky - HPLC analýza

Stanovení obsahu BaP při měření jeho kinetiky fotodegradace se uskutečnilo na koloně Zorbax Eclipse XDB-C18 (50mm x 4,6 mm, 1,8 μm) s isokratickou elucí methanolem o průtoku 0,5 ml/min a při 35°C. Detekce byla použita fluorescenční ($\lambda_{\text{Ex}} = 300 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{Em}} = 410 \text{ nm}$). Obsah BaP v ozářených vzorcích se vypočte z lineární kalibrační závislosti (pracovní rozsah 0,2 $\mu\text{g/L}$ – 20 $\mu\text{g/L}$).

4.4 Statistické metody zpracování

- Na porovnání středních hodnot dvou souborů se použil Lordův test [9]

Lordovo kritérium u pro počet měření $n = n_A$ (vzorek čistého analytu) = n_B (matriční vzorek) se vypočítá jako:

$$u = \frac{|x_A - x_B|}{R_A + R_B} \quad (1)$$

Kde x_A je průměrná hodnota výsledků souboru A, x_B je průměrná hodnota výsledků souboru B,

R_A je rozpětí hodnot souboru A (všeobecně $R = x(\max) - x(\min)$), R_B je rozpětí hodnot souboru B

Pokud platí, že $u > u_\alpha$, je rozdíl $|x_A - x_B|$ statisticky významný, pokud $u < u_\alpha$, je přijata nulová hypotéza, že rozdíl $|x_A - x_B|$ je možno vysvětlit přítomností náhodných chyb obou výsledků.

5. VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Výběr vhodných podmínek pro separaci oxidovaných forem BaP

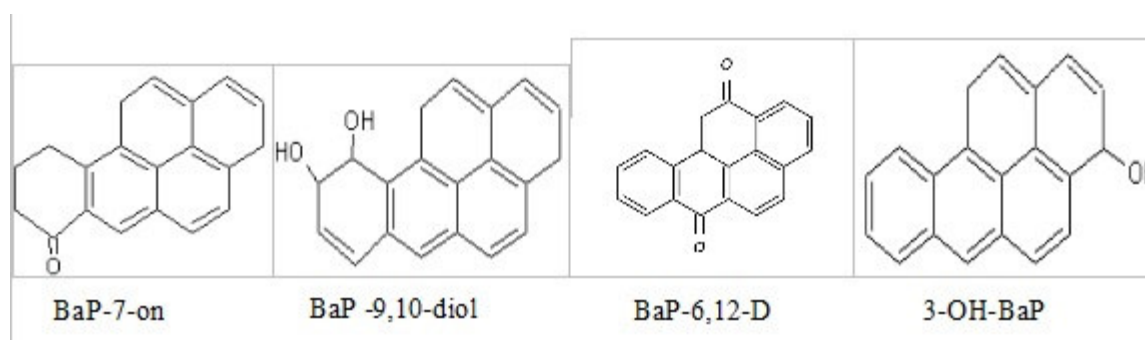
Na začátku řešení problému, kdy byly k dispozici pouze první 4 standardy (tj. BaP612D, BaP-9,10-diol, 3OHBaP a BaP-7-one), na základě jejich struktur (*obr. 10*) se hledala vhodná analytická kolona a vhodné složení mobilní fáze na jejich separaci, jakož i na separaci dalších látek vznikajících fotolýzou BaP, přičemž se předpokládalo, že by mohly vznikat látky polárnejší i méně polární jako BaP. Vycházeje z metod stanovení PAU se zvolila kolona Zorbax Eclipse XDB-C18 s chemicky vázaným oktadecylsilánem (rozměry: 4,6 x 50 mm, průměr částic 1,8 μm) a uvažovalo se o gradientové elucí. Průtok mobilní fáze byl limitován nejen velikostí částic ale i typem detektoru (MS) a složení mobilní fáze bylo limitováno použitím různých typů ionizace (elektrosprej ESI, chemická ionizace za atmosférického tlaku APCI, fotoionizace při atmosférickém tlaku APPI), zatímco pro sledované komponenty bylo třeba vhodně nastavit pár dalších parametrů (energií fragmentoru, teplotu sušícího plynu, průtok sušícího plynu, nebulizační tlak, napětí v kapiláře, ...). Na úvod jsme si pomohli klasickými způsoby detekce (např. detekce diodovým polem v UV a viditelné oblasti, fluorescence).

Způsob detekce sledovaných látek vychází z jejich struktury. Obsahují benzenové jádro, na kterém mohou být sledovány $\pi \rightarrow \pi^*$ elektronové přechody a zároveň ve své molekule obsahují atom kyslíku, který je nositelem volného elektronového páru a mohou být sledovány $n \rightarrow \sigma^*$ nebo $n \rightarrow \pi^*$ elektronové přechody. To znamená, že tyto látky absorbují záření v ultrafialové a viditelné oblasti. Jejich absorpční maxima se nacházejí v oblasti 260 - 300 nm resp. 360 - 420 nm [10].

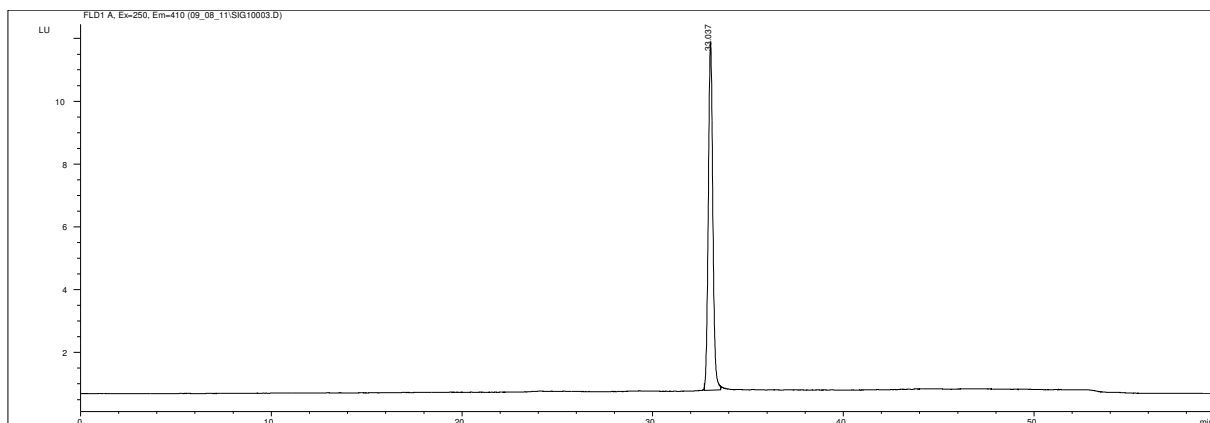
Navržené chromatografické podmínky poskytují separaci BaP (ret. čas 33 min., *obr. 11*) a 4 různých oxidovaných produktů (*obr. 12*).

Naše pozornost se soustředila pouze na ty oxidované produkty, které byly k dispozici a pokračovalo se výběrem ionizační techniky a hledáním vhodných parametrů pro detekci hmotnostní spektrometrií. Vyzkoušeli se následující ionizační techniky (ESI, APCI, APPI), přičemž z literatury je známo, že pro detekci BaP jako nepolární molekuly je vhodná ionizace

APPI [11]. Vycházejí z dostupné literatury [11, 15] pro oxidované formy BaP, které ve své molekule obsahují volný elektronový pár na atomu kyslíku, se předpokládalo, že vhodnějšími ionizačními technikami by mohly být ESI resp. APCI. V **tab.3** jsou uvedeny plochy píků vybraných analytů a charakteristických přechodů prekurzoru na produktové ionty v tzv. MRM módu zjištěné při použití různých ionizačních technik v pozitivním módu. Z jejich srovnání je zřejmé, že pro BaP-9,10-diol, 3OHBaP a BaP-7-one byly nejlepší odezvy získány chemickou ionizací za atmosférického tlaku a pouze pro BaP612D se nejvhodnější jevila technika fotoionizace. Pro další experimenty se používala APCI v pozitivním módu, aby se v jednom experimentu mohlo získat maximum informací.

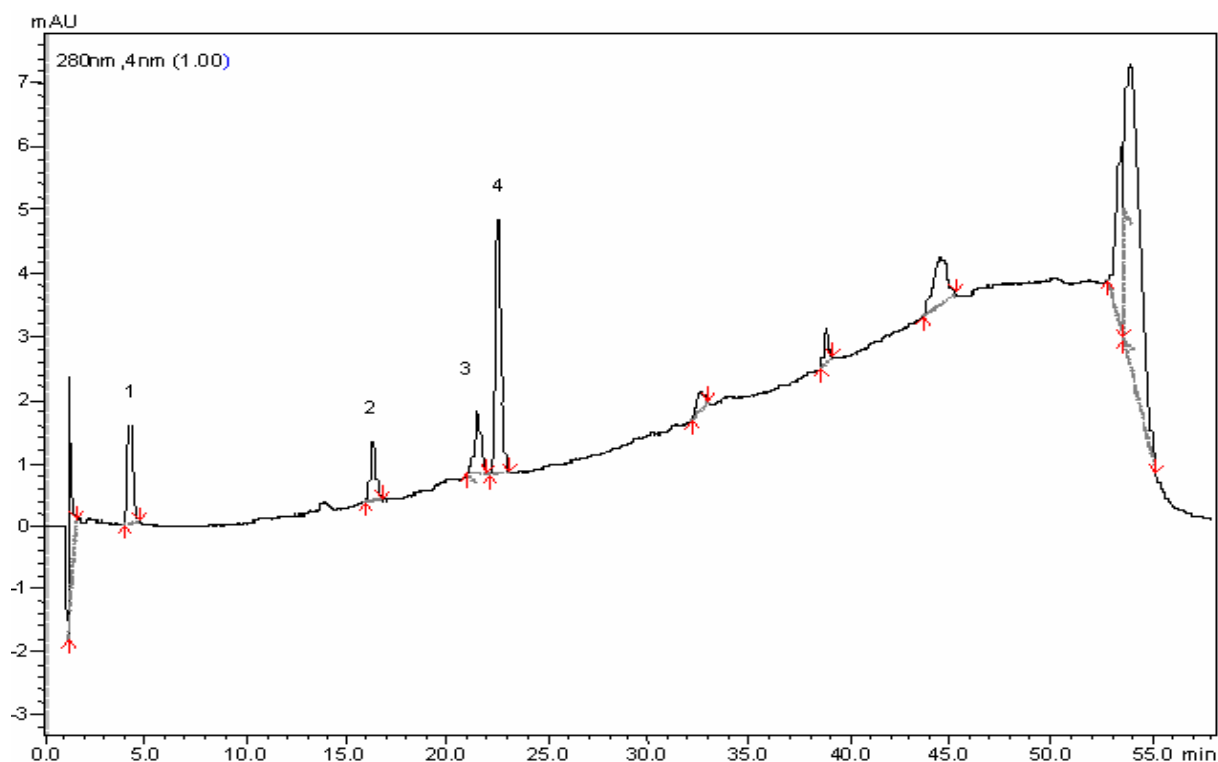


Obr. 10: *Struktura oxidovaných forem BaP*



Obr. 11: Chromatografický záznam roztoku BaP ($c = 100 \mu\text{g/L}$) v methanole, fluorescenční detekce $E_x = 250 \text{ nm}$, $E_m = 410 \text{ nm}$

(Chromatografické podmínky: kolona Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 mm x 50 mm; 1,8 μm); průtok mobilní fáze $0,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; gradient 0. – 3. min. 60 % methanol, 40 % voda, 43. – 50. min. 100 % methanol, 52. – 58. min. 60 % methanol, 40 % voda (ustalování podmínek); teplota kolony 35°C ; dávkovaný objem $10 \mu\text{L}$)



Obr. 12: Chromatografický záznam roztoku BaP-trans-9,10-dihydrodiolu

(označení 1, ret. čas 4,0 min., $c(\text{BaP-9,10-diol}) = 3,65 \mu\text{g/ml}$), BaP612D (označení 2, ret. čas 16,5 min., $c(\text{BaP612D}) = 3,9 \mu\text{g/ml}$), 3OHBaP (označení 3, ret. čas 21,74 min., $c(3\text{OHBaP}) = 12 \mu\text{g/ml}$) a 9,10-dihydro-BaP-7(8H)-ónu (označení 4, ret. čas 22,24 min., $c(\text{BaP-7-one}) = 3,65 \mu\text{g/ml}$) v methanolu)
(chromatografické podmínky viz obr. 21, UV detekce $\lambda = 280 \text{ nm}$)

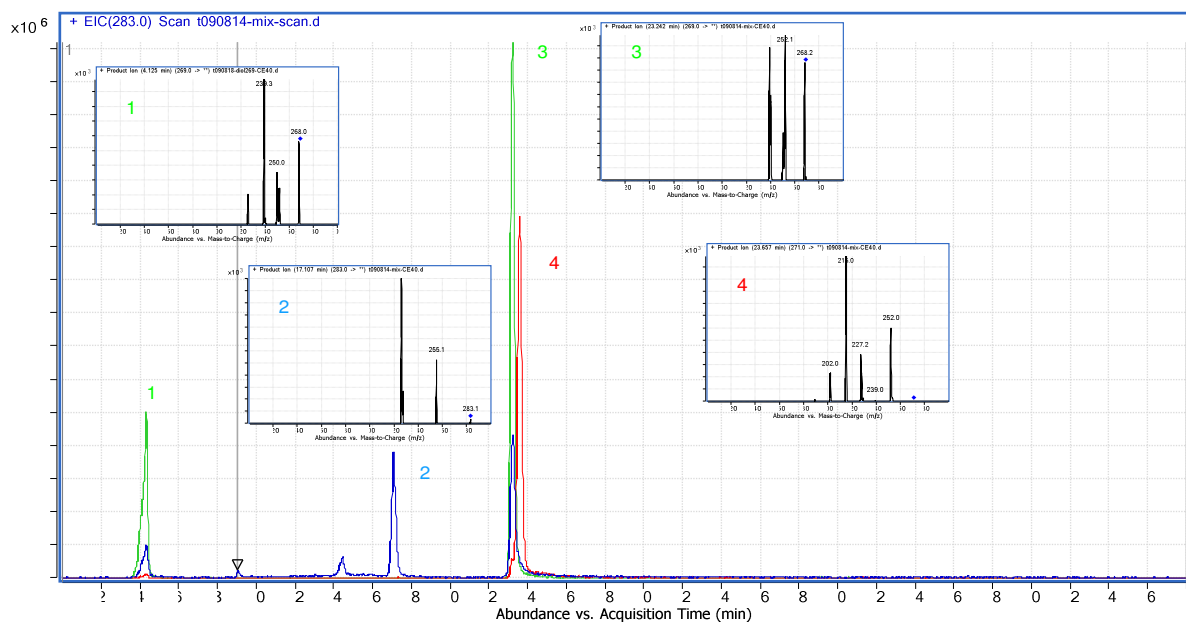
Tab. 3: Plochy píků sledovaných analytů při různých podmínkách ionizace v pozitivním módě ($c(\text{BaP-9,10-diol}) = 3,65 \mu\text{g/ml}$; $c(\text{BaP612D}) = 3,9 \mu\text{g/ml}$; $c(3\text{OHBaP}) = 12 \mu\text{g/ml}$; $c(\text{BaP-7-one}) = 3,65 \mu\text{g/ml}$)

Sledované fragmentační přechody pro vybrané analyty v MRM módě	ESI	APCI	APPI
	Podmínky: teplota sušícího plynu (N_2) 350°C , průtok sušícího plynu (N_2) $6 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, nebulizační tlak 20 psi, napětí na kapiláře 4000 V, napětí na fragmentoru 140 V, energie v kolízní cele 45 eV	Podmínky: teplota sušícího plynu (N_2) 350°C , teplota vypařování 250°C , průtok sušícího plynu (N_2) $6 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, nebulizační tlak 20 psi, napětí na kapiláře 2500 V, napětí na fragmentoru 150 V, energie v kolízní cele 45 eV	Podmínky: teplota sušícího plynu (N_2) 350°C , teplota vypařování 350°C , průtok sušícího plynu (N_2) $6 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, nebulizační tlak 60 psi, napětí na kapiláře 2000 V, napětí na fragmentoru 140 V, energie v kolízní cele 45 eV
BaP-9,10-diol			
269 → 239	35971	189160	1182
269 → 250	18466	101649	630
BaP612D			
283 → 226	8520	9416	25979
283 → 255	1040	728	2361
3OHBaP			
269 → 239	3212	66201	8016
269 → 252	1486	30274	4722
BaP-7-one			
271 → 215	10338	44447	6197
271 → 252	2932	12980	1947

Na **obr. 13** je ilustrativní záznam překrytých extrahovaných iontových chromatogramů (EIC) pro sledované standardy při použití APCI v pozitivním módu, přičemž chromatografické podmínky zůstaly nezměněny. BaP-9,10-diol eluuje v čase 4,1 min. a jeho molekulová hmotnost je $286 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, avšak pozorovaný byl iont m/z 269, což by mohlo odpovídat iontu $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$. 3OHBaP eluuje zase v čase 23,0 min., jeho molekulová hmotnost je $268 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a v kladném módě byl pozorován vznik pseudomolekulového iontu $[\text{M} + \text{H}]^+$ s m/z 269. Obě sloučeniny obsahují ve své molekule -OH skupinu a mohly by poskytovat odezvu v negativním módu. BaP612D se eluuje v čase 16,7 min., Jeho molekulová hmotnost je $282 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a v kladném módě byl pozorován vznik iontu $[\text{M} + \text{H}]^+$ m/z 283. BaP-7-one eluuje v čase 23,3 min., jeho molekulová hmotnost je $270 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ a v kladném módě byl pozorován vznik iontu $[\text{M} + \text{H}]^+$ s m/z 271. U těchto dvou sloučenin se nepředpokládá odezva v negativním módu.

Z fragmentačních schémat BaP-9,10-diolu a 3OHBaP je zřejmé, že poskytují některé fragmenty se stejným m/z (např. 268, 252, 239, 226), ale v různém vzájemném poměru, co by

mohlo sloužit později jako další ověřovací kritérium. Naproti tomu schémata fragmentace pro BaP612D a BaP-7-one jsou rozdílné. Všechny dosavadní informace tvoří základ pro následující pokusy identifikovat vzniklé oxidované produkty BaP po fotolýze v methanolu nebo hexanu metodou HPLC/MS/MS. Hlavním handicapem této techniky je, že zatím neexistují knihovny spekter, které by se mohly využít při řešení podobných problémů.



Obr. 13: Překryté extrahované iontové chromatografické záznamy (EIC) roztoku směsi standardů oxidovaných forem BaP (koncentrace jednotlivých analytů jsou uvedeny v textu k obr.22) chemicky ionizovaných při atmosférickém tlaku v pozitivním módu (APCI +) spolu s jejich fragmentačními schémata (použitá kolizní energie 40eV); (1) (BaP-9,10-diol), m/z 269 (2) BaP612D, m/z 283; (3) 3OHBaP, m/z 269 (4) (BaP-7-one), m/z 271

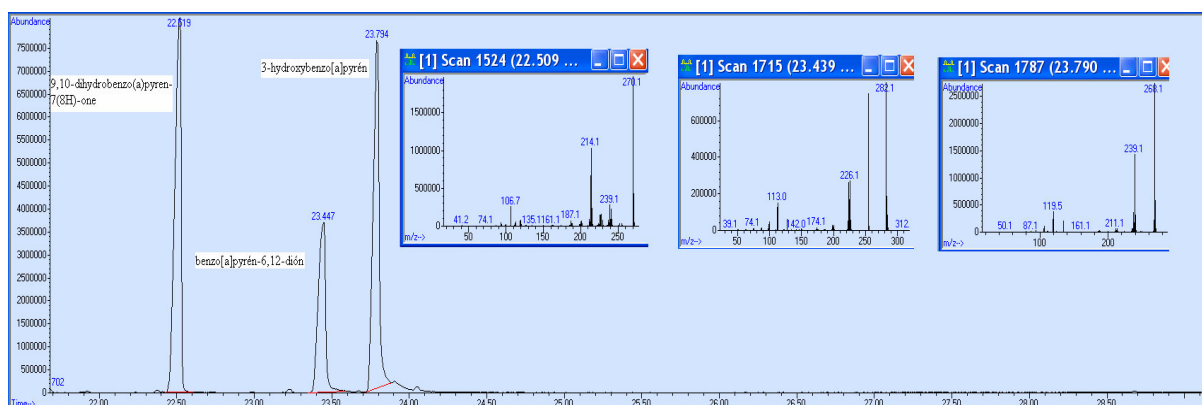
(Chromatografické podmínky viz **obr. II**, podmínky MS detekce: teplota sušícího plynu (N_2) 350°C, teplota vypařování 250°C, průtok sušícího plynu (N_2) 6 L.min⁻¹, nebulizační tlak 20 psi, napětí na kapiláře 2500 V, napětí na fragmentoru 150 V, dwell time 50 ms)

5.2 Identifikace produktů oxidace BaP metodami GC/MS aHPLC/MS/MS

5.2.1 GC/MS analýza

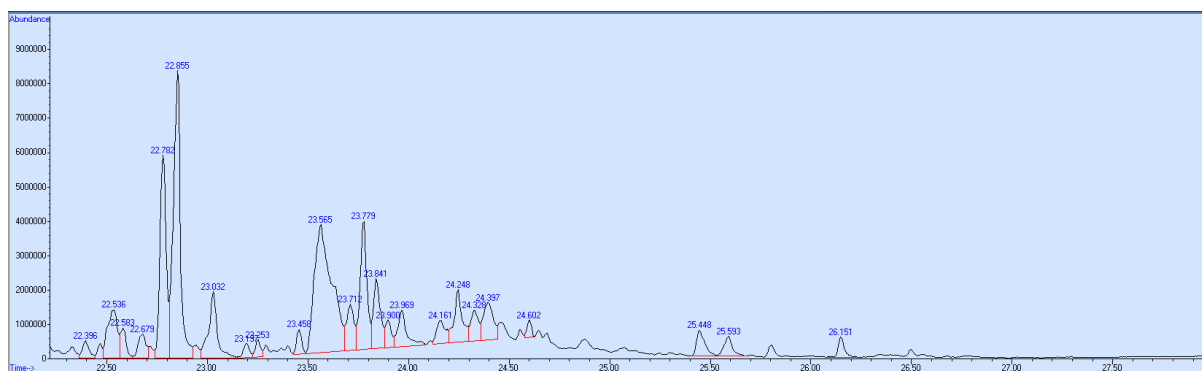
Analýza byla realizována na plynovém chromatogramu 6890N ve spojení s hmotnostním spektrometrem 5973 inert mass selective Spectrometer (Agilent Technologies, Palo Alto, California, USA). Pracovali jsme s J & W 123-5731 DB-5HT o rozměrech 30m x 0,32 mm x 0,1 μ m a teplotním programem 60 ° C, 10 / min do 350 ° C při průtoku helia jako nosného

plynu 1,9 ml/min. Vzorek se dávkované v režimu pulzní splitless při teplotě 280 ° C. Rozsah sledovaných hmotností byl 29 -500 daltonů. Záznam standardů je na **obr. 14**.



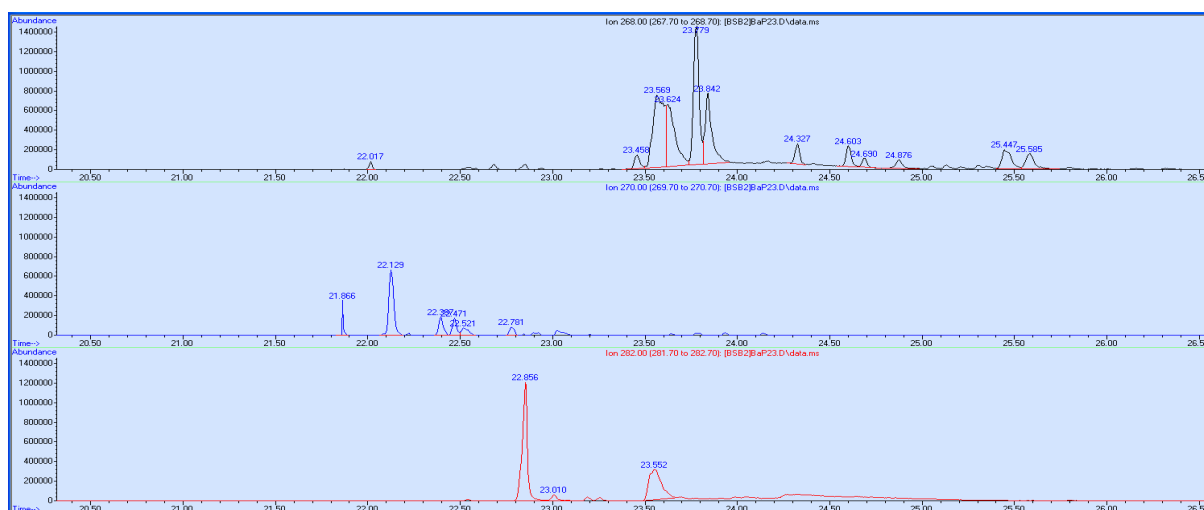
Obr. 14: Chromatogram vybraných standardů a jejich hmotnostních spekter

3OHBaP eluje jako symetrický pík i bez derivatizace, eluce dihydrodiolu se však nepozorovala a tento pík se výhodně stanovil metodou HPLC/MS/MS. Na základě získaných výsledků jsme se zaměřili na analýzu oxidovaných produktů BaP, které vznikly 24-hodinovou fotolýzou v methanolu a n-hexanu. Jak se však ukázalo v methanolu vznikaly hlavně metoxyderiváty oxidovaných produktů. Jejich identifikace je však vzhledem k nedostupnosti standardů i jejich hmotnostní spektrometrii mimořádně obtížná. Navíc je jejich vznik v uzených masných výrobcích pouze málo pravděpodobný vzhledem k nepřítomnosti methanolu. Z uvedeného důvodu jsme se zaměřili na analýzu oxidovaných BaP v hexanu, který je svojí polaritou více podobný lipofilnímu prostředí reálných vzorků. Získaný záznam je na **obr. 15**.



Obr. 15: Chromatogram oxidovaných produktů BaP v hexanu po 24-hodinové fotolýze

Jak vidno, jedná se o poměrně komplikovanou směs oxidovaných produktů, přičemž ve většině elučních křivek eluuje několik komponentů. Je to způsobeno zejména tím, že vzhledem k vysoké teplotě varu analyzovaných sloučenin není možné použít dlouhou kapilární kolonu s hrubým filmem stacionární fáze, což značně snižuje separační schopnost kolony. Jak vidno ze získaných fragmentogramů na **obr. 16** (m/z 268 pro hydroxy, m/z 270 pro -óny a m/z 282 pro diony BaP) pozorována přítomnost všech tří typů sloučenin.



Obr. 16: Fragmentogram oxidovaných forem BaP

V případě hydroxyderivátů lze pozorovat výrazný pík 3OHBaP, poloha hydroxy skupiny ostatních přítomných derivátů nebyla důvodu nedostupnosti standardů dosud určena. V případě dionů se pozorovala přítomnost BaP612D, který však pravděpodobně koeluuje s dalším dionem. Píku s retenčním časem 22,856 min byla na základě zjištěného hmotnostního spektra přiřazena struktura dionu.

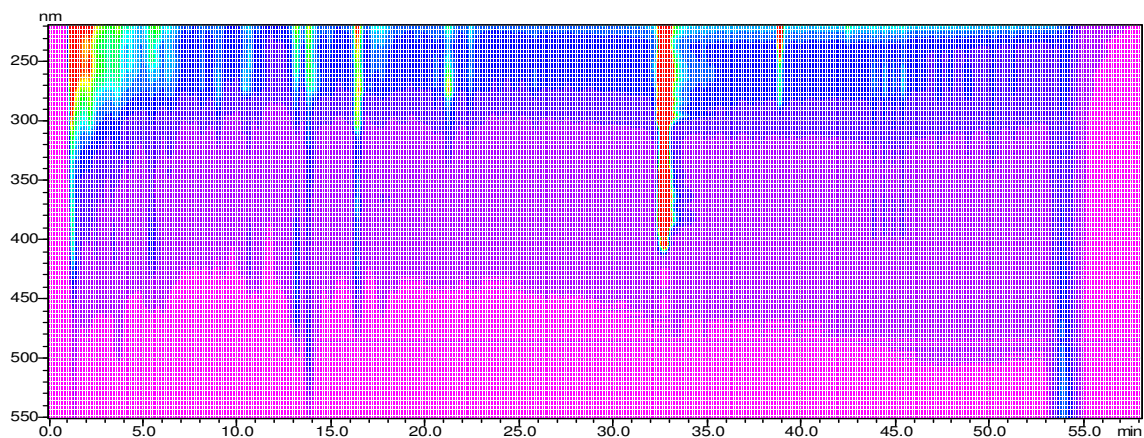
5.2.2 HPLC analýza oxidovaných forem benzo[a]pyrénu

Cílem této části diplomové práce bylo najít vhodný chromatografický systém pro stanovení kyslíkatých forem BaP vznikajících při jeho fotodegradaci. Z literatury [3] je známo, že mohou vznikat různé oxidované formy (hydroxyderiváty, dihydroxyderiváty, epoxideriváty, chinonové sloučeniny ...), ale je problém jejich komerční dostupnost. Z tohoto důvodu se postupovalo řešením dílčích úkolů. Byly k dispozici následující 4 standardy (BaP612D, BaP-9,10-diol, 3OHBaP a BaP-7-one), které reprezentovaly jednotlivé typy oxidovaných produktů BaP. Předpokládalo se, že vybrané sloučeniny by mohly vznikat fotolýzou BaP a jejich

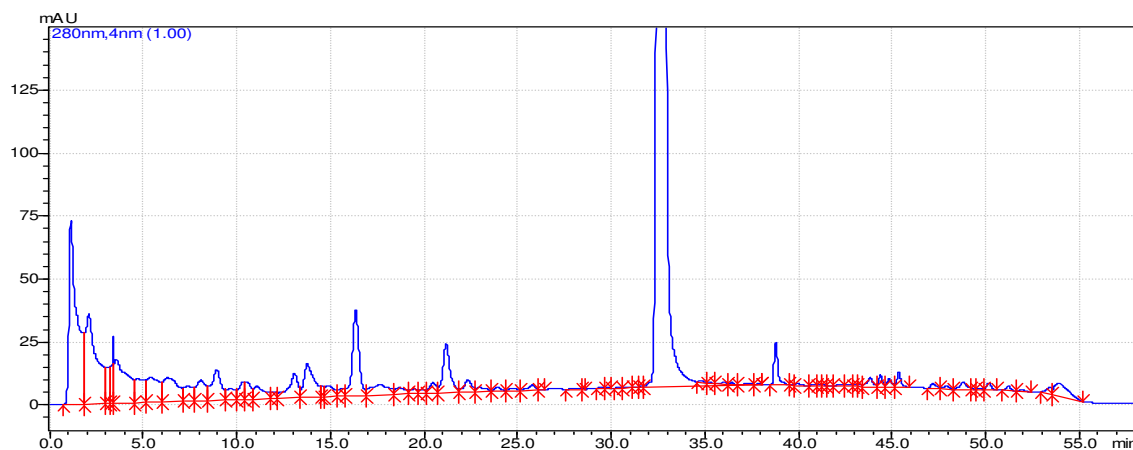
polohové izomery by mohly poskytovat stejné fragmentační ionty v hmotnostním spektru, tj. jejich rozlišení by bylo možné pouze díky použité separační technice.

5.2.2.1 Ověření vhodnosti chromatografických podmínek pro separaci degradačních produktů benzo[a]pyrénu

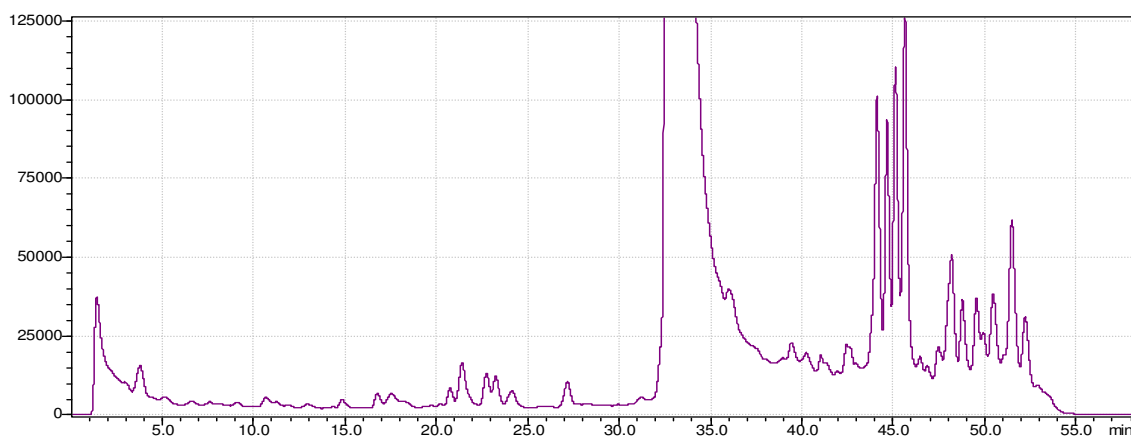
Navržené chromatografické podmínky poskytují separaci BaP (ret. čas 33 min., **obr.11**) a 4 různých oxidovaných produktů (**obr.12**), přičemž je třeba ověřit, zda poskytuje dostatek prostoru pro separaci sloučenin vzniklých v modelových systémech, tj. po 24-hodinové fotolýze BaP v methanolu a *n*-hexanu. Použily se dostupné způsoby detekce a na **obr. 14-22** jsou zobrazeny chromatografické záznamy při spektrofotometrické, fluorescenční i MS detekci.



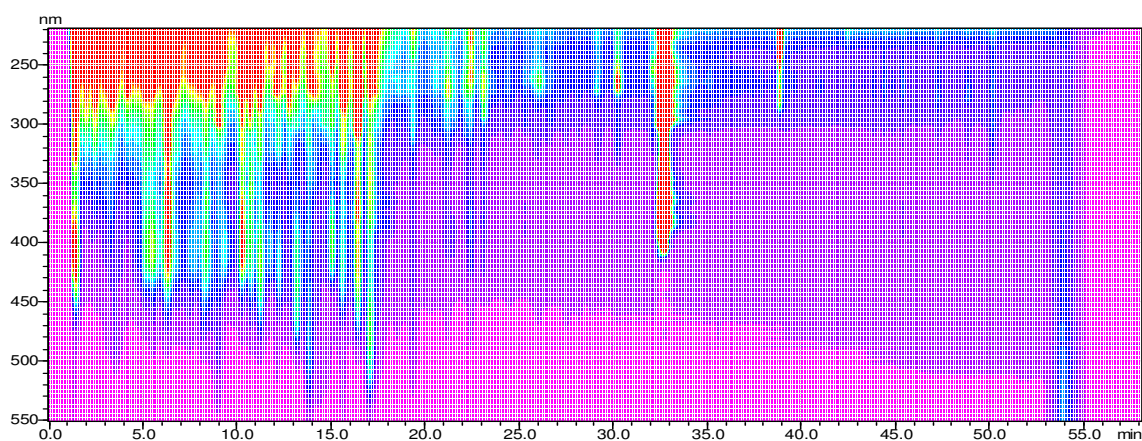
Obr. 14: Chromatografický záznam roztoku BaP ($c = 20 \text{ mg/L}$) po fotooxidaci v *n*-hexanu
(Chromatografické podmínky, viz **obr. 11**: detekce 220 nm – 550 nm)



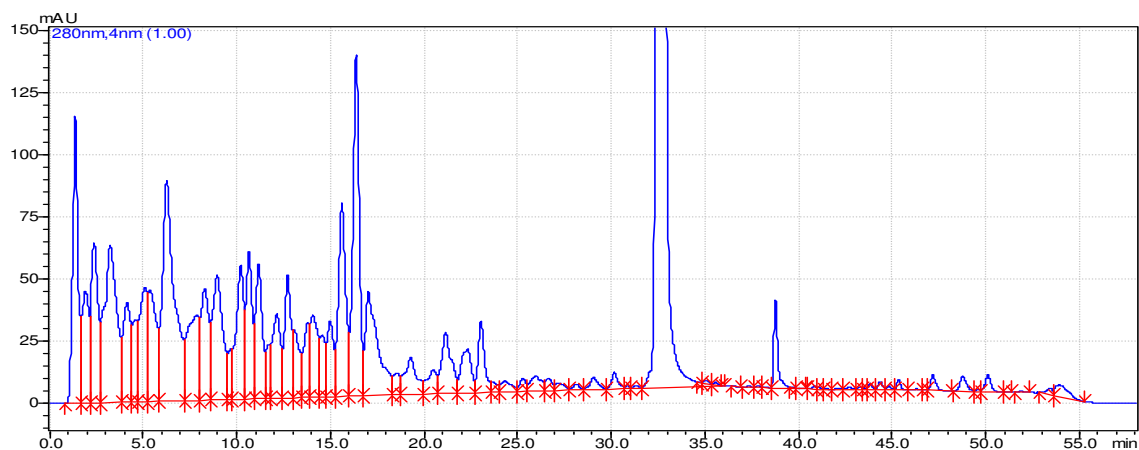
Obr. 15: Chromatografický záznam roztoku BaP ($c = 20 \text{ mg/L}$) po fotooxidaci v *n*-hexanu
(Chromatografické podmínky: viz **obr. 11**; UV detekce $\lambda = 280 \text{ nm}$)



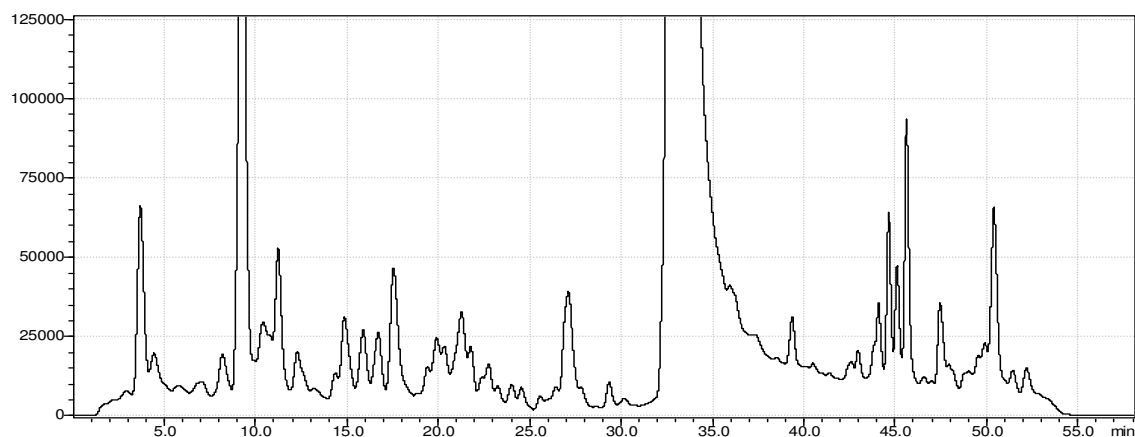
Obr. 16: Chromatografický záznam roztoku BaP ($c = 20 \text{ mg/L}$) po fotooxidaci v *n*-hexanu
(Chromatografické podmínky: viz **obr. 21**; detekce FLD detekce $E_x = 250 \text{ nm}$, $E_m = 410 \text{ nm}$)



Obr. 17: Chromatografický záznam roztoku BaP ($c = 20 \text{ mg/L}$) po fotooxidácii v methanolu
(Chromatografické podmínky: viz **obr. II**; detekce 220 nm – 550 nm)



Obr. 18: Chromatografický záznam roztoku BaP ($c = 20 \text{ mg/L}$) po fotooxidaci v methanolu
(Chromatografické podmínky: viz **obr. II**; UV detekce $\lambda = 280 \text{ nm}$)



Obr. 19: Chromatografický záznam roztoku BaP ($c = 20 \text{ mg/L}$) po fotooxidaci v *n*-methanolu
(Chromatografické podmínky: viz **obr. II**; detekce FLD detekce $E_x = 250 \text{ nm}$, $E_m = 410 \text{ nm}$)

Z **obr. 14 - 19** je zřejmé, že vzniklo velké množství produktů fotolýzy, které jsou polárnejší (eluuji v daném separačním systému před BaP) i méně polární jako původní analyt. Absorpční maxima některých produktů jsou posunuty až do oblasti 450 nm - 520 nm (**obr. 14, 17**), což způsobovalo zbarvení roztoků od světle žluté až po sytě oranžovou barvu. Některé složky v modelových systémech vykazovaly fluorescenční aktivitu při podmínkách vhodných pro stanovení BaP (**obr. 16, 19**), u jiných se schopnost fluoreskovat za daných podmínek ztratila, což pravděpodobně souvisí se změnami ve struktuře vzniklých produktů.

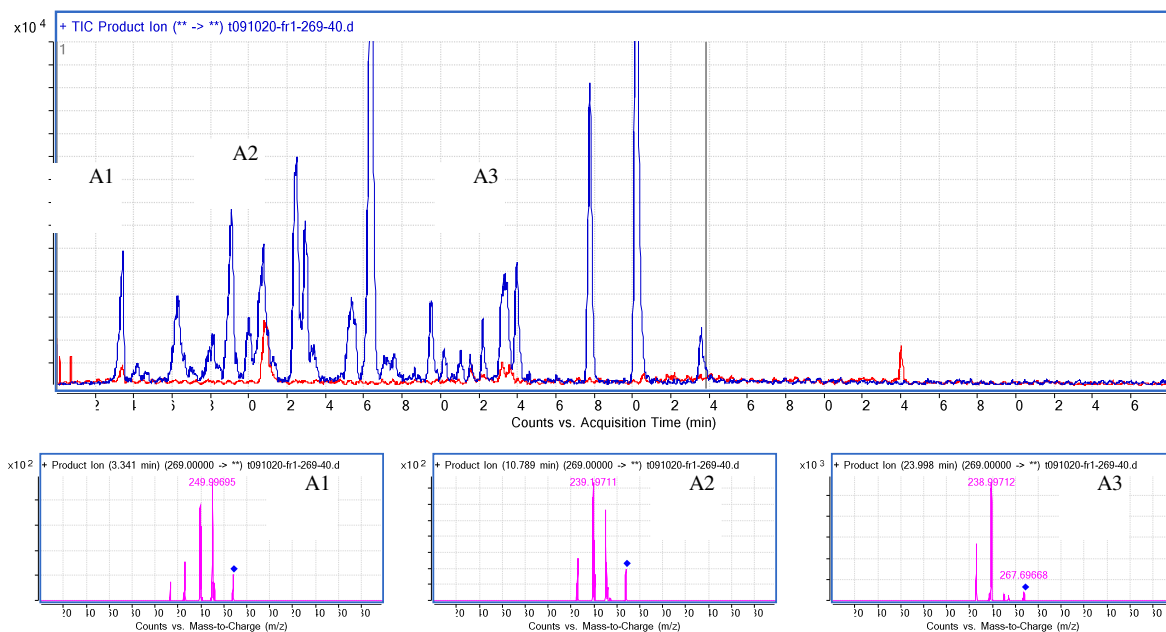
Na **obr. 20 - 22** jsou zobrazeny chromatografické záznamy methanolického a *n*-hexanového roztoku BaP po fotooxidácii získané po pozitivnej chemickej ionizácii za atmosferického tlaku a MS detekcii. Vzorky byly nejdříve naměřené v skenovacím módu a vyhodnocovacím softwarem MassHunter byly vyextrahovány iónové chromatogramy (EIC) při třech zvolených poměrech *m/z* (tj. *m/z* = 269, 271, 283), které korespondují s vybranými modelovými standardy oxidovaných forem BaP. Z grafického porovnání je zřejmé, že v prostředí methanolu vzniká větší množství rozkladných produktů, což je v souladu s publikovanými údaji [16]. Snaha identifikovat vzniklé produkty se dosud soustředila na ty, které vznikly v dostatečném množství v obou sledovaných systémech.

Z štěpení schémat pro píky s označením A1 a A2 (**obr. 20**) lze zjistit, že oba poskytují prekurzorový iont s *m/z* 269 a fragmentové ionty s *m/z* 268, 250, 240, 239, 226, které odpovídají štěpení schématu BaP-9,10-diolu. Liší se od měřeného standardu poměrem jednotlivých štěpení iontů i retenčním časem, což vede k vyslovení hypotézy o vzniku dvou dalších diolových derivátů BaP s rozdílnou polaritou. Pík s označením A3 poskytuje sice prekurzorový iont s *m/z* 269, ale jeho fragmentační schéma nebylo pozorováno ani při BaP-9,10-diol ani při 3OHBaP, takže není k dispozici dostatek informací pro vyslovení nějaké hypotézy.

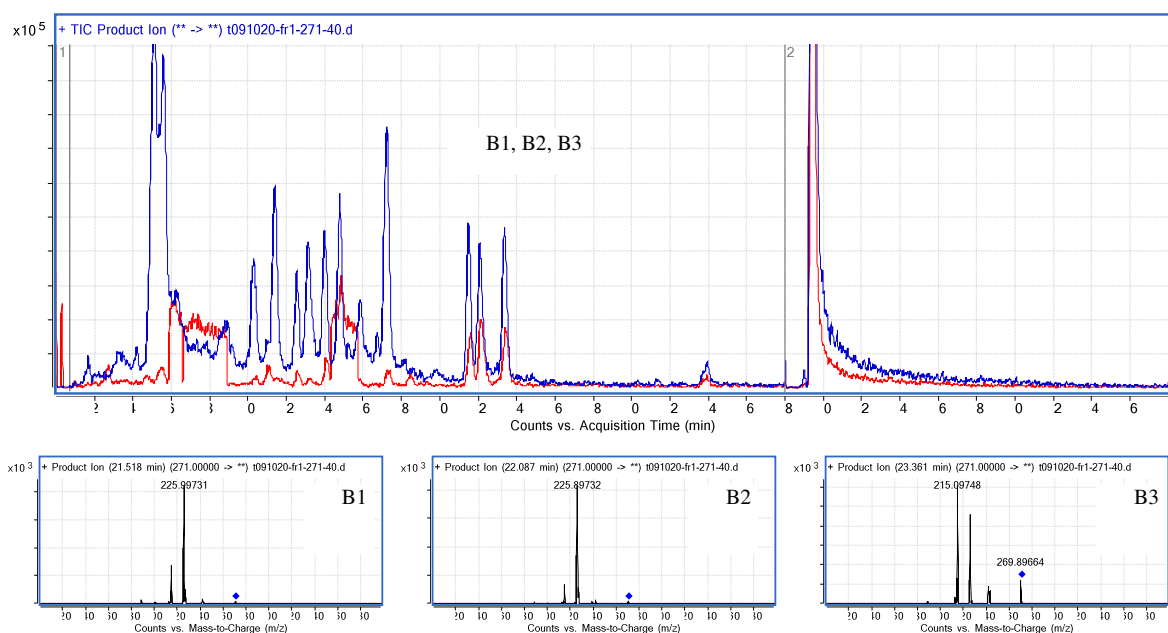
Píky s označením B1-B3 (**obr. 21**) poskytují sice prekurzorový iont s *m/z* 271, ale jejich schémata fragmentace se neshodují s fragmentací zjištěnou pro BaP-7-one, takže zatím není dostatek informací na vyslovení jakékoli hypotézy.

Pík s označením C3 (**obr. 22**) poskytuje prekurzorový iont s *m/z* 283 a fragmentační ionty s *m/z* 226 a *m/z* 255 [$M^+ - 28$]. Fragmentační schéma a retenční čas jsou ve shodě s předchozím měřením roztoku standardu BaP612D, který je zobrazen na **obr. 13**. Píky s označením C1 a C2 poskytují také prekurzorový iont s *m/z* 283 a fragmentační ionty s *m/z* 226 a *m/z* 255 [$M^+ - 28$], avšak mají odlišné retenční časy v daných chromatografických systémech, což vede k vyslovení hypotézy o jiných chinonových izomerech. Pík s označením C4 eluuje v separačním systému ve stejném retenčním čase jako BaP (RT 33,5 min.)

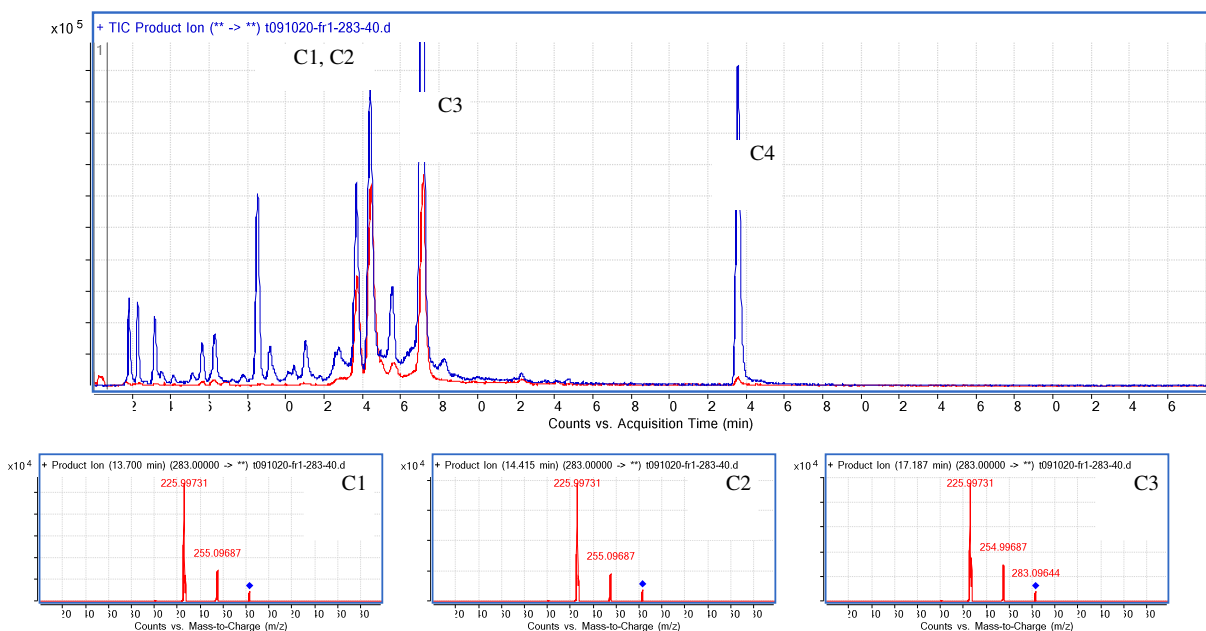
a poskytuje pouze fragmentační iont s m/z 252, což by mohl být iont-radikál BaP a vede k vyslovení domněnky, že pík s označením C4 je artefakt vznikající v iontovém zdroji během chemické ionizace.



Obr.20: Překryté EIC chromatografické záznamy s m/z 269 roztoku BaP ($c = 20$ mg/L) po fotooxidaci v methanolu (modrý záznam) a v *n*-hexanu (červený záznam) s fragmentačními schémata pro vybrané píky (použitá kolizní energie 40eV); (A1) neidentifikované, RT 3,3 min., (A2) neidentifikované, RT 10,8 min.; (A3) neidentifikované, RT 10,8 min (Chromatografické podmínky: viz *obr. II*; podmínky MS detekce: viz *obr. 13*)



Obr. 21: Překryté EIC chromatografické záznamy m/z 271 roztoku BaP ($c = 20$ mg/L) po fotooxidaci v methanolu (modrý záznam) a v n -hexanu (červený záznam) s fragmentačními schémata pro vybrané píky (použitá kolizní energie 40eV); (B1) neidentifikované, RT 21,5 min.; (B2) neidentifikované, RT 22,0 min.; (B3) neidentifikované, RT 23,4 min. (Chromatografické podmínky: viz obr. 11; podmínky MS detekce: viz obr. 13)



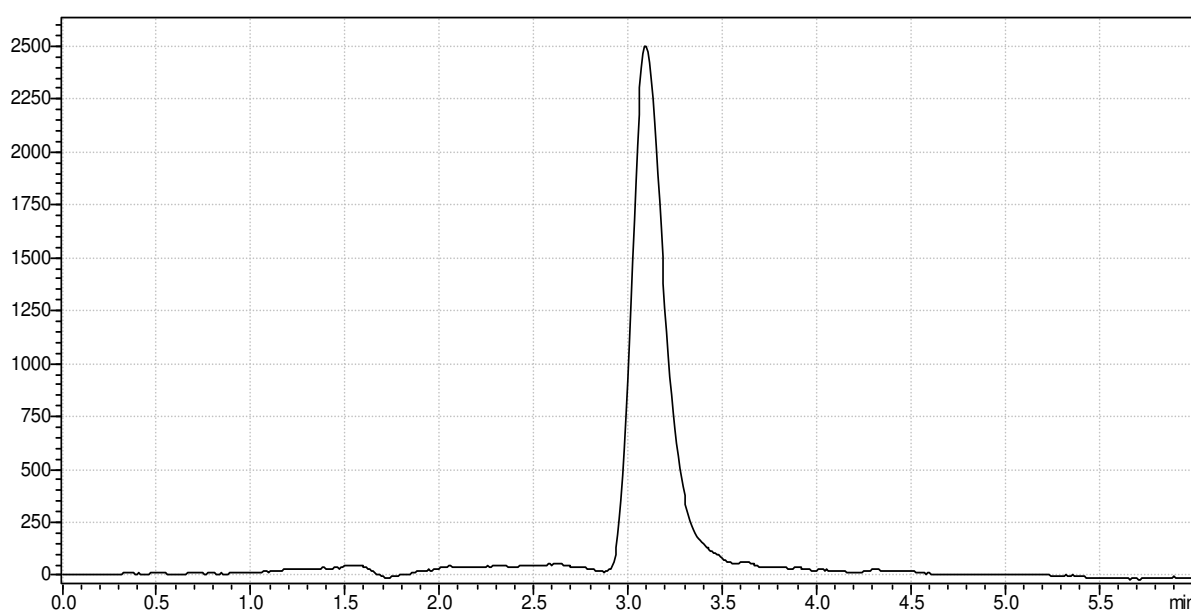
Obr. 22: Překryté EIC chromatografické záznamy m/z 283 roztoku BaP ($c = 20$ mg/L) po fotooxidaci v methanolu (modrý záznam) a v n -hexanu (červený záznam) s fragmentačními schémata pro vybrané píky (použitá kolizní energie 40eV); (C1) neidentifikované, RT 13,7 min.; (C2) neidentifikované, RT 14,4 min.; (C3) BaP612D, RT 16,7 min. (Chromatografické podmínky: viz obr. 11; podmínky MS detekce: viz obr. 13)

5.3 Kinetika fotooxidace BaP v modelovém systému

V této části diplomové práce se v zjednodušených modelových systémech sledovala fotooxidace BaP v různých experimentálních podmínkách (v roztoku nebo v tenké vrstvě, různé teploty, různé druhy záření) a na základě naměřených výsledků jsme se pokusili určit řád reakce a některé základní kinetické parametry (konstantu, poločas rozpadu). Vycházejí z literárních údajů [3], lze reakci fotolýzy BaP charakterizovat jako složitou, která se dá částečně rozdělit na reakce rozvětvené (*tj.* probíhající vedle sebe) a postupné (*tj.* produkty jedné reakce jsou výchozími složkami druhé reakce). Kinetické studium složitých reakcí vyžaduje kromě sledování časové závislosti koncentrace výchozí složky sledovat i koncentrační změny produktů. Vycházelo se z předpokladu, že jedna z dílčích reakcí je nejpomalejší a tedy i určující pro ostatní reakce. Pro stanovení obsahu BaP v modelových vzorcích po ozáření byla použita metoda HPLC.

Po odebrání ozářeného vzorku rozklad BaP pokračuje a proto bylo nutné minimalizovat čas analýzy. Z tohto důvodu byla použita pro stanovení obsahu BaP v modelových vzorcích rychlá izokratická HPLC metoda s fluorescenční detekcí, která je mimořádně citlivá a selektivní pro sledovaný analyt. Jak je uvedeno v části 5.1, při fotolýze BaP vzniká velké množství rozkladných produktů, ze kterých jen některé mají fluorescenční vlastnosti shodné s výchozí látkou. Předpokládalo se, že jejich koncentrace je minimálně o 2 řády nižší oproti BaP a tedy by neměly mít signifikantní vliv na sledování jeho úbytku v ozářených vzorcích.

Obr. 23 zobrazuje chromatografický záznam roztoku standardu při zvolených podmínkách.

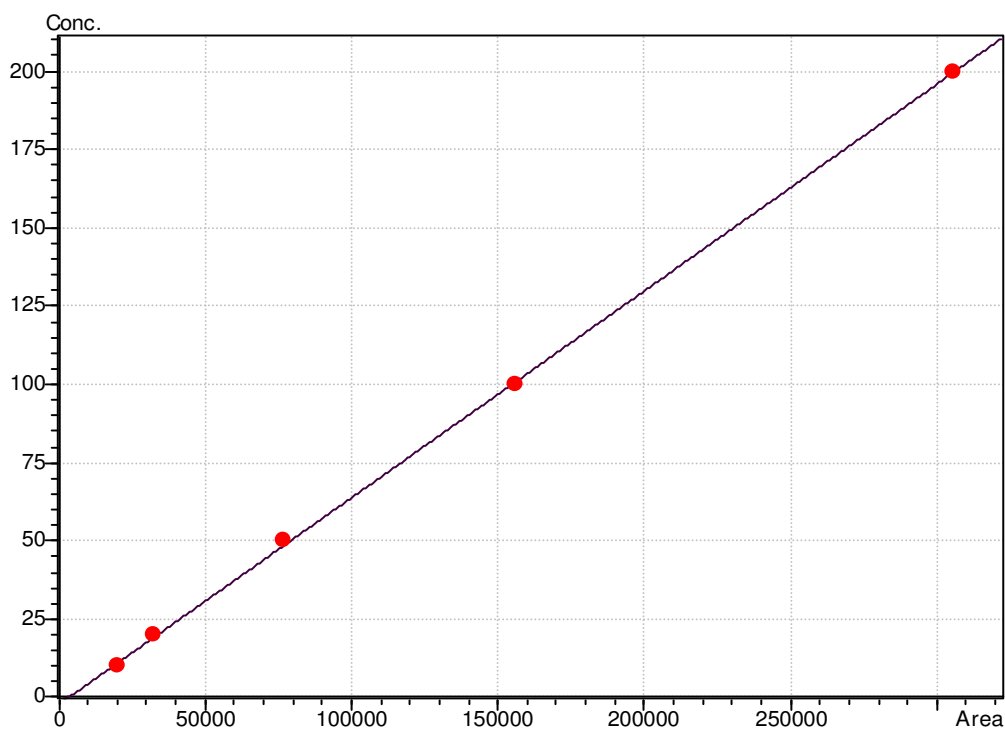


Obr. 23: Chromatografický záznam roztoku standardu BaP ($c = 2,0 \mu\text{g/L}$)

Pro sadu kalibračních roztoků se naměřily plochy píků za definovaných chromatografických podmínek a metodou nejmenších čtverců byly vypočteny kalibrační závislosti plochy piku BaP od jeho koncentracie. BaP byl ozářen v různých rozpouštědlech (methanol, *n*-hexan, tricapylin) a mobilní fáze obsahovala čistý metanol. Kalibrační roztoky se připravili stejným způsobem, jako se připravily vzorky a zjištěné závislosti byly srovnány pomocí Lordova testu na zhodnost dvou středních hodnot pro faktory odezvy, t.j. poměr A/c (**tab. 4**). Vypočítaly se hodnoty Lordova kritéria u pro střední hodnoty faktoru odezvy v methanole a směsi *n*-hexan–metanol ($u = 0,086$) resp, v methanole a směsi tricapylin-methanol ($u = 0,178$). Vypočítané hodnoty Lordova kritéria u jsou menší jako kritická hodnota u_α (pro 6 měření na hladině významnosti $\alpha=0,05$) = 0,250 a je tedy možné konstatovat, že není signifikantní rozdíl mezi kalibračními závislostmi BaP v methanole nebo ve směsi s *n*-hexan (1:9, v:v) resp. ve směsi s tricapylinem (1:9, v:v). Všechna měření kinetiky byla vyhodnocována z lineární kalibrační závislosti pro BaP v methanole (**obr. 24**).

Tab. 4: Parametry lineární závislosti pro BaP ve tvaru $c = aP + b$, kde c je koncentrace BaP v roztoku uvedená v $\mu\text{g/L}$, P je plocha píku BaP

Rozpouštědlo	Koeficient a	Koeficient b	Regresní koeficient R^2	A/c – průměr z 5 měření
Methanol	$6,597 \cdot 10^{-5}$	$2,952 \cdot 10^{-3}$	0,99996	15053,46
<i>n</i> -hexan - methanol	$6,577 \cdot 10^{-5}$	$-1,816 \cdot 10^{-2}$	0,99997	14959,39
<i>n</i> -hexan - tricapylin	$6,581 \cdot 10^{-5}$	-0,173	0,99900	16174,25



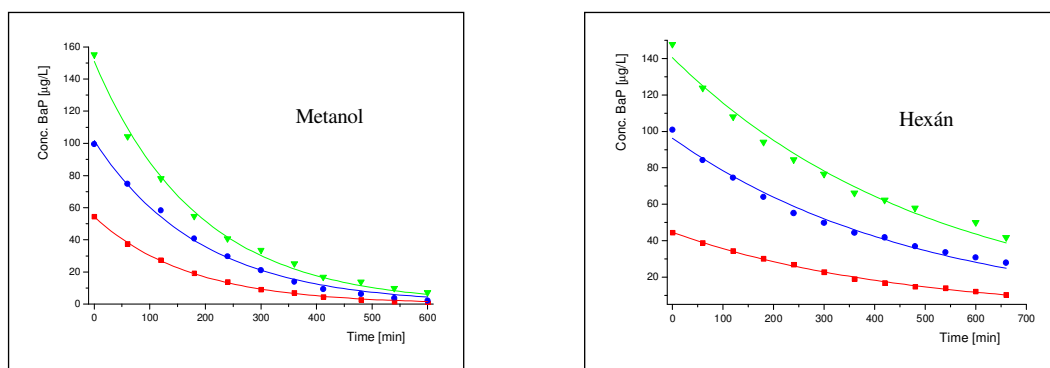
Obr. 24: Grafická závislost koncentrace BaP na ploše píku

5.3.1 Kinetika fotooxidacie benzo[*a*]pyrénu v roztoku

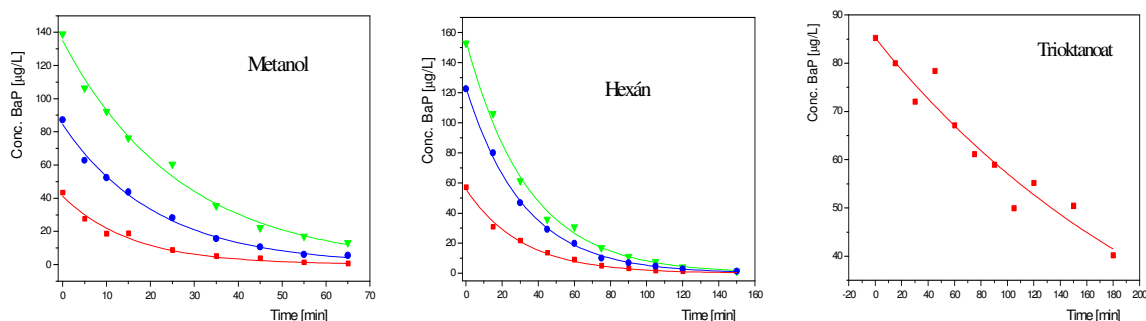
5.3.1.1 Izotermické podmínky

Fotolýza BaP se realizovala ve fotochemickom reaktoru firmy Photochemical reactors LTD, Berkshire, UK. Reálna potravinová matrice se obvykle skládá z tuhé i kapalné frakce s rozdílnou polaritou. Z důvodu nízké rozpustnosti BaP ve vodě (3,8 µg/L)[15], se použil v experimentech methanol. Modelem lipofilní frakce potravin byl zvolen *n*-hexan resp. glyceryltrioktanoát. Při izotermických měřeních se roztoky temperovali na teplotu 15°C.

Vlastní fotolýza byla realizována v polárním rozpouštědle (methanol), nepolárním (*n*-hexan) a v glyceryltrioktanoátu, který simuloval tukové prostředí. Kinetika se sledovala při třech koncentracích BaP a při 254 nm (nízkotlaká rtuťová výbojka) a 365nm (xenonová výbojka). Koncentrace BaP se průběžně stanovovány metodou HPLC. Zjistili jsme, že s polaritou rozpouštědla vzrůstá i rychlost eliminace BaP. Jak vidno z **obr. 25** a **26** je eliminace v methanolu podstatně rychlejší než v hexanu.



Obr. 25: Eliminace BaP v roztoku methanolu a n-hexanu při 254 nm pro počáteční koncentrace 50, 100 a 150 µg/L



Obr. 26: Eliminace BaP v roztoku methanolu a n-hexanu při 365 nm pro počáteční koncentrace 50, 100 a 150 µg/L a v glyceryltrioktanoátu (100 µg/L)

Pokusili jsme se určit řád reakce eliminace BaP při třech různých počátečních koncentracích v hexanu a v methanolu. Vzorec pro výpočet řádu reakce byl odvozen z rychlostní reakce n -tého řádu (2). Po integraci a úpravě byl získán vztah (3)

$$-\frac{dc}{dt} = kc^n \quad (2)$$

$$c = \frac{c_0}{\sqrt[n-1]{1 + c_0^{n-1} (n-1)kt}} \quad (3)$$

Vlastní výpočet byl proveden pomocí programu Origin Pro 7.0, výsledky jsou uvedeny v **tab. 5**.

Tab. 5: Hodnoty řádu reakce (*n*) eliminace BaP v methanolu a hexanu při 254 nm

Hexan		Methanol	
Konc. BaP [µg/L]	n	Konc. BaP [µg/L]	n
50	0,996	50	0,944
100	1,180	100	0,900
150	1,152	150	1,182

Z vypočtených hodnot vyplývá, že oxidaci BaP lze považovat za reakci 1. řádu nebo za reakci psedomonomolekovou, která je specifickým případem reakce 2. řádu, kdy je jeden z reaktantů ve velkém stechiometrickém nadbytku.

Pod reakcí 1. řádu se rozumí kvantitativní přeměna molekul výchozí složky na konečné produkty reakce, která je nezávislá na přítomnosti ostatních látek v systému a lze ji schematicky zapsat:



přičemž její kinetickou rovnicí lze psát ve tvaru:

$$c/c_0 = e^{-kt} \tag{4}$$

kde c_0 je počáteční koncentrace [µg/L],
 k je rychlostní konstanta [min⁻¹]
 t je čas [min].

Díky předchozím informacím byly vypočteny hodnoty rychlostních konstant a poločasy rozpadu BaP při různých podmínkách fotolýzy a výsledky jsou uvedeny v **tab. 6**.

Tab. 6: Hodnoty rychlostních konstant a poločasy rozpadu BaP při různých podmínkách fotolýzy

k[min^{-1}]	$\tau_{1/2}$ [min]	Rozpouštědlo
-0,00205	338,12	Hexan, 254nm
-0,03143	22,05	Hexan, 365nm
-0,00524	132,28	Metanol, 254nm
-0,04634	14,96	Metanol, 365nm
-0,00398	173,80	Tricaprylin, 365nm

5.3.1.2 Neizotermické podmínky

Mechanismus procesů je velmi často nejasný a značně komplikovaný, aby mohl být popsán jednoduchým kinetickým modelem. Navíc, předpokládali jsme, že rychlost fotodegradčních reakcí BaP je také funkcí teploty, a proto je nutné na její exaktní popis využít vhodný matematický aparát, zahrnující teplotu jako jeden z parametrů. Tento problém lze řešit využitím tzv. jednokrokové kinetické aproximace. [12-14]. Ty jsou založeny na skutečnosti, že procesy v tuhé fázi jsou obecně funkcí teploty a konverze.

$$\frac{d\alpha}{dt} = \Phi(T, \alpha) \quad (5)$$

Funkce Φ ve vztahu (5) může být vyjádřena jako součin dvou od sebe nezávislých funkcí, přičemž první, $k(T)$, závisí jen od teploty T a druhá, $f(\alpha)$, jen od konverze procesu α :

$$\Phi(T, \alpha) = k(T)f(\alpha) \quad (6)$$

Kombinací vztahů (5) a (6) dostaneme:

$$\frac{d\alpha}{dt} = k(T)f(\alpha) \quad (7)$$

Tento vztah je matematickým vyjádřením jednokrokové aproximace. Uvedenou kinetickou rovnici je možné řešit vyjádřením $k(T)$ pomocí Arrheniovy rovnice, ale pro neizotermické procesy nemá vzniklý integrál primitivní funkci. V tomto případě je jednou z možností vyjádřit teplotní funkci ve tvaru:

$$k(T) = AT^m \quad (8)$$

kde T je absolutní teplota a A a m jsou preexponenciální faktory, které nemají fyzikální význam.

Konverzní funkce je vyjádřena pro reakci n -tého řádu vztahem:

$$f(\alpha) = (1 - \alpha)^n \quad (6)$$

Kombinací vztahů (6), (7), (8) a úpravou vznikne pro reakci I. řádu rovnice:

$$\int_0^{\alpha} \frac{d\alpha}{(1 - \alpha)} = \int_0^t AT^m dt \quad (9)$$

Při neizotermickém ohřevu s konstantní rychlostí ohřevu je možné vyjádřit závislost teploty od času vztahem:

$$T = T_0 + \beta t \quad (10)$$

kde T_0 je počáteční teplota a β rychlost ohřevu. Kombinací vztahů (9) a (10) se po integraci a úpravě získa rovnice:

$$\alpha = 1 - \exp\left[-\frac{AT^{m+1}}{\beta(m+1)}\right] \quad (11)$$

V rovnici (9) se předpokládá, že počáteční teplota T_0 ohřevu je nastavena na hodnotu, při které nedochází k žádnému procesu, tj. dolní integrační limit je při $T_0 = 0$. Rovnici (9) je možné použít k určení hodnoty parametrů A a m . Řešením se však získají extrémně malé hodnoty parametru A , které jsou z praktického hlediska nepohodlné. Z uvedeného důvodu je výhodné zavést redukovanou teplotu ϑ , definovanou vztahem:

$$\vartheta = \frac{T}{T_r} \quad (12)$$

Přičemž T_r je referenční teplota, které hodnotu můžeme zvolit libovolně. Při našich experimentech byla její hodnota zvolena na 400 K, což odpovídá teplotě 126,85°C. Tím je možné vztah (8) vyjádřit jako:

$$k = a\vartheta^m \quad (13)$$

přičemž

$$a = AT_r^m \quad (14)$$

Dosazením do rovnice 11 je možné získat rovnici

$$\alpha = 1 - \exp\left[-\frac{a\vartheta^{m+1}}{\beta(m+1)}\right] \quad (15)$$

Konverze polymerizace je definována jako

$$\alpha = \frac{c_0 - c}{c_0} \quad (16)$$

kde c_0 a c reprezentuje obsah AA ve vzorku při teplotách T_0 a T . Kombinací (15) a (16) se získa výsledná rovnice, která slouží na výpočet kinetických parametrů procesu eliminace:

$$c = c_0 \exp \left[-\frac{aTr\vartheta^{m+1}}{\beta(m+1)} \right] \quad (17)$$

Hodnoty parametrů "a", "m" a c_0 se zjistily nelineární optimalizací pomocí programu Origin 7.5. Jak již bylo zmíněno parametry "a" a "m" nemají fyzikální význam, avšak umožňují modelovat kinetický proces bez hlubší znalosti jeho mechanismu [12-14].

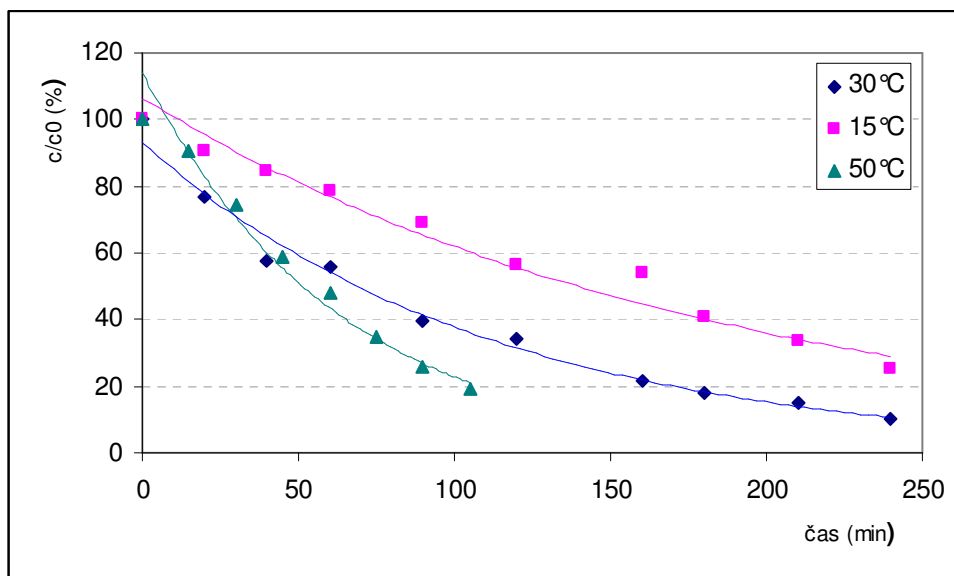
V důsledku toho je možné na základě výsledků získaných při neizotermickom procesu s lineární rychlostí ohřevu vypočítat hodnotu α i poločas rozpadu pro libovolnou izotermická teplotu v rámci měřeného teplotního intervalu. Pro konstantní teplotu a reakci I. řádu lze dosazením do vztahu (13) rovnici pro výpočet poločasu rozpadu vyjádřit jako

$$\tau_{1/2} = -\frac{\ln(0,5)}{k} = -\frac{\ln(0,5)}{a\vartheta^m} \quad (18)$$

Uvedené matematické vztahy umožňují výpočet základních kinetických charakteristik, tj, poločas reakce, rychlostní konstantu, popřípadě další parametry, jako je aktivační energie jednotlivých procesů. S ohledem na zadání a rozsah diplomové práce jakožto i náročnost matematického zpracování, v této práci jsme se zaměřili pouze na charakterizaci poločasů fotooxidačních reakcí.

Uskutečnili jsme sérii experimentů, ve kterých se sledoval vliv teploty na rychlost eliminace BaP v tricapyrlinu, který se svými vlastnostmi nejvíce blížil k vlastnostem olejů a tuků v reálné potravinové matici. Z **obr. 27** je zřejmé, že vzrůstající teplota urychluje degradaci BaP.

Při neizotermickém ohřevu s lineárním gradientem ohřevu je možný odhad kinetických parametrů v celém měřeném teplotním intervalu, takže není potřebné měřit kinetické parametry v izotermickém režimu pro každou požadovanou teplotu zvlášť, přičemž dobrou shodu obou typů experimentů dokumentuje i **tab. 7**.



Obr. 27: Eliminace BaP v roztoku tricaprilynu při různých teplotách

Tab. 7: Porovnání poločasů rozpadu za izotermických a neizotermických podmínek pro eliminaci BaP v tricaprilynu ($\lambda = 365 \text{ nm}$)

Teplota [°C]	Odhad $\tau_{1/2}$ [min] z neizotermických měření	$\tau_{1/2}$ [min] vypočteno z izotermických měření
15	144,3	173,8
30	95,4	73,0
50	52,0	48,5

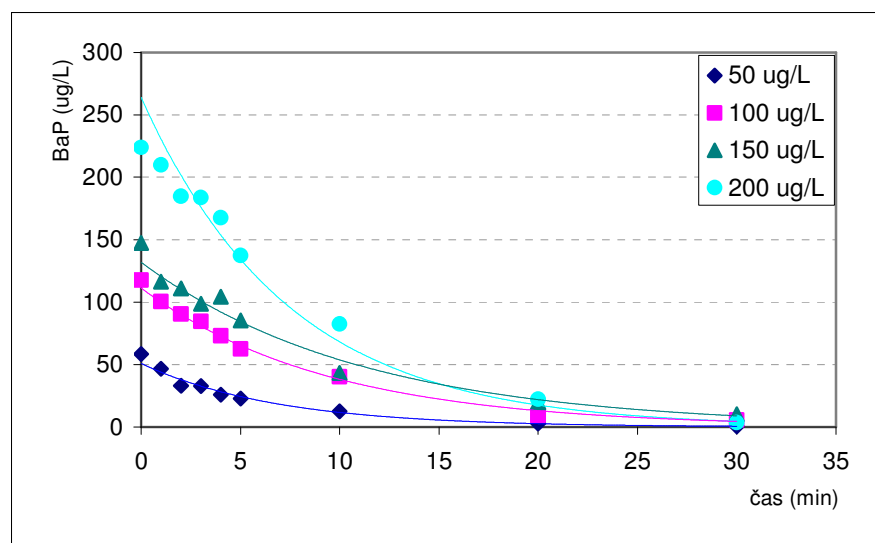
Výsledky experimentů prokázali, že s rostoucí teplotou se skracuje poločas reakce, což potvrzuje výrazně pozitivní vliv teploty na rychlost eliminace BaP. Při porovnání výsledků dosažených za izotermických a neizotermických podmínek lze konstatovat, výše opsaný trend je zjevný u obou procesů. S ohledem na reální podmínky fotooxidace, je však její opis pomocí aparátu pro neizotermickou kinetiku exaktnější.

5.3.2 Kinetika fotooxidace benzo[a]pyrénu na tenké vrstvě (filmu)

V reálných vzorcích se BaP vyskytuje v povrchových vrstvách, kde je vlhká tuhá frakce pokryta tenkým lipofilním resp. hydrofilním filmem. V této části diplomové práce se sledovala eliminace BaP v tenké vrstvě tricaprilynu, která byla ozařována xenonovou výbojkou či slunečním zářením při laboratorní teplotě. Naměřené závislosti úbytku BaP ozařovaného xenonovou výbojkou jsou zobrazeny na **obr. 28** a slunečním zářením jsou

uvedené v *tab. 8a* a *8b*, přičemž intenzita slunečního záření byla měřena luxmetrem. Metodou nelineární optimalizace byl určen řád reakce N , rychlostní konstanta reakce, na základě které byl určen poločas rozpadu BaP při daných experimentálních podmínkách. Na základě vypočtených hodnot řádu reakce lze i v těchto podmínkách považovat eliminaci BaP za reakci 1. řádu nebo za reakci pseudomonomolekovou. Vypočítal se poločas rozpadu BaP ve filmu tricaprylinu ($\tau_{1/2} = 6,0$ min) ozařovaného s UV lampou, jejíž intenzita byla 11,55 kLux. V porovnání s poločasem rozpadu v roztoku (*tab. 7*) je zřetelné výrazné zrychlení, což pravděpodobně souvisí s tloušťkou vrstvy, ve které se děj uskutočňoval.

..



Obr. 28: Eliminace BaP v tenké vrstvě tricaprylinu při 365 nm pro počáteční koncentrace 50, 100, 150 a 200 µg/L

Denní světlo je směsné záření s různou frekvencí a v našich experimentech jsme ho charakterizovali průměrnou intenzitou záření (první měření: 51.0 kLux, druhé měření: 93,7 kLux) a pro uvedené podmínky byl určen poločas rozpadu (první měření: 66 min., Druhé měření : 54,3 min.), jsou v souladu s domněnkou, že čím je záření intenzivnější tím je rozklad rychlejší a tudíž se zkracuje poločas rozpadu.

Tab. 8a: Klesající koncentrace BaP při použití počáteční koncentrace 100 µg/L při ozařování pomocí denního světla

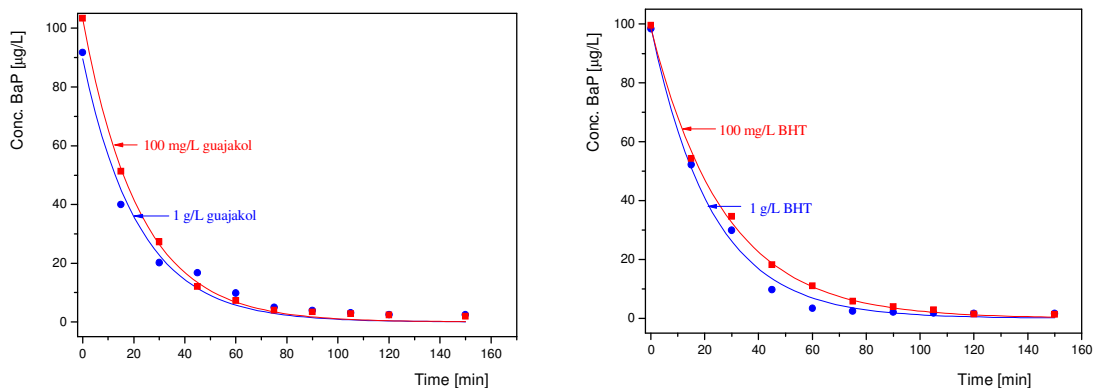
Čas [min]	Světlo [kLux]	Koncentrace BaP [µg/L]
0	96,6	100,3
30	85,0	87,0
60	82,3	51,8
90	58,5	39,3
120	16,9	29,2
180	7,2	14,9

Tab. 8b: Klesající koncentrace BaP při použití počáteční koncentrace 100 µg/L při ozařování pomocí denního světla

Čas [min]	Světlo [kLux]	Koncentrace BaP [µg/L]
0	71,1	109,3
30	87,3	85,3
60	97,3	53,5
90	107,5	38,4
120	114,6	20,5
180	58,3	4,4

5.4 Studium vlivu látek s antioxidačním účinkem na rychlost oxidace benzo[a]pyrénu

Byl studován vliv látek s antioxidační aktivitou BHT a o-metoxyfenolu (guajak) na kinetiku oxidace BaP. Předpokládali jsme, že v důsledku antioxidační aktivity bude potlačen vznik některých oxidovaných forem BaP. Měření se realizovalo pro počáteční koncentrace 100 µg/L BaP v hexanu. Pracovali jsme při dvou koncentracích 100 mg/L a 1g/L guajakolu, což simuluje poměr těchto sloučenin v uzených masných výrobcích. Pracovali jsme s xenonovou výbojkou při 365nm. Výsledky kinetiky eliminace jsou na **obr. 29**.



Obr. 29: Eliminace BaP v hexanu při 365 nm pro počáteční koncentraci BaP 100 µg/L v přítomnosti guajakolu a BHT s koncentrací 100 mg/L a 1 g/L

Jak vidno, porovnáním **obr. 26** a **obr. 29**, nebyla pozorována inhibice eliminace BaP v prostředí obou antioxidantů, naopak, rychlost eliminace BaP se zvýšila přibližně o 30% (**tab. 9**). Tento jev souvisí pravděpodobně s oxidačními, resp. polykondenzačními reakcemi mezi antioxidantem a BaP.

Tab. 9: Hodnoty rychlostních konstant a poločasy rozpadu BaP při různých podmínkách fotolýzy

$k[\text{min}^{-1}]$	$\tau_{1/2} [\text{min}]$	Rozpouštědlo
-0,03143	22,05	Hexan, 365nm
-0,04570	15,17	Hexan+100 mg/L guajakol, 365nm
-0,04000	18,74	Hexan+100 mg/L BHT, 365nm

6. ZÁVĚR

V práci se vyselektovali metody vhodné pro studium procesů fotoindukované degradace BaP v různých modelových systémech využitím moderní instrumentální techniky, zejména GC-MS a HPLC-MS-MS, které byly následně využité na identifikaci sloučenin vznikajících v procesu fotooxidace BaP v modelových systémech (roztoky BaP v methanolu a *n*-hexanu). Prostudoval se taktéž vliv těchto rozpouštědel, zdrojů osvětlení a vlnové délky použitého záření na rychlost eliminace BaP. Kinetické aspekty fotodegradace BaP byly vyhodnocovány pomocí modelů platných pro izotermické i neizotermické podmínky. Prostudoval se také vliv vybraných antioxidantů na rychlost fotooxidace BaP za izotermických podmínek.

1) Výběr vhodných metod pro studium procesů fotoindukované degradace benzo[*a*]pyrénu

- Jako optimální pro separaci produktů degradace BaP se ukázala být kolona Zorbax Eclipse XDB-C₁₈ (rozměry: 4,6 x 50 mm, průměr částic 1,8 μm), přičemž jako mobilní fáze byla použita směs metanol:voda v režimu gradientové eluce;
- Vyzkoušely se různé ionizační techniky (ESI, APCI, APPI), s ohledem na povahu studovaných sloučenin (polarita, strukturní vlastnosti – aromatické jádro, volný elektronový pár na atomu kyslíku), jako nejvhodnější se jevila technika chemické ionizace při atmosférickém tlaku v pozitivním módu.

Uvedené podmínky umožňují poměrně spolehlivou identifikaci sloučenin vznikajících v procesu fotooxidace BaP v modelových systémech pomocí HPLC-MS-MS.

V případě GC-MS byla efektivně využita metoda splitless dávkování, vzhledem k nízkým koncentračním hladinám vznikajících produktů fotodegradace BaP.

S ohledem na nízkou těkavost studovaných látek, jako efektivnější z hlediska separační účinnosti a následné identifikace se ukázala metoda HPLC-MS-MS. Je však nutné poznamenat, že identifikace sloučenin vznikajících během fotodegradace BaP v modelových směsích je stížená nedostupností zodpovídajících standardů oxidovaných forem.

2) Vliv experimentálních podmínek na rychlost degradace benzo[*a*]pyrénu

- Fotodegradace BaP se realizovala při dvou vlnových délkách – 254 nm (Hg výbojka) a 365 nm (Xe lampa) a ve třech rozpouštědlech s různou polaritou a viskozitními vlastnostmi (methanol, hexan, tricaprilin).

- Použité výpočetní postupy naznačují, že fotodegradace BaP probíhá mechanismem reakcí prvního, resp. pseudo-prvního řádu. Tato skutečnost ale nevylučuje průběh paralelních reakcí ani tvorbu reakčních meziproductů; avšak není možné tyto reakce/meziproducty charakterizovat exaktněji pomocí dostupné techniky.
- Výsledky kinetických měření ukázali, že degradační process probíhá výrazně rychleji při vlnové délce 365 nm, přičemž rychlost fotogradace klesá v pořadí metanol> hexan>tricaprylin, pravděpodobně z důvodu rozdílných fyzikálně-chemických charakteristik jednotlivých rozpouštědel.
- S rostoucí teplotou fotooxidace se zkracuje poločas reakce, což potvrzuje pozitivní vliv teploty na rychlost eliminace BaP.
- Uvedený trend je zjevný při zpracování výsledků jak pomocí kinetických modelů pro izotermické, tak i pro neizotermické podmínky.
- S ohledem na reálné podmínky fotooxidace, je však její opis pomocí aparátu pro neizotermickou kinetiku exaktnější.

3) Sledování vlivu vybraných antioxidantů na rychlost fotooxidace benzo[*a*]pyrénu

- Navzdory očekávání, se nepozorovala inhibice fotooxidace BaP v přítomnosti BHT ani guajakolu.
- V prostředí obou antioxidantů se naopak rychlost eliminace BaP zvýšila.

4) Experimenty na tuhých površích

- Sledovala se eliminace BaP na tenké vrstvě tricaprylinu ozařováním xenonovou výbojkou anebo slunečním zářením při laboratorní teplotě.
- Na základě vypočtených hodnot řádu reakce lze i v těchto podmínkách považovat eliminaci BaP za reakci 1. řádu nebo za reakci pseudomonomolekovou.
- Ve srovnání s experimenty v roztocích je zřejmý výrazný nárůst rychlostí fotodegradace, pravděpodobně to souvisí s minimální tloušťkou vrstvy, ve které fotodegradace probíhala.

Dosažené výsledky naznačují že proces degradace BaP je komplexní a jsou potřebné další experimenty za účelem exaktního poznání jeho průběhu.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

[1]	VELÍŠEK, J. <i>Chemie potravin 3</i> . Tábor: OSSIS, 1999. 368 s. ISBN 80-902391-5-3.
[2]	SUHAJ, M. – KOVÁČ, M. <i>Prírodné toxikanty a antinutričné látky v potravinách</i> . 1. vyd. Bratislava: Výskumný ústav potravinársky, 1996. 140 s. ISBN 80-967064-8-9.
[3]	LUNDSTEDT, S. <i>Analysis of PAHs and their transformation products in contaminated soil and remedial processes</i> . Umeå: Solfjädern Offset AB, 2003. 56 p. ISBN 91-7305-452-6.
[4]	Finding on the EFSA data collection on polycyclic aromatic hydrocarbons in food.. <i>European Food Safety Authority</i> [online]. 2010 [cit. 20-04-10]. Dostupné z: < www.efsa.europa.eu/en/scdocs/scdoc/33r.htm >.
[5]	KOT-WASIK, A. – DABROWSKA, D. – NAMIESNIK, J. Photodegradation and biodegradation study of benzo[a]pyrene in different liquid media. <i>Journal of Photochemistry and Photobiology</i> . 2004, 168, pp. 109–115.
[6]	ŠIMKO, P. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked meat products and smoke flavouring food additives. <i>Journal of Chromatography B</i> . 2002, 770, pp. 4-18.
[7]	Analytické stanovení polyaromatických uhlovodíků v ovzduší. <i>VŠCHT</i> [online]. 2008 [cit. 20-01-03]. Dostupné z: < http://www.vscht.cz/homepage >.
[8]	STAHL, W. – EISENBRAND, G. Determination of polynuclear aromatic hydrocarbons and nitrosamines. <i>Academic Press</i> . 1988, 10, pp. 377-387.
[9]	MELOUN, M. – MILITKY, J. <i>Statistické zpracování experimentalních dat</i> , Praha: PLUS, 1994. 839 s. ISBN 80-85297-56-6.
[10]	LONGFELLOW, D.G. <i>Handbook of analytical and spectral data for polycyclic aromatic hydrocarbons</i> . Kansas City: Midwest Research Institute, 1993. 296 s. ISBN 0-9638182-0-1.
[11]	GROSSE, S. – LETZEL, T. Liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry with post-column liquid mixing for the efficient determination of partially oxidized polycyclic aromatic hydrocarbons. <i>Journal of Chromatography A</i> . 2007, 1139, pp. 75-83.
[12]	ŠIMON, P. Consideration on the single-step kinetics approximation. <i>Journal of Thermal Analysis and Calorimetry</i> . 2005, 82, pp. 651-657.

[13]	ŠIMON, P. Isoconversional methods. <i>Journal of Thermal Analysis and Calorimetry</i> . 2004, 76, pp. 123-132.
[14]	ŠIMON, P. Single-step kinetics approximation employng non-Arrhenius temperature functions. <i>Journal of Thermal Analysis and Calorimetry</i> . 2005, 79, pp. 703-708.
[15]	KOEBER, R. – NIESSNER, R. – BAYONA, J. M. Comparsion of liquid chromatography-mass spectrometry interfaces for the analysis of polar metabolites of benzo[<i>a</i>]pyrene. <i>Journal of Analytical Chemistry</i> . 1997, 359, pp. 267-273.
[16]	DABROWSKA, D. – KOT-WASIK, A. – NAMIESNIK, J. Stability studies of selected polycyclic aromatic hydrocarbons in different organic solvents and identification of their transformation products. <i>Polish Journal of Environmental Studies</i> , 2008, 17, pp. 17-24.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

3OHBaP	3-hydroxybenzo[<i>a</i>]pyrén
ACN	acetonitril
Ant	anthracén
AOAC	Asociace oficiálních analytických metod (z angl. <i>Association of Official Analytical Methods</i>)
BaA	benzo[<i>a</i>]anthracén
BaAo	benzo[<i>a</i>]anthron
BaP	benzo[<i>a</i>]pyrén
BaP-7-one	9,10-dihydrobenzo[<i>a</i>]pyren-7-on
BaP-9,10-diol	benzo[<i>a</i>]pyren-trans-9,10-dihydrodiol
BbF	benzo[<i>b</i>] fluoranthén
BcF	benzo[<i>a</i>]fluorén
BcFe	cyklopenta[<i>c,d</i>]fenatrén
BghiF	benzo[<i>g,h,i</i>]fluoranthén
BghiP	benzo[<i>g,h,i</i>]perylén
BHT	2,6-di-terc-butyl-4-methylfenol
BjF	benzo [<i>j</i>] fluoranthén
BkF	benzo [<i>k</i>] fluoranthén
BPDE	benzo[<i>a</i>]pyrén-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid
BSTFA	bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamid
Chin	chinon
Cor	koronen
CPcdP	cyklopenta[<i>c,d</i>]pyrén
DbaeP	dibenzo[<i>a,e</i>]pyrén
DbahA	dibenz [<i>a,h</i>] antracén
DBahP	dibenzo[<i>a,h</i>]pyrén
DBaiP	dibenzo[<i>a,i</i>]pyrén
DBalP	dibenzo[<i>a,l</i>]pyrén
EPR	elektronová paramagnetická resonance
Fe	fenatrén
FID	plamenoionizační detekce (z angl. <i>flame ionization detector</i>)

Flu	fluorantén
GC	plynová chromatografie (z angl. <i>gas chromatography</i>)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. <i>high pressure liquid chromatography</i>)
I123cdP	indeno[1,2,3-cd]pyrén
IUCC	Mezinárodní liga proti rakovině (z angl. <i>International Union against Cancer</i>)
IUPAC	Mezinárodní unie čisté a užité chemie (z angl. <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
LOD	detekční limit (z angl. <i>limit of detection</i>)
MCH	5-methylchrysén
MOE	odhadované množství expozice (z angl. <i>margin of exposure</i>)
MS	hmotnostní spektrometrie (z angl. <i>mass spectrometry</i>)
Naf	naftalen
OHBP	hydroxybenzo[a]pyrén
oxyPAU	oxidované formy PAU
PAU	polycyclické aromatické uhlovodíky
PCB	polychlorované bifenyly
Per	perylén
Phe	fenantrén (z angl. <i>phenathrene</i>)
Pyr	pyrén
SCF	Vědecký výbor pro potraviny (z angl. <i>Scientific Committee on Food</i>)
TEMPO	2,2,6,6-tetrametylpiperidín-N-oxyl
TLC	tenkovrstvá chromatografie (z angl. <i>thin layer chromatography</i>)
TMCS	trimethylchloristan
TOF	detektor doby letu (z angl. <i>time of flight</i>)
UV	ultrafialové (z angl. <i>ultra-violet</i>)
VUV-ATOFMS	ultrafialová fotoionizace aerosolem za vakua s detekcí doby letu na hmotnostním spektrometru (z angl. <i>vacuum ultraviolet photoionization aerosol time-of-flight mass spectrometer</i>)