

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Vývoj, optimalizace a validace analytické metody na
stanovení 16 indikátorových polycyklických
aromatických uhlovodíků dle US EPA ve vodě
pomocí HPLC-PDA-FLD**

Diplomová práce

Bc. Pavel Pilík

Školitel: Ing. David Kahoun, Ph.D.

České Budějovice 2018

Pilík, P., 2017: Vývoj, optimalizace a validace analytické metody na stanovení 16 indikátorových polycyklických aromatických uhlovodíků dle US EPA ve vodě pomocí HPLC-PDA-FLD. [Development, optimization and validation of analytical method for determination of 16 indicator polycyclic aromatic hydrocarbons according to US EPA in water using HPLC-PDA-FLD. Mgr. Thesis, in Czech.] – 51 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Abstract

This thesis deals with determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface water using high performance liquid chromatography with spectrophotometric and fluorescence detection. Firstly, optimization of detection conditions was performed. Excitation wavelength, emission wavelength, emission filter and sensitivity were optimized. After optimization, the method was successfully validated. Then parameters of liquid-liquid extraction procedure (extraction time, amount of sodium chloride addition, amount of water sample) were optimized. Finally, the method was tested for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in river water.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů

V Českých Budějovicích dne 17. 4. 2018

.....
Pavel Pilík

Poděkování

Chtěl bych velice poděkovat Ing. Davidu Kahounovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky, ochotu a trpělivost.

Seznam použitých zkratk a symbolů

BaP	Benzo[a]pyren
BgP	Benzo[g,h,i]perylene
BkF	Benzo[k]fluoranthene
C18	Oktadecyl
ČR	Česká republika
ČSN	Česká technická norma
DBA	Dibenzo[a,h]anthracene
DLLME	Dispersive liquid-liquid microextraction
DNA	Deoxyribonucleic acid
EN	Evropská norma
EU	Evropská unie
FLD	Fluorescence detector
GC/MS	Gas chromatography/mass spectrometry
HFLPME	Hollow fiber liquid phase microextraction
HMW	High molecular weight
HPLC	High performance liquid chromatography
IARC	International Agency for Research on Cancer
IDL	Instrumental detection limit
IP	Indeno[1,2,3-c,d]pyrene
IQL	Instrumental quantification limit
ISO	International Organisation for Standardisation
LLE	Liquid-liquid extraction

LLME	Liquid-liquid microextraction
LMW	Low molecular weight
LOD	Limit of detection
LOQ	Limit of quantification
LPME	Liquid phase microextraction
MF	Mobilní fáze
PAU	Polycyklické aromatické uhlovodíky
PDA	Photodiode array detector
QC	Quality coefficient
RSD	Relative standard deviation
SBSE	Stir bar sorptive extraction
SPE	Solid phase extraction
SPME	Solid phase microextraction
USA	United States of America
US EPA	United States Environmental Protection Agency
VALLME	Vortex assisted liquid-liquid microextraction
VS	Vnitřní standard

Obsah

1 Teoretická část.....	1
1.1 Polycyklické aromatické uhlovodíky.....	1
1.1.1 Polycyklické aromatické uhlovodíky ve vodě	3
1.2 Stanovení PAU ve vodách	5
1.2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie.....	6
1.2.2 Spektrofotometrická detekce.....	6
1.2.3 Fluorescenční detekce	7
1.2.4 Hmotnostní detekce.....	9
1.3 Metody přípravy vzorků pro chromatografickou analýzu	9
1.3.1 Extrakce kapalina-kapalina	10
1.3.2 Extrakce tuhou fází.....	11
1.3.3 Jiné extrakční metody.....	12
1.4 Stanovení PAU v říčních vodách ve světě a v České republice	14
2 Materiál a metody	18
2.1 Přístroje a pomůcky	18
2.2 Chemikálie	19
2.3 Příprava mobilních fází.....	19
2.4 Příprava roztoků standardních sloučenin a vnitřního standardu	19
2.5 Příprava roztoků – optimalizace metody	20
2.6 Příprava roztoků – validace metody	20
2.7 Odběr říční vody	21
2.8 Postup extrakce PAU z vody	21
3 Výsledky a diskuze.....	22
3.1 Optimalizace metody	22
3.2 Validace metody	26
3.3 Optimalizace extrakce vzorku.....	31
3.3.1 Zdroje kontaminace.....	31
3.3.2 Optimalizace extrakce	34

3.4 Aplikace metody na reálné vzorky	36
4 Závěr	39
5 Citovaná literatura	41
6 Přílohy	51

Cíle práce:

- 1) Vypracovat rešerši na dané téma.
- 2) Vypracovat postup extrakce 16 indikátorových polycyklických aromatických uhlovodíků dle US EPA z vody do kapaliny (LLE) a provést základní optimalizaci tohoto postupu.
- 3) Vypracovat analytickou metodu na stanovení 16 indikátorových polycyklických aromatických uhlovodíků dle US EPA pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) se spektrofotometrickou detekcí s diodovým polem (PDA) a fluorescenční detekcí (FLD), včetně provedení základní optimalizace této analytické metody.
- 4) Provést validaci analytické metody.
- 5) Provést základní testování vypracované analytické metody pro její plánované použití na stanovení 16 indikátorových polycyklických aromatických uhlovodíků dle US EPA v povrchových vodách.

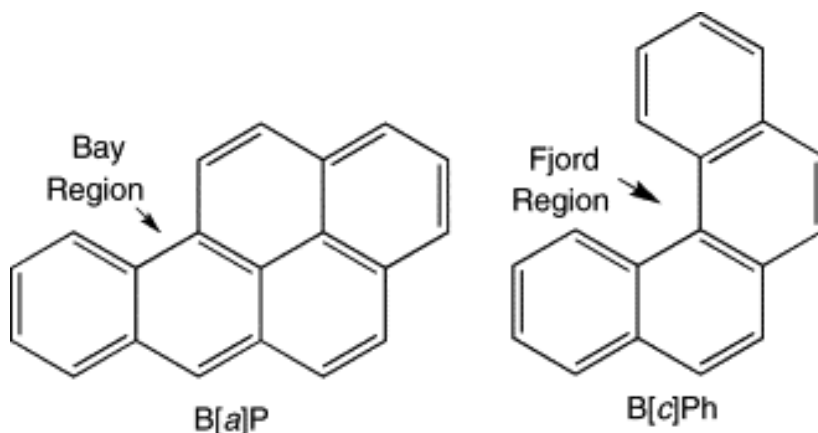
1 Teoretická část

1.1 Polycyklické aromatické uhlovodíky

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU) jsou aromatické uhlovodíky tvořené dvěma a více kondenzovanými aromatickými jádry (1). Vyskytují se v atmosféře, půdě (2), a přestože vykazují hydrofobní vlastnosti, bývají přítomny také ve vodách (3). Mohou také mezi jednotlivými složkami životního prostředí migrovat, např. z vysoce kontaminovaných vod se mohou uvolňovat do atmosféry (4). Vznikají přírodními procesy i činností člověka. Mezi nejvýznamnější přírodní zdroje patří lesní požáry a sopečná činnost (5). Antropogenními zdroji PAU jsou spalovací motory, tepelné elektrárny, úniky olejů a průmyslové procesy (6). Důležitým zdrojem PAU jsou spalovací procesy, především nedokonalé spalování organických látek (7), při němž nedochází k oxidaci uhlíku na oxid uhličitý, ale dochází ke vzniku uhlovodíků, které spolu reagují a vytvářejí polycyklické struktury (8). Polycyklické aromatické uhlovodíky tedy produkuje spalování biomasy, odpadu, oleje (6), benzínu, nafty (1), uhlí, zemního plynu a jiných uhlovodíků (7). Významné množství PAU se dále vytváří při výrobě koksu a hliníku (9) a velkým zdrojem jsou i úniky ropy (10). Zatímco v rozvinutých zemích jsou emise PAU z fosilních paliv kontrolovány, v rozvojových zemích je obsah polutantů v životním prostředí kontrolován výrazně méně (6). Obecně antropogenní zdroje produkují většinu PAU nacházejících se v prostředí (11).

Hlavní cesty vstupu PAU do těla člověka představují dýchání, příjem potravy a kontakt kůže s materiálem obsahujícím PAU (12). Pokožkou mohou do lidského těla vstoupit i z kontaminované vody při koupání (13). Je prakticky nemožné, aby se člověk v běžném životě vyhnul vystavení se stopovým množstvím PAU (8). Pokusy na zvířatech prokázaly karcinogenní, mutagenní a genotoxické vlastnosti PAU (14). Vyšší karcinogenitu a mutagenitu obecně vykazují takové PAU, které obsahují čtyři až sedm jader (5), nejvyšší je u těch, které mají jader pět. Karcinogenní účinky PAU také závisí na jejich struktuře. Ty, které ve své molekule mají oblast tzv. zátoky nebo fjordu (Obr. 1), jsou karcinogenní. Z 16 PAU podle US EPA obsahují zátoku například benzo[a]antracen, chrysen nebo benzo[a]pyren. Na protilehlých stranách zátoky (fjordu) je zvýšená hustota elektronů, tzv. oblast K. Tato oblast je velmi reaktivní a snadno zde dochází k adici různých sloučenin (15). Benzo[a]pyren je podle Mezinárodní agentury pro výzkum rakoviny (IARC) prokázaným lidským karcinogenem, dibenzo[a,h]anthracen je pravděpodobný karcinogen.

Polycyklické aromatické uhlovodíky jsou relativně inertní hydrofobní sloučeniny, které jsou v tělech savců metabolizovány na vysoce reaktivní dihydrodiol epoxidy. Tyto epoxidy reagují s DNA za vzniku *cis* a *trans* aduktů (10). Poškození DNA může způsobit mutaci a iniciovat vznik nádoru (5). Polycyklické aromatické uhlovodíky mohou také způsobit oxidativní stres a vznik reaktivních forem kyslíku (16).



Obr. 1: Oblast zátoky (Bay Region) v molekule benzo[a]pyrenu a oblast fjordu (Fjord Region) v molekule benzo[c]fenanthrenu (17).

Vzhledem k negativnímu vlivu PAU na lidské zdraví a životní prostředí stanovila americká agentura na ochranu životního prostředí (US EPA) 16 nesubstituovaných PAU jako prioritní polutanty, z nichž některé jsou možné nebo pravděpodobné karcinogeny (18). Do této skupiny byly zařazeny: naftalen, acenaftalen, acenaften, fluoren, fenanthren, anthracen, fluoranthren, pyren, benzo[a]anthracen, chrysen, benzo[b]fluoranthren, benzo[k]fluoranthren, benzo[a]pyren, dibenzo[a,h]anthracen, benzo[g,h,i]perylene, indeno[1,2,3-c,d]pyren (19). Z více než 100 PAU byly jako prioritní vybrány ty, které mají vyšší toxicitu, je o nich dostupných více informací, je u nich větší možnost lidské expozice a často se vyskytují na rizikových místech (5). V roce 2005 Evropská legislativa sestavila seznam 15 PAU, ve kterém je 8 sloučenin stejných jako v seznamu 16 PAU US EPA (benzo[a]anthracen, chrysen, benzo[b]fluoranthren, benzo[k]fluoranthren, benzo[a]pyren, indeno[1,2,3-c,d]pyren, dibenzo[a,h]anthracen a benzo[g,h,i]perylene. Benzo[a]pyren je jedním z nejvíce karcinogenních a stabilních PAU. Z těchto důvodů byl vybrán jako indikátor přítomnosti dalších PAU ve vodě, půdě nebo potravinách a byl mu přiřazen ekvivalent toxicity jedna (20). Výskyt PAU je často uváděn také jako koncentrace součtu benzo[b]fluoranthenu, benzo[k]fluoranthenu, benzo[g,h,i]perylenu a indeno[1,2,3-c,d]pyrenu (21).

1.1.1 Polycyklické aromatické uhlovodíky ve vodách

Polycyklické aromatické uhlovodíky jsou významné polutanty vody. V pitné vodě se nejčastěji vyskytují fluoranthen, fenanthren, pyren a anthracen. Přítomnost PAU v povrchové nebo podzemní vodě indikuje zdroj znečištění (1). Polycyklické aromatické uhlovodíky jsou široce rozšířeny ve sladkovodních jezerech, řekách a umělých nádržích. Dlouhodobý přísun PAU do těchto vodních ploch může ovlivnit kvalitu vod, protože může docházet k akumulaci PAU nejen v sedimentech, ale i v potravním řetězci na různých úrovních, která vede ke změně bioty (22).

Polycyklické aromatické uhlovodíky v povrchových a podzemních vodách pocházejí z atmosféry, odpadních vod, zpracování dřeva, olejových skvrn (5), z městských odtoků, průmyslových splachů, úniků ropy a ropných derivátů (23), splachů ze silnic a zemědělství (24). Splach olejů usazených na zemi a cestách přispívá ke vstupu PAU do vodních těles (25). Během intenzivních dešťů mohou být do vodních útvarů spláchnuty průmyslové částice kontaminované PAU dešťovou kanalizací, zejména pokud je kombinována s kanalizací na odpadní vodu (26). V místech, kde není znečištění z bodových zdrojů, je tento způsob přísunu PAU do řek nejvýznamnější (27). Znečištěné ovzduší a atmosférické depozice (suché i mokré) jsou hlavním zdrojem PAU ve vodě v aridních a semiaridních oblastech (28). Plyny a částice uvolněné spalovacími procesy v atmosféře, na které jsou navázány polycyklické aromatické uhlovodíky, jsou rozptýleny větrem, klesnou na pevninu, mohou klesat do vod nebo jsou deštěm spláchnuty do potoků, odkud se řekami dostanou až do oceánu (25; 29). Polycyklické aromatické uhlovodíky z průmyslových odpadů, zemědělských zdrojů a automobilových emisí mohou být vlivem povrchových odtoků a dešťové vody rozptýleny do povrchových vod, odkud mohou pronikat půdními vrstvami a kontaminovat podzemní vody (30). Dalšími zdroji znečištění podzemních vod jsou průmyslové a domovní odpady, skládky odpadů, zpracovaná voda z dolů, prosakující podzemní zásobníky oleje a potrubí, splaškové kaly a septiky. Sezónní změny klimatických podmínek mohou vést k rozdílné koncentraci PAU v podzemní vodě (31). Zdroji PAU v pobřežní vodě jsou nejčastěji odpady z pobřežních rafinerií a úniky olejů z podvodního vrtání (25). Znečištěné říční koryto a suspendovaný sediment mohou významně ovlivnit lokální říční ekosystém (27).

Transport hydrofobních organických polutantů v řekách je spojen s transportem rozptýlených částic (26), na které jsou PAU navázány. Nejvyšší koncentrace PAU ve vodních útvech a také nejvyšší rychlost jejich transportu se vyskytuje během povodní, kdy

energie vody dokáže rozpohybovat sedimentované kontaminované částice. Celková koncentrace PAU ve vodě je lineárně závislá na koncentraci suspendovaného sedimentu. Řeky představují hlavní transportní cestu polutantů z pevniny do moře (27). Ústí řek, která tvoří přechodovou zónu mezi řekou a oceánem, hrají důležitou roli v přenosu polutantů z pevniny do moře a z řek do otevřeného oceánu (32).

Voda přes povrchové splachy do řek, jezer i podzemních vod přenáší polutanty do rostlin, živočichů i člověka. Vodní rezervoáry jsou také místem akumulace různých sedimentů a mají funkci jako skladovací nádrže pro rozpuštěnou a pevnou hmotu (33).

Rozpustnost 16 PAU podle US EPA ve vodě se pohybuje od 32 mg/l do 0,00026 mg/l. Nejvyšší hodnotu rozpustnosti vykazuje naftalen, nejnižší benzo[g,h,i]perylen (18). V důsledku takto nízké rozpustnosti ve vodě mají PAU tendenci sorbovat se na částice a zůstávat tak suspendované nebo klesat ke dnu (5). Podle molekulové hmotnosti se PAU dělí do dvou skupin. První skupina zahrnuje PAU s nízkou molekulovou hmotností (LMW), které obsahují dvě nebo tři jádra, druhou skupinu tvoří PAU s vysokou molekulovou hmotností (HMW), které mají čtyři až šest jader. Obě skupiny vykazují rozdílné chování ve vodě. Zatímco LMW PAU obvykle uniknou do atmosféry, HMW PAU zůstávají ve vodě nebo se usadí v sedimentu na dně vodních toků (34). Hlavními způsoby přeměny PAU ve vodě jsou fotooxidace, chemická oxidace a biodegradace (5). Ta spočívá v přerušení chemických vazeb mikroorganismy nebo enzymy. Degradovat mohou také reakcí s oxidem siřičitým, oxidy dusíku nebo ozonem za vzniku derivátů (34). V důsledku hydrofobního charakteru jsou však tyto mikropolutanty vůči přirozené degradaci poměrně odolné (35).

Většina povrchových vod obsahuje jednotlivé PAU do koncentrace 0,05 µg/l, silně znečištěné řeky až do 6 µg/l. Koncentrace v povrchové a pitné vodě se pohybuje od 0,0002 do 0,0018 µg/l, v dešťové vodě je od 0,01 do 0,2 µg/l. V silně urbanizovaných oblastech bylo zjištěno do 1 µg/l PAU i ve sněhu a v mlze (36). Kvůli ochraně lidského zdraví a vodních organismů stanovily US EPA a Evropská unie limity pro prioritní karcinogenní PAU v povrchových vodách. Limit US EPA činí 3,8 ng/l, limit Evropské unie 2–100 ng/l (37). V České republice je pro pitnou a teplou vodu zákonem č. 83/2014 Sb. stanoven limit 0,1 µg/l pro součet benzo[b]fluoranthenu, benzo[k]fluoranthenu, indeno[1,2,3-c,d]pyrenu a benzo[g,h,i]perylenu (38). Podle zákona č. 401/2015 Sb. platí pro povrchové vody využívané pro vodárenské účely roční průměr nejvyššího přípustného znečištění 0,1 µg/l pro součet benzo[b]fluoranthenu, benzo[k]fluoranthenu, benzo[a]pyrenu, benzo[g,h,i]perylenu a indeno[1,2,3-c,d]pyrenu (39). Pro podzemní vody jsou podle metodického pokynu

Ministerstva životního prostředí limity koncentrací jednotlivých PAU následující: naftalen 0,14 µg/l, acenaften 400 µg/l, fluoren 220 µg/l, antracen 1300 µg/l, fluoranthen 630 µg/l, pyren 87 µg/l, benzo[a]antracen 0,029 µg/l, chrysen 2,9 µg/l, benzo[b]fluoranthen 0,029 µg/l, benzo[k]fluoranthen 0,29 µg/l, benzo[a]pyren 0,0029 µg/l, dibenzo[a,h]antracen 0,0029 µg/l, indeno[1,2,3-c,d]pyren 0,029 µg/l. Tyto limity představují indikátory znečištění a vycházejí z doporučení US EPA. Pro acenaftylen, fenantren a benzo[g,h,i]perylen nejsou indikátory znečištění stanoveny (40).

1.2 Stanovení PAU ve vodách

Stanovení PAU v odpadních a povrchových vodách je často složité. V těchto matricích se vlivem nízké rozpustnosti ve vodě vyskytují ve velice nízkých koncentracích (41). Právě kvůli extrémně nízkým koncentracím těchto hydrofobních látek hrozí ztráty těkáním, adsorpcí na sklo a degradací vzorku během přepravy a extrakce, a jejich stanovení je proto poměrně komplikované (42). Rutinní kvantifikace PAU v povrchových vodách v nízkých koncentracích podle norem US EPA a EU vyžaduje analytickou metodu, která umožní efektivní extrakci i následné koncentrační kroky a jednoduché, rychlé, spolehlivé a ekonomicky přijatelné stanovení (37). Z důvodu obohacení, vysoké výtěžnosti, jednoduchosti, rychlosti, snížení efektů matrice a nízké spotřeby rozpouštědel je preferována extrakce tuhou fází (SPE) v kombinaci s kapalinovou nebo plynovou chromatografií (41).

Analýza vzorků říční vody a dnových sedimentů vyžaduje analytické procedury založené na oddělení analytů od ostatních složek matrice a zakoncentrování analytů. Celá procedura se pak stává časově a pracovně náročnou a zajištění správné kvality výsledků se stává obtížnějším. Tyto obtíže jsou spojeny s dynamickým charakterem říčního ekosystému, který způsobuje relativně velkou fluktuaci zastoupení různých fyzikálních forem. Mnoho laboratoří proto vyvíjí nebo modifikuje staré analytické metody pro stanovení stopových množství PAU v sedimentech a říčních vodách. Během filtrace se PAU sorbují na části filtru a na formující se vrstvu suspenze. Proto stanovovaná koncentrace PAU ve filtrátu neodpovídá jejich skutečnému zastoupení ve vodné fázi. Postup pro analýzu PAU v povrchových vodách by tedy měl zahrnovat oddělení suspenze a stanovení těchto sloučenin ve vodné i suspendované fázi. Oddělovací proces by měl být veden způsobem, který zajistí, že bude analyzován stejný objem filtrátu a suspenze povrchové vody a bude stanovena hmotnost suspenze (33).

Dobře zavedené metody na stanovení PAU v odpadních a povrchových vodách zahrnují extrakci kapalina-kapalina (LLE) s použitím hexanu, toluenu, benzenu,

dichlormethanu nebo cyklohexanu a následnou analýzu plynovou nebo vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (23). Ve spojení s plynovou chromatografií bývá používán hmotnostní detektor, ve spojení s HPLC ultrafialový, fluorescenční nebo hmotnostní detektor (43). Standardní metoda na stanovení PAU ve vodě doporučená organizací International Organization for Standardization (ISO) ISO 17993:2002 je založena na LLE a stanovení pomocí HPLC (44). Kapalinová chromatografie s fluorescenční nebo ultrafialovou detekcí je také doporučena v metodách US EPA pro analýzy prioritních PAU v pitných, odpadních a podzemních vodách (37). Polycyklické aromatické uhlovodíky totiž vykazují relativně charakteristická UV spektra, většina jich rovněž vykazuje fluorescenci (45). Právě díky silné fluorescenci PAU je fluorescenční detekce velice vhodná pro jejich kvantitativní stanovení i ve stopových množstvích (20).

1.2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie nabízí některé výhody pro stanovení 16 PAU podle US EPA. Pokud je použita oktadecylová stacionární fáze, je kapalinová chromatografie selektivní i pro izomery. Kapalinová chromatografie je výhodnější oproti chromatografii plynové, která neumožňuje některé izomery rozlišit. Tato schopnost rozlišovat mezi podobnými chemickými strukturami (izomery PAU) bývá označována jako tvarová selektivita nebo molekulární rozpoznávání (46). Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je nejlepší metoda pro přímé stanovení PAU v přírodních vodách díky její schopnosti pracovat s organickými teplotně nestabilními látkami o vysoké molekulové hmotnosti (47) a možnosti použití několika detekčních systémů, které mohou být použity i v tandemovém zapojení (48).

1.2.2 Spektrofotometrická detekce

Spektrofotometrické detektory pracují na principu absorpce záření o vlnových délkách v rozsahu nejčastěji 200 až 800 nm. Kvantitativní vyhodnocení je prováděno na základě Lambert-Beerova zákona, který vyjadřuje závislost absorbance na tloušťce absorbující vrstvy, koncentraci absorbující látky a molárním absorpčním koeficientu absorbující látky. Podle konstrukce lze spektrofotometrické detektory rozdělit na detektory s fixní vlnovou délkou, proměnnou vlnovou délkou a detektory s diodovým polem (PDA). Hlavní výhodou PDA detektoru je schopnost měřit celé absorpční spektrum v reálném čase a možnost detekce i těch PAU, které nevykazují fluorescenci (např. acenaftylen) (49). PDA detektor lze použít nejen k detekci látky při zvolené vlnové délce, ale i k výpočtu čistoty píku. Změřená spektra je možné porovnat s knihovnou spekter, ale tato spektra nejsou příliš specifická (50).

Mezi významné nevýhody tohoto typu detekce, v porovnání s fluorescenční detekcí, patří nižší selektivita a vyšší detekční limity.

1.2.3 Fluorescenční detekce

Fluorescenční detekce je založena na schopnosti molekul některých látek emitovat část absorbované energie po excitaci valenčních elektronů jako luminiscenci trvající 10^{-8} až 10^{-5} s. Zvláštní forma luminiscence se nazývá fluorescence. Intenzita fluorescence je závislá na vlnové délce záření použitého k excitaci valenčních elektronů (excitační záření) a na vlnové délce záření použitého k měření intenzity emitovaného záření (emisní záření). Závislost intenzity fluorescence na vlnové délce emisního záření měřeného při určité konstantní vlnové délce excitačního záření se nazývá fluorescenční emisní spektrum. Závislost intenzity fluorescence na vlnové délce excitačního záření při určité konstantní vlnové délce emisního záření se nazývá fluorescenční excitační spektrum. Fluorescenční emisní spektrum vykazuje maximum intenzity fluorescence vždy při vyšších vlnových délkách než spektrum excitační. S fluorescencí se lze setkat u sloučenin se systémem konjugovaných dvojných vazeb. Intenzita fluorescence roste s počtem těchto dvojných vazeb (51). Míra fluorescence je hodnocena pomocí poměru počtu vyzářených a absorbovaných fotonů. Čím více daná látka fluoreskuje, tím je tento poměr větší. Hodnota poměru je však vždy menší než jedna (52). Fluorescence může být ovlivněna rozpouštědlem, pH, teplotou a koncentrací fluoreskujícího analytu. Většina aromatických uhlovodíků vykazuje silnou fluorescenci, zejména po excitaci zářeními z ultrafialové oblasti (51). Ne všechny PAU však vykazují fluorescenci. Z 16 EPA PAU se jedná o acenaftylen, který bývá stanovován UV detektorem (46).

Hlavními součástmi fluorescenčního detektoru jsou zdroj záření, měrná cela, fotonásobič a záznamové zařízení. Jako zdroj záření mohou být použity wolframové lampy, ale zvláště vhodné jsou rtuťové, xenonové nebo rtuťo-xenonové výbojky (51). Z polychromatického záření emitovaného zdrojem záření je monochromátorem izolováno záření o určité vhodné vlnové délce. Jeho energie musí být stejná nebo vyšší (a vlnová délka stejná nebo kratší) než energie (vlnová délka) sekundárního emitovaného záření (53). Část energie je totiž spotřebována vibračními relaxacemi. Tento rozdíl se nazývá Stokesův posun (52). K excitaci fluorescenčního záření se proto používá záření z ultrafialové oblasti. Toto záření prochází měřeným vzorkem, který je umístěn v cele detektoru (53). Po absorpci elektromagnetického záření (světla) dojde k přechodu molekul ze základního singletového elektronového stavu do excitovaného singletového elektronového stavu. Excitovaná

molekula absorbovanou energii vyzáří jako fluorescenci, přemění na energii vibrační nebo ji předá dalším molekulám. Když molekula ztratí vibrační energii, přejde nejprve do nejnižší vibrační hladiny ($v = 0$) excitovaného singletového stavu S_1 a potom emituje fluorescenční záření o stejné nebo vyšší vlnové délce než je vlnová délka absorbovaného záření (49). Vystupující (sekundární) záření prochází optickým filtrem nebo monochromátorem a dopadá na detektor, kterým je fotonásobič. Měření vystupujícího záření je uskutečněno ve směru kolmém k záření vstupujícímu (53).

Optimalizace fluorescenční detekce je prováděna za účelem dosažení co nejvyššího poměru signálu analytu k šumu základní linie. Mezi optimalizované parametry patří excitační a emisní vlnová délka, emisní filtr a citlivost fotonásobiče (54). Nejdůležitějšími parametry, které je třeba optimalizovat, jsou excitační a emisní vlnová délka (55). Nejprve je provedeno změření emisních spekter, při kterém excitační vlnová délka zůstává konstantní a monochromátor opakovaně skenuje nastavený rozsah emisních vlnových délek. Po získání emisních spekter jsou změřena spektra excitační. Emisní vlnová délka zůstává konstantní a monochromátor skenuje nastavený rozsah excitačních spekter (54). Změření excitačních a emisních spekter jsou získána excitační a emisní maxima jednotlivých sloučenin, podle kterých jsou voleny excitační a emisní vlnové délky. Vybraná emisní vlnová délka by měla být minimálně o 20 nm vyšší než excitační. K potlačení bloudivého světla (sekundární difrakce) jsou využívány emisní filtry. Tyto filtry mají určitou nominální hodnotu vlnové délky (cut-off). Propouštějí světlo, které má vlnovou délku delší než jejich cut-off, ale nepropouštějí světlo s kratší vlnovou délkou než je vlnová délka jejich cut-off. Vhodný emisní filtr může být volen automaticky nebo manuálně. V případě manuální volby emisního filtru by cut-off zvoleného filtru měla být o minimálně 15 nm vyšší než emisní vlnová délka. Optimalizace citlivosti detektoru je prováděna pomocí změny napětí na fotonásobiči a následného hodnocení jeho saturace vyjadřované v procentech (55). Příliš vysoké napětí může způsobit neúměrně vysoký tok elektronů nebo dokonce poškodit světlocitlivou fotokatodu. Příliš nízké napětí zvyšuje šum, čímž dochází ke snížení poměru signálu k šumu. Ideální nasycení fotonásobiče se pohybuje v rozmezí 30–80 %. Pokud je nasycení nižší než 30 %, je třeba zvýšit citlivost. Pokud je nasycení 100 %, přístroj citlivost automaticky sníží, aby nedošlo k poškození fotonásobiče (54).

Fluorescenční detekce patří mezi nejcitlivější optické detekce, které jsou využívány ve spojení s HPLC (54). Kromě vysoké citlivosti (až pikogramy analytu), nabízí spojení HPLC s programovatelným vícekanálovým fluorescenčním detektorem vysokou selektivitu

(redukce interference matrice), a lze jej v případě koeluce analytů s dostatečně rozdílnými spektrálními vlastnostmi použít ke spektrálnímu rozlišení těchto analytů (56). Díky vysoké selektivitě a citlivosti nachází využití v komplikovaných maticích a při stopových analýzách. Dalšími výhodami fluorescenčního detektoru jsou jednoduchost a robustnost provedení a relativně nízká cena (například ve srovnání s detektorem hmotnostním). V případě absence molekulárních struktur umožňujících fluorescenci (fluorofor) v molekule analytu je možné provést tzv. derivatizaci, tzn. zavedení fluoroforu do nefluoreskující látky za pomoci derivatizačních činidel (57). Výhodou spojení HPLC a fluorescenční detekce je schopnost kvantitativního stanovení jednotlivých izomerů PAU, které jsou obtížně kvantifikovatelné pomocí GC/MS. Nevýhodou fluorescenční detekce je, podobně jako u spektrofotometrické detekce, identifikace analytů pouze pomocí retenčního času a popř. i pomocí excitačních a emisních spekter (58).

1.2.4 Hmotnostní detekce

Dva nejběžnější způsoby ionizace používané při spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí – ionizace elektrosprejem a chemická ionizace za atmosférického tlaku – nejsou efektivní při ionizaci nepolárních látek, mezi které patří i PAU. Tento problém byl vyřešen vývojem fotoionizace za atmosférického tlaku, která je schopna ionizovat i PAU (46). Kapalinová chromatografie ve spojení s fotoionizací za atmosférického tlaku a tandemovou hmotnostní spektrometrií dokáže detekovat PAU v koncentracích řádově ng/l. Tato metoda již byla úspěšně aplikována na různé přírodní vody včetně vod mořských (59). I ionizace elektrosprejem může být použita k analýze PAU, ale musí být použita postkolonová derivatizace. Lze použít i chemickou ionizaci za atmosférického tlaku, pokud je přidán vhodný dopant, např. anizol. Toto spojení může představovat jistou alternativu k plynové chromatografii, zejména pro analýzu vysokomolekulárních PAU, kde bývají problémy s jejich nízkou těkavostí. Při spojení hmotnostní detekce s kapalinovou chromatografií na normálních fázích bývá problémem omezená kompatibilita s vodou ve vzorcích, což má za následek omezenou reprodukovatelnost metody (60).

1.3 Metody přípravy vzorků pro chromatografickou analýzu

Polycyklické aromatické uhlovodíky jsou ve vodách obsaženy řádově v ng/l, což téměř vždy vyžaduje provedení extrakce a následné zakoncentrování analytu, aby je bylo možné detekovat pomocí PDA nebo FLD detektoru (36).

Jednou z nejdůležitějších operací při stanovení kontaminantů v přírodních maticích představuje jejich extrakce. Nejčastější způsoby extrakce PAU z vody jsou extrakce tuhou

fázi (SPE) a extrakce kapalina-kapalina (LLE). Obě tyto metody poskytují výtěžnost vyšší než 70 % pro benzo[a]anthracen, chrysen, benzo[b]fluoranthén, benzo[k]fluoranthén, benzo[a]pyren, dibenzo[a,h]anthracen a indeno[1,2,3-c,d]pyren. Důležitým faktorem, který je třeba vzít v úvahu při vývoji extrakční metody, je silná adsorpce PAU na stěny nádob, což je způsobeno jejich hydrofobním charakterem. Hrozí tak ztráty těchto látek během skladování vzorků. Adsorpci lze předejít přidáním organického rozpouštědla (acetonitril, isopropanol, methanol) v koncentraci 20–40 objemových procent. U extrakčních technik používajících pevnou fázi je však třeba zkontrolovat vliv přídavku rozpouštědla na výtěžnost (37).

Je však nutné mít na paměti, že největší vliv na nejistotu analýzy má téměř vždy odběr a následné úpravy vzorku (21).

1.3.1 Extrakce kapalina-kapalina

Extrakce kapalina-kapalina (LLE) je založena na odlišné rozpustnosti analytu ve vodě a v organickém rozpouštědle nemísitelném s vodou (51). Rozpustnost analytu ve vodě by měla být co nejmenší, rozpustnost v organickém rozpouštědle zase naopak co největší (57). Distribuci charakterizuje Nernstův rozdělovací (distribuční) koeficient. Je roven podílu koncentrace analytu v organické a ve vodné fázi (61). Distribuce analytu mezi dvě fáze je dána typem organického rozpouštědla, hodnotou pH vodné fáze a poměrem objemu organické a vodné fáze. Výběr rozpouštědla je dán polaritou analytu (51). Pro extrakci PAU jsou používána rozpouštědla jako methanol, aceton, chloroform, dichlormethan, hexan a cyklohexan (62). Extrakce je zahájena přidáním organického rozpouštědla ke vzorku. Samotné převedení analytu ze vzorku do organického rozpouštědla je obvykle prováděno třepáním. Poté následuje odebrání supernatantu, ve kterém je rozpuštěn sledovaný analyt. Přebytek organického rozpouštědla je třeba odstranit například odfoukáváním proudem dusíku (61). Klasické odpařování nebo koncentrování v proudu plynu však může způsobit ztrátu analytu jeho odfoukáním, rozkladem teplotně citlivé látky, tvorbou aerosolu nebo adsorpcí na povrchy. V současné době je možné použít rotační odpařovače, které umožňují rychlé odpaření za mírných podmínek (51). Extrakce kapalina-kapalina však vyžaduje poměrně velké objemy vzorků, je časově náročná a spotřebuje velké objemy rozpouštědla, které je při koncentrování analytů odpařeno do atmosféry. Preferovaným rozpouštědlem je pro svůj nízký bod varu (40 °C) dichlormethan, který minimalizuje ztráty těkavých PAU při nízkoteplotním odpařování. Toto organické rozpouštědlo je však považováno za karcinogen s poměrně vysokou perzistencí v prostředí (23).

Extrakce kapalina-kapalina je stále jednou z nejpoužívanějších technik na přípravu vzorku v analytických laboratořích. Mezi výhody LLE patří jednoduchost a vysoká účinnost (90–100 %) (63; 64). Extrakce kapalina-kapalina umožňuje analyzovat vodu bez filtrace, díky čemuž lze extrahovat polutanty, které mají tendenci k akumulaci v pevných látkách (65). Na druhou stranu LLE vyžaduje velké množství rozpouštědel, čištění nádobí, dostatek prostoru v laboratoři a zakoncentrování vzorku odpařením rozpouštědla. Tyto skutečnosti činí z LLE techniku časově náročnou, problematickou v oblasti bezpečnosti práce a rizikovou pro životní prostředí. Proto během posledních desetiletí učinila LLE významný pokrok ve vývoji miniaturizovaných metod nazývaných mikroextrakce kapalnou fází (LPME), které odstranily předchozí problémy (64).

Pro přírodní, užitkové a po určité úpravě i pro odpadní vody je vhodná metoda extrakce kapalina-kapalina s následnou analýzou pomocí HPLC s fluorescenční detekcí. Tato metoda umožňuje stanovení PAU v povrchových vodách v koncentracích větších než 0,01 µg/l a v pitných a podzemních vodách v koncentracích větších než 0,005 µg/l. Extrakce PAU je prováděna pomocí hexanu, který je poté zakoncentrován odpařením a odparek je převeden do rozpouštědla vhodného pro HPLC. Tuto metodu popisuje norma ČSN EN ISO 17993 (75 7555) a týká se 15 PAU. Norma ISO 28540 popisuje stanovení 16 PAU ve vodě metodou plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Je vhodná pro všechny druhy vod. (66).

1.3.2 Extrakce tuhou fází

Extrakce tuhou fází je založena na rozdělení analytu mezi dvě nemísitelné fáze, přičemž jedna z těchto fází je tuhá (sorben) a druhá kapalná nebo plynná (vzorek). Mezi výhody SPE patří vysoká výtěžnost (70,0–127,0 %), krátká doba extrakce (<60 min), vysoký faktor obohacení (81–135) (67) a snadná automatizace. Tyto výhody činí z SPE metodu univerzálně použitelnou pro koncentrování PAU ve vodných vzorcích. Výběr adsorbentu je důležitý faktor pro získání vysoké účinnosti extrakce. Pro zakoncentrování PAU ve vodných vzorcích bývají používány porézní organokrystalový kompozit, maticí imobilizované organokrystal, polyvinylidenfluorid a bambusové dřevěné uhlí. Nejrozšířenější je však oktadecyl navázaný na silikagelový nosič (16). Extrakce tuhou fází poskytuje podobné výsledky jako LLE, v případě SPE však jsou závislé na ztrátách během přenosu vzorku na extrakční kolonu (44).

Extrakce kapalina-kapalina je efektivní pro PAU s vyšší molekulovou hmotností, zatímco SPE je vhodná pro všechny PAU (68).

1.3.3 Jiné extrakční metody

Vzhledem k časové náročnosti LLE a používání velkého objemu rozpouštědla při této technice jsou pro stanovení PAU v přírodních vzorcích používány i jiné druhy extrakcí, například mikroextrakce kapalnou fází, mikroextrakce tuhou fází nebo extrakce pomocí míchadla pokrytého polydimethylsiloxanem (43).

Mikroextrakce kapalnou fází

Mikroextrakce kapalnou fází (LPME) vychází z LLE, je to v podstatě její miniaturizovaná forma. Objem použité extrakční fáze je u LPME menší než 100 μ l, sníženo je rovněž množství vzorku (pro extrakci PAU z vody 3–10 ml). Extrakční rovnováhy je dosaženo v kratším čase (20–60 min). Více se však projevuje vliv matrice (iontová síla, suspendované částice, viskozita, teplota), díky čemuž pak není kontakt mezi oběma fázemi tak přímý jako v případě LLE (64). V posledních letech se LPME stává poměrně často používaným způsobem extrakce environmentálních, potravinových a farmaceutických vzorků. Tato metoda je jednoduchá, rychlá a cenově dostupná pro extrakci široké škály analytů z komplexních matic. Mikroextrakce kapalina-kapalina (LLME) je jedna z hlavních skupin patřících do kategorie LPME. Mikroextrakce kapalina-kapalina zahrnuje další čtyři skupiny: disperzní mikroextrakce, mikroextrakce magnetickými kapalinami, mikroextrakce supramolekulárním rozpouštědlem a mikroextrakce s pomocí vortexu (69).

Disperzní mikroextrakce kapalina-kapalina (DLLME) je založena na vstříknutí směsi extrakčního a dispergujícího rozpouštědla do vodného vzorku (70). Tím jsou vytvořeny velmi jemné kapičky extrakčního rozpouštědla. Velký povrch plochy mezi jemnými kapičkami a vodnou fází umožňuje rychlý přesun analytů z roztoku vzorku do extrakční fáze. Centrifugace směsi způsobí sedimentaci kapiček na dně zkumavky. Nakonec může být sediment odebrán stříkačkou a analyzován odpovídajícím zařízením. Metoda DLLME se stala velmi oblíbeným typem mikroextrakce díky výhodám jako rychlost, jednoduchost, vysoký faktor obohacení (pro extrakci PAU z vody 1630–2637) a nízká spotřeba rozpouštědla (několik mikrolitrů) (71; 69).

Magnetické tekutiny jsou kapaliny tvořené magnetickými nanočásticemi a nosnou kapalinou. Aplikace magnetických kapalin je však stále omezena, neboť povrch nanočástic je citlivý na změnu pH a iontové síly. Proto tyto částice bývají pokryty organickými i anorganickými látkami, které je stabilizují a umožní tak vyhnouti se nežádoucím komplikacím (69).

Supramolekulární rozpouštědla jsou s vodou nemísitelné nanostrukturní kapaliny. Polární oblasti SURPAS sestávají z karboxylových nebo amoniových skupin. Díky tomu je možné vytvoření π -kationtových, elektrostatických a vodíkových vazeb s analyty. Uspořádaná struktura uhlovodíkových řetězců poskytuje hydrofobní interakce s nepolárními sloučeninami. Vysoká koncentrace agregátů umožňuje rozpuštění velkého množství polárních i nepolárních molekul. Tyto vynikající vlastnosti supramolekulárního rozpouštědla jako extrakční fáze dovolují rychlou, jednoduchou a efektivní přípravu různých látek (69).

Mikroextrakce s pomocí vortexu (VALLME) je technika přípravy vzorku disperzí extrakčního rozpouštědla za pomoci míchání vortexem. Cílové molekuly mohou být extrahovány z vody do jemných kapiček extrakční fáze díky velmi velké ploše povrchu a krátké difuzní vzdálenosti těchto kapiček. Po centrifugaci může být plovoucí mikropapka jednoduše odebrána mikrostríkačkou z hladiny vodné fáze a může být použita v následující analýze. Jednoduchost, rychlost a eliminace disperzního rozpouštědla dělá z VALLME účinnou metodu pro extrakci a analýzu organických i anorganických polutantů environmentálních vzorků s vysokým faktorem obohacení (68–78) a nízkými mezemi detekce (2–5 ng/l) (72; 69).

Mikroextrakce kapalinou s pomocí dutého vlákna

Mikroextrakce kapalinou s pomocí dutého vlákna (HFLPME) je založena na rozdělení organické sloučeniny mezi vodnou fází a organické rozpouštědlo, které je umístěno v dutině vlákna (lumen). Tato technika má několik výhod: je jednoduchá, levná, dosahuje vysokého faktoru obohacení (48–95), je použit velice malý objem organického rozpouštědla (jednotky mikrolitrů) a může být realizována v mnoha konfiguracích (73). Mikroextrakce kapalinou s pomocí dutého vlákna je jednokroková metoda, která poskytuje lepší stabilitu organické fáze než jiné mikroextrakce, protože je umístěna v dutině v mikroporézní stěně kapilárního vlákna. Další výhodou HFLPME je, že cílové sloučeniny mohou být zakoncentrovány přímo v rozpouštědle, ve kterém jsou poté bez dalších úprav nadávkovány do kapalinového nebo plynového chromatografu (74; 75).

Mikroextrakce tuhou fází

Mikroextrakce tuhou fází (SPME) přináší oproti klasické SPE řadu výhod. Je jednoduchá, praktická, nepoužívá se při ní rozpouštědlo a navíc je použitelná pro stanovení i stopových koncentracích kontaminantů, které odpovídají jejich obsahu v životním prostředí. Umožňuje zahrnout víceúrovňové procedury (extrakce, zakoncentrování, čištění) do jednoho kroku. Také snižuje riziko ztráty analytů, které je obvyklé u LLE. Metoda SPME

může být také automatizována, což z ní činí metodu využitelnou v rutinní analýze (76). I přes tyto výhody jsou některé aspekty, které si zaslouží být studovány. Protože je SPME používána pro extrakci organických sloučenin ve stopových koncentracích z polárních matric, je nutný přídavek soli ke zvýšení iontové síly roztoku a tím i efektivity extrakce. V tomto případě je pak nutné provést hodnocení přídavku soli na funkci sorbentu a vliv tloušťky vrstvy sorbentu na separaci analytů. Dalším předmětem zkoumání je optimalizace objemu vzorku (77). Vlákna však mají krátkou životnost a jejich nestabilita při styku s organickými rozpouštědly do určité míry omezuje jejich spojení s HPLC (69).

Extrakce pomocí míchadla pokrytého polydimethylsiloxanem

Extrakce pomocí míchadla pokrytého polydimethylsiloxanem (SBSE) má řadu výhod, mezi něž patří vysoká citlivost (0,05–2,94 ng/l), dobrá reprodukovatelnost (4,8–16,9 %), vysoká výtěžnost (70,8–122 %) a malá spotřeba organických rozpouštědel (desítky mikrolitrů). Byla úspěšně aplikovaná ve stopové analýze přírodních, potravinových a biochemických vzorků (43).

1.4 Stanovení PAU v říčních vodách ve světě a v České republice

Řeka Qiantang protéká regionem Yangzi River Delta. Tento region patří k nejrozvinutějším oblastem v Číně. Řeka Qiantang je navíc jeden z nejdůležitějších zdrojů pitné vody v této oblasti. Chen a kol. (78) sledovali místní a časové rozšíření 15 PAU podle US EPA. Vynechán byl acenaftýlen, a to z důvodu absence fluorescence. Voda byla odebrána ze 45 míst podél řeky. Z těchto 45 míst se jich 15 nacházelo v městských průmyslových oblastech, 30 v oblastech venkovských. Vzorky byly připraveny extrakcí tuhou fází. Před extrakcí byla oktadecylová fáze promyta 5 ml dichlormethanu, 5 ml methanolu a 5 ml ultračisté vody. K vodnému vzorku o objemu 1 l bylo přidáno přibližně 150 ml methanolu. Roztok byl procezen přes kazetu při průtoku 3 ml/min ve vakuu. Po extrakci byly zachycené PAU eluovány do skleněné trubice 5 ml dichlormethanu. K odstranění zbytků vody bylo přidáno 0,2 g bezvodého síranu sodného. Rozpouštědlo bylo po přídavku 30 μ l dimethylsiloxanu odpařeno mírným proudem dusíku. Poté bylo do trubice přidáno 970 μ l acetonitrilu a obsah přenesen do 2 ml vialky. Pro každý set vzorků byl připraven slepý vzorek a také kontrolní vzorek obsahující všechny reagenty pro kontrolu interferencí a kontaminace. Pět samostatných čistých vod bylo zakoncentrováno pracovním roztokem obsahujícím všech 15 PAU, potom extrahováno a analyzováno stejně jako reálné vzorky. Analýza byla provedena na HPLC s fluorescenční detekcí. Průměrná výtěžnost PAU byla nad 72 %. Relativní směrodatná odchylka metody byla < 5 %. Koncentrace

dvoujaderných PAU se pohybovaly v rozmezí od 7,7 do 1038,0 ng/l, koncentrace tříjaderných PAU od 1,7 do 472,1 ng/l, čtyřjaderných PAU od 4,3 do 311,3 ng/l, pětijaderných PAU do 75,6 ng/l a pro šestijaderné PAU do 118,4 ng/l. Celkové koncentrace potenciálně karcinogenních PAU se pohybovaly od 1,9 do 234,7 ng/l, průměrná hodnota byla 25,5 ng/l. Koncentrace sumy PAU se pohybovala od 70,3 do 1844,4 ng/l. Byla zaznamenána sezónní změna v koncentraci PAU. Průměrná koncentrace sumy PAU byla v lednu 386,9 ng/l, v dubnu 257,7 ng/l, v červenci 199,2 ng/l a v říjnu 289,2 ng/l. Tyto koncentrace souvisí s rozdílným průtokem vody v řece. S vyšším průtokem stoupá rozptylovací poměr.

Řeka Huaihe je jednou z největších řek v Číně. Liu a kol. (11) sledovali prostorové a časové rozšíření PAU v této řece. Voda byla odebírána v prosinci, dubnu a srpnu v hloubce 0,5 m pod hladinou do předem vyčištěných nádob o objemu 25 l pomocí válcových vzorkovačů. Extrakce byla provedena pomocí SPE kazet, které byly před extrakcí kondicionovány 20 ml dichlormethanu, 20 ml methanolu a 20 ml ultračisté vody. K extrakci bylo použito 2 l vody a extrakce byla provedena rychlostí 5 ml/min. Kazety byly vysušeny mrazením po dobu 72 h pro odstranění vlhkosti. Poté byly 3x promyty 6 ml ethylacetátu. Pomocí rotačního odpařovače byl objem rozpouštědla snížen na 1 ml. Koncentrovaný extrakt byl přečištěn přes skleněnou kolonu, která byla v horní části pokryta 1 g bezvodého síranu sodného a v dolní části 2 g silikagelu. Po počátečním promytí kolony 8 ml hexanu byla frakce obsahující PAU eluována směsí n-hexanu a dichlormethanu (1:1, v/v). Vzorky byly zakoncentrovány na 1 ml pomocí rotačního odpařovače. Byla provedena kontrola kvality analýzou slepých vzorků rozpouštědla, obohacených vzorků i matrice. Analýza byla provedena v systému HPLC-FLD. Procentové zastoupení PAU bylo následující: dvoujaderné od 3,54 % do 17,06 %, tříjaderné od 73,32 % do 92,67 %, čtyřjaderné od 3,20 % do 13,05 %, pětijaderné od 0,06 % do 0,58 % a šestijaderné od detekčního limitu do 0,28 %. Nízkomolekulární PAU byly zastoupeny ve všech vzorcích vody. Naopak nejnižší obsahy byly zjištěny v případě BkF, BaP, DBA, BgP a InP. Průměrná koncentrace BkF byla 0,01 ng/l, BaP nebyl detekován, průměrná koncentrace DBA byla 0,10 ng/l, průměrná koncentrace BgP 0,01 ng/l a průměrná koncentrace InP 0,07 ng/l. Koncentrace sumy PAU ve vodě se pohybovala od 79,94 do 421,07 ng/l. Nejvyšší koncentrace (178,00 ng/l) byly zaznamenány v prosinci (období sucha), nejnižší (109,34 ng/l) v srpnu (období dešťů). Byly též zjišťovány zdroje PAU pomocí poměru některých PAU. Poměr anthracenu a součtu anthracenu a fenanthrenu byl nižší než 0,1, což poukazuje na ropný původ PAU. Poměr fluoranthenu a součtu fluoranthenu a pyrenu byl vyšší než 0,5, což naznačuje původ ze

spalovacích procesů. Poměr benzo[a]anthracenu a součtu benzo[a]anthracenu a chrysenu byl ze 41,90 % mezi 0,2 a 0,35 a z 21,70 % nižší než 0,2, což značí smíšený původ (ropný i ze spalovacích procesů).

Výrobna plynu v Německu v Meklenbursku-Předním Pomořansku vypouštěla během 50 let odpadní vody přímo do řeky Warnow ze které město Rostock odebírá pitnou vodu pro svých 250 000 obyvatel. Randow a kol. (79) zjišťovali skladbu polutantů a jejich možné uvolňování ze sedimentu do řeky. Vzorky vody byly odebírány z hladiny ze středu řeky. Extrakce PAU byla provedena pomocí cyklohexanu ze vzorků o objemu 1 l a stanovení PAU pomocí HPLC s UV detektorem a fluorescenčním detektorem. Detekční limit byl 4 ng/l pro 6 PAU podle německé normy. Koncentrace PAU se pohybovaly od 4 do 18 ng/l. Ve srovnání s německou normou, která stanovuje limit 200 ng/l, jsou tyto koncentrace velmi nízké. Hlavním zdrojem PAU je sediment, který uvolňuje malé konstantní množství PAU, ve vodě jsou rozpuštěna pouze stopová množství. Huminové kyseliny a seston snižují koncentraci PAU.

Wolska a kol. (80) analyzovali vodu a sediment a zjišťovali obsah různých polutantů včetně PAU. Nejprve byly vzorky obohaceny vnitřními standardy naftalen- d_8 a benzo[a]anthracen- d_{12} . Analyty byly izolovány pomocí SPE. Před izolací byl nosič sorbentu vysušen a analyty poté byly eluovány dichlormethanem. Eluát byl poté odpařen mírným proudem dusíku na 0,3 ml. Analýza byla provedena pomocí GC-MS. Detekční limit metody byl 1–5 ng/l, relativní směrodatná odchylka 10–20 %. Kvalita výsledků byla kontrolována analýzou roztoku standardu simulujícího přečištěný extrakt vzorku k zhodnocení účinnosti separace a reálných vzorků analyzovaných i v jiných laboratořích. Celkový obsah 16 PAU podle US EPA se pohyboval od hodnot pod detekčním limitem až po 1,5 $\mu\text{g/l}$. Ve vzorcích po povodních byl obsah PAU od 2,0 do 2,4 $\mu\text{g/l}$, v jednom případě dokonce 3,35 $\mu\text{g/l}$. Při většině měření byla koncentrace okolo 0,5 $\mu\text{g/l}$. Obecně vyšší koncentrace byly na horním toku Odry. To může být způsobeno tím, že řeka protéká vysoce urbanizovanými územími Skorogoszcz a Oława. Sever České republiky, odkud řeka přitéká, je vysoce průmyslovou oblastí a v povodí Odry se dále nachází polská elektrárna a teplárna Opole. Nejvyšší povolená hodnota koncentrace benzo[a]pyrenu (0,2 $\mu\text{g/l}$) nebyla překročena. Bylo zjištěno, že znečištění řeky PAU se mění se stavem hladiny řeky; nižší koncentrace byly zaznamenány při vyšších výškách hladiny.

Prokeš a kol. (42) sledovali místní a časové rozšíření hydrofobních polutantů včetně PAU v řece Moravě a jejím přítoku Dřevnici v průmyslových oblastech Zlína a okolí. Voda

v této oblasti byla v minulosti ovlivněna průmyslem a zemědělstvím. Odběr byl prováděn na pěti místech. Voda byla nabírána do žluté skleněné lahve o objemu 2,5 l se šroubovacím uzávěrem v hloubce 1 m pod hladinou. Pasivní vzorkovače z polydimethylsiloxanu byly vypláchnuty vodovodní vodou, destilovanou vodou a vysušeny papírovým kapesníkem. Poté byly extrahovány Soxhletovou extrakcí v methanolu po dobu 12 h. Objem extraktů byl snížen na 15 ml pomocí Kuderna-Danishova koncentrátoru. Konečné odpaření rozpouštědla bylo provedeno proudem dusíku, objem byl snížen na 2 ml. Vzorky byly přečištěny za použití silikagelové kolony, redukovány a byl přidán vnitřní standard, kterým byl terpenyl. Vzorky byly analyzovány pomocí GC/MS. Nejvyšší střední koncentrace všech PAU (kromě anthracenu) byly pozorovány v řece Dřevnici (suma PAU 93,19 ng/l). Tato řeka absorbuje znečištění z průmyslové oblasti s chemickým, plastikářským, gumárenským, obuvnickým a strojírenským. Díky malé velikosti je tato řeka více ovlivněna lokálním znečištěním než větší řeka Morava. V řece Moravě byly zjištěny zvýšené koncentrace anthracenu (3,40 ng/l). Místní variabilita se pohybovala mezi 7,8 a 25,7 % s výjimkou anthracenu, který vykazoval variabilitu 47,7 %. Zvýšené koncentrace anthracenu byly zjištěny v jednom místě, které se nachází v blízkosti producenta anthrachinonu. Koncentrace součtu PAU se pohybovala od 47,77 do 93,19 ng/l. Jasný trend poklesu koncentrace s rostoucí teplotou vody byl zaznamenán u dvou nejtěkavějších PAU, naftalenu a acenaftylenu, slabší trend lze zaznamenat u fluorenu a fenanthrenu. Vzrůst koncentrace PAU s poklesem teploty také může souviset s intenzivnějším vytápěním domácností během zimních měsíců, a tím i vyšší koncentrací PAU v atmosféře a vyššími atmosférickými depozicemi. Rovněž byl pozorován pokles koncentrace PAU v závislosti na toku.

2 Materiál a metody

2.1 Přístroje a pomůcky

Chromatografické separace byly prováděny na kapalinovém chromatografu Dionex UltiMate 3000 od firmy Thermo Scientific (USA), který je vybaven následujícími komponentami:

- zásobník mobilní fáze SR-3000
- čerpadlo LPG-3400SD
- autosampler WPS-3000TSL
- kolonový termostat TCC-3000SD
- přepínač kolon PD 715-025
- UV/VIS detektor DAD-3000RS
- fluorescenční detektor FLD-3400RS

Na ovládání chromatografu a zpracování chromatogramů byl použit program Chromeleon 7.2.1.5537., validace metody byla provedena v programech EffiValidation 3.0 a Microsoft Excel 2013.

Byla použita chromatografická kolona PAH C18 od firmy Waters (USA) o rozměrech 250 x 3,0 mm a velikosti částic náplně 5 μm . Tato kolona je speciálně určená pro PAU.

Objemy kapalných látek byly odměřovány automatickými pipetami Biopette PLUS od firmy Labnet (USA) o objemech 100 až 1000 μl , automatickou pipetou Transferpette S od firmy BRAND (Německo) o objemu 1-10 ml a skleněnými stříkačkami od firmy Hamilton (USA) o objemech 5; 10; 25; 50; 100, 250 a 500 μl . Deionizovaná voda byla připravena přístrojem Smart2Pure 6 UV/UF od firmy Thermo Scientific (USA). Extrakce byly prováděny na orbitální třepačce ORBIT 1000 od firmy Labnet (USA), centrifugace na centrifuze 3–30 K od firmy SIGMA Laborzentrifugen (Německo). K odstranění extrakčního rozpouštědla byl používán termoblok SBH130D/3 a koncentrátor vzorků SBHCONC/1 od firmy Stuart (UK).

Pro odběr vody z řeky byla z bezpečnostních důvodů použita plastová láhev o objemu 2 l s uříznutým hrdlem. Voda byla navažována na vahách od firmy DENVER INSTRUMENT (Německo).

2.2 Chemikálie

V průběhu práce byly použity následující chemikálie:

- směsný standard PAU MIX-9 od firmy Dr. Ehrenstorfer (Německo), šarže 30325AL, objem 10 ml, koncentrace 100 mg/l, který obsahoval 16 prioritních PAU podle US EPA: naftalen, acenaftylen, acenaften, fluoren, fenanthren, anthracen, fluoranthen, pyren, benzo[a]anthracen, chrysen, benzo[b]fluoranthen, benzo[k]fluoranthen, benzo[a]pyren, dibenzo[a,h]anthracen, benzo[g,h,i]perylen, indeno[1,2,3-c,d]pyren.
- vnitřní standard 9,10-difenylanthracen od firmy Sigma-Aldrich (Německo), šarže SZB8186XV
- acetonitril gradient grade pro kapalinovou chromatografii od firmy Merck (Německo)
- hexan čistoty 95,0 % od firmy J.T. Baker (USA)
- hexan čistoty 98,0 % od firmy Merck (Německo)
- cyklohexan čistoty 99,8 % od firmy Merck (Německo)
- isopropanol pro kapalinovou chromatografii a UV detekci od firmy Macron Fine Chemicals (USA)
- diethylenglykol čistoty p.a. od firmy Sigma-Aldrich (Německo)
- chlorid sodný čistoty p.a. od firmy Penta (ČR)
- bezvodý síran sodný čistoty p.a. od firmy Lach-Ner (ČR)
- dusík 4.0 (99,99 obj. %) od firmy Linde Gas (ČR)

2.3 Příprava mobilních fází

Mobilní fáze A (MF-A) byla připravena smícháním 500 ml vody a 500 ml acetonitrilu ve skleněné lahvi se šroubovacím uzávěrem. Mobilní fáze B (MF-B) byla připravena odlitím acetonitrilu ze zásobní lahve do skleněné lahve se šroubovacím uzávěrem.

2.4 Příprava roztoků standardních sloučenin a vnitřního standardu

Zásobní roztok analytů PAU-ST-A o koncentraci 100 mg/l byl zakoupen od výrobce ve skleněné lahvičce se šroubovacím uzávěrem o objemu 10 ml. Zásobní roztok vnitřního standardu PAU-VS-A byl připraven navážením 50 mg 9,10-difenylanthracenu a rozpuštěním v 1000 ml acetonu. Výsledná koncentrace vnitřního standardu v roztoku PAU-VS-A byla 50 mg/l.

Pracovní roztok analytů PAU-ST-B byl připraven smícháním 0,1 ml roztoku PAU-ST-A s 50 % acetonitrilem v 10 ml odměrné baňce. Výsledná koncentrace analytů v roztoku PAU-ST-B byla 1000 µg/l. Pracovní roztok vnitřního standardu (PAU-VS-B) byl připraven smícháním 1 ml roztoku PAU-VS-A s 50 % acetonitrilem v 10 ml odměrné baňce. Výsledná koncentrace vnitřního standardu v roztoku PAU-VS-B byla 5000 µg/l.

Pracovní roztok analytů PAU-ST-C byl připraven smícháním 0,2 ml roztoku PAU-ST-B a 50 % acetonitrilu v 10 ml odměrné baňce. Výsledná koncentrace analytů v roztoku PAU-ST-C byla 20 µg/l. Pracovní roztok vnitřního standardu PAU-VS-C byl připraven smícháním 1 ml roztoku PAU-VS-B a 50 % acetonitrilu v 50 ml odměrné baňce. Výsledná koncentrace vnitřního standardu v roztoku PAU-VS-C byla 100 µg/l.

Uzávěry všech odměrných baněk obsahujících roztoky standardu a vnitřního standardu byly překryty parafilmem pro zamezení odpaření rozpouštědla, což by způsobilo změny v koncentracích těchto sloučenin. Všechny tyto roztoky byly skladovány v chladničce při teplotě 4 °C po dobu maximálně 1 roku.

2.5 Příprava roztoků – optimalizace metody

Roztoky PAU použité pro účely optimalizace metody byly připraveny smícháním 0,4 ml MF-A, 0,1 ml PAU-VS-C a 0,5 ml PAU-ST-C do hnědých skleněných krimpovacích vialek a poté ihned hermeticky uzavřeny hliníkovým uzávěrem a teflonovým septem o objemu 1,8 ml. Mobilní fáze byla dávkována automatickou pipetou, standard a vnitřní standard stříkačkami Hamilton. Výsledná koncentrace jednotlivých sloučenin byla 10 µg/l.

2.6 Příprava roztoků – validace metody

Roztoky PAU použité pro účely validace metody (PAU-ST-D) byly připravovány do hnědých skleněných krimpovacích vialek a poté ihned hermeticky uzavřeny hliníkovým uzávěrem a teflonovým septem o objemu 1,8 ml. Mobilní fáze byla dávkována automatickou pipetou, standard a vnitřní standard stříkačkami Hamilton. Postup přípravy roztoků i koncentrace jednotlivých sloučenin je uveden v Tab. 1.

Tab. 1: Příprava roztoků PAU pro účely validace.

Koncentrační úroveň [µg/l]	Dávkovaný objem [µl]		
	PAU-ST-C	PAU-VS-C	MF-A
0,01	0,5	100	899,5
0,02	1	100	899
0,05	2,5	100	897,5
0,1	5	100	895
0,2	10	100	890
0,5	25	100	875
1	50	100	850
2	100	100	800
5	250	100	650
10	500	100	400

2.7 Odběr říční vody

K odběru byla použita aparatura popsaná v kapitole 2.1. Láhev na provazu byla spuštěna z mostu do řeky, asi 20 cm pod hladinu. Poté byla vyzvednuta na most a její obsah byl přelit do hnědé skleněné lahve o objemu 2,5 l se šroubovacím víčkem. Tento postup byl při každém odběru opakován 2–3 krát. Hnědá skleněná láhev s vodou byla poté dopravena do chemické laboratoře, kde byla voda ještě týž den spotřebována na analýzu.

2.8 Postup extrakce PAU z vody

Do hnědých skleněných lahví o objemu 500 ml se zábrusovou skleněnou zátkou bylo naváženo přesně asi 500 g vzorku vody. Do vody bylo přidáno 100 µl PAU-VS-C, 5 ml cyklohexanu a 5 g chloridu sodného. Lahve byly uzavřeny a zajištěny kovovou pojistkou, umístěny naležato na orbitální třepačku, kde byly třepány po dobu 30 min při frekvenci 150 ot/min. Poté byly lahve dolity pitnou vodou tak, aby hladina dosahovala asi 1 cm od horního okraje. Cyklohexan byl z hladiny odebírán automatickou pipetou do vialek, do kterých bylo nadávkováno 500 µl fixačního roztoku (směs diethylenglykolu a isopropanolu v poměru 1:4, v/v). Vialky byly vloženy do termobloku, který byl vyhřátý na 30 °C. Do vialek byly zavedeny jehly koncentrátoru umístěného nad termoblokem. Obsah vialek byl odふうkáván dusíkem z tlakové lahve napojené na koncentrátor na objem přibližně 100 µl. Nakonec bylo do vialek přidáno 400 µl MF-A, vialky byly uzavřeny a analyzovány v den přípravy.

3 Výsledky a diskuze

3.1 Optimalizace metody

Metoda optimalizovaná v této práci vycházela z již dříve vyvinuté a optimalizované metody (81). Podmínky chromatografické separace zůstaly zachovány (Tab. 2), ale kromě spektrofotometrického detektoru byl také použit detektor fluorescenční. Acenaftylen však nevykazuje fluorescenci, a tak nemůže být detekován fluorescenčním detektorem. Z tohoto důvodu byl acenaftylen stanovován pouze spektrofotometrickým detektorem při vlnové délce 230 nm. Tato vlnová délka je pro detekci acenaftyleny optimální, jak bylo zjištěno při dřívější optimalizaci spektrofotometrické detekce (81). Předmětem optimalizace této chromatografické metody bylo tedy zejména nalezení vhodných podmínek fluorescenční detekce pro každou sloučeninu. Optimalizovanými parametry byly excitační a emisní vlnová délka, emisní filtr a citlivost.

Tab. 2: Podmínky chromatografické separace.

Parametr	Hodnota
Teplota kolonového prostoru	35 °C
Objemový průtok mobilní fáze	1 ml/min
Objem nástřiku	90 µl
Gradientový program	0–2,5 min: 0 % MF-B
	2,5–10 min: 0 → 100 % MF-B
	10–14 min: 100 % MF B
	14–16 min: 100 → 0 % MF-B
	16–18,5 min: 0 % MF-B

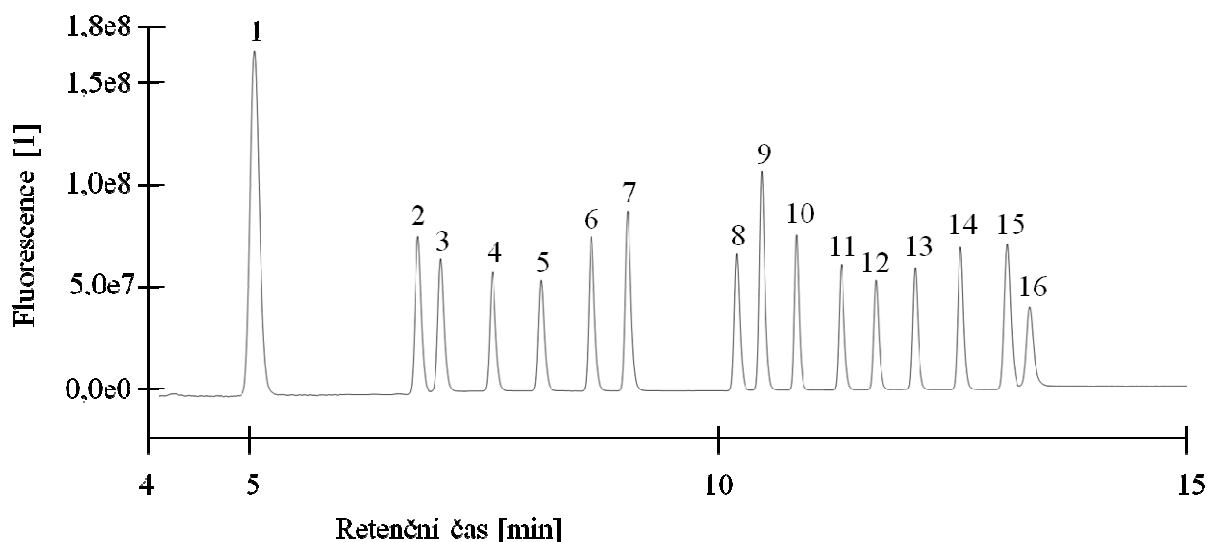
Optimalizace byla zahájena změřením absorpčních spekter jednotlivých sloučenin, čímž byla zjištěna jednotlivá absorpční maxima. Dále byla změřena emisní spektra vždy v určitém rozsahu emisních vlnových délek a při určité vhodné excitační vlnové délce, která vycházela z charakteru jednotlivých absorpčních spekter. Zjištěné vlnové délky emisních maxim byly zvoleny jako optimální. Podobným způsobem byla změřena i excitační spektra při optimální emisní vlnové délce a jejich maxima byla zvolena jako optimální. Emisní filtry byly voleny tak, aby se hodnota jejich cut-off nacházela mezi excitační a emisní vlnovou délkou. Použitý přístroj nabízí čtyři emisní filtry, které mají hodnoty cut-off 280, 370, 435 a 540 nm. Nakonec byla optimalizována citlivost detektoru. Zde byly voleny hodnoty od

1 do 8 tak, aby signál byl dostatečný a zároveň aby nedocházelo k přesycení fotonásobiče. Pro každý analyt byla zvolena nejnižší hodnota, která byla postupně zvyšována až do první deformace píku, která byla způsobena automatickým snížením citlivosti detektoru. Při výskytu tohoto jevu byla pro příslušný analyt zvolena taková hodnota, která byla o jednotku nižší než ta, při které došlo k deformaci píku. Výsledky optimalizace jsou shrnuty v Tab. 3.

Tab. 3: Optimální parametry fluorescenční detekce pro jednotlivé PAU.

Analyt	Excitační vlnová délka [nm]	Emisní vlnová délka [nm]	Emisní filtr [nm]	Citlivost [1]
Naftalen	219	331	280	7
Acenaften	227	337	280	4
Fluoren	261	310	280	4
Fenanthren	247	366	370	8
Anthracen	248	401	370	3
Fluoranthren	233	459	435	8
Pyren	237	391	370	6
Benzo[a]anthracen	283	389	370	5
Chrysen	264	382	370	5
VS	257	410	370	3
Benzo[b]fluoranthren	247	436	435	7
Benzo[k]fluoranthren	245	411	370	3
Benzo[a]pyren	261	406	370	4
Dibenzo[a,h]anthracen	293	397	370	6
Benzo[g,h,i]perylene	293	411	370	8
Indeno[1,2,3-c,d]pyren	247	504	435	8

Na Obr. 2 je uveden chromatogram sledovaných analytů při optimálních podmínkách fluorescenční detekce.



Obr. 2: Chromatogram 15 fluoreskujících PAU a vnitřního standardu za optimálních podmínek fluorescenční detekce: naftalen (1), acenaften (2), fluoren (3), fenantren (4), anthracen (5), fluoranthen (6), pyren (7), benzo[a]anthracen (8), chrysen (9), VS (10), benzo[b]fluoranthen (11), benzo[k]fluoranthen (12), benzo[a]pyren (13), dibenzo[a,h]anthracen (14), benzo[g,h,i]perylene (15), indeno[1,2,3-c,d]pyren (16).

Při porovnání excitačních a emisních vlnových délek použitých v této práci (viz v Tab. 3) s hodnotami, které ve svých pracích použili jiní autoři (viz Tab. 4) je zřejmé, že se tyto hodnoty v některých případech poměrně výrazně liší. V publikaci autorů Williamson a kol. (56) bylo zvoleno pouze 5 hodnot excitačních a emisních vlnových délek. Nejvyšší rozdíl excitační vlnové délky oproti této práci byl u naftalenu (61 nm), nejvyšší rozdíl emisní vlnové délky u benzo[g,h,i]perylenu (54 nm). V publikaci autorů Brum a kol. (82) bylo zvoleno 7 hodnot excitačních vlnových délek, ale u emisních vlnových délek byla zvolena pro každý analyt jiná hodnota. Nejvyšší rozdíl excitační vlnové délky oproti této práci byl u indeno[1,2,3-c,d]pyrenu (53 nm), nejvyšší rozdíl emisní vlnové délky u benzo[b]fluoranthenu (21 nm). Tyto rozdíly jsou však způsobeny zřejmě možnostmi použité instrumentace, protože charakter emisních i excitačních spekter sloučenin je do jisté míry stabilní. V této práci byly voleny vždy optimální hodnoty excitačních i emisních vlnových délek pro každý analyt, aby bylo dosaženo co nejnižších mezí detekce.

Tab. 4: Excitační a emisní vlnové délky fluorescenční detekce z jiných zdrojů.

Analyt	Williamson a kol. (56)		Brum a kol. (82)	
	Excitační vlnová délka [nm]	Emisní vlnová délka [nm]	Excitační vlnová délka [nm]	Emisní vlnová délka [nm]
Naftalen	280	355	224	332
Acenaften	280	355	230	336
Fluoren	280	355	230	316
Fenanthren	280	355	252	364
Anthracen	250	420	252	404
Fluoranthen	250	420	252	452
Pyren	250	420	238	388
Benzo[a]anthracen	270	390	238	396
Chrysen	270	390	238	376
Benzo[b]fluoranthen	290	410	268	447
Benzo[k]fluoranthen	290	410	268	432
Benzo[a]pyren	290	410	268	412
Dibenzo[a,h]anthracen	290	410	292	400
Benzo[g,h,i]perylene	300	465	292	420
Indeno[1,2,3-c,d]pyren	300	465	300	500

3.2 Validace metody

Po optimalizaci analytické metody byla provedena její validace. Pro účely validace byly připraveny roztoky PAU o koncentracích 0,01–10 µg/l, jejichž postup přípravy je uveden v Tab. 1. Validačními parametry byly linearita, přesnost, správnost, rozsah, mez detekce a mez stanovitelnosti. Pro hodnocení parametrů linearita, přesnost, správnost a rozsah byly pro každý analyt vybrány ty koncentrační úrovně, na kterých bylo pro daný analyt dosaženo poměru signálu odezvy detektoru (S) k šumu základní linie (N) vždy minimálně $S/N \geq 10$.

Linearita byla hodnocena pomocí korelačního koeficientu a QC koeficientu. Kritérium přijatelnosti pro korelační koeficient je $\geq 0,99000$ a pro QC koeficient $\leq 5,00$ %.

Tab. 5: Korelační koeficient a QC koeficient.

Analyt	Korelační koeficient [1]	QC koeficient [%]	Analyt	Korelační koeficient [1]	QC koeficient [%]
Naftalen	0,99998	0,79	Benzo[a]anthracen	0,99998	0,84
Acenaftylen	0,99984	1,74	Chrysen	0,99998	0,82
Acenaften	0,99998	0,77	Benzo[b]fluoranthen	0,99998	0,81
Fluoren	0,99998	0,89	Benzo[k]fluoranthen	0,99997	0,94
Fenanthren	0,99997	0,94	Benzo[a]pyren	0,99991	1,69
Anthracen	0,99997	0,99	Dibenzo[a,h]anthracen	0,99997	1,02
Fluoranthen	0,99998	0,84	Benzo[g,h,i]perylen	0,99993	1,56
Pyren	0,99996	1,13	Indeno[1,2,3-c,d]pyren	0,99990	1,59

Z dat uvedených v Tab. 5 vyplývá, že hodnoty korelačního koeficientu a QC koeficientu vyhovují kritériím přijatelnosti u všech analytů.

Cioroiu a kol. (83) provedli validaci HPLC-FLD metody pro PAU. Byla sestrojena sedmibodová kalibrační křivka v rozsahu koncentrací od 5 do 400 pg/µl. Standardní roztoky byly analyzovány ve třech opakováních. Korelační koeficient pro všech 16 PAU byl minimálně 0,999, stejně jako v této práci.

Dalším hodnoceným validačním parametrem byla přesnost. Nejprve byla vyjádřena jako opakovatelnost pomocí relativní směrodatné odchylky (RSD) pro koncentrační úrovně 0,1; 1 a 10 µg/l. Přijatelná hodnota RSD pro koncentrační úroveň 10 µg/l činí ≤ 21 %, pro koncentrační úroveň 1 µg/l to je ≤ 15 % a pro koncentrační úroveň 0,1 µg/l také ≤ 15 % (84).

Tab. 6: Přesnost vyjádřená jako opakovatelnost.

Analyt	RSD [%]			Analyt	RSD [%]		
	0,1* µg/l	1 µg/l	10 µg/l		0,1* µg/l	1 µg/l	10 µg/l
Naftalen	3,6	2,1	0,5	Benzo[a]anthracen	1,5	0,5	0,1
Acenaftylen	12,0	2,3	0,3	Chrysen	1,7	0,6	0,3
Acenaften	1,2	0,5	0,3	Benzo[b]fluoranthen	3,3	0,5	0,1
Fluoren	4,4	0,1	0,3	Benzo[k]fluoranthen	1,1	1,6	0,1
Fenanthren	8,1	0,7	0,0	Benzo[a]pyren	2,1	0,8	0,3
Anthracen	0,6	0,6	0,1	Dibenzo[a,h]anthracen	1,2	0,5	0,0
Fluoranthen	8,2	1,1	0,1	Benzo[g,h,i]perylen	3,3	1,0	0,2
Pyren	1,6	1,1	0,2	Indeno[1,2,3-c,d]pyren	6,9	3,4	0,1

*Z důvodu vyšší meze stanovitelnosti byla pro acenaftylen použita koncentrační úroveň 0,5 µg/l a pro naftalen, benzo[b]fluoranthen a indeno[1,2,3-c,d]pyren 0,2 µg/l.

Z Tab. 6 je zřejmé, že hodnoty RSD se pohybují od 0,0 % (fenanthren a dibenzo[a,h]anthracen) do 12,0 % (acenaftylen), což vyhovuje kritériím přijatelnosti na všech koncentračních úrovních pro všechny sledované analyty.

V rámci přesnosti byla testována i přesnost mezilehlá pro koncentrační úrovně 0,1; 1 a 10 µg/l, také pomocí RSD. Přijatelná hodnota RSD pro koncentrační úroveň 10 µg/l činí ≤ 21 %, pro koncentrační úroveň 1 µg/l to je ≤ 15 % a pro koncentrační úroveň 0,1 µg/l také ≤ 15 % (84).

Tab. 7: Přesnost vyjádřená jako mezilehlá přesnost.

Analyt	RSD [%]			Analyt	RSD [%]		
	0,1* µg/l	1 µg/l	10 µg/l		0,1* µg/l	1 µg/l	250 µg/l
Naftalen	13,6	1,5	1,1	Benzo[a]anthracen	1,2	1,3	1,1
Acenaftylen	9,2	3,8	1,2	Chrysen	1,4	0,8	1,0
Acenaften	2,2	0,7	0,6	Benzo[b]fluoranthen	2,4	1,4	1,5
Fluoren	4,6	0,5	0,5	Benzo[k]fluoranthen	2,6	1,3	0,4
Fenanthren	9,0	0,8	0,7	Benzo[a]pyren	3,2	3,5	5,1
Anthracen	2,3	1,6	1,8	Dibenzo[a,h]anthracen	1,0	1,6	1,4
Fluoranthen	5,8	1,7	1,5	Benzo[g,h,i]perylen	3,4	0,9	0,8
Pyren	2,8	0,9	1,0	Indeno[1,2,3-c,d]pyren	6,5	2,4	1,4

*Z důvodu vyšší meze stanovitelnosti byla pro acenaftylen použita koncentrační úroveň 0,5 µg/l a pro naftalen, benzo[b]fluoranthen a indeno[1,2,3-c,d]pyren 0,2 µg/l.

Hodnoty RSD v Tab. 7 se pohybují od 0,4 % (benzo[k]fluoranthen) do 13,6 % (naftalen), což vyhovuje kritériím přijatelnosti u všech analytů na všech koncentračních úrovních.

Pro výpočet mezilehlé přesnosti v publikaci autorů Cioroiu a kol. (83) byl použit vzorek o koncentraci 100 µg/l, který byl analyzován ve dvou různých dnech za stejných podmínek na stejném přístroji dvěma různými pracovníky. Relativní směrodatná odchylka pro všechny analyty byla <2 %. V této práci se hodnoty mezilehlé přesnosti hodnocené jako RSD pohybovaly v rozmezí od 0,4 do 13,6 %. V této práci RSD sice dosahuje vyšších hodnot, ale ovšem na až téměř 1000x nižších koncentračních úrovních (13,6 % na koncentrační úrovni 0,2 µg/l).

Dalším hodnoceným validačním parametrem byla správnost, která byla hodnocena pomocí výtěžnosti. Přijatelná hodnota výtěžnosti pro koncentrační úroveň 10 µg/l činí 60–115 %, pro koncentrační úroveň 1 µg/l to je 40–120 % a pro koncentrační úroveň 0,1 µg/l také 40–120 % (84).

Tab. 8: Správnost vyjádřená jako výtěžnost.

Analyt	Výtěžnost [%]			Analyt	Výtěžnost [%]		
	0,1* µg/l	1 µg/l	10 µg/l		0,1* µg/l	1 µg/l	10 µg/l
Naftalen	96,7	101,6	101,2	Benzo[a]anthracen	99,3	98,6	100,3
Acenaftylen	104,7	100,6	100,5	Chrysen	100,0	99,8	100,6
Acenaften	97,7	99,7	100,0	Benzo[b]fluoranthen	100,5	98,8	100,9
Fluoren	99,0	99,5	100,1	Benzo[k]fluoranthen	95,0	99,0	100,3
Fenantren	105,3	99,4	100,6	Benzo[a]pyren	94,0	106,9	110,6
Anthracen	96,7	98,3	99,1	Dibenzo[a,h]anthracen	100,3	98,5	100,8
Fluoranthen	94,3	98,9	100,1	Benzo[g,h,i]perylene	92,7	99,3	102,7
Pyren	93,3	98,8	99,7	Indeno[1,2,3-c,d]pyren	98,3	105,2	100,4

*Z důvodu vyšší meze stanovitelnosti byla pro acenaftylen použita koncentrační úroveň 0,5 µg/l a pro naftalen, benzo[b]fluoranthen a indeno[1,2,3-c,d]pyren 0,2 µg/l.

Hodnoty výtěžnosti v Tab. 8 se pohybují od 92,7 % (benzo[g,h,i]perylene) do 110,6 % (benzo[a]pyren) a vyhovují tedy kritériím přijatelnosti na všech koncentračních úrovních u všech analytů.

Správnost metody v publikaci Cioroiu a kol. (83) byla hodnocena také jako výtěžnost, ale na odlišných koncentračních úrovních – 400, 200 a 100 µg/l. Hodnoty výtěžnosti pro jednotlivé analyty jsou uvedeny v Tab. 9, z níž vyplývá, že hodnoty výtěžnosti se pohybují v rozmezí od 82,45 % (dibenzo[a,h]anthracen) do 120,85 % (chrysen). V této práci se hodnoty výtěžnosti pohybovaly v rozmezí od 92,7 % (benzo[g,h,i]perylene) do 110,6 % (benzo[a]pyren). Jedná se tak o užší rozsah než v uvedené publikaci, navíc více než 1000x

nižších koncentračních úrovních. Výrazný rozdíl lze pozorovat v případě chrysenu (120,85 % na koncentrační úrovni 400 µg/l oproti 100,0 % na koncentrační úrovni 0,1 µg/l).

Tab. 9: Správnost hodnocená jako výtěžnost (83).

Analyt	Výtěžnost [%]		
	400 µg/l	200 µg/l	100 µg/l
Naftalen	97,98	99,95	88,46
Acenaftylen	86,35	90,26	89,47
Acenaften	83,19	85,06	90,58
Fluoren	95,51	91,50	89,45
Fenanthren	103,70	104,40	83,51
Anthracen	84,89	97,74	89,96
Fluoranthren	82,71	83,55	86,45
Pyren	89,87	90,13	88,68
Benzo[a]anthracen	92,12	97,25	91,43
Chrysen	120,85	115,32	90,55
Benzo[b]fluoranthren	90,00	101,20	92,32
Benzo[k]fluoranthren	82,62	92,45	87,39
Benzo[a]pyren	102,66	97,77	90,80
Dibenzo[a,h]anthracen	82,45	89,48	85,82
Benzo[g,h,i]perylene	82,61	83,70	83,65
Indeno[1,2,3-c,d]pyren	87,98	93,54	89,72

Rozsah metody se u většiny analytů pohyboval od 0,1 do 10 µg/l (viz. Tab. 10). Nejužší interval byl v případě acenaftylenu (0,5 až 10 µg/l), což bylo dáno nutností použití méně citlivého spektrofotometrického detektoru. V případě naftalenu, benzo[b]fluoranthenu a indeno[1,2,3-c,d]pyrenu byl rozsah 0,2 až 10 µg/l z důvodu nízké odezvy detektoru.

Tab. 10: Rozsah metody.

Analyt	Rozsah [µg/l]	Analyt	Rozsah [µg/l]
Naftalen	0,2–10	Benzo[a]anthracen	0,1–10
Acenaftylen	0,5–10	Chrysen	0,1–10
Acenaften	0,1–10	Benzo[b]fluoranthren	0,2–10
Fluoren	0,1–10	Benzo[k]fluoranthren	0,1–10
Fenanthren	0,1–10	Benzo[a]pyren	0,1–10
Anthracen	0,1–10	Dibenzo[a,h]anthracen	0,1–10
Fluoranthren	0,1–10	Benzo[g,h,i]perylene	0,1–10
Pyren	0,1–10	Indeno[1,2,3-c,d]pyren	0,2–10

Posledními validačními parametry byly instrumentální mez detekce (IDL) a instrumentální mez stanovitelnosti (IQL). Mez detekce byla hodnocena jako trojnásobek poměru signálu k šumu a mez stanovitelnosti jako desetinásobek poměru signálu k šumu. Hodnoty IDL a IQL pro jednotlivé PAU jsou uvedeny v Tab. 11.

Tab. 11: Instrumentální mez detekce a instrumentální mez stanovitelnosti.

Analyt	IDL [ng/l]	IQL [ng/l]	Analyt	IDL [ng/l]	IQL [ng/l]
Naftalen	38	160	Benzo[a]anthracen	24	80
Acenaftylen	150	520	Chrysen	3	10
Acenaften	9	41	Benzo[b]fluoranthen	42	170
Fluoren	7	33	Benzo[k]fluoranthen	3	8
Fenanthren	11	61	Benzo[a]pyren	2	7
Anthracen	11	36	Dibenzo[a,h]anthracen	4	13
Fluoranthen	21	69	Benzo[g,h,i]perylen	10	64
Pyren	11	96	Indeno[1,2,3-c,d]pyren	44	170

Z Tab. 11 je zřejmé, že instrumentální mez detekce se pohybuje od 2 do 150 ng/l a instrumentální mez stanovitelnosti od 7 do 520 ng/l. Vysoké hodnoty IDL a IQL u acenaftyleny jsou způsobeny použitím méně citlivého spektrofotometrického detektoru pro tento analyt.

Hodnoty meze detekce v publikaci autorů Cioroiu a kol. (83) se pohybovaly v rozmezí od 250 ng/l do 23 230 ng/l a meze stanovitelnosti od 830 ng/l do 77 830 ng/l. V této práci se meze detekce pohybovaly v rozmezí 2–151 ng/l a meze stanovitelnosti v rozmezí 7–253 ng/l. Dosažení výrazně nižších hodnot mezí detekce i mezí stanovitelnosti v této práci je velice pravděpodobně docíleno použitím naprosto optimálních spektrálních podmínek pro každý analyt a vysokým objemem nástřiku (90 µl).

3.3 Optimalizace extrakce vzorku

Po úspěšné optimalizaci a validaci analytické metody na stanovení PAU pomocí HPLC-PDA-FLD byl vypracován a optimalizován postup extrakce analytů ze vzorku vody. Pro relativní jednoduchost provedení a přijatelnou finanční náročnost byla zvolena extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE). Postup extrakce byl prováděn podle kapitoly 2.8. Pro účely optimalizace postupu byla použita pitná voda z veřejného vodovodu. Extrakce byla prováděna v hnědých skleněných lahvích o objemu 1 l s plastovým těsněním a plastovou šroubovací zátkou. Jako extrakční rozpouštědlo byl použit cyklohexan. Rozsah optimalizace LLE extrakce je uveden v Tab. 12. Hodnocena byla správnost (vyjádřená jako výtěžnost v %) a přesnost (vyjádřená jako opakovatelnost pomocí RSD v %)

Tab. 12: Rozsah optimalizace LLE extrakce.

Parametr extrakce	Rozsah
Obsah NaCl	0; 0,5; 5 a 50 g
Doba extrakce	30, 60 a 120 min
Objem vzorku	100, 200, 450 a 900 ml

3.3.1 Zdroje kontaminace

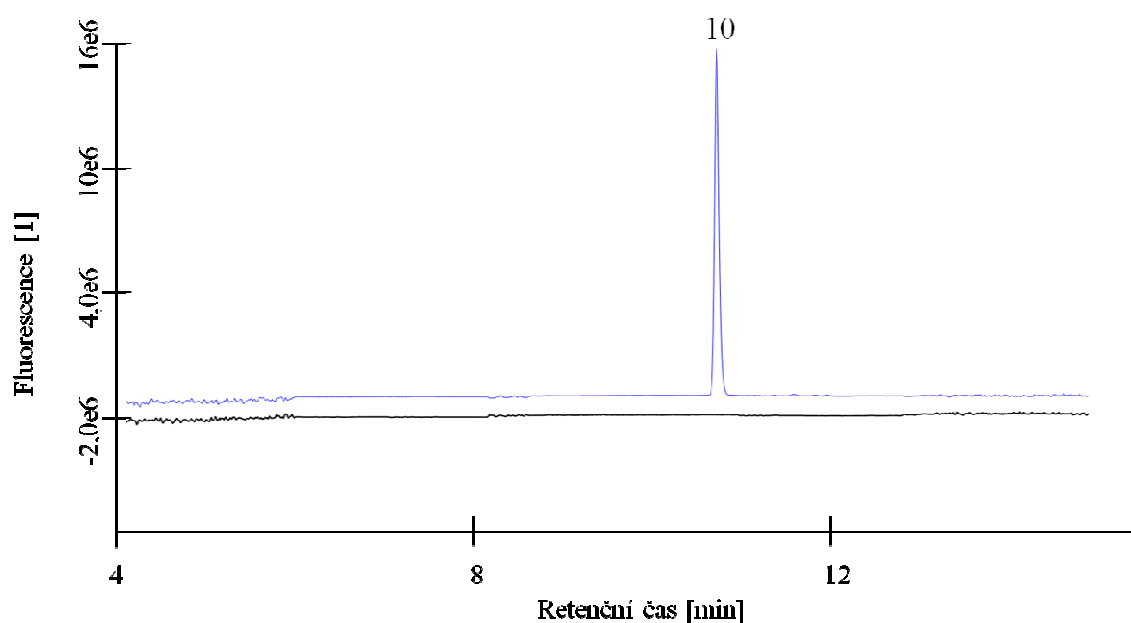
Po provedení prvních analýz extraktů byly v chromatogramech zaznamenány neobvykle intenzivní píky čtyř analytů (konkrétně naftalen, fenantren, fluoranthen, pyren), což by značilo vysokou koncentraci těchto čtyř sloučenin v pitné vodě. Jejich výskyt v tak vysoké koncentraci v pitné vodě se však zdál být velice nepravděpodobný. Zřejmě tedy došlo ke kontaminaci vzorků v některém extrakčním kroku.

Pro zjištění zdroje či zdrojů této kontaminace byla nejprve provedena série analýz bez zahrnutí LLE extrakce (viz Tab. 13). Byla provedena analýza všech chemikálií, které byly při extrakci použity. Dále byly testovány tyto látky: vnitřní standard, izopropylalkohol, diethylenglykol, jejich směs v poměru diethylenglykol–izopropylalkohol (1:4, v/v) (fixační směs), hexan od výrobců J.T. Baker a Merck a cyklohexan od výrobce Merck.

Tab. 13: Přehled provedených analýz bez zahrnutí LLE extrakce.

Měření	Provedená analýza	Prokazovaná informace
1	1000 μl mobilní fáze A	čistota mobilní fáze, vialek, špiček i přístroje
2	900 μl MF A a 100 μl VS	čistota VS
3	400 μl izopropylalkoholu a 200 μl MF A	čistota izopropylalkoholu
4	100 μl diethylenglykolu a 500 μl MF A	čistota diethylenglykolu
5	500 μl fixační směsi a 100 μl MF A	čistota fixační směsi
6	500 μl fixační směsi, odfoukat dusíkem na 100 μl a poté přidavek 500 μl MF A	čistota evaporátoru a dusíku
7	500 μl fixační směsi a 1000 μl hexanu J.T. Baker, odfoukat dusíkem na 100 μl a přidat 500 μl MF A	čistota hexanu od firmy J.T. Baker
8	500 μl fixační směsi a 1000 μl hexanu Merck, odfoukat dusíkem na 100 μl a přidat 500 μl MF A	čistota hexanu od firmy Merck
9	500 μl fixační směsi a 1000 μl cyklohexanu Merck, odfoukat dusíkem na 100 μl a přidat 500 μl MF A	čistota cyklohexanu od firmy Merck

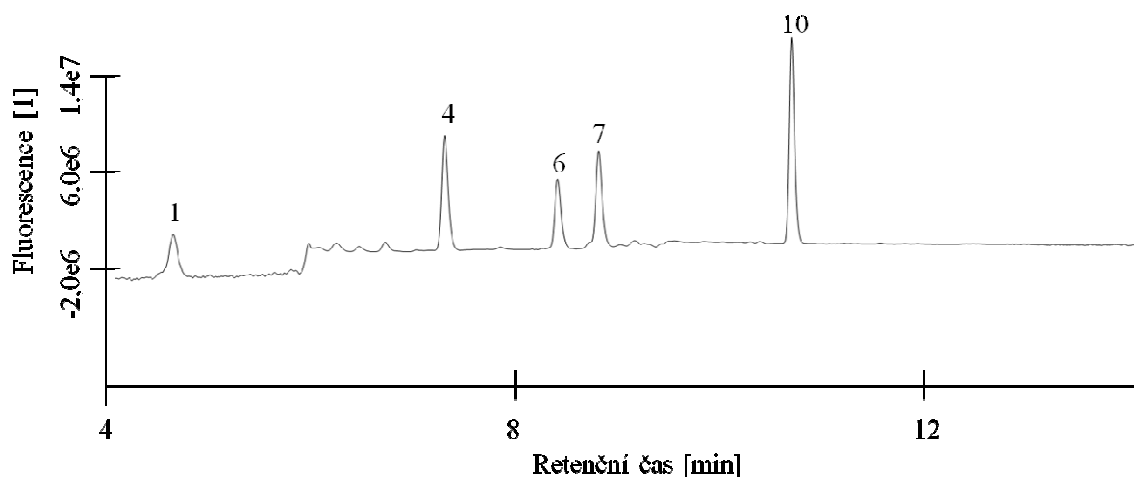
V chromatogramu čisté mobilní fáze (viz obr. 3) nebyl zaznamenán žádný pík, což prokazuje, že mobilní fáze, vialky, špičky i vlastní kapalinový chromatograf nejsou zdrojem kontaminace. Kontaminace nebyla prokázána ani ve vnitřním standardu (viz Obr. 3).



Obr. 3: Chromatogram mobilní fáze (černě) a vnitřního standardu (modře): VS (10).

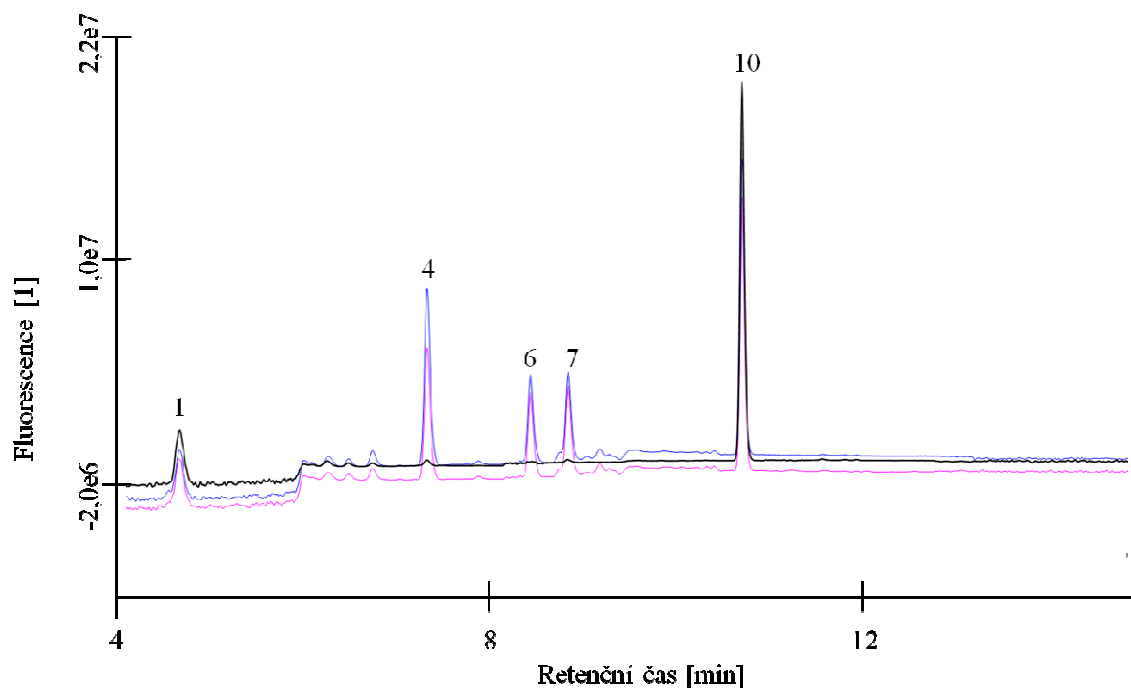
V chromatogramech izopropylalkoholu, diethylenglykolu a fixační směsi také nebyla zjištěna žádná kontaminace PAU. I porovnáním hexanů od dvou různých výrobců a cyklohexanu bylo zjištěno, že žádné z těchto rozpouštědel není kontaminováno PAU a může tedy být použito kterékoliv z nich.

Vzhledem k tomu, že žádná z chemikálií nebyla prokázána jako zdroj kontaminace, byl do testování zahrnut i krok LLE extrakce. Do tří skleněných lahví (1000 ml) bylo nadávkováno 900 ml pitné vody, Dobré vody a deionizované vody (do každé lahve voda jednoho druhu), přidáno 100 μ l vnitřního standardu, 2 ml hexanu od firmy J.T. Baker. Lahve byly třepány po dobu 60 minut při 150 otáčkách za minutu. Po vytřepání a dolití vody po okraj lahví bylo rozpouštědlo odebráno do vialek, odfoukáno na 100 μ l a přidáno 500 μ l MF A. Ve všech chromatogramech extraktů (viz. Obr. 4) se objevily píky čtyř analytů (naftalen, fenanthren, fluoranthen, pyren), což prokazuje, že ke kontaminaci musí docházet v průběhu LLE extrakce.



Obr. 4: Chromatogram vzorku po extrakci: naftalen (1), fenanthren (4), fluoranthen (6), pyren (7), VS (10).

Zdrojem kontaminace PAU je tedy s největší pravděpodobností nádoba používaná k extrakci. Byly tedy provedeny dvě LLE extrakce, přičemž jedna extrakce byla provedena v dosud používané skleněné lahvi s plastovým uzávěrem a druhá extrakce byla provedena nově ve skleněné odměrné baňce se skleněným zábrusovým uzávěrem. Do obou lahví bylo odpipetováno 90 ml vzorku pitné vody, 100 μ l vnitřního standardu a 2 ml hexanu J.T.Baker. Následnou analýzou bylo zjištěno, že 3 ze 4 PAU se nevyskytují ve vzorku po extrakci v odměrné baňce. Porovnání chromatogramů obou extraktů je uvedeno na Obr. 5.



Obr. 5: Porovnání chromatogramů extrakce v lahvi z objemu vzorku 900 ml (růžově), v lahvi z objemu vzorku 90 ml (modře) a v odměrné baňce z objemu vzorku 90 ml (černě): naftalen (1), fenanthren (4), fluoranthen (6), pyren (7), VS (10).

Zdrojem kontaminace bylo tedy jednoznačně prokázáno plastové těsnění skleněných lahví. Z tohoto důvodu byly zakoupeny jiné lahve o objemu 500 ml. Byly rovněž z hnědého skla, ale byly uzavřeny skleněnými zábrusovými zátkami. Menší objem byl zvolen z důvodu užšího hrdla, které usnadňuje odběr extrakčního rozpouštědla. Naftalen se však vyskytoval i ve vzorku v odměrné baňce a zároveň pouze v těch vzorcích, které byly odfoukávány. Jako nejpravděpodobnější zdroj naftalenu se tedy jevil dusík používaný k odfoukávání rozpouštědla. Kompenzace této kontaminace byla provedena pomocí slepého pokusu.

3.3.2 Optimalizace extrakce

Při optimalizaci extrakce byly hledány takové hodnoty parametrů, při nichž bylo dosaženo dostatečných hodnot přesnosti a správnosti, a to i s ohledem na časovou i finanční náročnost. Stejně jako u validace metody byla přesnost hodnocena jako opakovatelnost (pomocí RSD v %) a správnost jako výtěžnost (v %). Postupováno bylo podle postupu v kapitole 2.8. Do vzorku bylo navíc přidáváno 50 μ l standardu o koncentraci 20 μ g/l (PAU-ST-C). Každá hodnota optimalizovaných parametrů byla analyzována ve třech opakováních, včetně jednoho opakování slepého vzorku. Pro každou testovanou hodnotu parametru byla vypočítána minimální, maximální, průměrná a středová hodnota RSD

a výtěžnosti. Koncentrace standardu PAU ve vzorcích byla 2 ng/l; přijatelné hodnoty správnosti pro tuto úroveň jsou 40–120 % a přijatelné hodnoty přesnosti jsou ≤ 30 % (84).

Nejprve byla provedena optimalizace přídavku chloridu sodného v množství 0; 5 a 50 g na 450 ml vzorku vody. Při optimalizaci přídavku chloridu sodného byla nejprve vyzkoušena extrakce bez přídavku chloridu sodného (0 g) a s přídavkem 50 g chloridu sodného. Bylo zjištěno, že vyšší správnosti je dosaženo s přídavkem chloridu sodného (průměrně 100,8 %) než bez něj (průměrně 91,1 %). Dále bylo množství přídavku optimalizováno v množství 0; 5 a 50 g, aby bylo dosaženo co nejlepší správnosti a zároveň nedocházelo k vysoké spotřebě této chemikálie. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 14.

Tab. 14: Optimalizace přídavku chloridu sodného.

Množství přídavku NaCl	Hodnocený parametr	Hodnota
0 g	Přesnost	13,4 %
	Správnost	91,1 %
5 g	Přesnost	5,8 %
	Správnost	96,2 %
50 g	Přesnost	2,2 %
	Správnost	100,1 %

Z Tab. 14 vyplývá, že nejlepších hodnot bylo dosaženo v případě 50 g. Přijatelné hodnoty výtěžnosti a RSD jsou však i u přídavku 5 g. Tato hodnota byla zvolena zejména z důvodu nižší spotřeby chloridu sodného.

Následně byla provedena optimalizace doby extrakce pro časy 30, 60 a 120 min za účelem zkrácení doby přípravy vzorku k analýze.

Tab. 15: Optimalizace doby extrakce.

Doba extrakce	Hodnocený parametr	Hodnota
30 min	Přesnost	5,9 %
	Správnost	94,9 %
60 min	Přesnost	3,6 %
	Správnost	96,7 %
120 min	Přesnost	2,8 %
	Správnost	93,8 %

Z Tab. 15 vyplývá, že nejlepších hodnot bylo dosaženo v případě 60 min. Jako optimální však byla zvolena doba 30 min, neboť i při této době bylo dosaženo přijatelných

hodnot Přesnosti i správnosti. Navíc je možné ušetřit čas a elektřinu spotřebovanou během extrakce vzorků.

Optimalizaci LLE provedli Brum a kol. (82). Extrakce PAU byla prováděna v Erlenmayerových baňkách pomocí magnetického míchadla. Předmětem optimalizace byly objem extrakčního rozpouštědla (hexanu), doba extrakce a počet extrakčních kroků. Testované objemy hexanu se pohybovaly od 20 do 80 ml, doba extrakce od 5 do 20 min a počet extrakčních kroků od 2 do 4. Jako optimální byl zvolen objem hexanu 77 ml, doba extrakce 18 min a 4 extrakční kroky. Správnost stanovení se pohybovala od 80,9 do 106 % a přesnost stanovení od 0,2 do 14 %. Objem extrakčního rozpouštědla (cyklohexanu) v této diplomové práci byl pouhých 5 ml, což je výrazně méně než ve výše uvedené publikaci. Naproti tomu doba extrakce je o něco delší (30 min). Správnost stanovení v této práci se pro extrakční objem 100 ml pohybovala od 73 do 117 % a přesnost stanovení od 1 do 17 %. Rozsahy hodnot správnosti i přesnosti jsou v porovnání s prací Brum a kol. (82) širší, avšak stále se pohybují v přijatelných mezích.

3.4 Aplikace metody na reálné vzorky

Metoda byla následně použita pro monitoring výskytu PAU v říční vodě, konkrétně v řece Vltavě v Českých Budějovicích. Odběr byl prováděn dle postupu uvedeného v Kap. 2.7 z chodníku na severní straně Nového mostu (po pravé straně ve směru k sídlišti Vltava). Voda byla odebírána ze středu toku řeky v hloubce asi 15 – 30 cm pod hladinou. Říční voda měla být odebírána 1x týdně ve stejný den a to po dobu 11 týdnů v době od 28. 2. do 23. 5. 2017.

V průběhu monitoringu bylo zjištěno, že postupně začalo docházet k výrazným změnám ve výtěžnosti vnitřního standardu, což negativně ovlivňovalo přesnost a správnost analytické metody. Příčinou byl pravděpodobně žlutý shluk nečistot a pěnovitá fáze, která se po provedení extrakce tvořila na hladině. Tím byl jednak prokazatelně ztížen odběr organické fáze a negativně ovlivněna účinnost extrakce analytů i vnitřního standardu. Z těchto důvodů byly následně provedeny úpravy procesu extrakce. Před odběrem extraktu byl extrakt v extrakční nádobě vysušen přidavkem bezvodého síranu sodného. Extrakt byl poté odebrán do centrifugačních zkumavek (1,8 ml), které byly odstředěny při 15 000 G po dobu 10 min. Po odstředění byl extrakt odebrán pomocí mikropipety přenesen do vialky a postup pokračoval dále podle kapitoly 2.8. Žádné z těchto opatření však nevedlo ke zlepšení.

Nakonec bylo tedy provedeno testování postupného snižování objemu vzorku vody, a to na koncentrační úrovni 10 ng/l. Nejprve byl objem snižen na 450 ml. Z Tab. 16 je zřejmé, že hodnoty přesnosti a správnosti pro objem vzorku 450 ml u řady sloučenin neodpovídají kritériím přijatelnosti.

Tab. 16: Výsledky optimalizace objemu vzorku k analýze

Analyt	Objem vzorku					
	450 ml		200 ml		100 ml	
	Správnost	Přesnost	Správnost	Přesnost	Správnost	Přesnost
	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]	[%]
Naftalen	66	93	104	93	115	3
Acenaftylen	74	43	n.a.	43	n.a.	n.a.
Acenaften	44	71	124	71	106	2
Fluoren	84	56	128	56	114	6
Fenantren	109	104	120	104	112	4
Anthracen	88	42	130	42	117	1
Fluoranthren	230	55	119	55	98	10
Pyren	220	50	130	50	100	8
Benzo[a]anthracen	175	37	120	37	94	7
Chrysen	201	35	127	35	107	7
Benzo[b]fluoranthren	289	46	117	46	73	17
Benzo[k]fluoranthren	140	39	120	39	94	5
Benzo[a]pyren	198	37	111	37	85	6
Dibenzo[a,h]anthracen	88	50	120	50	98	2
Benzo[g,h,i]perylen	188	38	115	38	90	3
Indeno[1,2,3-c,d]pyren	176	36	107	36	114	8
Krit. přijatelnosti	40 - 120	≤ 30	40 - 120	≤ 30	40 - 120	≤ 30
Hodnocení	Nevyhovuje	Nevyhovuje	Nevyhovuje	Nevyhovuje	Vyhovuje	Vyhovuje

Z tohoto důvodu byl objem vzorku dále snižován, nejprve na 200 ml a poté na 100 ml. Pro tento účel byly použity menší lahve z průhledného skla se šroubovacím víčkem. V případě objemu 200 ml vzorku ještě některé hodnoty kritériím přijatelnosti nevyhovovaly, ale v případě objemu 100 ml vzorku již vyhovovaly všechny hodnoty. Se snižujícím se objemem však docházelo ke zvýšení mezi detekce a stanovitelnosti (Tab. 17).

Tab. 17: Vliv snížení objemu na zvýšení mezí detekce a stanovitelnosti.

Analyt	Objem vzorku					
	450 ml		200 ml		100 ml	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
	[ng/l]	[ng/l]	[ng/l]	[ng/l]	[ng/l]	[ng/l]
Naftalen	0,084	0,36	0,19	0,80	0,38	1,6
Acenaftylen	0,33	1,2	0,75	2,6	1,5	5,2
Acenaften	0,020	0,091	0,045	0,21	0,090	0,41
Fluoren	0,016	0,073	0,035	0,17	0,070	0,33
Fenanthren	0,024	0,14	0,055	0,31	0,11	0,61
Anthracen	0,024	0,080	0,055	0,18	0,11	0,36
Fluoranthren	0,047	0,15	0,11	0,35	0,21	0,69
Pyren	0,024	0,21	0,055	0,48	0,11	0,96
Benzo[a]anthracen	0,053	0,18	0,12	0,40	0,24	0,80
Chrysen	0,0067	0,022	0,015	0,050	0,030	0,10
Benzo[b]fluoranthren	0,093	0,38	0,21	0,85	0,42	1,7
Benzo[k]fluoranthren	0,0067	0,018	0,015	0,040	0,030	0,080
Benzo[a]pyren	0,0044	0,016	0,010	0,035	0,020	0,070
Dibenzo[a,h]anthracen	0,0089	0,029	0,020	0,065	0,040	0,13
Benzo[g,h,i]perylene	0,022	0,14	0,050	0,32	0,10	0,64
Indeno[1,2,3-c,d]pyren	0,098	0,38	0,22	0,85	0,44	1,7

Z Tab. 17 vyplývá, že nejvyšší meze stanovitelnosti bylo dosaženo v případě acenaftyleny a indeno[1,2,3-c,d]pyreny. Pro účely hodnocení povrchových vod dle zákona č. 401/2015 Sb. jsou však rozhodující meze stanovitelnosti benzo[b]fluoranthenu, benzo[k]fluoranthenu, benzo[a]pyreny, benzo[g,h,i]perylenu a indeno[1,2,3-c,d]pyreny. Hodnota ročního průměru nejvyššího přípustného znečištění dle tohoto zákona činí 0,1 µg/l pro součet těchto 5 PAU, přičemž tato metoda umožňuje dosažení hodnoty 0,0042 µg/l. Meze stanovitelnosti analytické metody tedy vyhovují požadavkům výše uvedené aktuálně platné legislativy České republiky.

4 Závěr

V rámci této diplomové práce byla provedena optimalizace podmínek fluorescenční detekce metody na stanovení 16 indikátorových polycyklických aromatických uhlovodíků podle US EPA ve vodě pomocí HPLC s PDA a FLD detekcí. Separační podmínky této metody byly převzaty z dřívější bakalářské práce autora (81). Předmětem optimalizace fluorescenční detekce byly excitační a emisní vlnová délka, hodnota emisního filtru a citlivost. Pro každý analyt byla zvolena optimální hodnota jednotlivých parametrů tak, aby každý analyt poskytoval co nejvyšší odezvu a nedocházelo k interferencím.

Po úspěšné optimalizaci analytické metody byla provedena její základní validace. Hodnocenými validačními parametry byly rozsah, linearita, přesnost (hodnocena jako opakovatelnost i mezilehlá přesnost), správnost (hodnocena jako výtěžnost), instrumentální mez detekce a instrumentální mez stanovitelnosti. Bylo prokázáno, že analytická metoda vyhovuje kritériím přijatelnosti u všech validačních parametrů v rozsahu 0,1–10 µg/l u většiny sloučenin, v rozsahu 0,2–10 µg/l u naftalenu, benzo[b]fluoranthenu a indeno[1,2,3-c,d]pyrenu a v rozsahu 0,5–10 µg/l u acenaftylenu.

Po optimalizaci fluorescenční detekce a validaci chromatografické metody byla provedena optimalizace extrakce PAU z vody. Jako extrakční rozpouštědlo byl zvolen cyklohexan. Po provedení první analýzy byla zjištěna kontaminace vzorku 4 PAU (naftalen, fenantren, fluoranthen, pyren). Bylo proto nutné nejprve nalézt zdroj (zdroje) kontaminace. Za tímto účelem byly analyzovány veškeré chemikálie použité během extrakce. Dále byla otestována i různá doba odfoukávání extrakčního rozpouštědla a jiná extrakční nádoba. Právě otestování jiné extrakční nádoby se ukázalo jako klíčový krok, neboť po provedení extrakce v odměrné baňce na rozdíl od extrakce v hnědých lahvích byl ve vzorku přítomen pouze naftalen. Odměrná baňka totiž byla uzavřena skleněnou zábrusovou zátkou na rozdíl od hnědých lahví, které byly uzavřeny plastovým těsněním a plastovou šroubovací zátkou. Právě plastové těsnění bylo experimentálně prokázáným zdrojem kontaminace. Po tomto zjištění byly zakoupeny jiné extrakční nádoby (hnědé skleněné lahve se skleněnou zábrusovou zátkou). Optimalizovány byly přídavek chloridu sodného a doba extrakce. Na základě výsledků optimalizace byly zvoleny optimální přídavek chloridu sodného 5 g a optimální doba extrakce 30 min.

Analytická metoda byla následně použita pro monitoring PAU v říční vodě. V průběhu monitoringu však začalo docházet k výraznému kolísání výtěžnosti vnitřního standardu, což

negativně ovlivnilo přesnost a správnost celé metody. Zároveň po extrakci docházelo k vytváření žlutého shluku nečistot na hladině vzorku. Vlivem těchto nečistot byl odběr extrakčního rozpouštědla značně ztížen a tyto nečistoty byly pravděpodobnou příčinou rozdílné výtěžnosti vnitřního standardu. Z těchto důvodů byl proces přípravy vzorku rozšířen o další kroky (přidání bezvodého síranu sodného před odběrem extrakčního rozpouštědla, odstředění extraktu před odběrem extrakčního rozpouštědla). Jelikož žádný z těchto kroků nevedl k odstranění problému, byly nakonec testovány nižší objemy vzorku (450, 200 a 100 ml). Tento krok se ukázal jako klíčový, neboť při objemu vzorku 100 ml již hodnoty přesnosti a správnosti vyhovovaly kritériím přijatelnosti. Nejvyšší mez stanovitelnosti metody byla zjištěna v případě acenaftylenu (0,0052 µg/l – spektrofotometrická detekce) a benzo[b]fluoranthenu a indeno[1,2,3-c,d]pyrenu (0,0017 µg/l – fluorescenční detekce). V případě benzo[b]fluoranthenu, benzo[k]fluoranthenu, benzo[a]pyrenu, benzo[g,h,i]perylenu a indeno[1,2,3-c,d]pyrenu bylo dosaženo mezí stanovitelnosti v rozsahu 0,00007–0,0017 µg/l, což vyjádřené jako suma všech těchto 5 analytů představuje koncentraci 0,0042 µg/l. Zákon č. 401/2015 Sb., který platí pro povrchové vody využívané pro vodárenské účely, stanovuje roční průměr nejvyššího přípustného znečištění 0,1 µg/l pro součet těchto 5 PAU. Meze stanovitelnosti analytické metody tedy vyhovují požadavkům aktuálně platné legislativy České republiky.

5 Citovaná literatura

1. **Nkansah, M.A., a další.** The use of lightweight expanded clay aggregate (LECA) as sorbent for PAHs removal from water. *Journal of Hazardous Materials*. 2012, 217–218, stránky 360–365. [ISSN 0304-3894].
2. **Fatemi, M.H., a další.** Extraction optimization of polycyclic aromatic hydrocarbons by alcoholic-assisted dispersive liquid-liquid microextraction and their determination by HPLC. *Journal of Separation Science*. 2012. 35, stránky 86-92. [ISSN 1615-9314].
3. **Vinci, G., Antonelli, M.L. a Preti, R.** Rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in rainwater by liquid–liquid microextraction and LC with core-shell particles column and fluorescence detection. *Journal of Separation Science*. 2013, 36, stránky 461–468.[ISSN 1615-9314].
4. **Tidwell, L.G., Paulik, L.B. a Anderson, K.A.** Air-water exchange of PAHs and OPAHs at a superfund mega-site. *Science of the Total Environment*. 2017, 603–604, stránky 676–686. [ISSN 0048-9697].
5. **Dabestani, R. a Ivanov, I.N.** Invited review. A compilation of physical, spectroscopic and photophysical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Photochemistry and Photobiology*. 1999, 70(1), stránky 10–34. [ISSN 1751-1097].
6. **Sarria-Villa, R., a další.** Presence of PAHs in water and sediments of the Colombian Cauca River during heavy rain episodes, and implications for risk assessment. *Science of the Total Environment*. 2016, 540, stránky 455–465. [ISSN 0048-9697].
7. **Huang, Y., a další.** Determination of low levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by high performance liquid chromatography with tandem fluorescence and diode-array detectors. *Chemosphere*. 2013. 92, stránky 1010–1016. [ISSN 0045-6535].
8. **Oluseyi, T., a další.** Comparison of extraction and clean-up techniques for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soil samples. *African Journal of Environmental Science and Technology*. 2011, 5(7), stránky 482–493. [ISSN 1996-0786].

9. **Wenzl, T., a další.** Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union. *Trends in Analytical Chemistry*. 2006, 25(7), stránky 716–725. [ISSN 0165-9936].
10. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) [MAK Value Documentation 2012]. *The MAK Collection for Occupational Health and Safety*. 2013. stránky 1–216. [ISSN 2509-2383].
11. **Liu, M., a další.** Spatial-temporal distributions, sources of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in surface water and suspended particular matter from the upper reach of Huaihe River, China. *Ecological Engineering*. 2016, 95, stránky 143–151. [ISSN 0925-8574].
12. **Maiga, D.T., a další.** Preparation of SPE hybrid mesoporous silica sorbents for the analysis and removal of organic pollutants in water. *Physics and Chemistry of the Earth*. 2014, 72–75, stránky 83–87. [ISSN 1474-7065].
13. **Sudová, P.** Stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků v pevných matricích hydrosféry metodou QuEChERS – porovnání se stávajícími metodami. Diplomová práce. Praha : Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, 2012.
14. **Escarrone, A.L.V., a další.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in rice grain dried by different processes: Evaluation of a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction method. *Food Chemistry*. 2014, 146, stránky 597–602. [ISSN 0308-8146].
15. **Holoubek, I.** Survey of contaminated sites. *Vybrané typy environmentálních polutantů (05/01). Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs)*. [Online] [Citace: 11. listopad 2017.] http://www.recetox.muni.cz/res/file/prednasky/holoubek/chzp-III-2008/CH%C5%BDP_III_05_PAHs_01.pdf.
16. **Ma, J., a další.** Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples by solid-phase extraction using multi-walled carbon nanotubes as adsorbent coupled with gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2010, 1217, stránky 5462–5469. [ISSN 0021-9673].
17. **Scicchitano, D.A.** Transcription past DNA adducts derived from polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2005, 577, stránky 146–154. [ISSN 0027-5107].

18. **Manoli, E. a Samara, C.** Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters: sources, occurrence and analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. 1999, 18(6), stránky 417–428. [ISSN 0165-9936].
19. **Lim, L.W., Okouchi, Y. a Takeuchi, T.** On-line preconcentration of trace carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in microcolumn liquid chromatography via large volume injection. *Talanta*. 2007, 72, stránky 1600–1608. [ISSN 0039-9140].
20. **Zhou, N., a další.** Highly sensitive and selective spectrofluorimetric approach for the rapid determination of trace benzo[α]pyrene in drinking water and in solutions leached from disposable paper cups. *Luminescence. The Journal of Biological and Chemical Luminescence*. 2011, 26, stránky 35-43. [ISSN 1522-7243].
21. **Mauri-Aucejo, A., a další.** Comparison of the solid-phase extraction efficiency of a bounded and an included cyclodextrin-silica microporous composite for polycyclic aromatic hydrocarbons determination in water samples. *Talanta*. 2016, 156–157, stránky 95–103. [ISSN 0039-9140].
22. **Yan, J., a další.** Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water from three estuaries of China: Distribution, seasonal variations and ecological risk assessment. *Marine Pollution Bulletin*. 2016, 109, stránky 471–479. [ISSN 0025-326X].
23. **Ramirez, C.E., Wang, C. a Gardinali, P.R.** Fully automated trace level determination of parent and alkylated PAHs in environmental waters by online SPE-LC-APPI-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2014. 406, stránky 329–344. [ISSN 1618-2650].
24. **Nagai, A., a další.** Mutagenic characteristics and contribution of polycyclic aromatic hydrocarbons to mutagenicity of concentrates from municipal river water by blue chitin column. *Journal of Health Science*. 2002. 48(3), stránky 232–241. [ISSN 1347-5207].
25. **Santos, L.O., a další.** Simultaneous determination of PAHS, nitro-PAHS and quinones in surface and groundwater samples using SDME/GC-MS. *Microchemical Journal*. 2017, 133, stránky 431–440. [ISSN 0026-265X].
26. **Rügner, H., a další.** Monitoring of event-based mobilization of hydrophobic pollutants in rivers: Calibration of turbidity as a proxy for particle facilitated transport in field and laboratory. *Science of the Total Environment*. 2014, 490, stránky 191-198. [ISSN 0048-9697].

27. **Schwientek, M., a další.** A parsimonious approach to estimate PAH concentrations in river sediments of anthropogenically impacted watersheds. *Science of the Total Environment*. 2017, 601–602, stránky 636–645. [ISSN 0048-9697].
28. **Stein, E.D., Tiefenthaler, L.L. a Schiff, K.** Watershed-based sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban storm water. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2006, 25(2), stránky 373–385. [ISSN 1552-8618].
29. **Arruda-Santos, R.H. de, a další.** Sources and distribution of aromatic hydrocarbons in a tropical marine protected area estuary under influence of sugarcane cultivation. *Science of the Total Environment*. 2018, 624, stránky 935–944. [ISSN 0048-9697].
30. **Li, J., Li, F. a Liu, Q.** PAHs behavior in surface water and groundwater of the Yellow River estuary: Evidence from isotopes and hydrochemistry. *Chemosphere*. 2017, 178, stránky 143–153. [ISSN 0045-6535].
31. **Adekunle, A.S., a další.** Determination of polycyclic aromatic hydrocarbon levels of groundwater in Ife north local government area of Osun state, Nigeria. *Toxicology Reports*. 2017, 4, stránky 39–48. [ISSN 2214-7500].
32. **Niu, L., a další.** Dynamics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water column of Pearl River estuary (China): Seasonal pattern, environmental fate and source implication. *Applied Geochemistry*. 2018, 90, stránky 39–49. [ISSN 0883-2927].
33. **Wolska, L., Galer, K. a Namieśnik, J.** Transport and speciation of PAHs and PCBs in a river ecosystem. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2003, 12, stránky 105–110. [ISBN 1230-1485].
34. **Malakahmad, A., a další.** The fate and toxicity assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water streams of Malaysia. *Procedia Engineering*. 2016, 148, stránky 806–811. [ISSN 1877-7058].
35. **Islam, M.N., a další.** Thermodynamic and kinetic study for subcritical water extraction of PAHs. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 2013, 19(1), stránky 129–136. [ISSN 1226-086X].
36. **Layton, C. a Reuter, W.M.** PAHs in surface water by PDA and fluorescence detection. *Liquid Chromatography. Application note*. místo neznámé: PerkinElmer, 2015.

37. **Ballesteros-Gómez, A., Rubio, S. ad a Pérez-Bendito, D.** Determination of priority carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater and surface water by coacervative extraction and liquid chromatography-fluorimetry. *Journal of Chromatography A*. 2008, 1203, stránky 168–176. [ISSN 0021-9673].
38. **ČESKÁ REPUBLIKA.** Vyhláška č. 83/2014 Sb., kterou se mění vyhláška č. 252/2004 Sb., kterou se stanoví hygienické požadavky na pitnou a teplou vodu a četnost a rozsah kontroly pitné vody, ve znění pozdějších předpisů. Sbírka zákonů. *Sbírka zákonů*. [Online] 2014. [Citace: 11. září 2017.] http://www.mzcr.cz/Legislativa/dokumenty/vyhlaska-c83/2004-sb-kterou-se-meni-vyhlaska-c252/2004-sb-kterou-se-stand_9091_2439_11.html.
39. **ČESKÁ REPUBLIKA.** Sbírka zákonů. částka 166. 2015, stránky 5442–5504. Dostupné z: <http://www.tzb-info.cz/pravni-predpisy/narizeni-c-401-2015-sb-o-ukazatelich-a-hodnotach-pripustneho-znecistenipovrchovychvod-a-odpadnichvod>.
40. **Ministerstvo životního prostředí.** Věstník Ministerstva životního prostředí. ročník XIV. leden 2014. částka 1. Dostupné z: [https://www.mzp.cz/web/edice.nsf/975999522D9B19C3C1257C710050418A/\\$file/V%C4%9Bstn%C3%ADk_01_2014_final.pdf](https://www.mzp.cz/web/edice.nsf/975999522D9B19C3C1257C710050418A/$file/V%C4%9Bstn%C3%ADk_01_2014_final.pdf).
41. **Rahimi, M. a Noroozian, E.** Frits coated with nano-structured conducting copolymer for solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples and liquid chromatographic analysis. *Talanta*. 2014, 123, stránky 224–232. [ISSN 0039-9140].
42. **Prokeš, R., Vrana, B. a Klánová, J.** Levels and distribution of dissolved hydrophobic organic contaminants in the Morava river in Zlín district, Czech Republic as derived from their accumulation in silicone rubber passive samplers. *Environmental Pollution*. 2012, 166, stránky 157–166. [ISSN 0269-7491].
43. **Hu, C., a další.** Sorptive extraction using polydimethylsiloxane/metal–organic framework coated stir bars coupled with high performance liquid chromatography-fluorescence detection for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental water samples. *Journal of Chromatography A*. 2014, 1356, stránky 45–53. [ISSN 0021-9673].
44. **Wolska, L.** Determination (monitoring) of PAHs in surface waters: why an operationally defined procedure is needed. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2008, 391, stránky 2647–2652. [ISSN 1618-2650].

45. **Abdel-Shafy, H.I. a Mansour, M.S.M.** A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. *Egyptian Journal of Petroleum*. 2016, 25, stránky 107–123. [ISSN 1110-0621].
46. **Wise, S.A., Sander, L.C. a Schantz, M.M.** Analytical methods for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) — a historical perspective on the 16 U.S. EPA priority pollutant PAHs. *Polycyclic Aromatic Compounds*. 2015, 35, stránky 187–247. [ISSN 1563-5333].
47. **Yang, X.P., a další.** Quantum dots extraction coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Applied Ecology and Environmental Research*. 2017, 15(3), stránky 171–186. [ISSN 1785-0037].
48. **Nirmaier, H.-P., a další.** Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples using high-performance liquid chromatography with amperometric detection. *Journal of Chromatography A*. 1996, 730, stránky 169–175.
49. **Nováková, L. a Douša, M. a kol.** *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. Praha : Lucie Nováková, Michal Douša, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
50. **Beltrán, J.L., Guiteras, J. a Ferrer, R.** Parallel factor analysis of partially resolved chromatographic data. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *Journal of Chromatography A*. 1998, 802, stránky 263–275. [ISSN 0021-9673].
51. **-S. Boos, K., a další.** High performance liquid chromatographic methods for the determination of organic substances in biological materials [Biomonitoring Methods, 2000]. *The MAK Collection for Occupational Health and Safety*. 2012, stránky 1–72. [ISSN 2509-2383].
52. **Smyčková, M. a kol.** *Budiž světlo! Biologická olympiáda 2016-2017, 51. ročník, přípravný text pro kategorie A, B*. Praha : Česká zemědělská univerzita v Praze, 2016. ISBN 978-80-213-2684-2.
53. **Drbal, K. a Křížek, M.** *Analytická chemie*. České Budějovice : Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, 1999. ISBN 80-7040-352-7.
54. **Franz, H. a Jendreizik, V.** *Fluorescence Method Development Handbook*. Germering : Thermo Fisher Scientific, 2013.

55. **Thermo Fisher Scientific.** UltiMate 3000 FLD Fluorescence Detector . *Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000 Series. Fluorescence detectors FLD-3100 and FLD-3400RS. Operating Instructions (Original Operating Instructions)* . [Online] 2013. [Citace: 2. srpen 2016.] <http://www.dionex.com/en-us/webdocs/84233-MAN-LC-FLD-3x00-Operation-DOC4820-7850.pdf>.
56. **Williamson, K.S., a další.** HPLC-PFD determination of priority pollutant PAHs in water, sediment, and semipermeable membrane devices. *Chemosphere*. 2002, 49, stránky 703–715. [ISSN 0045-6535].
57. **Štulík, K., a další.** *Analytické separační metody*. Praha : Univerzita Karlova v Praze - Nakladatelství Karolinum, 2005. ISBN 80-246-0852-9.
58. **Bouzige, M., Pichon, V. a Hennion, M.-C.** Class-selective immunosorbent for trace-level determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in complex sample matrices, used in off-line procedure or on-line coupled with liquid chromatography/fluorescence and diode array detections in series. *Environmental Science & Technology*. 1999, 33, stránky 1916–1925. [ISSN 1520-5851].
59. **Magi, E. a Di Carro, M.** Marine environment pollution: The contribution of mass spectrometry to the study of seawater. *Mass Spectrometry Reviews*. 2016, 9999, stránky 1–21. [ISSN 1098-2787].
60. **Song, L., a další.** Liquid chromatography/dopant-assisted atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for the analysis of non-polar compounds. *International Journal of Mass Spectrometry*. 2011, 303, stránky 173-180. [ISSN 1387-3806].
61. **Kuželová, K.** Validace HPLC metody stanovení piroxikamu v plasmě s využitím SPME a deproteinace. Rigorózní práce. Hradec Králové : Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2015.
62. **Jánská, M., a další.** Appraisal of “classic” and “novel” extraction procedure efficiencies for the isolation of polycyclic aromatic hydrocarbons and their derivatives from biotic matrices. *Analytica Chimica Acta*. 2004, 520, stránky 93–103. [ISSN 0003-2670].
63. **Tavakoli, L., a další.** Homogeneous liquid-liquid extraction for preconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons using a water/methanol/chloroform ternary component system. *Journal of Chromatography A*. 2008, 1196–1197, stránky 133-138. [ISSN 0021-9673].

64. **Alexovič, M., a další.** Automation of static and dynamic non-dispersive liquid phase microextraction. Part 1: Approaches based on extractant drop-, plug-, film- and microflow-formation. *Analytica Chimica Acta*. 2016, 906, stránky 22–40. [ISSN 0003-2670].
65. **Robles-Molina, J., a další.** Comparative evaluation of liquid–liquid extraction, solid-phase extraction and solid-phase microextraction for the gas chromatography–mass spectrometry determination of multiclass priority organic contaminants in wastewater. *Talanta*. 2013, 117, stránky 382–391. [ISSN 0039-9140].
66. **Fremrová, L., a další.** Polycyklické aromatické uhlovodíky. *Podklady pro Ministerstvo životního prostředí k provádění Protokolu o PRTR – přehled metod měření a identifikace látek sledovaných podle Protokolu o registrech úniků a přenosů znečišťujících látek v únicích do vody*. Praha : HYDROPROJEKT, MŽP, 2007.
67. **Sibiya, P., a další.** Development and application of solid phase extraction method for polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples in Johannesburg Area, South Africa. *South African Journal of Chemistry*. 2012, 65, stránky 206–213. [ISSN 1996-840X].
68. **Titato, G.M. a Lancas, F.M.** Comparison between different extraction (LLE and SPE) and determination (HPLC and capillary-LC) techniques in the analysis of selected PAHs in water samples. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2005, 28, stránky 3045–3056. [ISSN 1520-572X].
69. **Hashemi, B., a další.** Recent advances in liquid-phase microextraction techniques for the analysis of environmental pollutants. *Trends in Analytical Chemistry*. 2017, 97, stránky 83–95. [ISSN 0165-9936].
70. **Kocúrová, L., a další.** Recent advances in dispersive liquid–liquid microextraction using organic solvents lighter than water. A review. *Microchemical Journal*. 2012, 102, stránky 11–17. [ISSN 0026-265X].
71. **Kozáková, K.** Zelená chromatografie - trendy ve vývoji ekologicky šetrných metod. Bakalářská práce. Hradec Králové : Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, 2015.
72. **Zheng, J., a další.** Vortex- and shaker-assisted liquid–liquid microextraction (VSA-LLME) coupled with gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS) for analysis of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in offshore produced water. *Water, Air, & Soil Pollution*. 2015, 226. [ISSN 1573-2932].

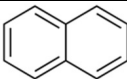


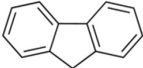

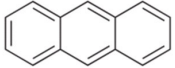


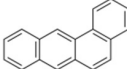
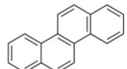

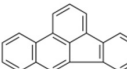
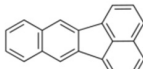
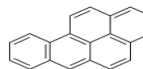


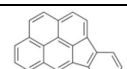
73. **Sibiya, P., a další.** Hollow-fibre liquid-phase microextraction for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in Johannesburg Jukskei River, South Africa. *Chromatographia*. 2013, 76, stránky 427–436. [ISSN 1612-1112].
74. **Kokosa, J.M.** Advances in solvent-microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*. 2013, 43, stránky 2–13. [ISSN 0165-9936].
75. **López-López, J.A., a další.** Solvent bar micro-extraction (SBME) based determination of PAHs in seawater samples. *Science of the Total Environment*. 2017, 598, stránky 58–63. [ISSN 0048-9697].
76. **Rianawati, E. a Balasubramanian, R.** Optimization and validation of solid phase micro-extraction (SPME) method for analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in rainwater and stormwater. *Physics and Chemistry of the Earth*. 2009, 34, stránky 857–865. [ISSN 0079-1946].
77. **Cheng, X., Forsythe, J. a Peterkin, E.** Some factors affecting SPME analysis and PAHs in Philadelphia's urban waterways. *Water Research*. 2013, 47, stránky 2331–2340. [ISSN 0043-1354].
78. **Chen, Y., Zhu, L. a Zhou, R.** Characterization and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbon in surface water and sediment from Qiantang River, China. *Journal of Hazardous Materials*. 2007, 141, stránky 148–155. [ISSN 0304-3894].
79. **Randow, F.F.E., Hübener, T. a Merkel, G.** Hazards for the Rostock water supply from a tar-contaminated sediment in the river Warnow. *Toxicology Letters*. 1996, 88, stránky 355–358. [ISSN 0378-4274].
80. **Wolska, L., Zygmunt, B. a Namieśnik, J.** Organic pollutants in the Odra river ecosystem. *Chemosphere*. 2003, 53, stránky 561–569. [ISSN 0045-6535].
81. **Pilík, P.** Vývoj, optimalizace a validace analytické metody na stanovení polyaromatických uhlovodíků ve vodě pomocí HPLC-PDA. Bakalářská práce. České Budějovice : Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, 2015.
82. **Brum, D.M., Cassella, R.J. a Pereira Netto, A.D.** Multivariate optimization of a liquid–liquid extraction of the EPA-PAHs from natural contaminated waters prior to determination by liquid chromatography with fluorescence detection. *Talanta*. 2008, 74, stránky 1392–1399. [ISSN 0039-9140].

83. **Cioroiu, B.I., a další.** Determination of PAHs in lung tissue samples using specific chromatographic techniques: method development and validation. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2014, 37, stránky 713–725. [ISSN 1520-572X].

84. **AOAC INTERNATIONAL.** AOAC Official Methods of Analysis. *Guidelines for Standard Method Performance Requirements Appendix F*. [Online] 2012. [Citace: 8. listopad 2017.] http://www.eoma.aoac.org/app_f.pdf.

6 Přílohy

Příloha 1: Seznam 16 prioritních polycyklických aromatických uhlovodíků dle US EPA a použitého vnitřního standardu (řazeno dle rostoucí retence sloučenin).

POLYCYKLIČKÉ AROMATICKÉ UHLOVODÍKY				
Analyt	Vzorec		M _r (g/mol)	CAS
	Strukturní	Sumární		
Naftalen		C ₁₀ H ₈	128,17	91-20-3
Acenaftylen		C ₁₂ H ₈	152,19	208-96-8
Acenaften		C ₁₂ H ₁₀	154,21	83-32-9
Fluoren		C ₁₃ H ₁₀	166,22	86-73-7
Fenanthren		C ₁₄ H ₁₀	178,23	85-01-8
Anthracen		C ₁₄ H ₁₀	178,23	120-12-7
Fluoranthen		C ₁₆ H ₁₀	202,25	206-44-0
Pyren		C ₁₆ H ₁₀	202,25	129-00-0
Benzo[a]anthracen		C ₁₈ H ₁₂	228,29	56-55-3
Chrysen		C ₁₈ H ₁₂	228,29	218-01-9
Vnitřní standard		C ₂₆ H ₁₈	330,42	1499-10-1
Benzo[b]fluoranthen		C ₂₀ H ₁₂	252,31	205-99-2
Benzo[k]fluoranthen		C ₂₀ H ₁₂	252,31	207-08-9
Benzo[a]pyren		C ₂₀ H ₁₂	252,31	50-32-8
Dibenzo[a,h]anthracen		C ₂₂ H ₁₄	278,35	53-70-3
Benzo[g,h,i]perylen		C ₂₂ H ₁₂	276,33	191-24-2
Indeno[1,2,3-c,d]pyren		C ₂₂ H ₁₂	276,33	193-39-5