

**Metodika sledování kontaminace ovzduší
v okolí veřejných komunikací aromatickými
polycyklickými uhlovodíky na základě jejich
analýz na povrchu listů dřevin**

Petr Maršík, Tomáš Vaněk, Pavel Kinderman

1. Úvod

1.1. Princip metody

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) jsou sloučeniny tvořené dvěma a více aromatickými kruhy které vznikají při spalování nejrůznějších materiálů organického původu. Jsou to polutanty s řadou pro živočišné organismy a člověka rizikových vlastností: patří mezi ně potenciální karcinogeny a mutageny a řada z nich je vysoce toxická. Nejsledovanější a potenciálně nejškodlivější skupinou PAH jsou látky s 2-6 kondenzovanými benzenovými jádry (obr. 1). Některé z těchto PAH (chrysen, benzo(a)anthracen, benzo(b)fluoranthén, benzo(k)fluoranthén, benzo(a)pyren, indeno(1,2,3-c,d)pyren, di-benzo(a,h)anthracen) jsou klasifikovány agenturou US EPA jako karcinogeny. Mezi nejlépe prozkoumané karcinogenní PAH patří benzo(a)pyren, jehož koncentrace v potravinách upravuje nařízení Evropské komise č. 208/2005 a který slouží jako marker pro určení nebezpečných koncentrací PAH. Na základě koncentrace benzo(a)pyrenu (BaP) je též českou legislativou stanoven cílový imisní limit pro polycyklické aromatické uhlovodíky v ovzduší (nařízení vlády č. 597/2006 Sb.), který je vyjádřen jako koncentrace BaP ve výši 1 ng/m³. V České republice jsou prováděna pravidelná měření průměrných ročních koncentrací PAH v ovzduší (vyjádřeno jako ekvivalent koncentrace BaP) sítí monitorovacích stanic ČHMÚ (v roce 2009 na 23 stanicích). Obsah některých PAH v odpadních vodách a kalech (např. fluoranthenu) je regulován českou státní normou č. 75 7554/1998.

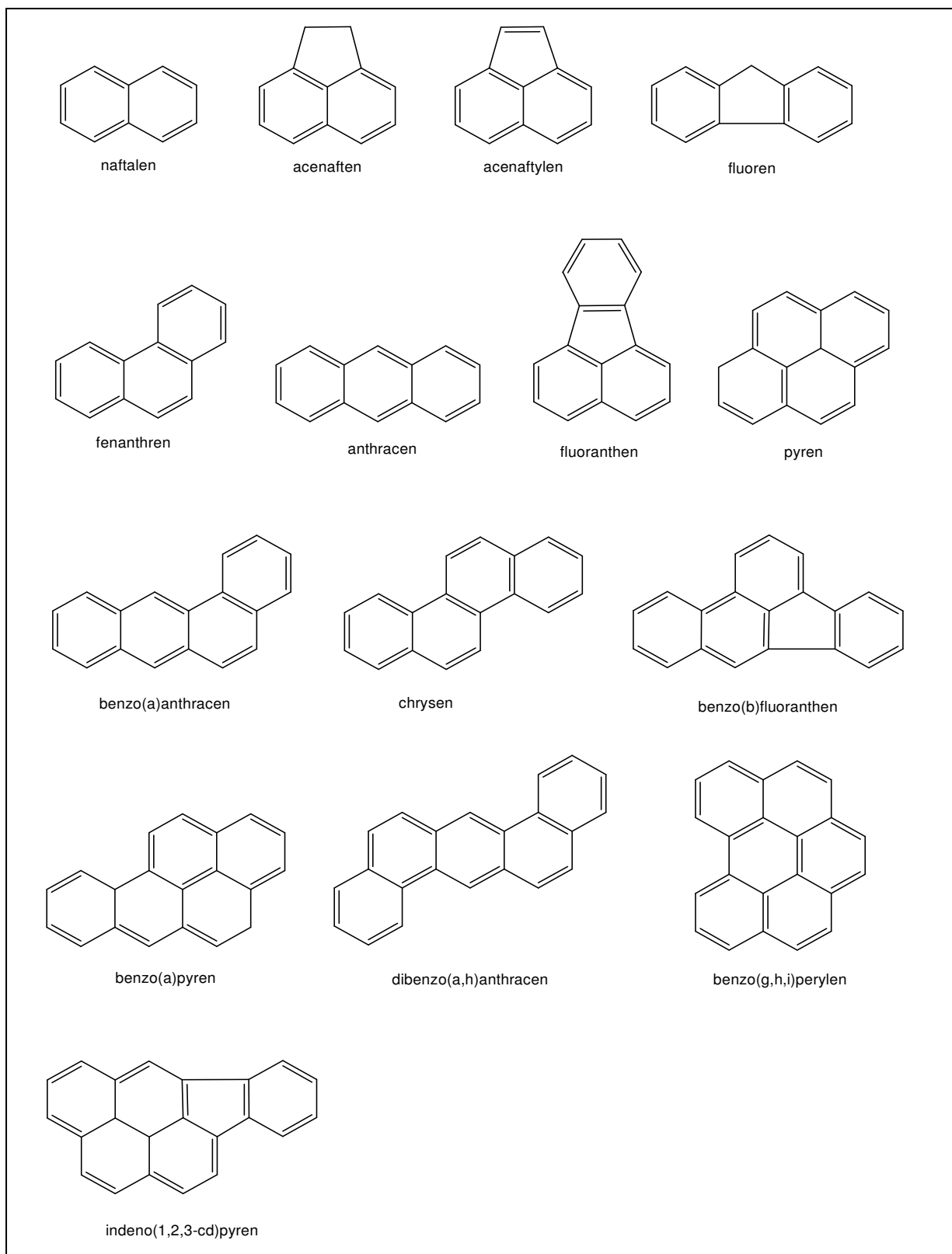
Významným zdrojem PAH jsou spalovací motory (především dieselové) motorových vozidel (Lim a kol., 1999). Z tohoto důvodu je významně zvýšená koncentrace PAH v ovzduší v městských aglomeracích především v okolí frekventovaných komunikací (hlavní silnice, křižovatky). PAH s menším počtem aromatických jader (2-4) jsou v ovzduší přítomny v plynné formě, zatímco vyšší (4 a více) se vyskytují především adsorbované na prachové částice (De Nicola a kol. 2005). Protože značná část jak plyných tak i prachových polutantů ze vzduchu je zachytávána vegetací, která díky svému olistění disponuje velkou absorpční plochou, jsou obě zmíněné frakce PAH ve zvýšené míře zachytávány především na jejich povrchu. Tomu napomáhá i lipofilní charakter povrchu listů, které jsou kryty voskovou vrstvou (kutikulou) a ve které jsou lipofilní PAH dobře rozpustné (Howsam a kol., 2001). Mnohé rostliny mají navíc povrch listů pokrytý i množstvím jemných chloupků (trichomů), které účinně zachycují polévaté prachové částice. Z tohoto důvodu je obsah PAH na povrchu listů dobrým ukazatelem lokálního atmosférického znečištění těmito látkami.

Předkládaná metodika je zaměřena na monitorování obsahu atmosférických PAH v okolí komunikací či jiných míst se zvýšenou koncentrací PAH v ovzduší, které jsou zachyceny okolní vegetací. Je založená na kvalitativní i kvantitativní analýze frakce PAH zachycené na povrchu (kutikula) či ve vnitřních pletivech listu a na frakci obsažené v prachových částicích na listech zachycených. Měla by sloužit především jako nástroj pro zjišťování stavu ovzduší v okolí komunikací především v dlouhodobém horizontu (v řádu měsíců) a vzájemnému porovnání úrovně znečištění na sledovaných lokalitách. Zároveň by výstupem provedených analýz měly být informace o absorpční kapacitě jednotlivých rostlinných druhů na témže stanovišti, což může být jedním z výběrových kritérií při volbě druhového složení vysazované zeleně na exponovaných místech.

1.2 Odborné termíny a jejich definice

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) - rámci této metodiky se termínem polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH - Polycyclic aromatic hydrocarbons) rozumí uhlovodíky tvořené 2 až 6 kondenzovanými benzenovými jádry (naftalen až benzo(g,h,i)perylene – viz obr. 1). PAH s vyšším počtem kondenzovaných jader nemohou být prostřednictvím této metodiky dostatečně přesně identifikovány ani kvantifikovány.

Obrázek 1: Strukturální vzorce vybraných polyaromatických uhlovodíků sledovaných v rámci této metodiky.



Vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC) – separační metoda založená na průchodu směsi látek v proudu kapaliny (mobilní fáze) kolonou naplněnou sorbentem (stacionární fáze) zachycujícím s různou intenzitou jednotlivé látky směsi. Ty

procházejí kolonou různou rychlostí a jsou tak navzájem oddělovány. HPLC bývá spojena s různými detekčními zařízeními.

Plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií – Chromatografická separační metoda, při které se používá jako mobilní fáze proud plynu, který prochází velmi tenkou kolonou. Při průchodu směsi látek dochází k jejich interakcím s vnitřním povrchem kolony a tak i rozdílu v rychlosti průchodu kolonou a následné separaci. V hmotnostním spektrometru je pak analyzovaná látka ionizovaná a profil vzniklých iontů analyzován na základě jejich molekulární (iontové) hmotnosti. Iontové spektra jsou často pro konkrétní chemické sloučeniny charakteristická a lze podle nich s určitou mírou pravděpodobnosti odhadnout strukturu měřených látek.

2. Vybavení

Terénní odběr vzorků

- polyethylenové sáčky
- pracovní rukavice
- zahradnické nůžky
- samolepící štítky, popisovací fix
- fotoaparát

Laboratorní zpracování vzorků

- skener
- rastrový skenovací program (např. LAM (Leaf Area Measurement, version 1.3, Copyright ©2003 The University of Sheffield, A.P. Askew))
- ultračistá deionizovaná voda, dichlormethan, hexan, acetonitril
- 2M roztok KOH
- sušidlo (Na_2SO_4)
- pinzeta
- ultrazvuková lázeň
- laboratorní kádinka o objemu 1 l
- silnostěnná odsávací baňka 500 ml
- filtrační zařízení s výměnnými teflonovými filtračními membránami o porositě 0,45 μm
- Petriho misky různých velikostí
- filtrační papír
- skleněné 500 ml Erlenmeyerovy baňky se zábrusem
- vakuová rotační odparka
- odpařovací baňky o objemu 10 – 250 ml
- kádinky různých objemů
- Pasteurovy pipety skleněné, pipetovací nástavec pro Pasteurovy pipety
- 60 ml zábrusové zkumavky
- silnostěnné zkumavky se šroubovacím uzávěrem s teflonovým těsněním
- plynný dusík (6.0)
- skleněná kolona 400 x 20 mm
- silikagel Kieselgel 60

Analýza vzorků

- HPLC systém s fluorescenční detekcí:
 - vysokotlaková gradientová pumpa
 - autosampler nebo vysokotlaký nástříkový ventil
 - chromatografická kolona Pinnacle II PAH 4 μm (250 x 4.6 mm)
 - kolonový termostat
 - průtokový fluorescenční detektor
 - PDA nebo UV detektor
 - mobilní fáze: ultračistá deionizovaná voda, acetonitril (gradient grade)

nádoba na jímání odpadu
ovládací a vyhodnocovací software

GC/MS systém

autosampler (AI 3000)
split/splitless injektor
plynový chromatograf (Trace)
kapilární kolona TR-5MS SQC (30m; 0,25mm; 0,25 µm)
MS detektor (ITQ ion trap)
mobilní fáze: Hélium 5.0
ovládací a vyhodnocovací software

3. Vzorkování

3.1 Výběr odběrových lokalit

Monitorovací odběrové lokality jsou vybírány na základě blízkosti a typu zdroje znečištění (křižovatka, frekventovaná komunikace, železniční trať). Důležitá je zejména exponovanost a geografická poloha odběrového místa. Rozhodující úlohu při tom hraje především hustota provozu, výskyt a frekvence dopravních kongescí a sklon komunikace (na komunikacích s prudším sklonem jsou zpravidla koncentrace PAH vyšší). Významnou roli hraje též poloha lokality – zda se jedná o místo v otevřené krajině se zvýšeným prouděním vzduchu, uzavřené údolí či zástavbu. Vzhledem ke sledování vztahu PAH v ovzduší a jejich sorbce na listy je vhodné při výběru lokality zohlednit také blízkost monitorovacích stanic ČHMÚ, na kterých se provádí standardní měření koncentrací benzo(a)pyrenu v ovzduší (viz kap.1.1).

Pro odběr vzorků listů je vhodné zvolit úsek podél komunikace ne delší než 50 m vzdálené 2-10 m od okraje komunikace (vzdálenost od okraje komunikace by měla být na stejné lokalitě vždy přibližně stejná). V otevřené krajině je vhodnější volit dřeviny rostoucí blíže ke zdroji znečištění.

3.2 Odběr vzorků listů

Listí opadavých stromů je odebíráno zhruba od poloviny dubna do konce růstové sezóny (říjen). Frekvenci odběrů je vhodné zvolit podle exponovanosti komunikace, zpravidla 2 až 4 odběry do měsíce. Odběry se provádějí za suchého počasí, nejlépe alespoň den po posledních dešťových srážkách z důvodu lepšího skladování a snadnější manipulace a podílu prachových částic, které mohou být prudkým deštěm smyty. Nicméně na obsah PAH na listech má podle dostupných údajů rozhodující vliv především jejich koncentrace v ovzduší a nikoliv množství a frekvence srážek, jak ukazují některé výzkumy (Howsam a kol. 2001).

Vzorky listů jsou odebírány z okrajových částí koruny dřevin přibližně ve stejné partii (zpravidla blíže ke komunikaci) ve výšce 1-2 m nad úrovní okolního terénu. Odběr je prováděn v rukavicích co nejšetrněji, aby nedocházelo k otěru povrchové vrstvy. Jsou sbírány dospělé listy přibližně stejného stáří (ve stejné vzdálenosti od vrcholu větve). Odebrané listy jsou uloženy v plastových sáčcích označených samolepicími popisnými štítky. Odebrané vzorky jsou poté přímo dále zpracovávány nebo před zpracováním uskladněny v chladu při 4 °C po dobu maximálně 5 dnů.

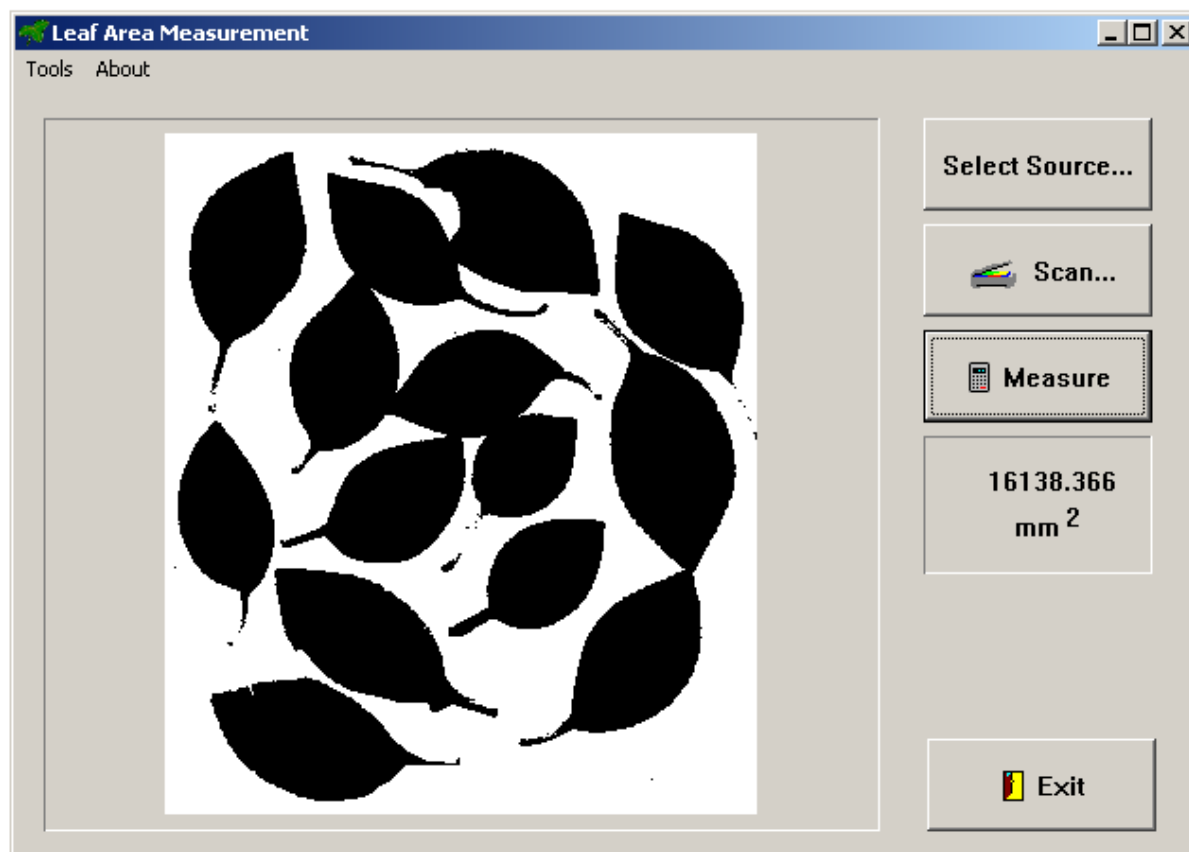
Při odběru je pořizována fotodokumentace jak celé odběrové lokality, tak i jednotlivých dřevin tak, aby byla zřejmá jejich poloha v rámci dané lokality.

4. Zpracování vzorku

4.1 Měření plochy listů

Plocha listů je měřena pomocí stolního skeneru a rastrového skenovacího software (např. volně dostupného „Leaf Area Measurement“, který přímo provádí přepočet na jednotku plochy - mm²). Použité rozlišení se liší podle velikosti skenovaných listů: velmi malé listy jsou skenovány při více než 600 dpi (zpravidla 800), středně velké při 600 dpi a velké při 400 dpi. Pro další analýzu se zpracovává množství listů o celkové ploše přibližně 10 dm² (tj. 100 000 mm²). Přesná hodnota plochy dále zpracovávaných listů je zaznamenána do protokolu. Na tuto hodnotu jsou pak vztahována všechna další naměřená data. Takto naměřená plocha se zpravidla násobí dvěma (sorpce na obou stranách listu – nutné zaznamenat do protokolu). Příklad výstupu změřené plochy ze skenovacího software je na obr. 2.

Obrázek 1: Výstup měření listové plochy (slivoň) pomocí software „Leaf Area Measurement“.



4.2 Přečištění extraktů

Extrakce PAH z prachových částic

Po změření povrchu je adsorbovaný prach z listů opláchnut jejich ponořením na 20 vteřin do kádinky s ultračistou vodou (500 ml) umístěnou v ultrazvukové lázni. Suspenze je poté pod vakuem zfiltrována přes na laboratorních vahách předem zvážený teflonový filtr (0.45μm), jehož přesná hmotnost je zaznamenána do protokolu. Filtr se zachyceným prachem je poté sušen při laboratorní teplotě ve tmě cca 5-7 dní. Suché filtry jsou zváženy na přesných laboratorních vahách a hmotnost je zaznamenána do protokolu. Odečtením hmotnosti čistého filtru a filtru se zachycenými prachovými částicemi získáme čistou hmotnost omyvatelných prachových částic, která bude dále použita při přepočtech PAH v prachové frakci.

Poté jsou extrahovány 1 den ve tmě hexanem (20 ml) ve skleněných zkumavkách s těsnícím šroubovacím uzávěrem. Pokud se jedná o vzorky, které budou měřeny pomocí GC/MS, přidá se v této fázi ke vzorku roztok směsi deuterovaných PAH (200 ng každé látky)

jako vnitřní standardy (viz kap. 4.3). V případě analýzy na HPLC je přidána směs halogenderivátů PAH (500 ng každé látky) (viz kap. 4.3). Po extrakci jsou zkumavky 2 min ponořeny do ultrazvukové lázně a celá extrakce stejným objemem hexanu zopakována. Obě hexanové frakce se slíjí a zakoncentrují se na vakuové odparce ve vodní lázni o teplotě 37°C. Po zahuštění je zbytek rozpouštědla opatrně odpařen proudem dusíku.

Pro přípravu vzorků určených pro analýzu na GC/MS je třeba se pokud možno vyhnout kontaktu vzorků s předměty vyrobenými z plastů, neboť tím se dramaticky zvyšuje podíl kontaminujících organických látek (změkčovadla) ve vzorku.

Extrakce PAH z listů

Listy jsou po oplachu prachových částic uskladněny ve chladu (4°C) - nejdéle však 2 dny – poté umístěny do zábrusové baňky se 200 ml dichlormethanu a 2 min extrahovány v ultrazvukové lázni. Po vyjmutí z lázně jsou při laboratorní teplotě ponechány ve tmě ještě 2 x 2 hod. Pokud se jedná o vzorky, které budou měřeny pomocí GC/MS, přidá se v této fázi ke vzorku vnitřní standard (směs deuterovaných PAH ke vzorkům pro analýzu GC/MS, směs halogenderivátů PAH pro analýzu HPLC) (viz kap. 4.3). Poté je dichlormetanový extrakt slit, přidáno sušidlo (Na_2SO_4) a po zfiltrování vzorek zahuštěn na vakuové odparce a odpařen do sucha proudem dusíku. Takto zpracované vzorky jsou uskladněny ve tmě a chladu pro následnou purifikaci.

Při přípravě vzorků pro GC/MS analýzu je třeba se stejně jako při přípravě extraktů z prachových částic vyhýbat používání plastových pomůcek z důvodu kontaminace vzorku látkami z těchto předmětů.

Přečištění extraktů

Odparek je rozpuštěn ve 20 ml n-hexanu 1 min v ultrazvukové lázni a 60 ml skleněné zábrusové zkumavce extrahován vytřepáním do stejného množství acetonitrilu, aby byl zbaven polárních příměsí. Svrchní hexanová vrstva je po dokonalém oddělení obou fází odebrána a rezidua PAHů ze spodní acetonitrilové vrstvy extrahována znovu 20 ml hexanu. Obě hexanové vrstvy jsou slity a zahuštěny na objem cca 1 ml na vakuové odparce.

V případě extraktů z pletiv listů bývá zpravidla přítomno značné množství lipidických příměsí, které mohou být účinně odstraněny saponifikací. Ta se provede 2M roztokem KOH za občasného míchání při teplotě 40°C po 2 hodiny ve zkumavce se šroubovacím uzávěrem. Svrchní hexanová vrstva je poté odebrána a 3x vytřepávána se stejným množstvím vody. Poté je přidáno sušidlo (Na_2SO_4) a vzorek je dále čištěn stejně jako extrakt prachových částic.

Zahuštěný hexanový extrakt je následně aplikován na skleněnou kolonu naplněnou aktivovaným silikagelem (14 g) pokrytým vrstvou sušidla (Na_2SO_4). Kolona je pak následně promyta 50 ml n-hexanu a poté 100 ml směsí n-hexan-dichlormethan (1:1), aby se odstranily zbytky polárních kontaminací. Obě frakce jsou poté slity a zahuštěny na objem cca 100 μl .

4.3 Analýza PAH

Vzorky byly analyzovány dvěma způsoby: pomocí kapalinové chromatografie s PDA a fluorescenční detekcí a GC/MS analýzou umožňující spolehlivější identifikaci detekovaných polycyklických uhlovodíků. Obě metody se výhodným způsobem doplňují a umožňují přesné stanovení sledovaných látek v analyzovaném materiálu. Pro měření koncentrace PAH v ovzduší se standardně používá postup podle technické normy ISO 12884:2000 „Stanovení sumy (plynná a pevná fáze) polycyklických aromatických uhlovodíků ve vnějším ovzduší – Odběr na filtry a sorbent s analýzou metodou plynové chromatografie/hmotnostní spektrometrie“. Jelikož je popsána metoda založená na zachycení prachových částic a PAH na sorbenty a filtry a obsahuje tudíž poměrně malé množství organických kontaminantů, je ve stávající podobě pro analýzu PAH na povrchu listů nevhodná (týká se to především extrakce a purifikace PAH). Z tohoto důvodu byla metodika měření modifikována, aby vyhovovala účelům analýzy rostlinného materiálu.

Pro kvantifikaci byly použity v závislosti na způsobu analýzy dva typy vnitřních standardů: pro GC/MS analýzu vybrané PAH značené deuteriem a pro HPLC halogenované deriváty PAH. Výhoda použití deuterovaných derivátů spočívá v jejich prakticky identických vlastnostech, jako mají nedeuterované PAH vzorku, tudíž při přečištění vzorku dochází ke stejným ztrátám u obou skupin látek. Ze ztráty vnitřních standardů při manipulaci pak lze dopočítat i ztráty u sledovaných látek. Navíc mají deuterované látky podobné retenční vlastnosti (vzhledem k vyšší molekulové hmotnosti zpravidla mírně zpožděnou retenci), jako látky sledované. Deuterované PAH mají molekulovou hmotnost (a tudíž i hmotnost molekulového iontu) navýšenou oproti přirozeným PAH o příslušný počet jednotek odpovídající počtu deuteriových jader nahrazujících v molekule vodíkové atomy, takže jsou v MS spektru snadno odlišitelné a kvantifikovatelné. Vzhledem k rozdílným vlastnostem PAH o různém počtu kondenzovaných benzenových jader je vhodné zvolit výběr několika deuterovaných standardů tak, aby z tohoto hlediska pokrývaly celou měřenou škálu PAH (např. acenaften-d10, chrysen-d12, benzo(a)pyren-d12, naftalen-d8, anthracen-d10 jaké byly použity při vývoji této metodiky).

Jako vnitřní standardy pro HPLC jsou vhodné halogenové (např. fluorované, bromované) deriváty PAH. Vzhledem ke změnám fluorescenčních vlastností je však účelné provést kalibraci pomocí absorpce při UV vlnových délkách, což sice vyžaduje vyšší navážku vnitřních standardů, ale umožňuje snímání signálu z UV spektrometru nezávisle na výstupu z fluorescenčního detektoru, takže se lze mnohdy vyhnout překrývání signálů látek o podobných retenčních časech.

Analýza pomocí HPLC s fluorescenční detekcí

Při použití HPLC s fluorimetrickou detekcí je nespornou výhodou nižší pozadí šumu a poměrně vysoká citlivost metody. Detekční limit se pohybuje od 1 do 15 ng v závislosti na konkrétní látce a na měřicím systému. PAH, které mají slabou fluorescenční odezvu (acenaftylen) jsou však touto metodou analyzovány obtížně. Identifikaci lze provádět pouze na základě retenčních časů píků při charakteristických excitačních a emisních vlnových délkách. Pouze při vyšších koncentracích PAH (řádově stovky ng v závislosti na konkrétní látce) je možné identifikovat dané látky pomocí UV-Vis absorbních spekter.

Pro separaci na použité koloně (Pinnacle II PAH (Restek)) specializované na separaci PAH byl při vypracování dané metodiky použit gradient voda:acetonitril (od 40% acetonitrilu v čase 0, 100% ve 28 min pokračujících až do 40 min). V průběhu analýzy byla teplota kolony udržována na 35 °C, průtok mobilní fáze činil 1 ml/min.

Pro jednotlivé PAH jsou v tabulce 1 uvedeny excitační a emisní vlnové délky a retenční časy, které byly za výše popsanych podmínek použity pro jejich detekci.

Tabulka 1.

Název	Retenční čas [min]	λ excitační	λ emisní
naftalen	10,3	270	340
acenaftylen	-	-	-
acenaften	13,9	270	340
fluoren	14,2	270	340
fenatren	15,7	254	375
antracen	17,1	260	420
fluoranthen	18,8	260	420
pyren	20,2	254	390

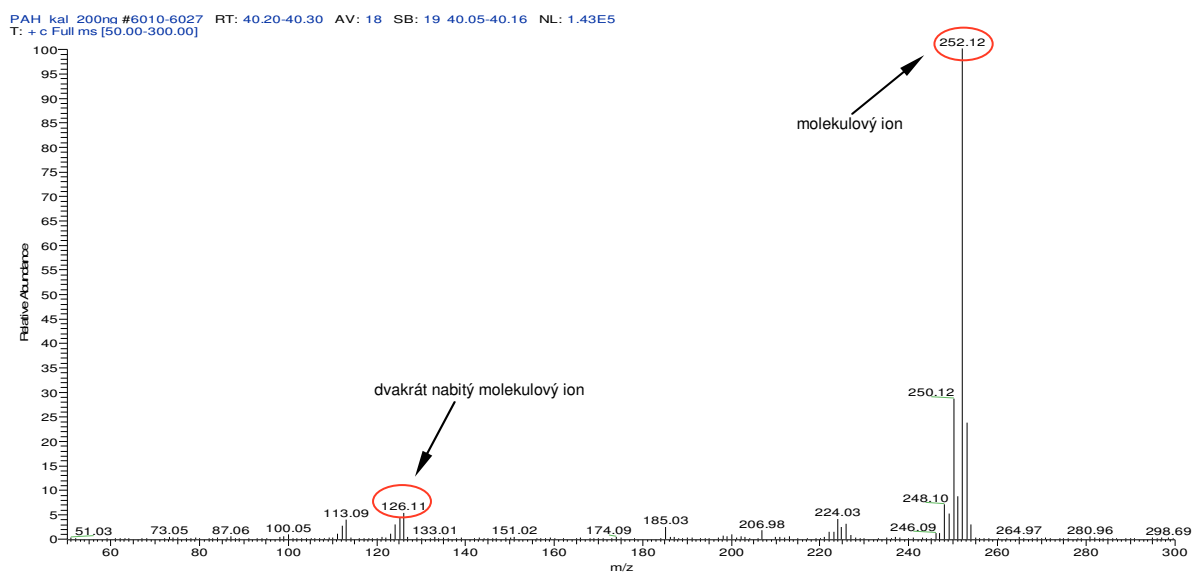
benzo(a)antracen	24,0	254	390
chrysen	24,8	254	390
benzo(b)fluoranthen	28,2	260	420
benzo(a)pyren	31,1	260	420
dibenzo(a,h)antracen	32,8	260	420
benzo(g,h,i)perylene	34,8	260	420
indeno(1,2,3-cd)pyren	35,4	293	498

Analýza pomocí GC-MS

Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí poskytuje za daných podmínek vysokou citlivost na zhruba stejné úrovni jako předešlá metoda (detekční limit 1-12 ng). Navíc lze využít poměrně spolehlivou kvantifikaci pomocí deuterovaných vnitřních standardů. Nespornou výhodou je i jistější identifikace založená na kombinaci retenčních charakteristik a hmotnostních spekter (v případě PAH především molekulových hmotností), v případě přístrojového vybavení použitého při vypracování této metodiky i možností tandemové hmotnostní spektrometrie (MS^n), kdy se riziko záměny s případnou interferující látkou výrazně snižuje. Nevýhodou je vysoká citlivost vůči kontaminaci detektoru (vysoké pozadí) a tudíž i vyšší nároky na přípravu a purifikaci vzorků (viz kap. 4.2).

PAH mají vesměs typická hmotnostní spektra, která díky svým charakteristikám usnadňují jejich rozpoznání i kvantifikaci. Ionty hmotnostního spektra jsou charakterizovány hodnotami m/z (molekulová hmotnost dělená počtem nábojů), kdy ve většině případů každý ion nese náboj jediný a proto číselná hodnota odpovídá zpravidla i molekulové hmotnosti příslušného iontu. Hlavní ion je zpravidla i iontem molekulovým a má tudíž při použití ionizace EI hodnotu m/z rovnou molekulové hmotnosti (viz obr. 3). Další fragmenty se ve srovnání s hlavním molekulovým iontem vyskytují zpravidla v minimálních množstvích. U vyšších PAH se mohou vyskytnout ionty s poloviční hodnotou m/z molekulového iontu, což je způsobeno tím, že určité procento molekul nese dvojnásobný náboj.

Obrázek 3: MS spektrum benzo(a)fluoranthenu.



Pro vypracování dané metodiky byla použita následující instrumentace: hmotnostní spektrometr ITQ Ion Trap (iontová past), plynový chromatograf TRACE opatřený autosamplérem AI 3000 a split/splitless injektorem (Thermo Scientific). Jako mobilní fáze

bylo použito helium o průtoku 1 ml/min. Měření probíhalo ve splitless módu, nastříkáváno bylo 1 µl vzorku. Pro separaci byla použita kolona THERMO TR-5ms SQC (délka 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm, tloušťka filmu 0,25 µm). Teplotní gradient pro separaci sledovaných PAH začínal na 60°C a pokračoval do 300°C ve 48 minutě. Jednotlivé látky byly kvantifikovány na základě odezvy při m/z uvedených v tabulce 2, které odpovídaly molekulovým hmotnostem příslušných PAH.

Tabulka 2.

Název	Retenční čas [min]	m/z
naftalen	9,2	128
acenaftylen	15,7	152
acenaften	16,5	153
fluoren	18,8	166
fenatren	23,2	178
antracen	23,4	178
fluoranthen	28,7	202
pyren	29,7	202
benzo(a)antracen	35,5	228
chrysen	36,7	228
bezo(b)fluoranthen	40,3	252
benzo(a)pyren	41,6	252
dibenzo(a,h)antracen	45,9	278
benzo(g,h,i)perylene	45,7	276
indeno(1,2,3-cd)pyren	46,7	276

Kalibrace a stanovení limity detekce a limity stanovitelnosti

Před každou měřenou sérií vzorků je nezbytné provádět kalibraci příslušného měřicího systému (HPLC i GC/MS) s použitím kalibračních roztoků směsi standardů PAH a používaných vnitřních standardů, aby se omezily chyby vzniklé změnou odezvy příslušného zařízení. Tato kalibrace se provádí prostřednictvím sestavení kalibrační přímky, která je vypočítána na základě ředící řady směsi standardů. Kromě toho se provádí po každých 3 analyzovaných vzorcích měření testovacího vzorku směsi standardů a vnitřních standardů pro korekci posunu retenčních časů a síly odezvy signálu. Je vhodné používat jeden a týž testovací vzorek pro celou sérii měření, aby se v průběhu celé série zajistily minimální odchylky v koncentracích sledovaných látek v rámci testovacího vzorku. Koncentrace standardů testovacího vzorku by se měly pohybovat přibližně ve středu rozsahu kalibrační přímky.

Zpravidla se volí 5-10 bodová kalibrace ($N=5$ až 10), kde každý bod odpovídá konkrétní známé koncentraci. Pro sestavení kalibrační přímky se jako odezva signálu (závislá proměnná y kalibrační přímky) zpravidla používá plocha píku. Při kalibraci je nutné nejprve zvolit příslušný pracovní rozsah. Ten by měl pokrývat hodnoty koncentrací očekávaných v měřených vzorcích, hodnoty měřené odezvy by měly být v rámci tohoto

rozsahu lineárně korelované s koncentrací (viz dále) a rozptyl těchto hodnot by měl být nezávislý na koncentraci. Při sestrovování kalibrační křivky se zjišťují následující parametry:

- homogenita rozptylů
- linearita kalibrace
- odhad koeficientů vlastní kalibrační funkce
- odhad konfidenčních intervalů

Pro ověření **homogenity rozptylů** je třeba provést n opakovaných měření (nejlépe 10) kalibračních roztoků při nejnižší a nejvyšší (i -té) koncentraci pracovního rozsahu (ČSN ISO 8466-1, 1993). Oba tyto soubory koncentrací se použijí pro výpočet rozptylů s_1^2 a s_2^2 :

$$s_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^n (y_{i,j} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1} \quad (4.3.1)$$

kde n_i je počet opakování na dané koncentrační úrovni a \bar{y}_i je příslušný průměr naměřených hodnot.

Významnost rozdílů v mezních hodnotách pracovního rozsahu se rozptyly testují pomocí F-testu. Testovaná hodnota PG se vypočte následujícím způsobem:

$$PG = \frac{s_i^2}{s_1^2} \quad \text{pro } s_i^2 > s_1^2 \quad (4.3.2)$$

$$PG = \frac{s_1^2}{s_i^2} \quad \text{pro } s_1^2 > s_i^2 \quad (4.3.3)$$

a porovná se s tabelovanými hodnotami pro F-rozdělení. Pokud je hodnota $PG \leq F_{f1,f2;0,99}$, není rozdíl mezi oběma rozptyly statisticky významný, pokud je $PG > F_{f1,f2;0,99}$, je tento rozdíl významný a je nutné zúžit pracovní rozsah.

Pro výpočet je účelné využít dostupný software (např. Microsoft Excel, SPSS, Statistica a pod.).

Předběžný **test linearity** lze provést grafickým vynesemím kalibračních bodů spolu s vypočtenou regresní přímkou, ze kterého lze často případnou nelinearitu odhalit pouhým pohledem. Statistický test linearity spočívá v testování vhodnosti proložení naměřených kalibračních hodnot lineární a nelineární (zpravidla polynom 2 -3 řádu) kalibrační funkcí. To se provede testem reziduálních směrodatných odchylek s_{y1} a s_{y2} obou funkcí. Hodnoty těchto odchylek jsou mírou rozptýlení naměřených hodnot kolem dané regresní funkce. Rozdíl hodnot rozptylů DS^2 získáme výpočtem:

$$DS^2 = (N - 2) \cdot s_{y1}^2 - (N - 3) \cdot s_{y2}^2 \quad (4.3.4)$$

a tuto hodnotu a hodnotu rozptylu nelineární kalibrační funkce s_{y2}^2 testujeme F-testem:

Pokud je hodnota $PG \leq F$, nevede použití nelineární kalibrační funkce k těsnějšímu proložení hodnot a kalibrační funkce je lineární. Pokud je $PG > F$, je nutné opět zúžit pracovní rozsah tak, aby bylo linearity dosaženo, nebo se pro výpočet použije nelineární kalibrace, což však celé hodnocení komplikuje.

Vlastní **kalibrační funkce** se provádí pomocí lineární regresní analýzy N naměřených hodnot koncentrační řady kalibračních roztoků standardů. Pomocí regresní analýzy se získají koeficienty kalibrační funkce a a b , vyjádřené rovnicí:

$$y = a + b \quad (4.3.5)$$

kde y je naměřená hodnota odezvy, x je koncentrace vzorku, průsečík s osou odezev a je vypočtená hodnota slepého stanovení (pozadí) a citlivost měření b odpovídá směrnici kalibrační funkce. Tuto analýzu je účelné provádět pomocí některého z výše zmíněných software. Z kalibrační funkce se potom určí hodnota koncentrace v analyzovaném vzorku podle vzorce:

$$x = \frac{y - a}{b} \quad (4.3.6)$$

Takto získaná kalibrační funkce je však pouze odhadem – mírou shody tohoto odhadu s naměřenými kalibračními daty je reziduální směrodatná odchylka s_y , která vyjadřuje rozptýlení hodnot kolem kalibrační přímky. Je dána následujícím vztahem:

$$s_y = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N - 2}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N [y_i - (a + bx_i)]^2}{N - 2}} \quad (4.3.7)$$

kde \hat{y}_i je hodnota opakování naměřená se stejným vzorkem, x_i a y_i získané hodnoty použité pro výpočet kalibrační křivky, N počet koncentračních úrovní, a vypočtená hodnota slepého stanovení a b citlivost metody (směrnice kalibrační přímky).

Další zjišťovanou charakteristikou kalibrační funkce jsou **konfidenční intervaly (intervaly spolehlivosti)**. Je to rozmezí, ve kterém se na základě zákona o rozdělení chyb náhodných veličin může pro konkrétní zvolenou hladinu statistické významnosti α vyskytovat skutečná kalibrační funkce, jejíž vypočítaný průběh je vždy zatížen určitou chybou. Výpočet konfidenčního intervalu (VB) pro konkrétní naměřenou hodnotu se určí ze vztahu:

$$\hat{x}_{1,2} = \hat{x} \pm VB(\hat{x}) \quad (4.3.8)$$

$$\hat{x}_{1,2} = \frac{\hat{y} - a}{b} \pm \left(\frac{s_y \cdot t(f_1, 1 - \alpha)}{b} \times \sqrt{\frac{1}{N} + \frac{1}{\hat{n}}} + \frac{(\hat{y} - \bar{y})^2}{b^2 \cdot \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \right) \quad (4.3.9)$$

kde \hat{n} je počet opakovaných stanovení, \hat{y} je průměr naměřených hodnot z n opakování, \hat{n} je počet opakovaných stanovení, \bar{y} průměr kalibračních hodnot y_i , \bar{x} průměr kalibračních koncentrací x_i , s_y hodnota reziduální směrodatné odchylky a $t(f_1, 1 - \alpha)$ tabelovaná (kritická) hodnota Studentova t-rozdělení pro $f_1 = N - 2$ stupně volnosti a hladinu spolehlivosti $(1 - \alpha)$. Pro výpočet konfidenčních intervalů je vhodné použít specializovaný software.

Pro vyjádření přesnosti a citlivosti kalibrace je třeba stanovit základní limitní hodnoty, kterými jsou především limita detekce a limita stanovitelnosti.

Limita detekce

Limita detekce y_d udává takovou úroveň měřeného signálu, kdy je ještě možné odlišit signál od šumu. Tomu odpovídající koncentrace x_d je minimální koncentrací, kterou je ještě možné na základě odezvy signálu odlišit od nulové koncentrace.

V případě použitých metod (HPLC, GC-MS) lze pro výpočet limity detekce použít velikost signálu slepého pokusu a směrnice kalibrační přímky. Pro toto stanovení je nutné

nejprve změřit chromatogram slepého pokusu (rozpouštědla). Z chromatogramu slepého pokusu se určí maximální kolísání baseline (h_{max}) v oblasti vymezené 20-ti násobkem $\frac{1}{2}$ šířky píku stanovované látky. Limita detekce (odezva signálu) se pak určí ze vztahu:

$$y_d = 3 \cdot h_{max} \quad (4.3.10)$$

a odpovídající limitní koncentrace analytu x_d ze vzorce:

$$x_d = \frac{y_d}{b_h} \quad (4.3.11)$$

kde b_h je směrnice kalibrační přímky sestrojené nikoliv na základě ploch píků, ale jejich výšky.

Limita stanovitelnosti

Limita stanovitelnosti y_s je nejmenší hodnota signálu, pro kterou je relativní směrodatná odchylka predikce z kalibračního modelu dostatečně malá a rovna nějakému zvolenému číslu C, zpravidla rovnému 0,1 (tj. 10%).

Limita stanovitelnosti lze podobně jako limita detekce pro použité separační metody určit z úrovně šumu chromatogramu slepého pokusu, kdy se opět určí maximální kolísání baseline (h_{max}) v oblasti 20-ti násobku $\frac{1}{2}$ šířky píku analytu, a limita stanovitelnosti se analogicky vypočte na základě vztahu:

$$y_s = 10 \cdot h_{max} \quad (4.3.12)$$

a limitní koncentrace stanovované látky x_s :

$$x_s = \frac{y_s}{b_h} \quad (4.3.13)$$

kde b_h je směrnice kalibrační přímky sestrojené nikoliv na základě ploch píků, ale jejich výšky.

5. Interpretace výsledků

Koncentrace a zastoupení PAH sorbovaných na povrch listů i v prachových částicích jsou vyhodnocovány odděleně. Celkové množství jednotlivých PAH zachycených jednotkou listové plochy (zpravidla dm^2) je pak vypočteno jako součet obou frakcí. Při hodnocení sorpční kapacity listů je třeba brát v potaz vlastnosti jejich povrchu jako je přítomnost trichomů (chlupů), síla kutikuly (povrchové voskové vrstvy), sezónní přítomnost lepkavých exudátů (např. u lípy v době květu) na povrchu listů apod., které mohou ovlivnit především množství zachycených prachových částic a tím i koncentraci PAH v příslušné frakci.

Při finálním hodnocení je třeba zahrnout i řadu dalších doplňkových údajů jako jsou informace o místě odběru (exponovanost, geografické umístění – viz kap. 3.1), vzdálenost od okraje vozovky, povětrnostní podmínky v době odběru a v dané sezóně či kondice sledovaných dřevin. Tyto údaje umožní dokonalejší interpretaci výsledků v širším kontextu. Do hodnocení je účelné též zahrnout výsledky dlouhodobého monitoringu stavu ovzduší (koncentrace BaP) a modelové zpracování imisních dat prováděné ČHMÚ a to především z lokalit v blízkosti monitorovacích stanic.

6. Odběrové a analytické protokoly

Viz přílohy č. 1, 2 a 3

7. Archivace

Z odběrových míst je nutné archivovat spolu s originálními odběrovými protokoly též plány lokalit a fotodokumentaci pořízenou v rámci sezóny. Stejně tak je nezbytné archivovat (v elektronické podobě) i výstupy (naměřená surová data) z měřících systémů spolu s protokolem dokumentujícím dané podmínky měření a vyhodnocování a kalibračními soubory.

Zpracované vzorky je vhodné archivovat po dobu dvou let od jejich zpracování a to v tmavých vzduchotěsných vialkách nejlépe v mrazáku (-18 °C).

8. Možné komplikace

Na kvalitu naměřených dat mohou mít vliv následující faktory:

- **Kontaminace rostlinnými vosky.** Jedná se především o látky pocházející především z povrchové voskové vrstvy listů (kutikuly), nebo pryskyřičných kanálků. Může se vyskytnout při extrakci některých rostlinných materiálů se silnou kutikulou nebo obsahem pryskyřic (jehličnany). Takovéto vzorky je nutné před měřením pomocí GC/MS ještě důkladně přečistit sloupcovou chromatografií na silikagelu, popříp. na na koloně se sephadexovou náplní (molekulové síto). Při analýze pomocí HPLC běžných koncentrací vzorků nečiní tento typ kontaminací zpravidla větší potíže.
- **Vegetační sezóna.** Může mít vliv zejména při vzájemném porovnávání různých druhů dřevin. Je nutné zohlednit též dobu kvetení a s tím spojené vylučování lepkavých sekretů (lípa), které mohou výrazně ovlivnit zejména frakci PAH v prachových částicích.
- **Povětrnostní podmínky.** Povětrnostní podmínky mohou ovlivnit především množství sorbovaných prachových částic (oplach deštěm, vítr) a tím i množství PAH v této frakci. Je proto třeba, aby odběru předcházelo alespoň několik dní bez srážek. Obsah PAH na povrchu listů není podle údajů v literatuře povětrnostními podmínkami výrazněji ovlivňován.
- **Skladování.** Při skladování může docházet k přeměnám PAH vlivem světla. Proto je třeba jak nezpracovaný výchozí materiál tak i zpracovávané vzorky chránit před světlem.
- **Čistota použitých chemikálií.** Použití kontaminovaných rozpouštědel může v některých případech zkreslit konečné koncentrace PAH ve vzorku.
- **Purifikační kroky.** Při čištění extraktů může docházet k určitým ztrátám PAH ze vzorku, proto je třeba dbát na pečlivé dodržování všech parametrů extrakce (objem, doba, koncentrace, pH roztoků, eluční objemy).

9. Bezpečnost práce

Při odběru vzorků v bezprostřední blízkosti veřejných komunikací je nutné dodržovat pravidla silničního provozu a dbát zvýšené opatrnosti.

Řada PAH patří mezi kancerogenní a vysoce toxické látky, proto je třeba při práci s extrakty (zejména koncentrovanými) a používanými standardy dodržovat pravidla pro nakládání s jedovatými látkami (používat vždy vhodný pracovní oděv a ochranné rukavice, při práci nejíst, nepít, nekouřit). Protože se často jedná o látky těkavé, je nezbytné provádět veškerou manipulaci v laboratorní digestoři v dobře větrané místnosti. Je též nezbytné nutné zajistit skladování vzniklého odpadu ve speciálních a zřetelně označených nádobách. Odpad musí být odborně likvidován v souladu se zákonem o nebezpečných chemických odpadech.

Podobně i používaná rozpouštědla (zejména chlorovaná) patří mezi zdraví škodlivé až nebezpečné těkavé látky, proto pro manipulaci s nimi platí stejná pravidla jako pro nakládání s PAH. Navíc se jedná zpravidla o hořlaviny 1. třídy, proto je nezbytné dodržovat pokyny pro práci s vysoce hořlavými látkami.

10. Závěr

Předkládaná metodika je zaměřena na kvantitativní analýzu a zastoupení nejvýznamnějších polyaromatických uhlovodíků (PAH) z ovzduší sorbovaných na povrchu listů. Metoda je založena na měření obsahu PAH dvěma nezávislými metodami - HPLC s fluorescenční detekcí a GC/MS. Umožňuje kvantitativní porovnání adsorbce sledovaných PAH na listy různých druhů dřevin. Výsledky mohou být následně využity orgány místní samosprávy a státní správy pro monitoring znečištění ovzduší v obytných lokalitách. Kromě toho mohou zjištěné informace o absorpční kapacitě listů různých druhů dřevin posloužit jako vodítko při výběru druhů pro výsadbu ochranné zeleně podél dopravně vytížených komunikací.

Metodika může dále posloužit jako základ pro výzkum mechanismů adsorpce PAH na povrch a do pletiv listů a fyziologických procesů, které mohou být zvýšenou přítomností těchto látek ovlivňovány.

11. Použitá literatura

ČSN 75 7554 (1998) Jakost vod - Stanovení vybraných polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU) - Metoda HPLC s fluorescenčním, a metoda GC s hmotnostním detektorem. Český normalizační institut

Nařízení Komise (ES) č. 208/2005 ze dne 4. února 2005, kterým se mění nařízení (ES) č. 466/2001, pokud jde o polycyklické aromatické uhlovodíky

Nařízení vlády č. 597/2006 Sb. ze dne 12. prosince 2006, o sledování a vyhodnocování kvality ovzduší , příloha 1, část C, odstavec 1

ISO 12884:2000 (2000) - Stanovení sumy (plynná a pevná fáze) polycyklických aromatických uhlovodíků ve vnějším ovzduší - Odběr na filtry a sorbent s analýzou metodou plynové chromatografie/hmotnostní spektrometrie.

Directive 2004/107/EC of the European Parliament and of the Council of 15 December 2004 relating to arsenic, cadmium, mercury, nickel and polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air. (26.1.2005) Official Journal of the European Union, L 23/3

Lim L. H., Harrison R. M., Harrad S. (1999) The contribution of traffic to atmospheric concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons. ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY, 33 (20): 3538-3542

De Nicola F., Maisto G., Prati M. V., Alfani A. (2005) Temporal variations in PAH concentrations in *Quercus ilex* L. (holm oak) leaves in an urban area. CHEMOSPHERE 61 (3): 432-440

Howsam M., Jones K. C., Ineson P. (2001) PAHs associated with the leaves of three deciduous tree species. II: uptake during a growing season. CHEMOSPHERE 44 (2): 155-164

Meloun M., Militký J. (2004) Statistická analýza experimentálních dat. Academia, Praha

ČSN ISO 8466-1 (1993) Česká státní norma, Jakost vod, Kalibrace a hodnocení analytických metod a určení jejich charakteristik. Část 1: Statistické hodnocení lineární kalibrační funkce. Český normalizační institut