

Stanovení 3,4-benzpyrenu ve směsi pomocí fluorescenční spektrografie za teploty —197 °C

J. JÄGER, O. LUGROVÁ

Ústav hygieny, Praha

Na základě fluorescenční spektrografie prováděné za velmi nízkých teplot je možné vykonat analýsy i ve směsi látek. Je vypracován postup stanovení 3,4-benzpyrenu ve směsi s ostatními uhlovodíky a jsou rozebrány vlivy, které mohou stanovení nepříznivě ovlivnit. Přesnost metody byla kontrolována souběžnými spektrofotometrickými analýsami. Relativní chyba nepřesáhla hodnotu 8 %.

Sledování fluorescenčních spekter hraje důležitou úlohu při stanovení vyšších polycyklických aromatických uhlovodíků, které se provádí převážně při analýze látek podezřelých z kancerogenních účinků [1—3]. Nejčastěji stanovovanou látkou, vzhledem k její silné kancerogenní aktivitě a výhodným analytickým vlastnostem, je 3,4-benzpyren.

Pokusy o stanovení jednotlivých polycyklických aromatických uhlovodíků ve směsi na základě jejich intenzivní fluorescence jsou jen ojedinělé [4, 5]. Úplně nové možnosti při analýze těchto uhlovodíků ve směsi se objevily využitím fluorescenčních spekter pořízených za velmi nízkých teplot a za použití vhodného rozpouštědla z řady normálních parafinů. Za těchto podmínek má fluorescenční spektrum vyjimečně ostrý časový charakter, který v řadě případů můžeme přirovnat ke spektru atomového. Princip získávání těchto právem zvaných quasi čarových spekter je následující: Molekuly analyzované látky pronikají do krystalové mřížky rozpouštědla, ve které jsou pevně zabudovány. Tím se excitované molekuly nacházejí ve větších vzdálenostech od sebe, snižuje se jejich silné vzájemné působení a na minimum je sníženo působení okolního prostředí. Jelikož se stanovení provádí za velmi nízké teploty, má každá molekula minimální zásobu vibrační energie.

Tato metoda směsných krystalů byla vypracována a široce použita v laboratoři E. V. Špolského ke zkoumání elektronových a vibračních hladin složitých organických molekul [6—8]. Pokusy o využití tohto způsobu získávání fluorescenčních spekter v analytické chemii jsou doposud jen velice řídké. Během posledních let se v literatuře objevilo několik pokusů o kvantitativní využití quasi čarových fluorescenčních spekter při stanovení 3,4-benzpyrenu [12, 13, 11]. Všechny tyto metody se více méně přidržují známých principů kvantitativních metod emisní atomové analýsy.

Probereme nyní vlastnosti fluorescenčních quasi čarových spekter, které skýtají neobvyklé možnosti při jejich analytickém využití.

Specifičnost

Čarová spektra jsou přísně individuálními vlastnostmi zkoumaných látek. Pokusně bylo zjištěno, že závislost charakteru spekter derivátů 1,2-benzantracenu na poloze a druhu substituentů je značná [9, 10]. Díky čarovému charakteru spektra může být přítomnost určované látky zjištěna ve složitých mnohokomponentních směsích dokonce i v případě, kdy tato látka je přítomna ve směsi jen ve stopách.

Citlivost

Obyčejně při dostatečně vysokém kvantovém výtěžku fluorescence můžeme látku

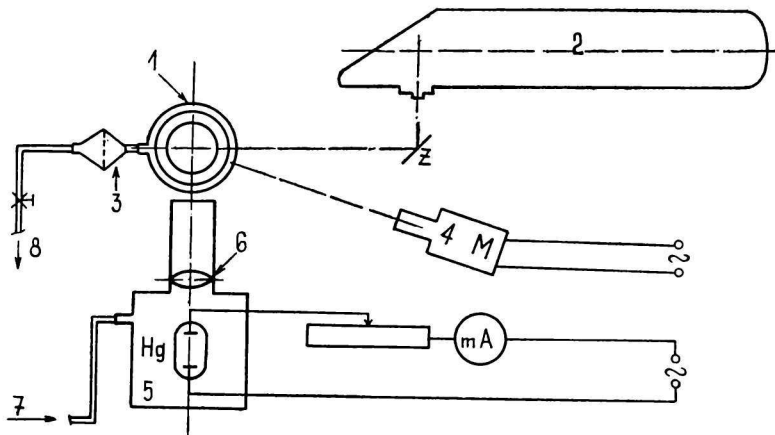
dokázat při koncentraci 10^{-8} až 10^{-9} g/ml. 3,4-Benzpyren dává dokonce ještě jasné maximum $\lambda = 4030 \text{ \AA}$ při koncentraci 10^{-11} g v 1 ml oktanového roztoku [11].

Značně těžké je vypracovat vhodnou kvantitativní analytickou metodu, která by se vypořádala nejen s problémy spojenými s běžnou kvantitativní fluorimetrií, ale navíc ještě se specifickými těžkostmi, vznikajícími nutností zmrazovat vzorky na tak nízké teploty. Základem metody stanovení 3,4-benzpyrenu, kterou jsme vypracovali v naší laboratoři, je standardní přídavek čistého 3,4-benzpyrenu do analysovaného vzorku.

Experimentální část

Benzenový extrakt analysovaného vzorku, získaný obvyklým způsobem, chromatografujeme na tenké vrstvě kysličníku hlinitého [14]. Takto získaná benzpyrenová frakce obsahuje vedle 3,4-benzpyrenu další polycyklické aromatické uhlovodíky, které nelze tímto jednoduchým chromatografickým postupem oddělit [15]. Tato směs se odpaří, zbytek se rozpustí v chromatograficky čistěném *n*-heptanu a roztok se převede do 5 ml odměrky. Z tohoto základního roztoku odebereme tři stejné díly a do každého jednotlivého přidáme 0,03; 0,06 a 0,10 μg 3,4-benzpyrenu pomocí jeho standardního roztoku. Musíme zvolit takové množství základního roztoku, aby výsledné koncentrace 3,4-benzpyrenu, to znamená součet koncentrace přidaného a stanovovaného 3,4-benzpyrenu, nepřesáhly po zředění v 10 ml odměrce hranici 0,15 μg v 1 ml. Podle velikosti a intenzity fluorescence odděleného pásu benzpyrenové frakce odhadneme poměrně snadno již během chromatografování alespoň řádové množství 3,4-benzpyrenu, přítomného v analysovaném vzorku. Dále se při volbě množství základního vzorku řídíme intenzitou fluorescence, kterou vzorek vykazuje při pokojové teplotě, a absorpčním spektrem tohoto roztoku, porizným v oblasti vlnových délek kolem 3650 \AA .

Takto připravené roztoky analyzujeme pomocí fluorescenční spektrografie. Schéma pokusného uspořádání je na obr. 1. Dewarova nádoba je skleněná (obr. 2a) s hliníkovou fólií, která odráží fluorescenční záření na štěrbinu spektrografu. Přední strana je během

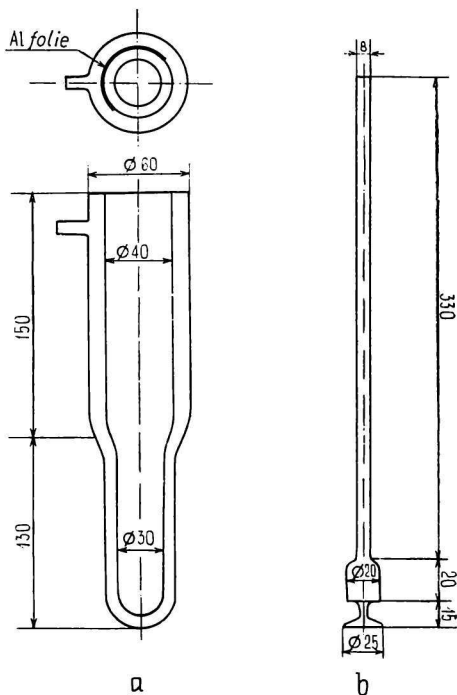


Obr. 1. Schéma pokusného uspořádání.

1. Dewarova nádoba; 2. spektrograf KSA-1; 3. silikagel; 4. zdroj teplého vzduchu;
5. ochranný kryt rtuťové výbojky; 6. kondenzor; 7. přívod chladícího vzduchu;
8. odvod k vodní vývěvě.

Obr. 2.

a) skleněná Dewarova nádoba; b) kyveta na analysovaný roztok.



exponování spekter vystavena proudu teplého vzduchu, aby se zabránilo vymrazování vodní páry ze vzduchu na vnějším plášti nádoby. Odsávání je prováděno vodní vývěvou přes silikagelový uzávěr, který zabraňuje vzniku námrazy uvnitř pláště Dewarovy nádoby. Rtuťová výbojka je v ochranném krytu, chlazená stálým proudem vzduchu. Intenzita proudu je nastavena posuvným reostatem na 1,8 A a kontrolována pomocí mikroampérmetru.

Podmínky fluorescenční spektrografie a pracovní postup

Spektrograf: KSA-1 se skleněnou optikou, na střed desky nastavená vlnová délka 4200 Å.

Štěrbina: 0,2 mm.

Buzení: Rtuťová lampa Philips 57202E/70 s Woodovým filtrem 125 W, intenzita proudu 1,8 A.

Expozice: 15 minut.

Teplota: Spektra jsou snímána při teplotě bodu varu kapalného dusíku.

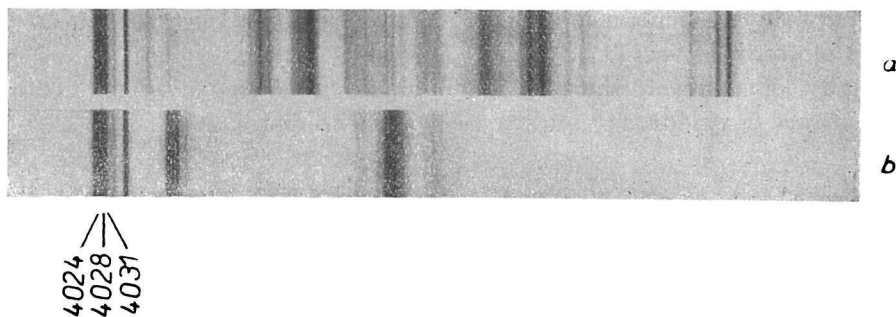
Desky: Foma Super Ortho 9 × 24.

Vývojka: 1 20 Rodinal, vyvolávací doba 7 minut.

Speciální skleněná kyveta (obr. 2b) je naplněna 5 ml analysovaného roztoku a ponořena do Dewarovy nádoby s kapalným dusíkem. Diskovitě upravené dno kyvety zajišťuje její fixaci na dně nádoby, její sklon a pootočení je vždy stejně nastaveno pomocí korkového uzávěru se skleněnou trubičkou, kterou horní konec kyvety prochází. Roztok necháme minimálně 5 minut ponořený v kapalném dusíku, než začneme se snímáním fluorescenčních spekter. Každý roztok exponujeme třikrát a při výměně kyvet s jednotlivými roztoky odstraníme všechen kapalný dusík z Dewarovy nádoby, kterou do sucha vytřeme. Zabráníme tím případnému rozptylu světla na mikrokrystalech vody, které se během doby v kapalném dusíku vytvoří. Po každé 15 minutové expozici doléváme dusík na původní hladinu. Na jednu desku rozměru 9 × 24 exponujeme jeden vzorek, to znamená devět fluorescenčních spekter. Další postup analýzy je obdobný jako při normálním spektrografování. Po celou dobu snímání fluorescenčních spekter jednoho vzorku je ne-

zbytné dodržovat stejné geometrické uspořádání pokusu. Směr a vzdálenost excitačního zdroje a poloha měrné kyvety musí být vždy stejné a reprodukovatelně nastavitelné.

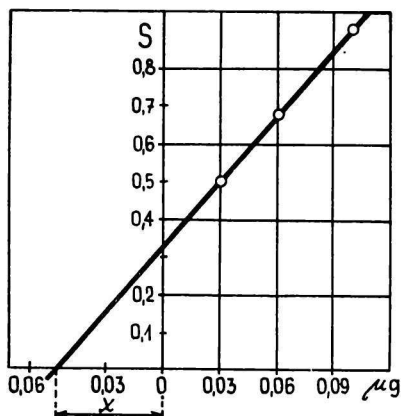
Charakter získaného fluorescenčního spektra 3,4-benzpyrenu vidíme na obr. 3. Při koncentracích, za kterých měření provádíme, obsahuje spektrum pouze několik čar, sdružených do skupin po třech (tripletů).



Obr. 3. Fluorescenční spektra při teplotě -197°C v *n*-heptanu.
a) analyzovaný vzorek; b) čistý 3,4-benzpyren. Vlnové délky udány v Å.

Na Zeissově rychlofotometru (štěrbina 1 mm při 30 násobném zvětšení) proměřujeme zčernání poslední čáry nejintenzivnějšího tripletu o vlnové délce 4031 Å. V této oblasti spektra je pozadí prakticky nulové, takže s ním při měření nemusíme počítat. Délka expozice byla volena tak, že pracujeme stále v přímkové části charakteristické křivky desky (0,3–1,3).

Ze tří naměřených hodnot zčernání pro jeden roztok vypočteme aritmetický průměr, který vyneseme do grafu oproti koncentraci přidaného 3,4-benzpyrenu (obr. 4). Získáme tak tři body, které při správném provedení analýzy leží vždy na přímce. Přímku těmito body proložíme a prodloužíme její dolní konec tak, až protne koncentrační osu. Pak hodnota úsečky x , měřené od průsečíku přímky s osou k počátku souřadnic, udává hodnotu neznámé koncentrace 3,4-benzpyrenu, původně přítomného ve vzorku.



Obr. 4. Závislost zčernání čáry $\lambda = 4031$ na koncentraci přidávaného 3,4-benzpyrenu.

x — absolutní hodnota koncentrace původně přítomného 3,4-benzpyrenu ve vzorku.

Výsledky a diskuse

Uvedená metoda byla prověřována pomocí uměle připravených směsí, které se skládaly z těch uhlovodíků, jejichž přítomnost se dá podle literárních údajů [16] předpokládat v benzpyrenové frakci, získané chromatografováním na tenké vrstvě kysličníku hlinitého. Také jejich poměrná množství byla upravena tak, aby odpovídala jejich zastoupení ve skutečných vzorcích odebraných z motorových sazí [17].

Obsahy jednotlivých uhlovodíků ve směsi *I* a *II* jsou uvedeny v tab. 1. Koncentrace je vyjádřena v μg v 1 ml konečného roztoku.

Tabulka 1
Obsah uhlovodíků v umělé směsi *I* a *II*

Uhlovodík	Směs <i>I</i> (μg)	Směs <i>II</i> (μg)
anthantren	0,015	0,012
perlyen	0,010	0,008
1,2-benzpyren	0,04	0,032
1,12-benzperlyen	0,20	0,16
11,12-benzfluoranthén	0,04	0,032

3,4-Benzpyrenu bylo přidáno tolik, aby jeho konečné množství v 1 ml směsi bylo 0,04; 0,05 a 0,06 μg .

Výsledky měření jsou shrnuty v tab. 2.

Tabulka 2
Výsledky stanovení 3,4-benzpyrenu v uměle připravených směsích

Směs <i>I</i>			Směs <i>II</i>		
přidáný 3,4-benzpyren (μg)	nalezený 3,4-benzpyren (μg)	relativní chyba (%)	přidáný 3,4-benzpyren (μg)	nalezený 3,4-benzpyren (μg)	relativní chyba (%)
0,05	0,045	—10	0,04	0,037	—8
0,06	0,054	—10	0,05	0,046	—8
			0,06	0,056	—7

Popsanou metodou byly analysovány vzorky pevných částic odebraných z výfukových plynů motorového vozidla Škoda 1201 a Škoda 440 za různých provozních podmínek. Pro porovnání správnosti výsledků byl současně stanoven 3,4-benzpyren pomocí klasické spektrofotometrické metody. Výsledky jsou uvedeny v μg na 1 g pevných částic (tab. 3).

Tabulka 3

Výsledky stanovení 3,4-benzpyrenu absorpční a fluorescenční metodou ve vzorcích výfukových plynů

Absorpční metoda (μg)	Fluorescenční metoda (μg)	Relativní chyba (%)
228	220	—3,5
86	79	—8,0
32	31	—3,1
134	130	—3,0
164	155	—5,5
176	165	—6,3

Podle výsledků je zřejmé, že chyba stanovení je značně ovlivněna obsahem ostatních složek v analysovaném roztoku a je vždy záporná. Tento nepříznivý vliv vedlejších organických látek v excitovaném roztoku omezíme na minimum, analyzujeme-li vzorky s dostatečně nízkými koncentracemi. Při měření ve směsi II a při analýze vzorků výfukových plynů nepřesáhla nikdy absorpce konečného roztoku, měřená při $\lambda = 3650 \text{ \AA}$, hodnotu 0,017 na 1 cm tloušťky roztoku. Je-li dodržena tato hodnota jako kritérium konečné koncentrace všech látek v měřeném roztoku, nepřesáhne chyba stanovení 8 %. Ve všech případech analýsy přírodních vzorků bylo toto koncentrační kritérium automaticky splněno, byl-li roztok zředěn tak, aby koncentrace 3,4-benzpyrenu byla v mezích předepsaných metodou, tj. nepřesáhla 0,15 μg v 1 ml konečného roztoku.

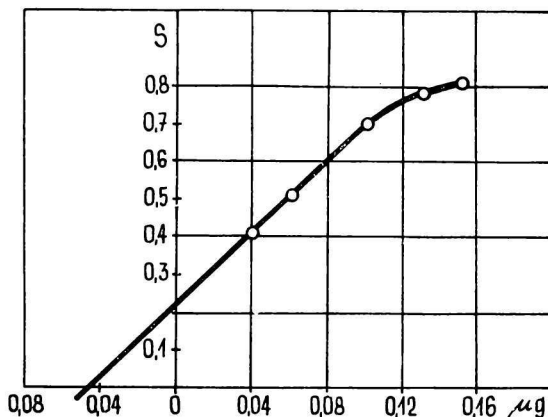
Rozbor zdrojů chyb, které se mohou vyskytnout při fluorescenční spektrografii za nízkých teplot

Kromě obvyklých chyb, vyskytujících se při běžné kvantitativní emisní spektrografii pracující s fotografickou deskou (nestejnorodost emulze, obměna při vyvolávání, chyby při fotometrickém proměřování zčernání, chyby v určení koncentrace při odečítání z grafu), mohou se vyskytnout při fluorescenční spektrografii za nízkých teplot další specifické chyby:

1. Koncentrační chyba

Tato chyba vzniká překročením koncentračního prahu, kdy intenzita fluorescence přestává být lineárně závislá na koncentraci stanovované látky. Koncentrace stanovované látky i látek vedlejších, s kterými je ve směsi, nesmí překročit experimentálně zjištěnou mez, jednak aby nemohlo dojít ke koncentračnímu zhasnutí látkou samotnou, jednak aby byl vliv příměsí na fluorescenci analysované látky snížen na minimum. Na obr. 5 je uveden průběh křivky, znázorňující závislost zčernání proměřované čáry 3,4-benzpyrenu na koncen-

Obr. 5. Závislost zčernání čáry $\lambda = 4031$ na koncentraci přidávaného 3,4-benzpyrenu.

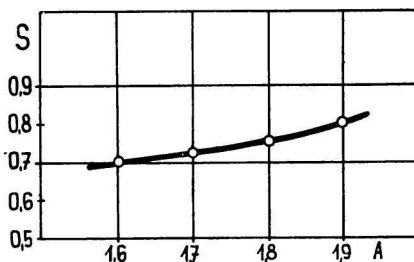


traci 3,4-benzpyrenu přidávaného do jednotlivých dílů vzorku. Základní stanovované množství 3,4-benzpyrenu v umělé směsi bylo $0,05 \mu\text{g/ml}$. Vidíme, že při překročení celkové koncentrace přítomného 3,4-benzpyrenu $0,15 \mu\text{g}$ v 1 ml konečného roztoku dochází k odklonu od přímky.

2. Chyba buzení

Tato chyba se zaneše do měření, nedodržíme-li konstantní hodnotu intenzity proudu na zdroji ultrafialového záření. Podle našich vlastních zkušeností dosáhneme dostatečné přesnosti, udržujeme-li intenzitu proudu pomocí posuvného reostatu v mezích $\pm 0,02 \text{ A}$ (obr. 6). Jak bylo již uvedeno, musí být po

Obr. 6. Závislost zčernání čáry $\lambda = 4031$ na intenzitě budícího proudu.



celou dobu zpracovávání jednoho vzorku (expozice 9 spekter) nezbytně zachováno geometrické uspořádání pokusu.

3. Chyba zmrazování

Při různé rychlosti zmrazování měřených roztoků můžeme do analýsy vnést závažné chyby. Podle literárních údajů [18] i podle našich vlastních měření závisí intenzita jednotlivých čar ve fluorescenčním spektru značně na způsobu zmrazování. Dostatečné reprodukovatelnosti ve způsobu ponořování květy s roztokem dosáhneme tehdy, když květu do kapalného dusíku v Dewarově

nádobě nevnořujeme, ale necháme vždy volně klesat ke dnu jen její vlastní váhou.

4. Chyba rozpouštědla

Rozdělení intenzity zčernání mezi jednotlivé čáry multipletu je závislé na povaze a čistotě používaného rozpouštědla. Je proto nezbytně nutné používaný *n*-heptan čistit nejen destilací, ale také chromatograficky, přeléváním přes sloupec kysličníku hlinitého a silikagelu.

Všechny tyto chyby, kterých se můžeme lehce vyvarovat pečlivým dodržováním pracovního předpisu, jsou mnohonásobně vyváženy přednostmi, které skýtá metoda fluorescenční spektrografie za velmi nízkých teplot s *n*-parafiny jako rozpouštědlem. Nebudeme zde již opakovat výhody této metody, které byly uvedeny v úvodu naší práce, ať je to již citlivost, specifická nebo selektivnost. Chceme jenom zdůraznit, že díky všem těmto vlastnostem je možno přistoupit ke kvantitativní analýze látek ve směsi, která pomocí fluorescenčních měření za pokojové teploty je nemožná, nebo je proveditelná jen ve velmi omezené míře.

V současné době není ještě možné určit hranice použitelnosti quasi čarových fluorescenčních spekter jak pro analytické tak pro fyzikální účely, neboť po této stránce je prozkoumáno jen nepatrné množství látek a metodika práce se doposud vyvíjí.

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ 3,4-БЕНЗПИРЕНА В СМЕСИ С ПОМОЩЬЮ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОГРАФИИ ПРИ ТЕМПЕРАТУРЕ —197°

И. Егер, О. Лугрова

Институт гигиены, Прага

В работе приведена разработка метода количественного определения 3,4-бензпирена в неочищенных бензпиреновых фракциях, полученных простой хроматографией природных образцов в тонком слое окиси алюминия. Для анализа используется флюоресцентная спектрография, которая проводилась при температуре жидкого азота с применением *n*-гептана в виде растворителя. Эти условия разрешают количественно определить 3,4-бензпирен также в присутствии остальных углеводов. Принцип метода состоит в стандартной добавке чистото 3,4-бензпирена до трех частей анализированного образца.

Приведены результаты определения в искусственных смесях, а также в образцах твердых частиц выхлопных газов автомашин. Относительная ошибка метода не превышает 8 %. Дискутируются преимущества этого способа анализа, а также возможные специфические ошибки, которые могут возникать при применении описанного метода.

Preložil M. Fedoroňko

QUANTITATIVE BESTIMMUNG DES 3,4-BENZOPYRENS IN EINEM
GEMISCH DURCH DIE FLUORESZENSSPEKTROGRAPHIE BEI
DER TEMPERATUR VON -197°C

J. Jäger, O. Lugrová

Institut für Hygiene, Praha

In der vorliegenden Arbeit wird eine ausgearbeitete quantitative Methode angeführt, die zur Bestimmung von 3,4-Benzpyren in ungereinigten Benzpyrenfraktionen, die durch eine einfache Chromatographie von Naturproben auf einer Aluminiumoxid-Dünnschicht erhalten wurden, dient. Für diese Analyse wird die Fluoreszenzspektrographie benutzt, die bei der Temperatur des flüssigen Stickstoffs mit dem Lösungsmittel *n*-Heptan durchgeführt wird. Diese Bedingungen erlauben es, 3,4-Benzpyren auch in einem Gemisch der übrigen Kohlenwasserstoffe quantitativ zu bestimmen. Das Prinzip dieser Methode beruht in einer Standardzugabe von reinem 3,4-Benzpyren in 3 Teile der zu analysierenden Probe.

Es werden die Ergebnisse der Bestimmungen einerseits in künstlichen Gemischen und andererseits in Proben fester Teilchen der Auspuffgase von Motorfahrzeugen angeführt. Der relative Fehler dieser Methode überschreitet nicht den Wert von 8 %. Es werden der Vorteil dieses Analysenverfahrens und die möglichen spezifischen Fehler, die bei der Applikation der beschriebenen Methode auftreten können, diskutiert.

Preložil K. Ullrich

LITERATURA

1. Sawicki E., *Chemist-Analyst* **53**, 24 (1964).
2. Sawicki E., Elbert W. C., Stanley T. W., Hauser T. R., Fox F. T., *Int. J. Air Poll.* **2**, 273 (1960).
3. Dikun P. P., *Vopr. onkol.* **5**, 24 (1955).
4. Sawicki E., Hauser T. R., Stanley T. W., *Int. J. Air Poll.* **2**, 253 (1960).
5. Monkman J. L., Moore G. E., Katz M., *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **23**, 487 (1962).
6. Špolskij E. V., Klimova L. A., *Izv. Akad. nauk SSSR, ser. fiz.* **18**, 673 (1954).
7. Špolskij E. V., Klimova L. A., *Opt. spektr.* **7**, 852 (1959).
8. Špolskij E. V., Klimova L. A., *Opt. spektr.* **13**, 174 (1962).
9. Dikun P. P., *Vopr. onkol.* **7**, 64 (1961).
10. Dikun P. P., *Vopr. onkol.* **6**, 75 (1960).
11. Muel B., Lacroix G., *Bull. Soc. chim. France* **1960**, 2139.
12. Dikun P. P., *Vopr. onkol.* **7**, 42 (1961).
13. Personov R. I., *Ž. anal. chim.* **17**, 506 (1962).
14. Jäger J., Lugrová O., *Čs. hygiena* (v tisku).
15. Sawicki E., Stanley T. W., Elbert W. C., Pfaff J. D., *Anal. Chem.* **36**, 497 (1964).
16. Sawicki E., Stanley T. W., Pfaff J. D., *Chemist-Analyst* **53**, 6 (1964).
17. Sawicki E., Hauser T. R., Elbert W. C., Fox F. T., Mecker J. E., *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **23**, 137 (1962).
18. Špolskij E. V., Personov R. I., *Zavodskaja lab.* **28**, 428 (1962).

Do redakcie došlo 3. 2. 1965

V revidovanej podobe 28. 5. 1965

Adresa autorů:

Inž. Jiří Jäger, inž. Olga Lugrová, Ústav hygieny, Praha 10, Šrobárova 48.