



You have downloaded a document from
RE-BUŚ
repository of the University of Silesia in Katowice

Title: Badania nad oznaczaniem nitrowych pochodnych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w powietrzu

Author: Marzena Zaciera

Citation style: Zaciera Marzena. (2007). Badania nad oznaczaniem nitrowych pochodnych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w powietrzu. Praca doktorska. Katowice : Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.



Marzena ZACIERA

**Badania nad oznaczaniem nitrowych pochodnych
wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych
w powietrzu**

Praca wykonana w Zakładzie Szkodliwości Chemicznych
Instytutu Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego
w Sosnowcu i przedstawiona Radzie Naukowej Instytutu
Chimii Uniwersytetu Śląskiego jako rozprawa doktorska

Promotor pracy: dr hab. inż. Wojciech Mniszek, prof. IMPiZŚ

*Praca naukowa finansowana ze środków na naukę w latach 2005-2007
jako projekt badawczy nr 2 P05D 03629*

Katowice, 2007

Wolny dostęp



D7BG 2743

Składam serdeczne podziękowania:

*Promotorowi pracy Panu prof. Wojciechowi Mniszkowi
za ukierunkowanie niniejszej pracy oraz cenne wskazówki,*

*Pracownikom Zakładu Szkodliwości Chemicznych
za pomoc i okazaną życzliwość,
a w szczególności Pani Lidii Dzwonek
za pomoc w analizach GC/MS,*

oraz Rodzinie za wsparcie

Pracę niniejszą dedykuję Tacie

SPIS TREŚCI

WYKAZ SKRÓTÓW.....	5
I. WPROWADZENIE.....	6
II. CEL PRACY.....	7
III. CZĘŚĆ TEORETYCZNA.....	7
III.1. WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE NITRO-WWA.....	7
III.2. POWSTAWANIE NITRO-WWA.....	9
III.3. WŁAŚCIWOŚCI TOKSYCZNE NITRO-WWA.....	12
III.3.1. Oddziaływanie na zwierzęta.....	15
III.3.2. Oddziaływanie na człowieka.....	17
III.4. ŹRÓDŁA NARAŻENIA NA NITRO-WWA.....	18
III.4.1. Powstawanie nitro-WWA w procesach spalania.....	18
III.4.2. Produkcja nitro-WWA na skalę przemysłową.....	20
III.5. PRZEMIANY NITRO-WWA ORAZ ICH MIGRACJA W RÓŻNYCH ELEMENTACH ŚRODOWISKA.....	20
III.6. METODY OZNACZANIA WYBRANYCH NITRO-WWA W POWIETRZU.....	23
IV. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	30
IV.1. WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE I TOKSYKOLOGICZNE WYBRANYCH DO ANALIZ NITRO-WWA.....	30
IV.1.1. Rozpuszczalność nitro-WWA.....	31
IV.2. APARATURA I ODCZYNNIKI.....	32
IV.2.1. Aparatura i drobny sprzęt laboratoryjny.....	32
IV.2.2. Materiały i odczynniki.....	33
IV.3. PRZYGOTOWANIE ROZTWORÓW WZORCOWYCH.....	34
IV.3.1. Przygotowanie roztworów wzorcowych mononitrowych pochodnych WWA.....	34
IV.3.1.1. Roztwór wzorcowy podstawowy poszczególnych mononitro-WWA.....	34
IV.3.1.2. Roztwór wzorcowy pośredni mieszaniny mononitro- WWA.....	34
IV.3.1.3. Roztwory wzorcowe robocze mieszaniny mononitro- WWA.....	34
IV.3.2. Przygotowanie roztworów wzorcowych dinitrowych pochodnych WWA.....	35
IV.3.2.1. Roztwór wzorcowy podstawowy poszczególnych dinitro WWA.....	35
IV.3.2.2. Roztwór wzorcowy pośredni mieszaniny dinitro-WWA.....	35
IV.3.2.3. Roztwory wzorcowe robocze mieszaniny dinitro-WWA.....	35
IV.4. METODYKA POBIERANIA PRÓBEK POWIETRZA.....	36
IV.5. PRZYGOTOWANIE PRÓBEK DO ANALIZY CHROMATOGRAFICZNEJ...37	
IV.5.1. Ekstrakcja.....	37
IV.5.2. Frakcjonowanie.....	38

IV.6. OZNACZANIE WWA I NITRO-WWA.....	38
IV.6.1. Oznaczanie WWA techniką chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną.....	38
IV.6.2. Oznaczanie nitro-wwa techniką chromatografii gazowej z detekcją mas.....	39
IV.7. PRZYGOTOWANIE KRZYWEJ KALIBRACYJNEJ.....	43
IV.7.1. Analiza ślepych próbek.....	44
IV.8. SPRAWDZENIE POPRAWNOŚCI OPRACOWANEJ METODY FRAKCJONOWANIA.....	45
IV.9. SCHEMAT BLOKOWY OPRACOWANEJ METODY OZNACZANIA NITRO-WWA.....	46
IV.10. TESTY MUTAGENNOŚCI WYBRANYCH PRÓBEK.....	47
IV.11. ELEMENTY WALIDACJI METODY OZNACZANIA NITROWYCH POCHODNYCH WWA.....	48
IV.11.1. Liniowość, czułość oraz zakres pomiarowy	48
IV.11.2. Precyzja	52
IV.11.3. Granica wykrywalności i granica oznaczalności	56
IV.11.4. Odzysk.....	58
IV.11.5. Selektowność metody	59
IV.11.6. Dokładność.....	61
IV.11.6.1. Dokładność oznaczania techniką GC/MS.....	61
IV.11.6.1.1. Porównanie wartości wyniku z wartością odniesienia przy zastosowaniu testu t-Studenta.....	62
IV.11.6.1.2. Porównanie wartości wyniku z wartością odniesienia z uwzględnieniem niepewności.....	63
IV.11.6.2. Dokładność metody oznaczania nitro-WWA	63
IV.11.6.2.1. Porównanie wartości wyniku z wartością odniesienia przy zastosowaniu testu t-Studenta.....	65
IV.11.6.2.2. Porównanie wartości wyniku z wartością odniesienia z uwzględnieniem niepewności.....	66
IV.12. BADANIE STĘŻEŃ WWA I NITRO-WWA W POWIERZU.....	68
IV.12.1. Strategia pobierania próbek.....	68
IV.12.2. Wyniki badań.....	69
IV.12.2.1. Wyniki oznaczeń.....	69
IV.12.2.2. Efekt mutageny frakcji II i III.....	77
IV.12.3. Omówienie wyników.....	78
V. PODSUMOWANIE.....	82
VI. WNIOSKI.....	84
VII. PIŚMIENNICTWO.....	85
ZAŁĄCZNIK 1 Certyfikat materiału odniesienia SRM 1587	
ZAŁĄCZNIK 2 Certyfikat materiału odniesienia SRM 1975	

WYKAZ SKRÓTÓW

WWA	wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne
nitro-WWA	nitrowe pochodne wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych
GC/MS	technika chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas
EI	jonizacja elektronami
NICI	jonizacja chemiczna jonów ujemnych
SIM	monitorowanie wybranych jonów
HPLC	technika wysokosprawnej chromatografii cieczowej
LC	technika chromatografii cieczowej
GC	technika chromatografii gazowej
ECD	detektor wychwytu elektronów
FID	detektor płomieniowo-jonizacyjnym
UV	detektor fotometryczny absorpcji w nadfiolecie
SFE	technika ekstrakcji w stanie nadkrytycznym
SPE	technika ekstrakcji do fazy stałej
TLC	technika chromatografii cienkowarstwowej
IARC	Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia
Dz.U.	Dziennik Ustaw
<i>in vitro</i>	badanie procesów biologicznych w warunkach doświadczalnych
<i>in vivo</i>	badanie procesów biologicznych w żywym organizmie
SRM	Certyfikowany Materiał Odniesienia
DCM	dichlorometan
MeOH	metanol
CY	cykloheksan
DMSO	dimetylosulfotlenek
POCH	Polskie Odczynniki Chemiczne
LOQ	granica oznaczalności
LOD	granica wykrywalności
u.j.p.	umowna jednostka powierzchni
RSD	względne odchylenie standardowe
CV	współczynnik zmienności
NIST	National Institute of Standards and Technology
Ace+F	acenaften + fluoren
Fen	fenantren
A	antracen
Flu	fluoranten
B[a]A	benzo[a]antracen
Chr	chryzen
B[b+k]F	benzo[b+k]fluoranten
B[a]P	benzo[a]piren
D[a,h]A	dibenzo[a,h]antracen
B[g,h,i]P	benzo[g,h,i]perylen
I[1,2,3-cd]P	indeno[1,2,3-cd]piren
1-NN	1-nitronaftalen
2-NF	2-nitrofluoren
9-NA	9-nitroantracen
3-NFa	3-nitrofluoranten
1-NP	1-nitropiren
1,3-diNP	1,3-dinitropiren

I. WPROWADZENIE

Nitrowe pochodne wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (nitro-WWA) są bezpośrednimi lub pośrednimi produktami niepełnego spalania m.in. paliw w silnikach samochodowych. Związki te powstają najczęściej w wyniku reakcji w fazie gazowej wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) z tlenkami azotu, a następnie są bardzo szybko adsorbowane na cząstkach stałych. Reakcje te są inicjowane rodnikami azotanowymi lub rodnikami hydroksylowymi w obecności światła. Nitro-WWA współwystępują w środowisku w mieszaninach z wielopierścieniowymi węglowodorami aromatycznymi oraz setkami innych związków organicznych. Szacuje się, że WWA oraz ich pochodne są w głównej mierze odpowiedzialne za aktywność mutagenną powietrza atmosferycznego. Niektóre nitro-WWA charakteryzują się wyższą mutagennością i kancerogennością w porównaniu do ich niepodstawionych odpowiedników WWA. W związku z tym aktywność mutagenna frakcji zawierających nitro-WWA, nawet w dużo niższych stężeniach w porównaniu do WWA, jest zdecydowanie wyższa. Związki te są trwałe w środowisku i mogą być przenoszone na duże odległości od źródła ich powstawania, jak również mogą współwystępować w różnych elementach środowiska. Istnieje zatem uzasadniona konieczność badania stężeń tych związków w źródłach pierwotnych, jak również obserwacja przemian i migracji tych zanieczyszczeń w środowisku atmosferycznym. Stężenia nitro-WWA kształtują się na poziomie pg/m^3 w powietrzu atmosferycznym oraz ng/g pyłu w przypadku cząstek emitowanych ze spalinami z silnika Diesla. Oznaczanie stężeń tych związków w środowisku, w którym występują one w śladowych ilościach, stanowi wyzwanie dla analityki chemicznej. Istnieje wiele metod oznaczania nitro-WWA w powietrzu głównie opartych na przekształcaniu nitro-WWA w ich aminowe lub fluorkowe pochodne, natomiast metody oznaczania nitro-WWA w ich pierwotnej postaci zwykle wymagają zastosowania kosztownych technik ekstrakcji, frakcjonowania (np. SFE, HPLC) i oznaczania (np. GC/MS-NICI).

Powodem mojego zainteresowania nitrowymi pochodnymi WWA były kilkuletnie badania nad szkodliwościami spalin z silników Diesla ukierunkowane na poszukiwania głównych kancerogenów spalin. W wyniku tych badań rozpoczęto studia literaturowe oraz podjęto wyzwanie opracowania, alternatywnej do już istniejących, metody oznaczania nitro-WWA.

II. CEL PRACY

Celem badań było opracowanie metody oznaczania nitrowych pochodnych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (nitro-WWA) w powietrzu atmosferycznym. Opracowanie metody polegało na dobraniu takich parametrów pobierania próbek pyłu z powietrza, ekstrakcji związków organicznych z pyłu, frakcjonowania ekstraktu na poszczególne grupy związków i oznaczania nitro-WWA, aby metoda oznaczania była specyficzna i przydatna do oznaczeń niskich stężeń tych związków w powietrzu.

Przydatność opracowanej metody sprawdzono oznaczając stężenia WWA i nitro-WWA w próbkach pyłu zawieszonego w powietrzu pobranych w środowisku miejskim oraz pozamiejskim. Dodatkowo zbadano efekt mutagenny frakcji ekstraktu zawierającej WWA i nitro-WWA.

III. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

III.1. WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE NITRO-WWA

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, nitrowe pochodne WWA oraz inne wielopierścieniowe związki aromatyczne są głównie zaadsorbowane na cząstkach stałych, a w mniejszej części występują w formie gazowej. Jest to uzależnione głównie od prężności par WWA będących w fazie ciekłej oraz temperatury w jakiej zachodzą reakcje. Związki organiczne, których prężność par jest większa od $1,33 \cdot 10^{-4}$ Pa w temperaturze otoczenia, występują w atmosferze (co najmniej częściowo) w fazie gazowej [1]. Dwupierścieniowe nitro-WWA występują głównie w fazie gazowej, pozostałe występują w fazie gazowej oraz zaadsorbowane na cząstkach stałych. Przykładowo czteropierścieniowe WWA fluoranten i piren są obecne głównie w fazie gazowej, natomiast nitrofluoranteny i nitropireny ze względu na niską prężność par występują w atmosferze wyłącznie będąc zaadsorbowane na cząstkach stałych [2, 3, 4]. I tak np.: 1-nitronaftalen występuje głównie w fazie gazowej [3], 2-nitrofluoren występuje zarówno w fazie gazowej jak i zaadsorbowany na cząstkach stałych, podczas gdy 1-nitropiren występuje jedynie w fazie stałej [2].

W temperaturze otoczenia nitro-WWA są ciałami stałymi o zabarwieniu żółtym do pomarańczowego [2]. Wykazują one zdolność do sublimacji.

Nitro-WWA są nierozpuszczalne lub trudno rozpuszczalne w wodzie, natomiast są dobrze rozpuszczalne w rozpuszczalnikach organicznych takich jak aceton, benzen, dimetylosulfotlenek i dichlorometan [2].

Właściwości fizykochemiczne nitrowych pochodnych WWA przedstawia tabela 1.

Tabela 1. Właściwości fizykochemiczne niektórych nitro-WWA [2, 5, 6, 7]

Nazwa związku	Numer CAS	Masa cząst.	Temp. topnienia [°C]	Temp. wrzenia [°C] przy 101,3 kPa	Prężność pary (Pa w 25 °C)	Rozp. w wodzie w 25 °C [mg/l]	Współ. podziału oktanol/woda $pK_{o/w}$
Dwa pierścienie w cząsteczce							
1-nitronaftalen	86-57-17	173,17	56,5	312	$3,2 \times 10^{-2}$	9,18	3,19
2-nitronaftalen	581-89-5	173,17	76	304	$3,2 \times 10^{-2}$	9,24	3,24
Trzy pierścienie w cząsteczce							
1-nitrofluoren	22250-99-3	211,22	-	326	$9,7 \times 10^{-5}$	0,28	-
2-nitrofluoren	607-57-8	211,22	158	326	$9,7 \times 10^{-5}$	0,16	3,37
3-nitrofluoren	5397-37-5	211,22	105-106	326	$9,7 \times 10^{-5}$	0,28	-
2-nitroantracen	3586-69-4	223,23	172	-	-	-	4,23
9-nitroantracen	602-60-8	223,23	146	ok. 275	-	-	4,50
2-nitrofenantren	17024-18-9	223,23	119-120	-	-	-	4,23
Cztery pierścienie w cząsteczce							
2-nitrofluoranten	13177-29-2	247,25	-	420	$9,9 \times 10^{-7}$	0,019	-
3-nitrofluoranten	892-21-7	247,25	166	-	-	-	4,69
7-nitrofluoranten	13177-31-6	247,25	144-145	420	$9,9 \times 10^{-7}$	0,017	4,69
8-nitrofluoranten	13177-32-7	247,25	158-164	420	$9,9 \times 10^{-7}$	0,017	4,69
1-nitropiren	5522-43-0	247,25	153	472	$4,4 \times 10^{-6}$	0,017	4,69
2-nitropiren	789-07-1	247,25	197-199	472	$4,4 \times 10^{-6}$	0,021	-
4-nitropiren	57835-92-4	247,25	190-192	472	$4,4 \times 10^{-6}$	0,017	-
1,3-dinitropiren	75321-20-9	292,25	295-297	-	-	-	4,44
1,6-dinitropiren	42397-64-8	292,25	309-310	-	-	-	4,44
1,8-dinitropiren	42397-65-9	292,25	299-300	-	-	-	4,44
6-nitrochryzen	7496-02-8	273,29	208	-	-	-	5,41
Pięć pierścieni w cząsteczce							
6-nitrobenzo (a)piren	63041-90-7	297,31	260	567	-	-	5,87
3-nitroperylen	20589-63-3	297,31	209	-	-	-	6,34

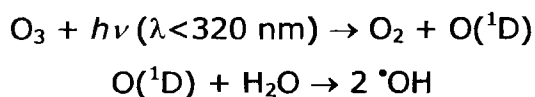
III.2. POWSTAWANIE NITRO-WWA

Jak opisano w poprzednim rozdziale, WWA oraz nitro-WWA mogą występować w fazie gazowej lub być zaadsorbowane na cząstkach stałych w zależności od ich prężności pary oraz warunków zewnętrznych. Istnieją również zasadnicze różnice w stężeniach nitro-WWA w powietrzu w zależności od pory dnia – noc czy dzień - w różnych warunkach atmosferycznych [2, 8]. Zatem powstawanie nitro-WWA w powietrzu jest procesem złożonym, uzależnionym od wielu czynników.

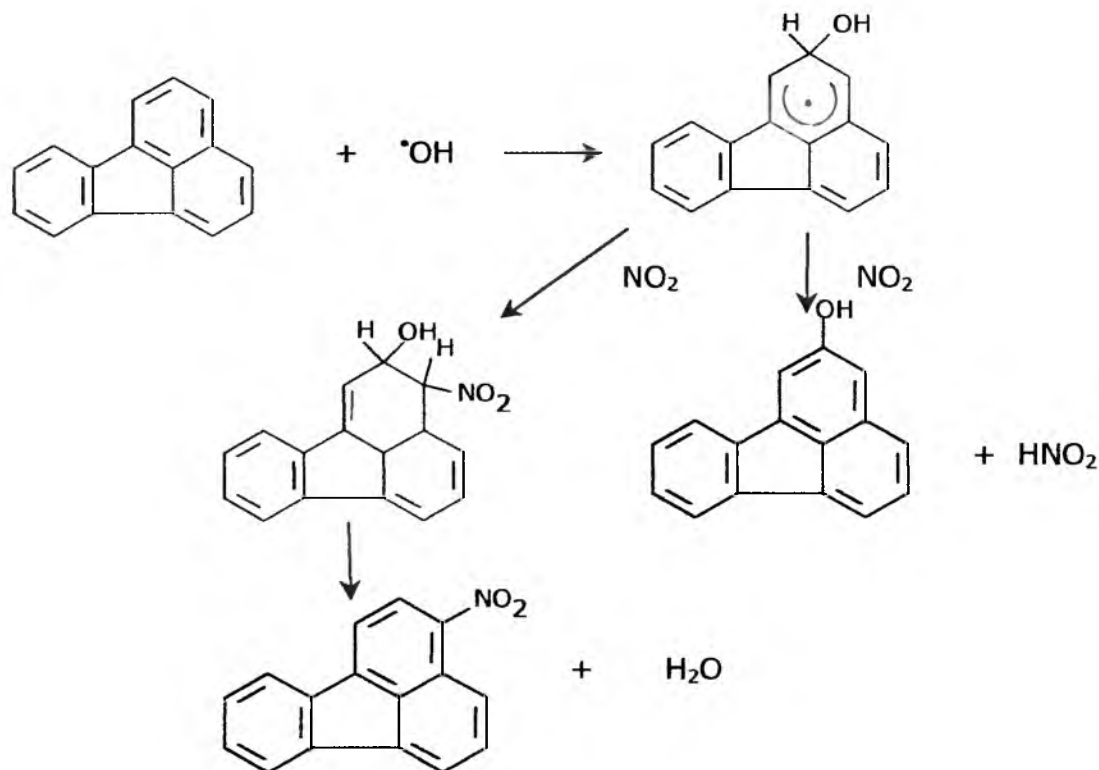
Nitro-WWA, takie jak 1-nitropiren i 3-nitrofluoranten, powstają w reakcjach elektrofilowych w obecności NO_2 w strumieniu gazów spalinowych, ale przed rozległym rozcieńczeniem w powietrzu po emisji. Natomiast powstawanie 2-nitrofluorantenu i 2-nitropirenu obejmuje reakcje WWA z rodnikami $\cdot\text{OH}$ lub $\cdot\text{NO}_3$ w fazie gazowej i są one natychmiast adsorbowane na cząstkach stałych i nie są wykrywane w fazie gazowej [4, 9]. Wytłumaczeniem różnic w procesie powstawania izomerów nitro-WWA pomiędzy reakcją inicjowaną rodnikiem a nitrowaniem elektrofilowym jest takie [10], że rodnik $\cdot\text{OH}$ lub $\cdot\text{NO}_3$ atakuje pierścienie aromatyczne w miejscu największej gęstości elektronowej cząsteczki WWA (pierwsza pozycja dla pirenu i trzecia dla fluorantenu) po czym następuje przyłączenie NO_2 do $\cdot\text{OH}$ -WWA lub $\cdot\text{NO}_3$ -WWA w pozycji orto, uwolnienie cząsteczki wody lub kwasu azotowego i powstanie nitro-WWA [4]. Dotychczasowe badania (referencje w Atkinson 1994) dowodzą, że nitro-WWA obecne w powietrzu atmosferycznym powstają wyłącznie w reakcjach z dwu do czteropierścieniowymi WWA w fazie gazowej w dwojaki sposób:

- ***inicjowane rodnikiem hydroksylowym w obecności światła, a więc w ciągu dnia***

Rodnik hydroksylowy powstaje w wyniku dysocjacji fotochemicznej cząsteczek ozonu, którego w niezanieczyszczonej troposferze jest 7×10^{11} cząsteczek/ cm^3 . Zachodzą wówczas reakcje [1]:

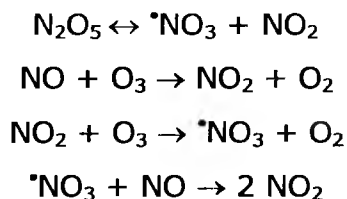


Rodnik hydroksylowy reaguje z lotnymi WWA i w obecności ditlenku azotu prowadzi do powstawania nitro-WWA [1]. Podstawnik hydroksylowy jest silnie aktywujący i wywiera wpływ kierujący na czynnik elektrofilowy w pozycję *orto* i *para* [11]. Postulowany mechanizm reakcji rodnika hydroksylowego z WWA na przykładzie fluorantenu w obecności tlenków azotu jest następujący [1]:

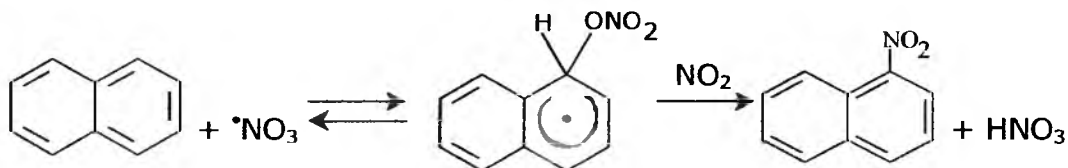


– **inicjowane rodnikiem azotanowym w porze nocnej**

Tego typu reakcja jest charakterystyczna dla naftalenu oraz jego alkilowych pochodnych. Rodnik azotanowy powstaje w wyniku termicznego rozkładu pięciotlenku azotu lub powstaje w reakcji ditlenku azotu z ozonem [1]:



Reakcja naftalenu z mieszaniną: $N_2O_5 - NO_2 - \cdot NO_3$ w powietrzu prowadzi do podstawienia rodnika azotanowego do pierścienia aromatycznego:



Zestawienie niektórych pochodnych nitro-WWA ze wskazaniem typu inicjacji reakcji pod wpływem jakich powstały oraz wydajnościami tych reakcji zawiera tabela 2.

Tabela 2. Powstawanie nitro-WWA w reakcjach WWA z rodnikiem hydroksylowym i rodnikiem azotanowym (w obecności ditlenku azotu) oraz wydajność reakcji [1]

WWA	Nitro-WWA powstałe w wyniku reakcji inicjowanej			
	Rodnikiem hydroksylowym	Wydajność reakcji	Rodnikiem azotanowym	Wydajność reakcji
Naftalen	1-nitronaftalen	0,3 %	1-nitronaftalen	17 %
	2-nitronaftalen	0,3 %	2-nitronaftalen	7 %
Acenaften	5-nitroacenaften	$\Sigma \sim 0,2$ %	4-nitroacenaften	40 %
	3-nitroacenaften		3-nitroacenaften	~ 2 %
	4-nitroacenaften	2 %	5-nitroacenaften	$\sim 1,5$ %
Fluoren	3-nitrofluoren	$\sim 1,4$ %	Nie powstają	
	1-nitrofluoren	$\sim 0,6$ %		
	4-nitrofluoren	$\sim 0,3$ %		
	2-nitrofluoren	$\sim 0,1$ %		
Piren	2-nitropiren	$\sim 0,5$ %	4-nitropiren	$\sim 0,06$ %
	4-nitropiren	$\sim 0,06$ %		
Fluoranten	2-nitrofluoranten	~ 3 %	2-nitrofluoranten	~ 24 %
	7-nitrofluoranten	~ 1 %		
	8-nitrofluoranten	$\sim 0,3$ %		

Powstawanie nitro-WWA z WWA zaadsorbowanych na cząstkach stałych w wyniku reakcji nitrowania elektrofilowego jest możliwe jedynie w warunkach laboratoryjnych przy wysokim stężeniu ditlenku azotu [2]. Wyjątkiem mogą być niektóre nitro-WWA powstałe w wyniku spalania paliw w silnikach samochodowych, np.: 9-nitroantracen [12].

Według wytycznych do szacowania ryzyka wynikającego z narażenia na substancje toksyczne w powietrzu, nitro-WWA są uważane jedynie za wtórne zanieczyszczenie, pierwotnym zaś emitowanym ze źródeł są WWA [5].

III.3. WŁAŚCIWOŚCI TOKSYCZNE NITRO-WWA

Badania fazy stałej, fazy gazowej oraz pyłu miejskiego przeprowadzone przez Centrum Badań Zanieczyszczeń Powietrza (Air Pollution Research Center) w Kalifornii dowodzą że produkty przemian WWA w powietrzu są odpowiedzialne za ponad połowę aktywności mutagennej powietrza atmosferycznego [13].

Nitro-WWA są grupą około 200 różnych związków chemicznych, z których wiele wykazuje właściwości mutagenne w testach mutagenności bakteryjnej (microbial mutagenicity bioassays) jak również w testach mutagenności opartych na komórkach ludzkich (forward mutation assay based on human cells), a liczne związki z tej grupy wykazują działanie kancerogenne w badaniach przeprowadzonych na zwierzętach [4, 14]. Podczas gdy WWA wykazują pośrednią aktywność mutagenną, to ich nitrowe pochodne wykazują bezpośrednią aktywność mutagenną i konsekwentnie kilka z nich znajduje się na liście związków o działaniu rakotwórczym IARC [15]. Niektóre związki nitro-WWA wykazują wyższą mutagenność (2×10^5 razy) i kancerogenność (10 razy) w porównaniu z WWA [4]. Klasyfikacja nitro-WWA ze względu na potencjalne działanie rakotwórcze została przedstawiona w tabeli 3.

Trwałość nitro-WWA w fazie stałej może powodować narażenie inhalacyjne na te związki [16].

Liczne badania [14, 17, 18, 19, 20, 21] polegające na frakcjonowaniu ekstraktu z pyłowych zanieczyszczeń powietrza oraz badaniu efektu mutagennego uzyskanych frakcji wykazały, że frakcja zawierająca nitrowe pochodne WWA charakteryzowała się zdecydowanie wyższą aktywnością mutagenną od pozostałych.

Tabela 3. Klasyfikacja działania rakotwórczego nitro-WWA według Międzynarodowej Agencji Badań nad Rakiem IARC, National Toxicology Program-USA oraz ustawodawstwa polskiego [22, 23, 24]

Nazwa związku	Klasyfikacja wg IARC i WHO	Report of Carcinogens 11'th USA	Rozporządzenie Ministra Zdrowia Dz. U. Nr 160 z 2005 r
1-nitronaftalen	Grupa 3 ¹	-	-
2-nitronaftalen	Grupa 3	-	Kat. 2 ²
9-nitroantracen	Grupa 3	-	-
2-nitrofluoren	Grupa 2B ³	-	-
3-nitrofluoranten	Grupa 3	-	-
1-nitropiren	Grupa 2B	Przewidywalnie rakotwórcza dla ludzi ⁴	-
2-nitropiren	Grupa 3	-	-
4-nitropiren	Grupa 2B	Przewidywalnie rakotwórcza dla ludzi	-
6-nitrochryzen	Grupa 2B	Przewidywalnie rakotwórcza dla ludzi	-
5-nitroacenaften	Grupa 2B	-	-
5-nitro-1,2-dihydroacenaftylen	-	-	Kat.2
7-nitro benzo(a)antracen	Grupa 3	-	-
3-nitroperylen	Grupa 3	-	-
6-nitrobenzo(a)piren	Grupa 3	-	-
3,7-dinitrofluoranten	Grupa 2B	-	-
3,9-dinitrofluoranten	Grupa 2B	-	-
1,3-dinitropiren	Grupa 3	Przewidywalnie rakotwórcza dla ludzi	-
1,6-dinitropiren	Grupa 2B	-	-
1,8-dinitropiren	Grupa 2B	Przewidywalnie rakotwórcza dla ludzi	-

¹ **Grupa 3:** Substancja nie jest zaklasyfikowana jako rakotwórcza dla ludzi

² **Kategoria 2** Substancje, które rozpatruje się jako rakotwórcze dla człowieka.

Są to substancje, dla których istnieją wystarczające dowody pozwalające na przyjęcie założenia, że narażenie człowieka na te substancje może w rezultacie prowadzić do powstania raka. Na przyjęcie takiego założenia pozwalają dane uzyskane na podstawie:

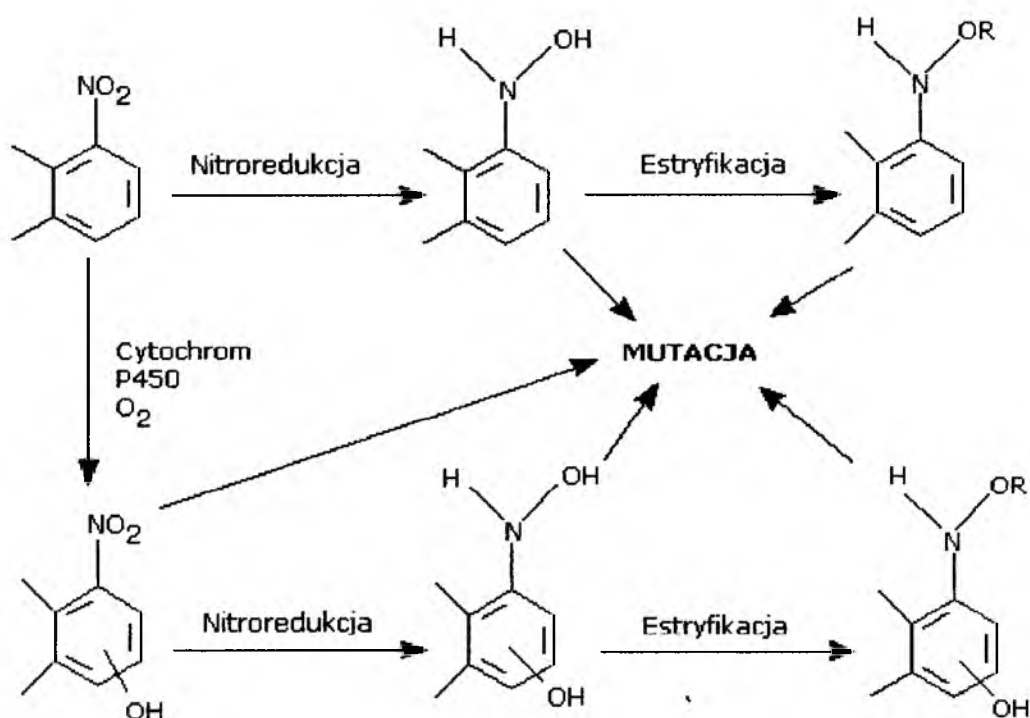
1) odpowiednich, długoterminowych badań na zwierzętach,

2) innych istotnych informacji wskazujących, że narażenie człowieka na te substancje może w rezultacie prowadzić do powstania raka

³ **Grupa 2B:** Substancja może być rakotwórcza dla ludzi.

⁴ **Przewidywalnie rakotwórcza dla ludzi-** substancje dla których istnieją dowody występowania nowotworów płuc w grupie zawodowo narażonej na spaliny z silnika Diesla w uzupełnieniu o badania na zwierzętach

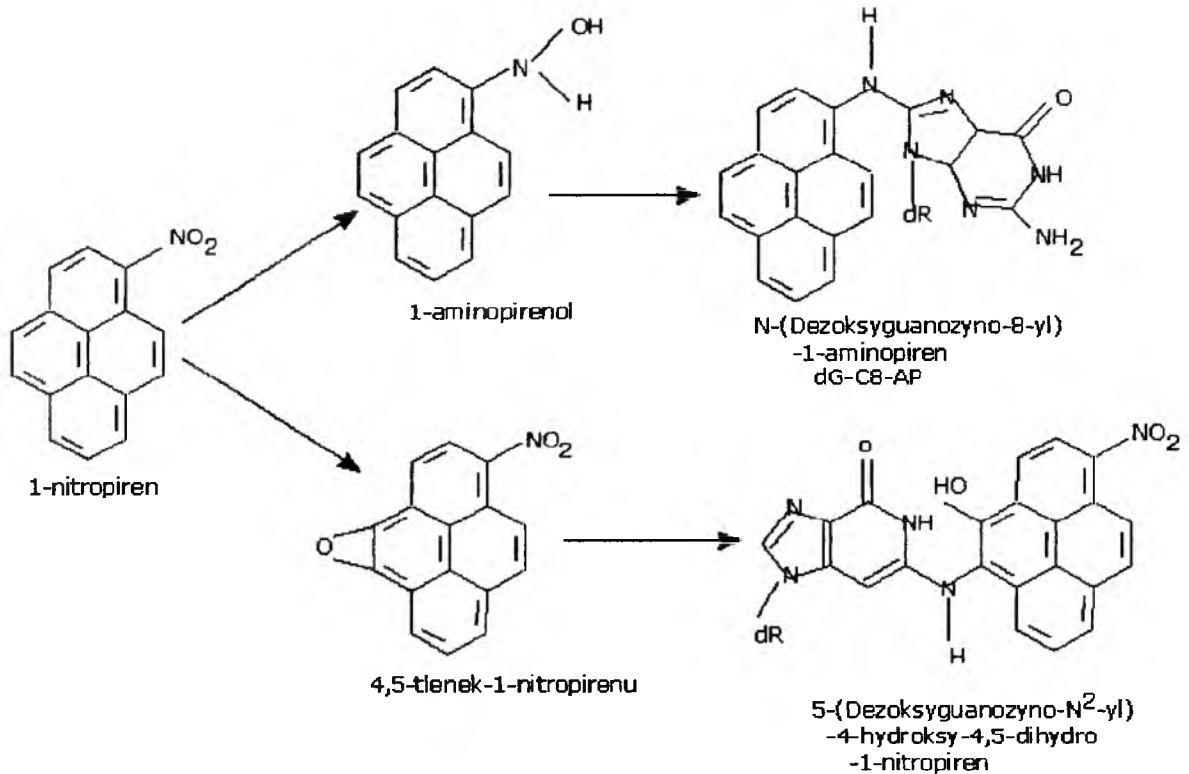
Metabolizm nitro-WWA w organizmie jest złożony. Pięć kierunków aktywacji metabolicznej, która prowadzi do wzbudzenia mutacji przez nitro-WWA w badaniach przeprowadzonych na bakteriach oraz u ssaków przedstawiono na schemacie 1.



Schemat 1. Aktywacja metaboliczna nitro-WWA prowadząca do mutacji [25]

Główną drogą aktywacji metabolicznej bakterii oraz 2-nitrofluorantenu w organizmie szczurów jest nitroredukcja [2, 26].

Nitro-WWA wykazują różne drogi aktywacji, np.: 1-nitropiren jest metabolizowany głównie przez hydroksylowanie, poprzedzone nitroredukcją i N-acetylacją. Schemat 2 przedstawia tworzenie adduktu 1-nitropirenu. Głównym adduktem DNA wykrywanym w badaniach *in vivo* oraz *in vitro* dla nitro-WWA jest C8 podstawiona dezoksyganozyna jak również wykrywane są pochodne N² podstawionej dezoksyganozy oraz C8 podstawionej dezoksyadenozyny [2].



Schemat 2. Powstawanie adduktu DNA z 1-nitropirenu [2]

III.3.1. Oddziaływanie na zwierzęta

Wyniki rakotwórczego działania nitro-WWA na zwierzęta doświadczalne przedstawiono w tabeli 4. Toksyczność ostra nitro-WWA jest zbadana jedynie dla kilku nitrowych pochodnych WWA, poniżej przedstawiono wyniki toksyczności ostrej dla tych właśnie związków [2, 14]:

Nazwa związku	Dawka śmiertelna
1-nitronaftalen	LD ₅₀ ⁵ = 86 mg/kg masy ciała
2-nitronaftalen	LD ₅₀ = 1300 mg/kg masy ciała
2-nitrofluoren	LD ₅₀ = 1600 mg/kg masy ciała
1-nitropiren	LD ₅₀ = >5000 mg/kg masy ciała
5-nitroacenaften	LD ₁₀₀ ⁶ = 1700 mg/kg masy ciała
3,9-dinitrofluoranten	LD ₅₀ = 50 µg/1 szczura

⁵ LD₅₀ – dawka śmiertelna medialna - statystycznie obliczona na podstawie wyników badań doświadczalnych ilość substancji chemicznej, która powoduje śmierć 50% organizmów badanych po jej podaniu [29]

⁶ LD₁₀₀ – dawka śmiertelna bezwzględna - najmniejsza ilość substancji chemicznej, która powoduje śmierć 100% organizmów badanych po jej podaniu [29]

Tabela 4. Wyniki rakotwórczego działania nitro-WWA na zwierzęta doświadczalne [23, 27, 28]

l.p.	Nazwa związku	Droga podania		
		Podskórnice	Dootrzewnowo/ Dożołądkowo	Śródchawiczo/ Śród płucnie
		Wyniki działania		
1.	1-nitronaftalen	Mięśniaki w miejscu podania		
2.	2-nitronaftalen	Mięśniaki w miejscu podania	Powstawanie brodawczaków w pęcherzu moczowym	
3.	3-nitronaftalen	Guzy w miejscu naniesienia		Guzy
4.	9-nitroantracen	Mięśniaki w miejscu podania		
5.	2-nitrofluoren	Nowotwór złośliwy sutka,	Nowotwór złośliwy przedzołądka, wątroby, ucha	
6.	3-nitrofluoren	Mięśniaki w miejscu podania		
7.	1-nitropiren	Mięśniaki w miejscu podania, białaczka, nowotwór piersi	Nowotwory płuc, wątroby	Nowotwory płuc
8.	2-nitropiren	Mięśniaki w miejscu podania		
9.	4-nitropiren	Mięśniaki w miejscu podania, białaczka, gruczolakorak sutka	Zwiększenie częstości występowania nowotworów wątroby oraz płuc	
10.	6-nitrochryzen	Mięśniaki w miejscu podania, białaczka, gruczolakorak sutka	Nowotwór złośliwy wątroby chłoniak złośliwy, dysplastyczne i gruczolakowate zmiany w jelicie grubym oraz gruczolakorak jelita grubego	Nowotwory płuc
11.	6-nitrobenzo (a)piren		Nowotwór złośliwy wątroby	
12.	7-nitrobenzo (a)antracen		Nowotwór złośliwy wątroby	
13.	3-nitroperylene	Mięśniaki w miejscu podania	Nowotwór złośliwy wątroby	
14.	1,3-dinitropiren	Mięśniaki w miejscu podania		
15.	1,6-dinitropiren	Mięśniaki w miejscu podania, białaczka	Nowotwory złośliwe wątroby i powstawanie mięśniaków jamy otrzewnej	Gruczolakoraki płuc Nowotwór złośliwy płuc
16.	1,8-dinitropiren	Mięśniaki w miejscu podania, białaczka, nowotwór piersi	Powstawanie mięśniaków jamy otrzewnej, nowotwór wątroby	
17.	3,7-dinitrofluoranten	Mięśniaki w miejscu podania		
18.	3,9-dinitrofluoranten	Mięśniaki w miejscu podania		

Badania toksykologiczne 2-nitrofluorenu, często obecnego w powietrzu atmosferycznym, przeprowadzone na szczurach narażonych przez okres 1 miesiąca na dawkę 25 mg/kg masy ciała dziennie, wykazały istotny spadek masy ciała badanych zwierząt. Podanie doustne 2-nitrofluorenu powodowało powstanie nowotworu złośliwego przedłożądka, wątroby, ucha. W wyhodowanych komórkach zwierzęcych 2-nitrofluoren indukował zmiany DNA, chromatyd siostrzanych, mutacje oraz zmiany morfologiczne [2, 27].

W przypadku narażenia krótkoterminowego lub długoterminowego na nitro-WWA, nie są opisywane żadne syndromy poza wczesnonowotworowymi, tzn.: spadek masy ciała oraz pierwsze zmiany w tkankach świadczące o zmianach nowotworowych.

Szersze dane dotyczące genotoksyczności 74 z 95 nitro-WWA zostały przeprowadzone w oparciu o badania *in vitro*.

III.3.2. Oddziaływanie na człowieka

Organizm ludzki jest narażony na nitro-WWA oraz inne współwystępujące z nimi zanieczyszczenia powietrza pochodzące z różnych źródeł. Brak jest jednoznacznych danych dotyczących wpływu poszczególnych nitro-WWA na organizm człowieka [2]. Istnieją natomiast dowody na powiązanie występowania nowotworów płuc w regionach uprzemysłowionych z obecnością WWA i nitro-WWA w powietrzu [30]. Szacuje się, że głównym źródłem narażenia na nitro-WWA w powietrzu atmosferycznym są spaliny z silnika Diesla [31]. Obecnie prowadzi się badania w celu oszacowania ryzyka narażenia na nitro-WWA poprzez badanie stężeń ich metabolitów w organizmie, tzw. biomarkerów narażenia. Badania metabolitów nitro-WWA w moczu są głównie prowadzone na grupach zawodowych narażonych na spaliny z silników Diesla [2, 13, 32, 33].

Ryzyko zachorowania na nowotwór w zależności od drogi narażenia na związku o potencjalnym działaniu rakotwórczym oszacowane za pomocą liniowego modelu dawka-odpowieź przedstawia tabela 5 [5].

Tabela 5. Ryzyko zachorowania na nowotwór dla niektórych związków o potencjalnym działaniu rakotwórczym [5]

Droga narażenia	2-nitrofluoren		4-nitropiren		1-nitropiren		Benzo(a)piren	
	Dawka mg·kg ⁻¹ ·dzień ⁻¹	Ryzyko ⁷	Dawka mg·kg ⁻¹ ·dzień ⁻¹	Ryzyko	Dawka mg·kg ⁻¹ ·dzień ⁻¹	Ryzyko	Dawka mg·kg ⁻¹ ·dzień ⁻¹	Ryzyko
Inhalacyjna	4,7x10 ⁻⁸	1,8x10 ⁻⁹	3,3x10 ⁻⁹	1,3x10 ⁻⁹	8,1x10 ⁻⁹	3,1x10 ⁻⁹	1,3x10 ⁻⁷	5,1x10 ⁻⁷
Woda pitna	6,2x10 ⁻⁸	7,4x10 ⁻⁹	3,4x10 ⁻⁹	4,1x10 ⁻⁹	8,5x10 ⁻⁸	1,0x10 ⁻⁷	1,9x10 ⁻¹³	2,4x10 ⁻¹²
Ryby	3,8x10 ⁻⁷	4,5x10 ⁻⁹	2,2x10 ⁻⁹	2,6x10 ⁻⁹	1,6x10 ⁻⁸	1,9x10 ⁻⁸	3,1x10 ⁻¹²	3,7x10 ⁻¹¹
Wieprzowina	1,7x10 ⁻¹⁰	2,0x10 ⁻¹¹	4,1x10 ⁻⁹	4,9x10 ⁻⁹	1,0x10 ⁻⁸	1,3x10 ⁻⁸	5,4x10 ⁻⁷	6,5x10 ⁻⁶
Owoce i warzywa	2,6x10 ⁻⁷	3,1x10 ⁻⁸	3,3x10 ⁻⁷	4,0x10 ⁻⁷	8,2x10 ⁻⁷	9,9x10 ⁻⁷	1,0x10 ⁻⁶	1,2x10 ⁻⁵
Gleba	3,7x10 ⁻⁷	4,4x10 ⁻⁸	3,5x10 ⁻⁷	4,2x10 ⁻⁷	9,7x10 ⁻⁷	1,2x10 ⁻⁶	1,8x10 ⁻⁶	2,2x10 ⁻⁵
Dermalna (kontakt z glebą i wodą)	4,6x10 ⁻¹⁰	5,6x10 ⁻¹¹	3,0x10 ⁻¹¹	3,6x10 ⁻¹¹	7,4x10 ⁻¹⁰	8,9x10 ⁻¹⁰	1,7 x10 ⁻¹⁰	2,1x10 ⁻⁹
Całkowite ryzyko	1,7x10⁻⁶						2,2x10⁻⁵	

Największe ryzyko zachorowania na nowotwór istnieje przy narażeniu na nitro-WWA drogą inhalacyjną oraz pokarmową, najmniejsze w przypadku kontaktu ze skórą. Należy zauważyć, że całkowite ryzyko zachorowania jest o jeden rząd większe w przypadku narażenia na benzo(a)piren.

III.4. ŹRÓDŁA NARAŻENIA NA NITRO-WWA

III.4.1. Powstawanie nitro-WWA w procesach spalania

Badania nad kancerogennością spalin z silnika Diesla w narażeniu inhalacyjnym szczurów wykazały, że faza gazowa (bez frakcji stałej) nie jest kancerogenna. Natomiast wszystkie obowiązujące badania na szczurach wykazały działanie kancerogenne fazy stałej w stężeniu powyżej 2 mg/m³ [34].

⁷ Ryzyko=q·a·d, gdzie

q – współczynnik równoważnikowy potencjalnej rakotwórczości – wskaźnik rakotwórczości ustanowiony przez EPA wynosi 0,1; 0,1; 0,01; oraz 1 odpowiednio dla 1-NP.; 4-NP.; 2-NF oraz BaP

a – współczynnik rakotwórczości [mg⁻¹·kg·dzień] dla BaP = 1 (przy narażeniu inhalacyjnym a=3,9; przy narażeniu dermalnym i drogą pokarmową a=12)

d – dawka [mg·kg⁻¹·dzień⁻¹]

W spalinach cztero-cylindrowego silnika Diesla wraz z setkami innych związków organicznych wykrywane są: nitrofluoren, nitroantracen, nitrofluoranten, mono- i dinitropireny i nitrobenzo(a)piren. Liczne badania potwierdziły obecność nitro-WWA w ekstraktach z cząstek spalin Diesla. Wykryto cząsteczki trzy-, cztero- i pięciopierścieniowe [34]. Najczęściej występującymi izomerami pirenu, fluorenu i fluorantenu obserwowanymi w spalinach z silnika Diesla są: 1-nitropiren, 2-nitrofluoren i 3-nitrofluoranten [2]. Zawartość 1-nitropirenu w spalinach z silnika Diesla wynosiła 15-25 mg/kg pyłu, podczas gdy benzo(a)piren występował w ilości powyżej 50 mg/kg pyłu [34]. Badania laboratoryjne powstawania nitro-WWA ze źródeł bezpośrednich i wtórnych wykazały, że charakterystyczne izomery nitro-WWA tworzą się w zależności od drogi powstawania (reakcje fazy gazowej czy spalanie). Przykładem mogą być 1-nitropiren i 3-nitrofluoranten, które są charakterystycznymi produktami spalania paliwa w silniku Diesla i nie są obserwowane w żadnych innych reakcjach fazy gazowej [4].

Nitrowe pochodne WWA są ważnym czynnikiem decydującym podczas szacowania skutków zdrowotnych wynikających z narażenia na spaliny z silnika Diesla [34].

Badania dowodzą [2], że stężenie 1-nitropirenu jest znacznie większe w cząstkach spalin z silnika Diesla niż silnika benzynowego, natomiast porównywalne są stężenia izomerów: 1,3-dinitropirenu, 1,6-dinitropirenu, 1,8-dinitropirenu w spalinach z obydwu typów silników.

Innymi źródłami powstawania nitro-WWA są [2]:

- spalanie paliwa w silnikach samolotowych, gdzie stwierdzono obecność nitro-WWA natomiast nie prowadzono badań określających ich stężenia
- emisje ze spalania czynników grzewczych (nafty, gazu opałowego oraz ciekłego gazu ziemnego) do celów gospodarczych – ogrzewanie mieszkań, gotowanie. Stwierdzono obecność: 1-nitronaftalenu, 2- lub 3-nitrofluorantenu i 1-nitropirenu w powietrzu
- spalanie oleju jadalnego – proces ten jest źródłem powstawania 1-nitropirenu oraz 1,3-dinitropirenu, których stężenia w produktach spalania według badań przeprowadzonych w Tajwanie w zależności od rodzaju użytego oleju wynoszą od 0,4 do 3,4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$

- palenie papierosów będące źródłem powstawania 1-nitropirenu, 1-nitronaftalenu oraz 6-nitrochryzenu
- spalanie koksu jest źródłem powstawania 3-nitrofenantrenu, 1-nitropirenu, 9-nitroantracenu oraz 3-nitrofenantrenu

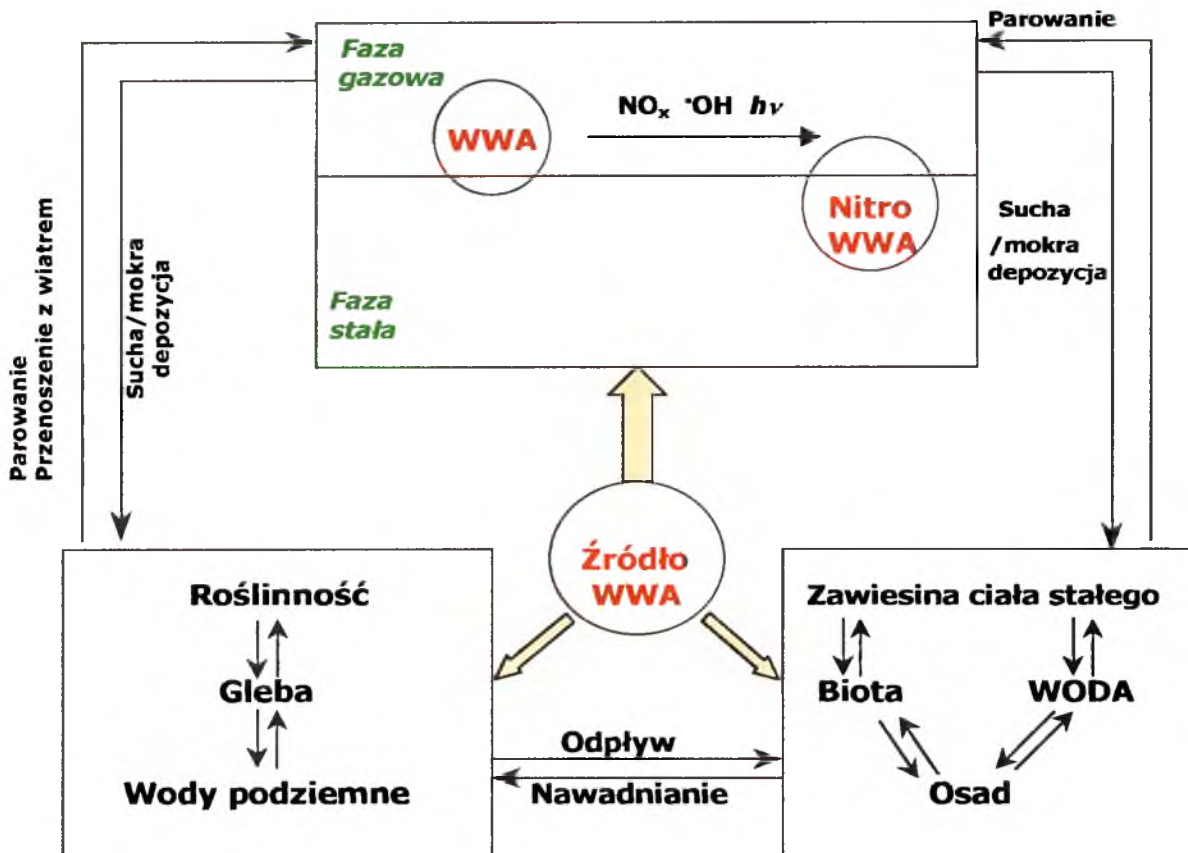
III.4.2. Produkcja nitro-WWA na skalę przemysłową

Na skalę przemysłową [2] produkowany jest 1-nitronaftalen (95 %) z naftalenu i mieszaniny kwasu azotowego z kwasem siarkowym w temp. 60 °C. Produktami ubocznymi tej reakcji są 2-nitronaftalen (5 %) oraz ilości śladowe dinitronaftalenu i dinaftolu. Zmiana temperatury tego procesu powoduje otrzymywanie konkretnych izomerów tych związków w określonych stosunkach względem siebie. Nitronaftaleny są produkowane w Niemczech oraz Japonii. W samej Japonii rocznie produkuje się 1200 ton dinitronaftalenów. Komercyjnie nitro-WWA wykorzystuje się:

- pośrednio do produkcji materiałów wybuchowych
- jako produkt pośredni do produkcji fluoryzującego środka rozjaśniającego i środków fotochemicznych
- do produkcji pigmentów

III.5. PRZEMIANY NITRO-WWA ORAZ ICH MIGRACJA W RÓŻNYCH ELEMENTACH ŚRODOWISKA

WWA oraz nitro-WWA mogą migrować pomiędzy różnymi elementami środowiska. Migracja ta jest związana z takimi czynnikami jak: sucha lub mokra depozycja, przenoszenie z wiatrem, parowanie. Migrację WWA oraz nitro-WWA w różnych elementach środowiska przedstawiono na schemacie 3. Narażenie na WWA oraz nitro-WWA jest uzależnione od ich stężenia w różnych elementach środowiska [5].



Schemat 3. Migracja WWA oraz nitro-WWA w różnych elementach środowiska [5]

Fotoliza nitro-WWA zależy nie tylko od warunków napromieniowania, ale również od tego czy dany związek występuje w fazie gazowej, w roztworze (w zależności od typu rozpuszczalnika) lub czy jest związany do fazy stałej lub zaadsorbowany na cząstkach stałych. Produktami rozkładu nitro-WWA są chinony, hydroksynitro-WWA, pochodne fenolowe [35] oraz hydroksy-WWA. Badania wykazują, że produkty rozpadu charakteryzują się mniejszą aktywnością mutagenną niż pierwotne nitro-WWA [2].

Jeżeli chodzi o fotolizę gazowych nitro-WWA to 1-nitronaftalen ulega szybciej dysocjacji fotochemicznej (0,5 h) niż 2-nitronaftalen (11 h), który głównie ulega degradacji pod wpływem rodników hydroksylowych [2].

Czas fotodegradacji nitro-WWA w fazie stałej jest zdecydowanie dłuższy niż dla nitro-WWA w roztworze [2]. Badania roztworu wzorców nitro-WWA w toluenie poddanych działaniu światła słonecznego przez 12 dni wykazały, że najszybciej rozkładowi uległy: 3-nitroantracen w temperaturze pokojowej oraz 7-nitrobenzo(a)piren (w ciągu 24 h), również niestabilne w porównaniu

z innymi nitro-WWA okazały się 1-nitropiren (w ciągu 6 dni) oraz 6-nitrochryzen, pozostałe związki uległy rozkładowi jedynie w około 40%. Próbkę kontrolną przechowywaną w ciemności w temperaturze pokojowej wykazały nieistotną degradację [36]. Nitro-WWA zaadsorbowane na cząstkach stałych są całkowicie lub częściowo odporne na fotolizę [1].

Nitro-WWA ulegają silnej adsorpcji na frakcji organicznej gleb i osadów [2]. W osadach ściekowych z oczyszczalni ścieków w uprzemysłowionym regionie Polski wykryto nitronaftalen, nitrobifenyl, nitrofluoren, nitronaftalen, nitroantracen, nitrofenantren oraz nitrochinolinę [37]. W naturalnie zanieczyszczonych glebach odnotowuje się największe stężenia 3-nitrofluorantenu (do 271 ng/g) oraz 2-nitrofluorenu (do 107 ng/g) wykrywane są również 1-nitronaftalen, 3-nitrobifenyl i 1-nitropiren w ilościach kilku ng/g gleby [38, 39]. Ługowanie do wód podziemnych jest nieznaczne [2].

Ze względu na wysokie powinowactwo nitro-WWA do fazy organicznej w porównaniu z powinowactwem do wody wykazują one potencjalną zdolność do bioakumulacji [2].

Mimo że WWA zawierające dwa do pięciu pierścieni w cząsteczce ulegają degradacji pod wpływem bakterii, grzybów i alg to ich nitrowe pochodne ulegają bardzo powolnej degradacji pod wpływem mikroorganizmów w związku z czym są trwałe w glebach i osadach. Właściwość ta wynika ze słabej rozpuszczalności w wodzie, silnej adsorpcji do fazy organicznej gleby, charakteru hydrofilowej grupy nitrowej, oraz dużego rozmiaru cząsteczek nitro-WWA [2].

Badania takich produktów żywnościowych jak: herbata, olej z pestek dyni, pietruszka oraz wędliny wykazały obecność 1-nitronaftalenu, 2-nitronaftalenu, 2-nitrofluorenu, 9-nitroantracenu oraz 3-nitrofluorantenu [36]. W oleju z pestek dyni oprócz wymienionych wykryto również 1-nitropiren [40]. 1-nitropiren jest oznaczany w grillowanej kukurydzy, makreli, wieprzowinie oraz kurczaku (aż do 43 ng/g). Odnotowano również wysokie stężenia 2-nitrofluorenu, 1-nitropirenu oraz 2-nitronaftalenu w wędzonej żywności jak również w owocach i warzywach, najprawdopodobniej związki te pochodzą z zanieczyszczonego powietrza [2].

III.6. METODY OZNACZANIA WYBRANYCH NITRO-WWA W POWIETRZU

Metody oznaczania nitro-WWA cytowane w piśmiennictwie zagranicznym opierają się na ekstrakcji tych związków z pyłu, frakcjonowaniu ekstraktu różnymi technikami oraz oznaczaniu nitro-WWA z wykorzystaniem techniki wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detektorem fluorescencyjnym, oraz technik chromatografii gazowej z detektorem wychwytu elektronów (ECD), detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID), detektorem masowym z jonizacją elektronami (EI) lub detektorem masowym z negatywną jonizacją chemiczną (NICI). Zastosowanie techniki HPLC z detektorem fluorescencyjnym jest możliwe po przekształceniu nitro-WWA do ich aminopochodnych, które wykazują silną fluorescencję. Zestawienie metod oznaczania nitro-WWA zawiera tabela 6.

Holly A. Bamford i współautorzy [4] opisali metodę frakcjonowania nitro-WWA z zastosowaniem techniki chromatografii cieczowej. Ekstrakt dichlorometanowy był oczyszczany na kolumnkach aminopropylowych techniką ekstrakcji do fazy stałej (SPE), a następnie poddawany frakcjonowaniu na chromatografii cieczowej w normalnym układzie faz na amino/cyjanowej kolumnie, fazą ruchomą był roztwór dichlorometanu w heksanie. Eluent był kontrolowany poprzez obserwację chromatogramu uzyskiwanego z detektora UV dla długości fali 254 nm. Frakcje były analizowane techniką GC/MS z negatywną jonizacją chemiczną.

W Polsce opracowano metodę oznaczania nitro-WWA [41] w której zastosowano technikę chromatografii kolumnowej na kolumnach wypełnionych kwasem krzemowym do wyodrębnienia nitro-WWA z ekstraktów dichlorometanowych pyłowych zanieczyszczeń powietrza, a następnie nitro-WWA przekształcano w pentafluoropropiloamidy. Związki identyfikowano techniką GC/MS, natomiast ilościowo oznaczano techniką chromatografii gazowej z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (FID). W innej pracy [42] zastosowano technikę chromatografii cienkowarstwowej (TLC) w celu separacji nitro-WWA z organicznego ekstraktu. Analizę związków przeprowadzono techniką GC/MS.

Opracowano również metodę [43] oznaczania nitro-WWA techniką chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz z detektorem fluorescencyjnym. W metodzie tej nitro-WWA były redukowane do odpowiednich amin aromatycznych przy użyciu wodorosiarczku sodu lub borowodorku sodu/chlorku miedzi, przy czym lepszą wydajność redukcji uzyskano dla wodorosiarczku sodu.

Metoda ekstrakcji i frakcjonowania ekstraktów dichlorometanowych pyłowych zanieczyszczeń powietrza na kolumnach wypełnionych żel krzemionkowym przy zastosowaniu różnych rozpuszczalników jest często wykorzystywana do badania efektu mutagennego pyłów zawieszonych w powietrzu [17, 18, 19, 20, 44,].

Tabela 6. Zestawienie metod oznaczania nitro-WWA w powietrzu

L.p.	Pobieranie próbki Rodzaj filtra/ Czas pobierania	Sposób ekstrakcji/ rozpuszczalnik	Sposób frakcjonowania	Technika oznaczania	Detektor	Kolumna chromatograficzna	Referencje	Uwagi
1.	Filtr z włókna szklanego, 24 h, 1 m ³ /min	Ultradźwięki, Benzen/etanol	-	HPLC	Elektrochemiczny	ODS 250x4,6 mm	[45]	Wymagane przekształcenie w aminowe pochodne
2.	Filtr z włókna szklanego; 24 h; 1 m ³ /min	Ekstrakcja w stanie nadkrytycznym CO ₂	-	GC	ECD	DB-17 30m x 0,25 mm	[15]	-
3.	Ekstrakty SRM	Oczyszczanie SPE	LC w normalnym układzie faz na amino/cyjanowej kolumnie	GC/MS	MS EI NICI	DB-5MS DB-17MS	[4], [46]	-
4.	Filtr z włókna szklanego oraz filtr kwarcowy	Ultradźwięki DCM/MeOH/toluen	Na kolumnach szklanych wypenionych żelalem krzemionkowym	HPLC	Fluorescencyjny MS	Fenylowa, pakowana: katalizator Pt na γ-tlenek glinowy	[47]	Wymagane przekształcenie w aminowe pochodne
5.	Filtr z włókna szklanego Obj. próbki 3600 m ³	W aparacie Soxleta DCM	Na kolumnach szklanych wypenionych żelalem krzemionkowym Dodatkowo frakcjonowano frakcję IV techniką HPLC	GC	FID MS EI MS NICI	Kapilarna 10m	[19]	Metodą tą nie wykryto nitro-WWA w próbkach środowiskowych
6.	Filtr z włókna szklanego Obj. próbki 2300-6600 m ³	W aparacie Soxleta DCM	Na kolumnach szklanych wypenionych kwasem krzemowym	GC	MS EI FID	Kapilarna 25 m x 0,20 mm CBP-5 Kapilarna 30m x 0,25m SE54	[41]	Wymaga przekształcania nitro-WWA w pentafluoropropylamidy

c.d. tabeli 6

Lp.	Pobieranie próbki Rodzaj filtra/ Czas pobierania	Sposób ekstrakcji/ rozpuszczalnik	Sposób frakcjonowania	Technika oznaczania	Detektor	Kolumna chromatograficzna	Referencje	Uwagi
7.	Filtr z włókna szklanego	W aparacie Soxleta DCM	Na kolumnach szklanych wypełnionych kwasem krzemowym	TLC GC	UV MS EI	Kapilarna 25 m x 0,20 mm CBP-5	[42]	Identyfikacja jakościowa
8.	Filtry kwarcowe Pobór 24 h	W aparacie Soxleta DCM	HPLC	GC GC	FID MS EI	-	[48]	
9.	Filtry szklane pokryte teflonem Obj. próbki 1500 m ³	W aparacie Soxleta DCM przez 72 h	Na kolumnach szklanych wypełnionych żelalem krzemionkowym	HPLC GC	MS EI	HP-5 30mx0,25mmx 0,25µm	[49]	
10.	-	-	-	Różnicowa polarografia pulsowa Różnicowa pulsowa wolt- amperometria	-	-	[50]	Metoda tylko dla 1,3-dinitronaftalenu
11.		W aparacie Soxleta DCM		HPLC	Fluore scencyjny		[43]	Redukcja nitro-WWA do amino-WWA przy użyciu NaHS oraz NaBH ₄ /CuCl ₂
12.	-	W aparacie Soxleta DCM, benzen/etanol	Frakcjonowanie na kolumnach wypełnionych żelalem krzemionkowym	HPLC	Fluore scencyjny	ODS Zorbax Spherisorb	Referencje w Cvačka 1998 [51]	Wymagana redukcja on-line lub off-line nitro-WWA do amino-WWA

c.d. tabeli 6

Lp.	Pobieranie próbki Rodzaj filtra/ Czas pobierania	Sposób ekstrakcji/ rozpuszczalnik	Sposób frakcjonowania	Technika oznaczania	Detektor	Kolumna chromatograficzna	Referencje	Uwagi
13.	-	W myjce ultradźwiękowej Benzen/etanol toluen	-	HPLC	Chemiluminescencyjny	ODS Cosmosil Zorbax	Referencje w Cvačka 1998 [51]	Wymagana redukcja on-line lub off-line nitro-WWA do amino-WWA, które następnie reagują z mieszaniną szczawianu bis(2,4,6-trichlorofenylo) i nadtlenu wodoru
14.	-	-	-	HPLC	Spektrofotometryczny	ODS Lichrosorb	Referencje w Cvačka 1998 [51]	
15.	-	W aparacie Soxhleta lub myjce ultradźwiękowej DCM	Frakcjonowanie na kolumnach wypełnionych żelalem krzemionkowym	HPLC	Elektrochemiczny	ODS Ultrasphere Nucleosil	Referencje w Cvačka 1998 [51]	
16.	Filtr z włókna szklanego oraz filtr kwarcowy Obj. próbki 1600 m ³	W aparacie Soxhleta DCM	Na kolumnach szklanych wypełnionych żelalem krzemionkowym	GC/MS	MS EI	DB 5 (25mx0,25mm x0,25µm)	[44]	Również do badania efektu mutagennego
17.	-	-	-	GC	ECD	-	[52]	Metoda wymaga przekształcania nitro-WWA w fluorokowe pochodne
18.	SRM1650 - cząstki spalin Diesla	W aparacie Soxhleta DCM	Na kolumnach szklanych wypełnionych żelalem krzemionkowym		Testy	Ames'a	[20]	Metoda wykorzystywana do badania efektu mutagennego

Wyszczególnione w tabeli metody charakteryzują się w głównej mierze koniecznością pobierania dużej objętości powietrza, najczęściej wymagany jest 24 godzinny pobór próbki o objętości przepuszczonego powietrza 1500-6600 m³, podczas gdy w opracowanej metodzie wystarczającym jest pobór próbki przez około 6 godzin, tak aby uzyskać objętość 150-200 m³ pobranego powietrza. Jeżeli chodzi o technikę ekstrakcji to najczęściej wykorzystywana jest ekstrakcja w aparacie Soxleta, a stosowanym rozpuszczalnikiem jest dichlorometan, wykorzystuje się również ekstrakcję za pomocą ultradźwięków oraz ekstrakcję w stanie nadkrytycznym. Najczęściej stosowanymi rozpuszczalnikami są: benzen, metanol, etanol, toluen, używane pojedynczo jak również w mieszaninach w różnych stosunkach objętościowych oraz w różnej ilości.

W pracach przeglądowych zaleca się [16] stosowanie ekstrakcji w stanie nadkrytycznym mieszaniną CO₂/toluen, która może zastąpić równocześnie etap oczyszczania próbki jak również frakcjonowania. Jest to możliwe, jeżeli w początkowym etapie ekstrakcji zastosuje się tylko fluid nadkrytyczny CO₂ w celu wyizolowania niepolarnych węglowodorów alifatycznych, a w drugim etapie zastosowana zostanie mieszanina CO₂/toluen w celu ekstrakcji nitrowych i tlenowych pochodnych WWA. Ograniczeniem w zastosowaniu tej techniki jest jej wysoki koszt jak również wymaga ona posiadania doświadczenia w tego typu technice analitycznej. Podobnie jest w przypadku wysokosprawnej chromatografii cieczowej, która jest często stosowaną i polecaną techniką na etapie frakcjonowania próbki. Frakcjonowanie próbki na kolumnach wypełnionych żel krzemionkowym, gdzie uzyskuje się rozdział co najmniej czterech frakcji i stosuje się rozpuszczalniki o podobnej polarności, jest najczęściej stosowane we frakcjonowaniu ekstraktów pyłowych zanieczyszczeń powietrza w celu oszacowania efektu mutagennego poszczególnych frakcji natomiast rzadko oznacza się stężenia poszczególnych związków w wyizolowanych frakcjach. Nitrowe pochodne WWA mogą być oznaczane za pomocą różnych technik chromatograficznych. Zastosowanie wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC wyposażonej w detektor fluorescencyjny, chemiluminescencyjny czy też elektrochemiczny wymaga przekształcenia nitro-WWA w ich aminowe pochodne. W przypadku detektora

chemiluminescencyjnego redukcja taka następuje przed (off-line) lub w trakcie (on-line) analizy chromatograficznej. Oznaczanie nitro-WWA techniką HPLC często wymaga oczyszczania próbki. Na etapach oczyszczania próbki oraz przekształcania nitro-WWA w ich pochodne mogą następować poważne straty.

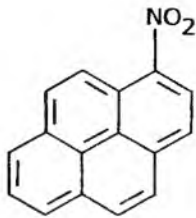
Wiele z opisywanych metod oznaczania nitro-WWA opartych jest na technice chromatografii gazowej wyposażonej w detektor wychwyty elektronów (ECD) lub detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID). Techniki te wymagają przekształcania nitro-WWA w ich fluorkowe pochodne i charakteryzują się gorszą granicą oznaczalności w porównaniu do chromatografii gazowej sprzężonej z detektorem mas (GC/MS). Zarówno technika GC/MS z jonizacją elektronami (EI) jak i technika GC/MS z negatywną jonizacją chemiczną (NICI) pozwalają na oznaczanie nitro-WWA w ich pierwotnej postaci bez konieczności przekształcania w ich pochodne. Oczywiście chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas z negatywną jonizacją chemiczną charakteryzuje się bardzo dobrą granicą oznaczalności – nawet $0,1 \text{ pg/m}^3$, ale jest to aparatura bardzo kosztowna i rzadko dostępna w laboratorium analitycznym. Technika GC/MS z jonizacją elektronami (EI) wydaje się najlepszą alternatywną techniką oznaczania nitro-WWA w ich pierwotnej postaci i dla niskich stężeń tych związków w powietrzu atmosferycznym.

IV. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

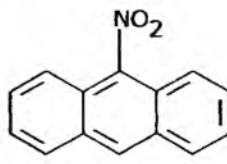
IV.1. WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE I TOKSYKOLOGICZNE WYBRANYCH DO ANALIZ NITRO-WWA

Na podstawie danych z piśmiennictwa dokonano wyboru nitrowych pochodnych WWA będących najczęstszym komponentem zanieczyszczeń powietrza i obecnych w spalinach z silnika Diesla [1, 2, 4, 5, 15, 28, 34, 40, 47, 48, 49; 41, 42, 43, 45, 46, 53].

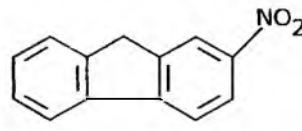
Poniżej przedstawiono wzory strukturalne wybranych do analiz mono- i dinitro-WWA. Właściwości fizykochemiczne związków są zebrane w tabeli 1 pkt III.1 w części teoretycznej.



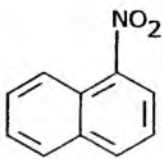
1-nitropiren



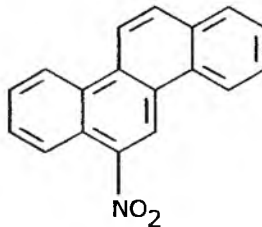
9-nitroantracen



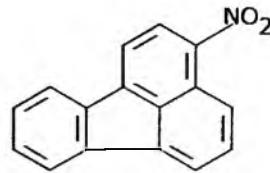
2-nitrofluoren



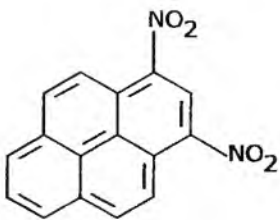
1-nitronaftalen



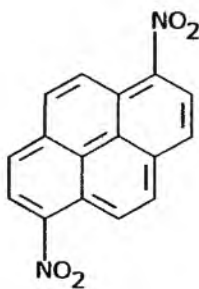
6-nitrochryzen



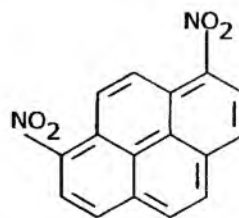
3-nitrofluoranten



1,3-dinitropiren



1,6-dinitropiren



1,8-dinitropiren

IV.1.1. ROZPUSZCZALNOŚĆ NITRO-WWA

Według danych literaturowych [2, 5, 6, 7] poszczególne nitrowe pochodne WWA rozpuszczają się w następujących rozpuszczalnikach organicznych:

1-nitronaftalen	metanol, cykloheksan, chloroform, eter, alkohol, benzen dwusiarczek węgla, benzen, pirydyna, dichlorometan
9-nitroantracen	metanol, dichlorometan
2-nitrofluoren	metanol, cykloheksan
1-nitropiren	dichlorometan, metanol, cykloheksan
6-nitrochryzen	metanol, dichlorometan
3-nitrofluoranten	metanol, cykloheksan, dichlorometan
1,3-dinitropiren	dichlorometan, metanol, cykloheksan
1,6-dinitropiren	dichlorometan, toluen
1,8-dinitropiren	dichlorometan, cykloheksan

Wybrano cztery rozpuszczalniki organiczne, w których sprawdzono rozpuszczalność pochodnych nitrowych WWA doświadczalnie rozpuszczając niewielką ilość pojedynczych związków (kilka kryształków) w 2 ml rozpuszczalnika w temp. 25°C, sprawdzano również efektywność rozpuszczalności pod wpływem ultradźwięków. Wyniki tych eksperymentów przedstawiono w tabeli 7.

Tabela 7. Rozpuszczalność badanych nitrowych pochodnych WWA w wybranych rozpuszczalnikach organicznych (✓-całkowicie rozpuszczalny)

Nazwa związku	metanol	cykloheksan	dichloro- metan	dwusiarczek węgla
1-nitronaftalen	✓	✓	✓	✓
9-nitroantracen	✓	✓**	✓	
2-nitrofluoren	✓	✓		
1-nitropiren	✓	✓	✓	
6-nitrochryzen	✓	✓**	✓	
3-nitrofluoranten	✓	✓	✓	
1,3-dinitropiren	✓	✓**	✓	
1,6-dinitropiren		✓**	✓	
1,8-dinitropiren		✓**	✓	

** rozpuszczane za pomocą ultradźwięków

Najlepszą rozpuszczalność badane związki wykazały w dichlorometanie, jednakże ze względu na gwałtowne odparowywanie tego rozpuszczalnika przy dozowaniu split/splitless był on nieodpowiedni do sporządzenia mieszanin. Zatem nitrowe pochodne WWA zostały rozpuszczone w cykloheksanie poddając je działaniu ultradźwięków przez około 15 min.

IV.2. APARATURA I ODCZYNNIKI

IV.2.1. Aparatura i drobny sprzęt laboratoryjny

- a) waga elektroniczna, analityczna *Sartorius* z dokładnością ważenia 0,01 mg
- b) chromatograf gazowy firmy *Hewlett-Packard* 5890 Seria II Plus z detektorem masowym 5972A
- c) kolumna chromatograficzna: kolumna kapilarna HP-5 MS; o długości 30m, średnicy 0.25 mm o grubości filmu 0.25 μm , *Agilent Technology*
- d) chromatograf cieczowy HP 1090 firmy *Hewlett-Packard* z detektorem fluorescencyjnym 1046 A
- e) kolumna chromatograficzna typu C-18 (Baker)
- f) próżniowa wyparka obrotowa *IGNOS RVO 400* z pompą próżniową membranową VM-20-D
- g) łaźnia ultradźwiękowa 220 V, 50 Hz, *Unimasz UM-4*
- h) mikrostrzykawki *HAMILTON* o pojemności 500 μl ; 100 μl ; 10 μl ; 5 μl ; 1 μl ; 0,5 μl ;
- i) pompa ssąca umożliwiająca pobranie powietrza ze stałym przepływem 0,5-1 m^3/min *Staplex* model TFIA-2, USA
- j) laboratoryjne płaszcze grzejne (*Olejniczak*) z regulatorami mocy (*Barel dla POCh*)
- k) aparaty wg Soxleta z kolbkami na 100 ml, *Wytwórnia Przyrządów Laboratoryjnych* w Gliwicach
- l) grzebień metalowy do odparowywania
- m) kolbki 10 ml, 100 ml
- n) fiołki 20 ml
- o) kolumny szklane do frakcjonowania 200x20 mm, spiek G1, *Wytwórnia Przyrządów Laboratoryjnych* w Gliwicach
- p) suszarka SML 32/250
- q) kapsle i fiołki (1ml), *Agilent Technologies*

IV.2.2. Materiały i odczynniki

- a) woda destylowana dejonizowana, MilliQ Plus, *Milipore*
- b) żel krzemionkowy 60, średnica cząstek 0,063-0,200 mm, *Merck*
- c) sączi z włókna szklanego o średnicy porów 1,6 μm Whatman GF/A, *POCh*
- d) gilzy ekstrakcyjne 25x80 mm, *POCh*
- e) azot o czystości N5.0 z atestem jakości: wolny od tlenków azotu, *BOC Gazy Sp. z o.o.*
- f) hel czysty N5.0 z certyfikatem zgodności, *BOC Gazy Sp. z o.o.*
- g) dichlorometan do HPLC, *Baker*
- h) cykloheksan do HPLC, *POCh*
- i) metanol do HPLC, *Baker*
- j) acetonitryl gradient grade do chromatografii, *Merck*
- k) certyfikowany materiał odniesienia SRM 1587 – nitrowe pochodne wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w metanolu, *National Institute of Standards and Technology, USA*
- l) certyfikowany materiał odniesienia SRM 1975 Diesel Particulate Extract, *National Institute of Standards and Technology, USA*
- m) suche wzorce nitrowych pochodnych WWA:
 - 1-nitropiren 99%, *Aldrich*
 - 2-nitrofluoren 98%, *Aldrich*
 - 1-nitronaftalen 99%, *Aldrich*
 - 6-nitrochryzen 95%, *Aldrich*
 - 9-nitroantracenen 97%, *Aldrich*
 - 3-nitrofluoranten 90%, *Aldrich*
 - 1,3-dinitropiren 99%, *Aldrich*
 - 1,6-dinitropiren 60%, *Sigma*
 - 1,8-dinitropiren 98%, *Aldrich*
- n) wzorzec mieszaniny WWA w dichlorometanie; PAH Mixture PM 610, *Baker-Eurokolor*

IV.3. PRZYGOTOWANIE ROZTWORÓW WZORCOWYCH

IV.3.1. Przygotowanie roztworów wzorcowych mononitrowych pochodnych WWA

IV.3.1.1. Roztwór wzorcowy podstawowy poszczególnych mononitro-WWA

Sporządzono roztwory wzorcowe podstawowe pojedynczych związków o stężeniu 0,2 mg/ml dla każdej pochodnej nitrowej WWA wybranej do badań poprzez odważenie 2 mg związku do kolby pomiarowej o pojemności 10 ml oraz uzupełnienie jej do połowy objętości cykloheksanem wytrząsanie i poddanie działaniu ultradźwięków, a następnie po całkowitym rozpuszczeniu uzupełnienie do kreski cykloheksanem. W celu uzyskania informacji o czasie retencji, widmie każdego ze związków oraz o jonach charakterystycznych przygotowano roztwory wzorcowe pośrednie poszczególnych związków o stężeniu 0,02 mg/ml i poddano je analizie chromatograficznej. Uzyskane w ten sposób dane zebrano w tabeli 8.

IV.3.1.2. Roztwór wzorcowy pośredni mieszaniny mononitro-WWA

Przygotowano roztwór wzorcowy pośredni mieszaniny mononitrowych pochodnych WWA o stężeniu 0,02 mg/ml poprzez odmierzenie objętości 100 μ l z każdego z roztworów podstawowych badanych związków do fiołki o pojemności 1 ml, odparowanie rozpuszczalnika w atmosferze azotu, oraz rozpuszczenie suchej pozostałości w 1 ml cykloheksanu za pomocą ultradźwięków.

IV.3.1.3. Roztwory wzorcowe robocze mieszaniny mononitro-WWA

W celu przygotowania roztworów wzorcowych roboczych odmierzone do sześciu fiołek o objętości 1 ml kolejno następujące objętości roztworu wzorcowego pośredniego mieszaniny: 100; 50; 25; 10; 5; oraz 2,5 μ l oraz dopełniono cykloheksanem do kreski, wymieszano i ekstrahowano około 1 minuty w myjce ultradźwiękowej. Zawartość nitrowych pochodnych WWA w 1 ml tak przygotowanego roztworu wynosiła: 2; 1; 0,5; 0,2; 0,1; 0,05 μ g/ml. Tak przygotowane roztwory badano chromatograficznie według pkt IV.6.2. Sporządzono krzywe wzorcowe robocze dla poszczególnych związków.

IV.3.2. Przygotowanie roztworów wzorcowych dinitrowych pochodnych WWA

IV.3.2.1. Roztwór wzorcowy podstawowy poszczególnych dinitro-WWA

Sporządzono roztwory wzorcowe podstawowe pojedynczych związków dinitropochodnych WWA o stężeniu 1 mg/ml dla każdej pochodnej dinitrowej WWA wybranej do badań poprzez odważenie 1 mg związku do fiolki o pojemności 1 ml oraz uzupełnieniu jej do kreski cykloheksanem wytrząsaniu i poddaniu działaniu ultradźwięków. W celu uzyskania informacji o czasie retencji, widmie każdego ze związków oraz o jonach charakterystycznych przygotowano roztwory wzorcowe pośrednie o stężeniu 0,02 mg/ml dla każdego z analizowanych związków i poddano je analizie chromatograficznej. Uzyskane w ten sposób dane zebrano w tabeli 8.

IV.3.2.2. Roztwór wzorcowy pośredni mieszaniny dinitro-WWA

Przygotowano roztwór wzorcowy pośredni mieszaniny dinitrowych pochodnych WWA o stężeniu 0,02 mg/ml poprzez odmierzenie objętości 20 μ l z każdego z roztworów podstawowych badanych związków do fiolki o pojemności 1 ml, odparowaniu rozpuszczalnika w atmosferze azotu, oraz rozpuszczeniu suchej pozostałości w 1 ml cykloheksanu za pomocą ultradźwięków.

IV.3.2.3. Roztwory wzorcowe robocze mieszaniny dinitro-WWA

W celu przygotowania roztworów wzorcowych roboczych odmierzone do pięciu fiolek o objętości 1 ml kolejno następujące objętości roztworu wzorcowego pośredniego mieszaniny: 100; 50; 25; 10 oraz 5 μ l oraz dopełniono cykloheksanem do kreski, wymieszano i ekstrahowano w myjce ultradźwiękowej przez około 1 minutę. Zawartość dinitrowych pochodnych WWA w 1 ml tak przygotowanego roztworu wynosiła: 2; 1; 0,5; 0,2; 0,1 μ g/ml. Tak przygotowane roztwory badano chromatograficznie według pkt IV.6.2.

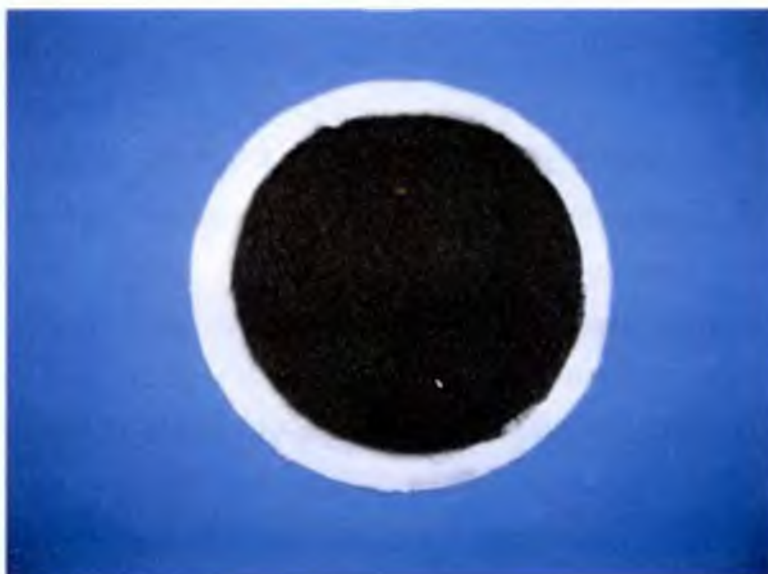
Sporządzono krzywe wzorcowe robocze dinitrowych pochodnych WWA.

IV.4. METODYKA POBIERANIA PRÓBEK POWIETRZA

Celem założonym na etapie pobierania próbki, było wyznaczenie takiej ilości pobranego pyłu by był on wystarczający do oznaczenia nitro-WWA opracowaną metodą.

Próbki pobierano na filtr z włókna szklanego wg pkt IV.2.2.c) o średnicy 11 cm za pomocą pompy ssącej Staplex wg pkt IV.2.1.i) umożliwiającej pobranie powietrza ze stałym przepływem 0,4-0,5 m³/min. Przeciętny czas pobierania próbki wynosił 6 godzin, a objętość pobranego w tych warunkach powietrza wynosiła 150-190 m³. Rysunek 1 przedstawia sączonek z pobraną próbką pyłu z powietrza.

Inne metody wymagają pobierania próbki o objętości około 1500 m³ przez 24 godziny [15, 45, 49].



Rysunek 1. Sączonek z pobraną próbką pyłu z powietrza

Sączoneki z pobranymi próbkami pyłu były zabezpieczane przed dostępem światła przez zawinięcie w folię aluminiową oraz przechowywane w zamrażarce do czasu analizy próbek.

IV.5. PRZYGOTOWANIE PRÓBEK DO ANALIZY CHROMATOGRAFICZNEJ

W niniejszej pracy wykorzystano technikę frakcjonowania ekstraktów dichlorometanowych pyłowych zanieczyszczeń powietrza na kolumnach wypełnionych żelem krzemionkowym do ilościowych oznaczeń związków organicznych w poszczególnych frakcjach. Opracowano metodę ekstrakcji próbek oraz frakcjonowania ekstraktu na podstawie metod [20, 49 i inne] badania efektu mutagennego pyłów zawieszonych w powietrzu. Na etapie przygotowania próbki wprowadzono zasadnicze zmiany dotyczące doboru odpowiedniej ilości rozpuszczalników, zmieniono sposób odparowywania próbki, zastosowano inne kolumny do frakcjonowania i zmodyfikowano sposób suszenia żelu krzemionkowego.

Opracowano parametry chromatograficzne oznaczania mieszaniny nitro-WWA techniką chromatografii gazowej ze spektrometrią mas tak aby uzyskać wyraźny rozdział poszczególnych związków przy możliwie krótkim czasie analizy.

IV.5.1. Ekstrakcja

Próbka o określonej w pkt IV.4. masie pyłu była umieszczana w gilzie, a następnie w aparacie Soxleta. Rozpuszczalnikiem używanym w ekstrakcji był dichlorometan (DCM). Ekstrakcję przeprowadzano w 100 ml dichlorometanu przez 9 h. Masa ekstrahowanego pyłu wynosiła średnio 50 mg w związku z czym taka objętość rozpuszczalnika była wystarczająca. Czas ekstrakcji został wyznaczony eksperymentalnie, największą wydajność ekstrakcji uzyskano w czasie 8-9 godzin, dalsze wydłużanie tego etapu nie miało wpływu na wydajność. Ekstrakt odparowywano do objętości 1 ml w wyparce próżniowej pod ciśnieniem 450 hPa w łaźni wodnej o temperaturze 40 °C.

Ekstrakt finalny przechowywano w fiolkach w temp. 4 °C w ciemności do momentu frakcjonowania.

IV.5.2. Frakcjonowanie

Ekstrakt surowy frakcjonowano na kolumnach szklanych wypełnionych żelazem krzemionkowym. Ze względu na małą masę pyłu zastosowano kolumny do frakcjonowania o wysokości 20 cm. Żel krzemionkowy suszono w temp. 150 °C przez 16 h a następnie dezaktywowano wodą destylowaną (w stosunku 90 g żelaza + 10 g wody). Kolumny napełniano żelazem krzemionkowym do wysokości 12 cm. Kolumnę kondycjonowano 25 ml cykloheksanu przed zastosowaniem. Zatężony ekstrakt surowy наносono na czoło kolumny.

Pięć kolejnych frakcji zbierano następująco:

- Frakcja I węglowodory alifatyczne wmywane 20 ml cykloheksanu
- Frakcja II WWA wmywane 50 ml cykloheksanu, a następnie 30 ml 25 % roztworu dichlorometanu w cykloheksanie
- Frakcja III nitro-WWA wmywane 20 ml dichlorometanu
- Frakcja IV dinitro-WWA wmywane 10 ml dichlorometanu
- Frakcja V związki polarne wmywane 30 ml metanolu

Frakcję I i II odparowywano do sucha w wyparce próżniowej pod ciśnieniem 550 hPa w łaźni wodnej o temperaturze 60 °C, natomiast frakcję III i IV pod ciśnieniem 450 hPa w łaźni wodnej o temperaturze 40 °C. Suchą pozostałość każdej z frakcji rozpuszczano w 1 ml cykloheksanu.

IV.6. OZNACZANIE WWA I NITRO-WWA

IV.6.1. Oznaczanie WWA techniką chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną

WWA wchodzące w skład II frakcji oznaczano techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej z wykorzystaniem chromatografu cieczowego HP 1090 firmy Hewlett-Packard z detektorem fluorescencyjnym 1046 A.

Suchą pozostałość frakcji II zalewano 1 ml acetonitrylu i poddawano analizie chromatograficznej.

Warunki pracy chromatografu cieczowego:

- rozdział na kolumnie chromatograficznej C-18
- elucja gradientowa acetonitryl/woda
- temp. kolumny: 30 °C
- czas trwania analizy: 45 minut
- przepływ fazy ruchomej: 0,5 ml/minutę

IV.6.2. Oznaczanie nitro-WWA techniką chromatografii gazowej z detekcją mas

Nitro oraz dinitro-WWA (frakcja III i IV) oznaczano z zastosowaniem chromatografu gazowego firmy Hewlett-Packard 5890 Seria II Plus z detektorem mas 5972A z jonizacją elektronami (EI) oraz z następującym wyposażeniem:

- dozownik split/splitless
- gaz nośny – hel
- biblioteka widm masowych *Wiley Library* (138 000 widm)

Analiza roztworów wzorcowych pośrednich pojedynczych związków oraz porównanie ich z biblioteką widm masowych *Wiley'a* pozwoliła na wyznaczenie jonów charakterystycznych oraz czasów retencji zebranych w tabeli 8.

Na podstawie analiz roztworów wzorcowych pośrednich mieszanin mono i dinitro-WWA przygotowanych wg pkt. IV.3.1.2 oraz IV.3.2.2. opracowano program temperaturowy dla kolumny chromatograficznej pozwalający na rozdział związków wchodzących w skład badanej mieszaniny, wyznaczono prędkość liniową gazu nośnego, temperaturę dozownika i detektora, objętość nastrzyku.

Poniżej przedstawiono wyznaczone doświadczalnie warunki chromatograficzne:

- stosowana kolumna kapilarna HP-5 MS; 30mx0.25nmx0.25µm
- gaz nośny: hel,
 - prędkość liniowa gazu nośnego: 35 cm/sek,
 - przepływ gazu nośnego: 0,85 ml/min
- regulacja ciśnienia EPC, program:
 - 35 psi (0.5 minuty) - 20 psi/minutę - 18 psi
- program temperaturowy kolumny chromatograficznej:
 - 50 °C przez 2 minuty
 - przyrost temperatury 10°C/minutę do 280°C
- temperatura dozownika: 290 °C
- temperatura detektora: 280 °C
- objętość nastrzyku: 1µl splitless
- czas przełączenia zaworu PURGE: 2 min
- czas analizy: 40 minut

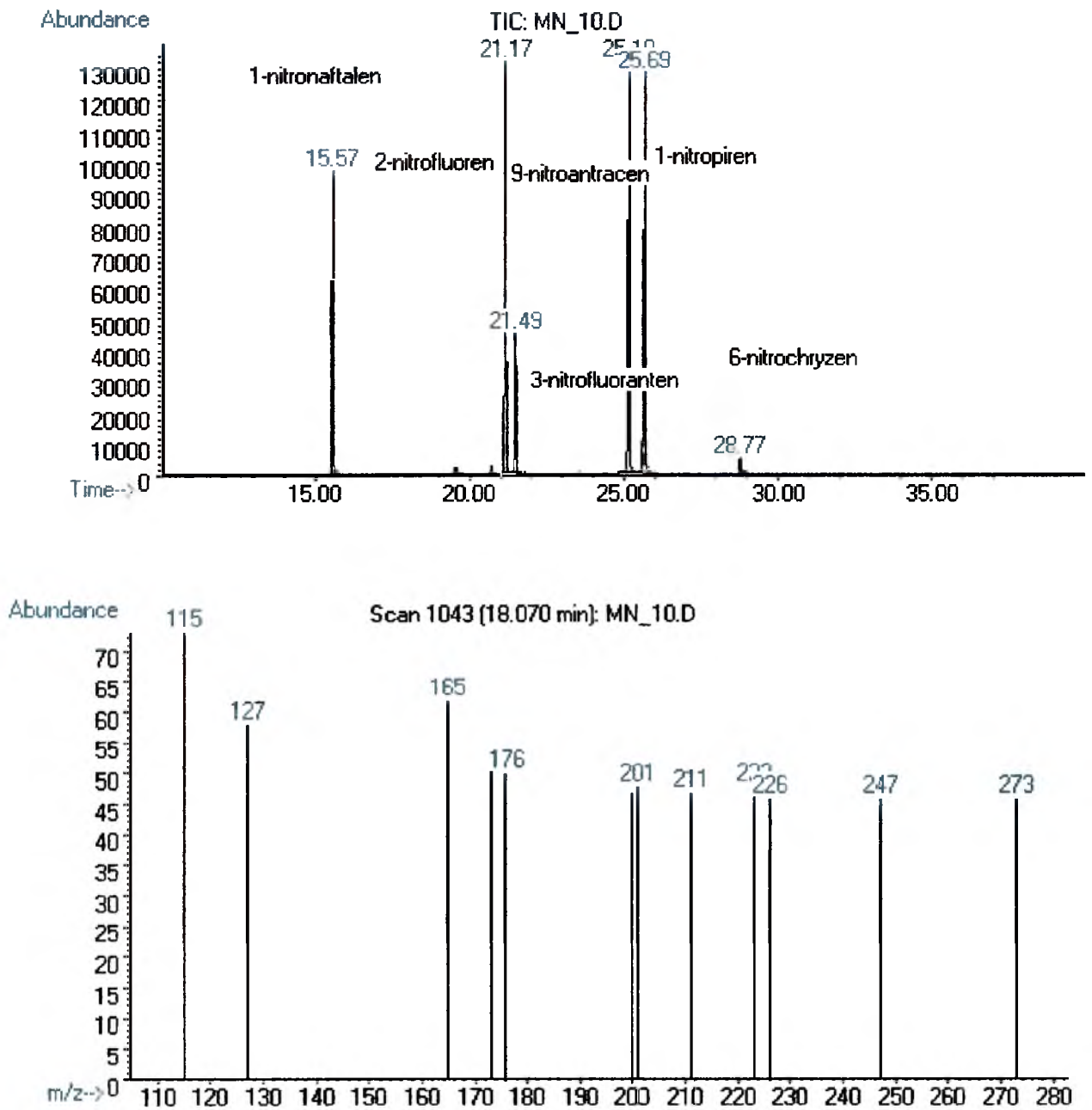
Analizy roztworów wzorcowych pośrednich mieszanin mono i dinitrowych pochodnych WWA według opracowanych parametrów chromatograficznych pozwoliły na uzyskanie zadawalającej selektywności metody opisanej w rozdziale „Elementy walidacji metody oznaczania nitrowych pochodnych WWA” w punkcie IV.11.5. Dane były zbierane poprzez „przemiatanie” (*scan*) oraz czulszym sposobem wykrywania wybranych jonów (SIM) [54].

Rysunki 2 i 3 przedstawiają chromatogramy mieszaniny mono i dinitro-WWA z odpowiadającymi każdemu związkowi jonami kwalifikującymi.

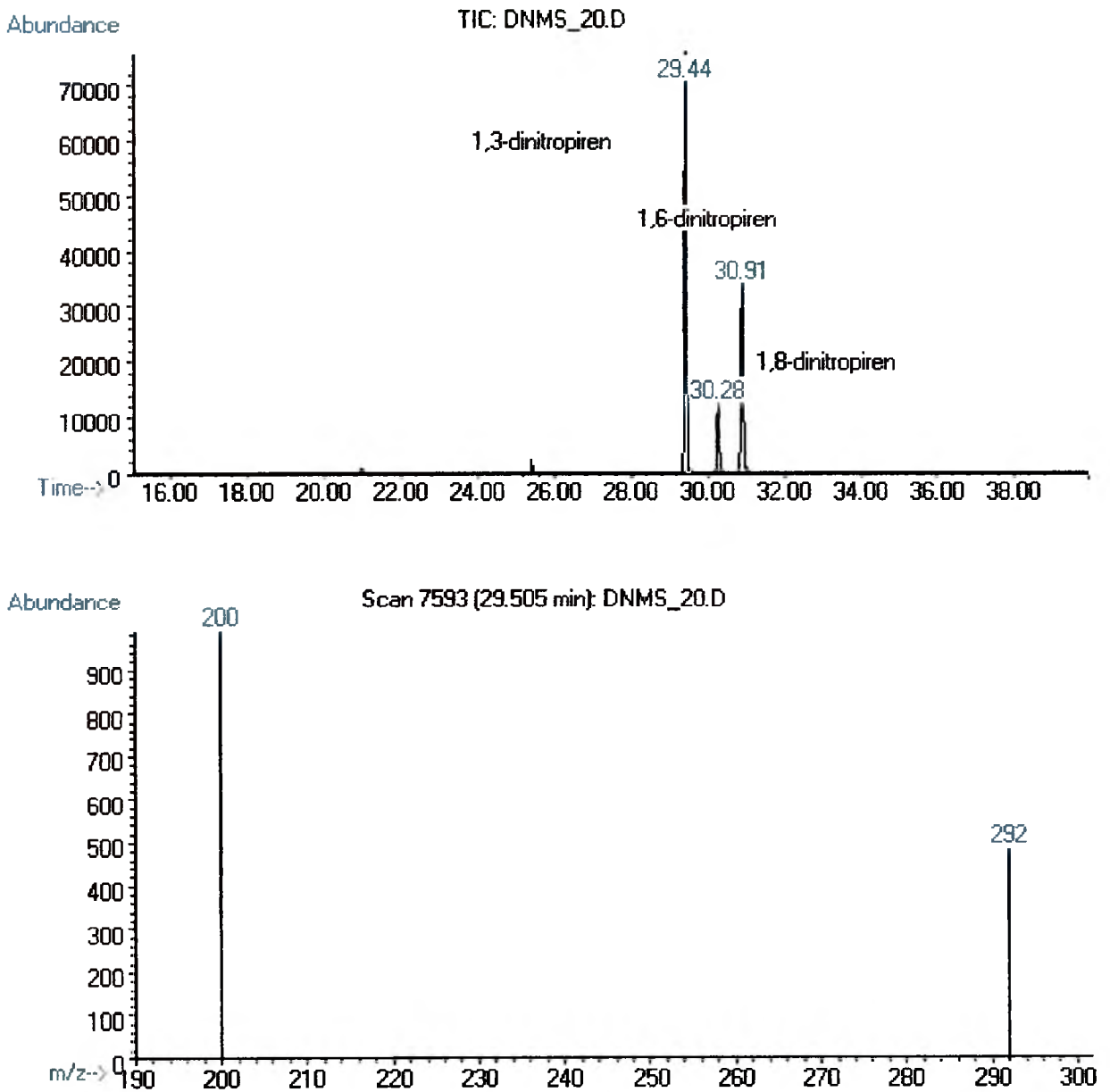
6-nitrochryzen dawał słaby sygnał dla niskich stężeń, a granica jego oznaczalności wynosiła 7 ng/m³. Ponieważ związek ten występuje w środowisku w niższych stężeniach został on wykluczony z dalszych analiz.

Tabela. 8. Czasy retencji oraz jony charakterystyczne badanych związków

L.p.	Nazwa związku	Czas retencji	Masa cząst.	Jon główny	Jony charakterystyczne		
1.	1-nitronaftalen	15,57	173,17	115	127	173	126
2.	2-nitrofluoren	21,17	211,22	165	211	164	163
3.	9-nitroantracen	21,49	223,23	223	176	177	165
4.	3-nitrofluoranten	25,10	247,26	247	200	217	189
5.	1-nitropiren	25,69	247,26	247	201	200	189
6.	6-nitrochryzen	28,77	273,3	273	226	215	227
7.	1,3-dinitropiren	29,44	292,25	292	200	-	-
8.	1,6-dinitropiren	30,28	292,25	292	200	-	-
9.	1,8-dinitropiren	30,91	292,25	292	200	-	-



Rysunek 2. Chromatogram mononitrowych pochodnych WWA wraz z jonami charakterystycznymi dla tych związków



Rysunek 3. Chromatogram dinitrowych pochodnych WWA wraz z jonami charakterystycznymi dla tych związków

IV.7. PRZYGOTOWANIE KRZYWEJ KALIBRACYJNEJ

Z roztworów wzorcowych roboczych mieszanin mono i dinitro-WWA wg pkt. IV.3.1.3. oraz IV.3.2.3. oraz mieszaniny WWA PM 610 przygotowano serię wzorców na sączkach Whatman o następujących stężeniach każdego ze związków 1,0; 0,5; 0,2; 0,1; 0,05⁸; oraz 0,02⁸ µg/ml.

Punkty do krzywej kalibracyjnej przygotowano w następujący sposób:

- stężenie 1,0 µg/ml - na sączek naniesiono 50 µl wzorca WWA; 50 µl roztworu wzorcowego pośredniego nitro-WWA; 50 µl roztworu wzorcowego pośredniego dinitro-WWA;
- stężenie 0,5 µg/ml - na sączek naniesiono 25 µl wzorca WWA; 25 µl roztworu wzorcowego pośredniego nitro-WWA; 25 µl roztworu wzorcowego pośredniego dinitro-WWA;
- stężenie 0,2 µg/ml - na sączek naniesiono 10 µl wzorca WWA; 10 µl roztworu wzorcowego pośredniego nitro-WWA; 10 µl roztworu wzorcowego pośredniego dinitro-WWA;
- stężenie 0,1 µg/ml - na sączek naniesiono 5 µl wzorca WWA; 5 µl roztworu wzorcowego pośredniego nitro-WWA; 5 µl roztworu wzorcowego pośredniego dinitro-WWA;
- stężenie 0,05 µg/ml - na sączek naniesiono 2,5 µl wzorca WWA; 2,5 µl roztworu wzorcowego pośredniego nitro-WWA;
- stężenie 0,02 µg/ml - na sączek naniesiono 1 µl wzorca WWA; 1 µl roztworu wzorcowego pośredniego nitro-WWA;

Przygotowano sześć czystych sączków - próbek ślepych. Tak przygotowane sączki umieszczono w gilzach ekstrakcyjnych i przeprowadzono ich ekstrakcję, następnie ekstrakty rozfrakcjonowano, suche ekstrakty rozpuszczono w 1 ml cykloheksanu, a poszczególne frakcje analizowano techniką chromatografii cieczowej oraz chromatografii gazowej GC/MS. Postępowano zgodnie z opracowaną metodyką opisaną w rozdziałach IV.5 i IV.6.

Sporządzono krzywe wzorcowe, które zamieszczono w punkcie IV.11.1. rozdziału „Elementy walidacji metody oznaczania nitrowych pochodnych WWA”.

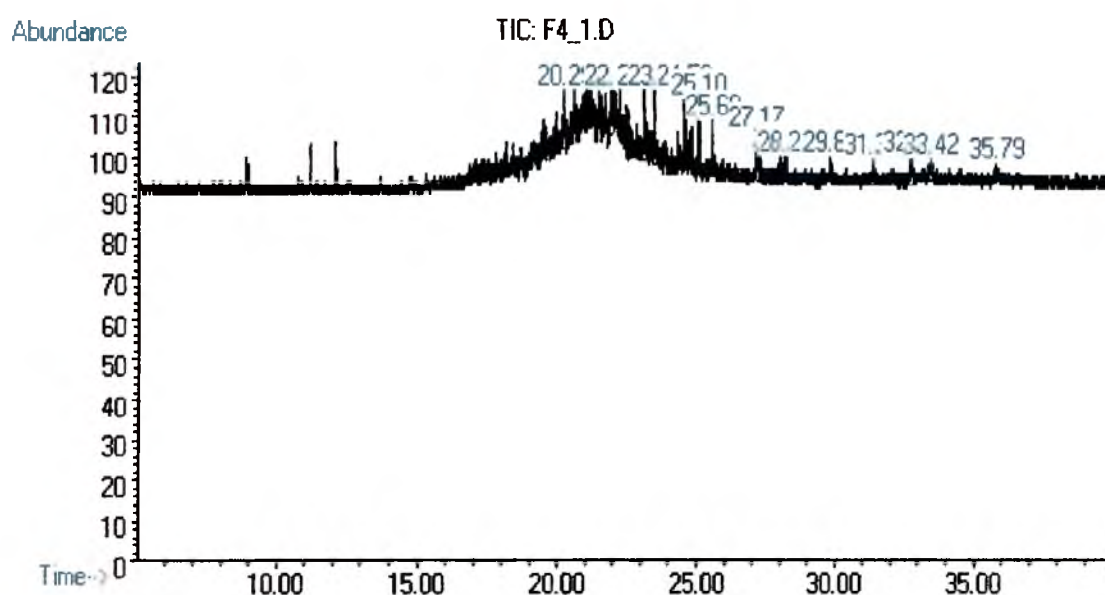
⁸ za wyjątkiem dinitro-WWA, ponieważ stężenia 0,02 oraz 0,05 są poniżej oznaczalności tych związków

IV.7.1. Analiza ślepych próbek

Wyniki uzyskane na podstawie analizy próbek ślepych zawiera tabela 9, natomiast rysunek 4 przedstawia przykładowy chromatogram próbki ślepej. W przypadku 3-nitrofluorantenu stwierdzono obecność sygnału analitycznego o średniej powierzchni pod pikiem wynoszącej 3365 u.j.p. w czasie retencji odpowiadającym próbce wzorcowej tego związku. Powierzchnia ta została uwzględniona w dalszej procedurze analitycznej.

Tabela 9. Wyniki analizy próbek ślepych

L.p.	Nazwa związku	Czas retencji	Pole powierzchni pod pikiem w próbce ślepej [u.j.p]					
			1	2	3	4	5	6
1.	1-nitronaftalen	15.57	-	-	-	-	-	-
2.	2-nitrofluoren	21.17	-	-	-	-	-	-
3.	9-nitroantracen	21.49	-	-	-	-	-	-
4.	3-nitrofluoranten	25.10	3452	3986	2840	3128	3421	-
5.	1-nitropiren	25.69	-	-	-	-	-	-
6.	6-nitrochryzen	28.77	-	-	-	-	-	-
7.	1,3-dinitropiren	29.44	-	-	-	-	-	-
8.	1,6-dinitropiren	30.28	-	-	-	-	-	-
9.	1,8-dinitropiren	30.91	-	-	-	-	-	-



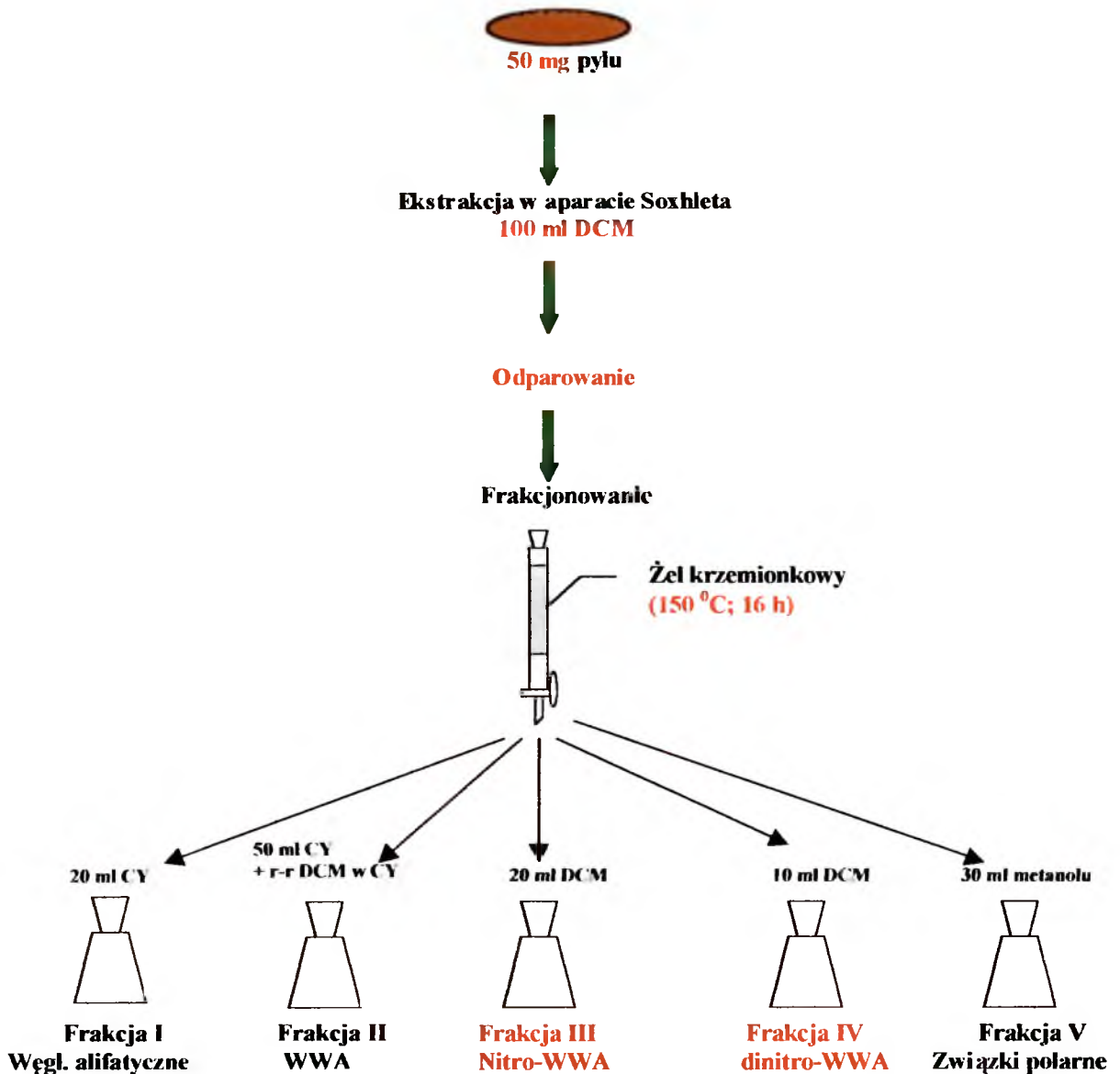
Rysunek 4. Przykładowy chromatogram próbki ślepej

IV.8. SPRAWDZENIE POPRAWNOŚCI OPRACOWANEJ METODY FRAKCJONOWANIA

W celu sprawdzenia poprawności opracowanego etapu frakcjonowania próbki analizowano chromatograficznie każdą z frakcji pod kątem obecności poszczególnych grup związków we frakcjach innych niż spodziewane. Do analizy wybrano próbki o stężeniach wyjściowych WWA, mononitro-WWA oraz dinitro-WWA: 1; 0,2; 0,05 µg/ml. Pod tym kątem szczegółowo również przeanalizowano kilka próbek środowiskowych. Na podstawie przeprowadzonych analiz stwierdzono, że:

- we frakcji I występowały oprócz węglowodorów alifatycznych niewielkie ilości WWA stanowiące od 0 do 8% całkowitej masy próbki
- we frakcji II występowały wyłącznie związki z grupy WWA
- we frakcji III występowały związki wyłącznie z grupy mononitrowych pochodnych WWA
- we frakcji IV występowały związki wyłącznie z grupy dinitrowych pochodnych WWA
- we frakcji V stwierdzono obecność mononitrowych pochodnych WWA w ilościach poniżej lub na granicy oznaczalności metody.

IV.9. SCHEMAT BLOKOWY OPRACOWANEJ METODY PRZYGOTOWANIA PRÓBEK DO OZNACZANIA NITRO-WWA



Schemat 4. Schemat blokowy opracowanej metody przygotowania próbek do oznaczania nitro-WWA ze wskazaniem elementów, w których wprowadzono zmiany w stosunku do metod znanych

IV.10. TESTY MUTAGENNOŚCI WYBRANYCH PRÓBEK

Właściwości rakotwórcze związków lub mieszanin mogą być zbadane poprzez zastosowanie krótkoterminowych testów z zakresu toksykologii genetycznej. Testy takie pozwalają stwierdzić uszkodzenie lub mutację w DNA co jest podstawowym zjawiskiem w procesie kancerogenezy. Bakteryjny test *Salmonella* (test Ames), który został wykorzystany w niniejszej pracy, jest bardzo dobrze przebadanym i szeroko stosowanym testem *in vitro* do oceny aktywności mutagennej ekstraktów z pyłów miejskich [18, 55].

W niniejszej pracy przebadano właściwości mutagenne dwóch frakcji jednej próbki pobranej w centrum miasta, w których oznaczono stężenia WWA oraz ich pochodnych nitrowych. Badania przeprowadzono w Zakładzie Toksykologii Genetycznej IMPiZŚ. Suche ekstrakty frakcji II i III zostały rozpuszczone w dimetylosulfotlenku (DMSO). Przy pomocy szczepu bakterii TA98, przebadano dwie dawki odpowiadające 2,5 oraz 5,0 m³ pobranego powietrza. Badanie przeprowadzono w dwóch wariantach: bez (-S9) i po zastosowaniu aktywacji metabolicznej (+S9) oraz w jednym powtórzeniu. Obliczano liczbę rewertantów indukowanych przez testowaną substancję dla dawki odpowiadającej 1 m³ przefiltrowanego powietrza. Termin rewertanty oznacza liczbę kolonii bakterii u których doszło do rewersji (odwrócenia) mutacji pierwotnej, mutacje indukowane powstają w następstwie działania na drobnoustroje czynnikami mutagennymi [18, 68]. Wszystkie płytki inkubowano w temp. +37°C, a kolonie rewertantów liczono po upływie 48 godzin.

IV.11. ELEMENTY WALIDACJI METODY OZNACZANIA NITROWYCH POCHODNYCH WWA

IV.11.1. Liniowość, czułość oraz zakres pomiarowy

Metoda jest liniowa dla takiego przedziału zawartości analitu w którym odpowiedź z urządzenia pomiarowego jest proporcjonalna do jego zawartości. Zależność tę przedstawia równanie krzywej kalibracyjnej [56]:

$$y=b \cdot x+a \quad 1)$$

gdzie:

- y - sygnał analityczny wzorca
- x - stężenie wzorca
- b - współczynnik nachylenia
- a - współczynnik przesunięcia

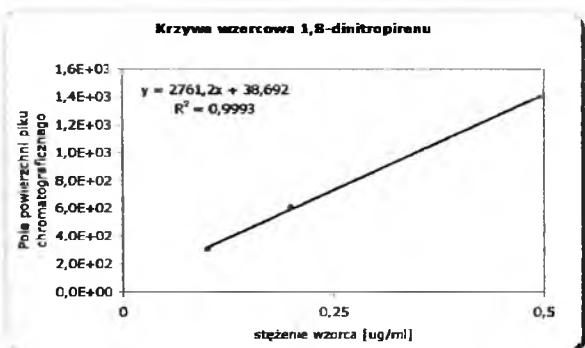
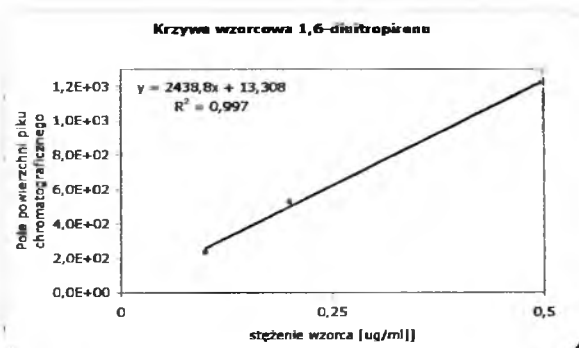
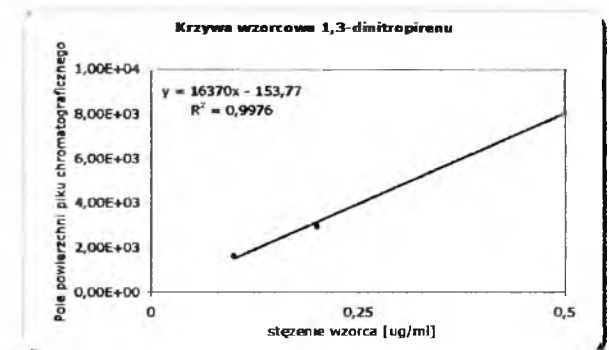
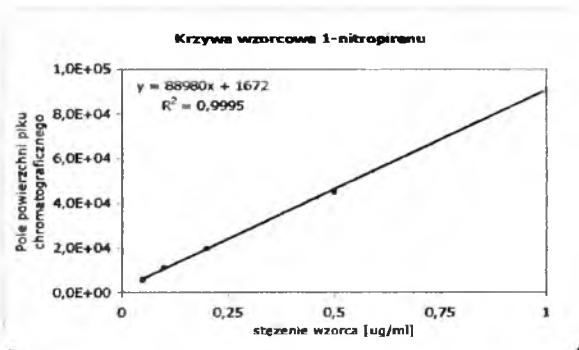
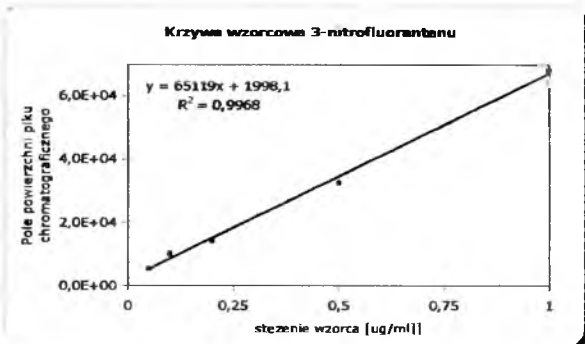
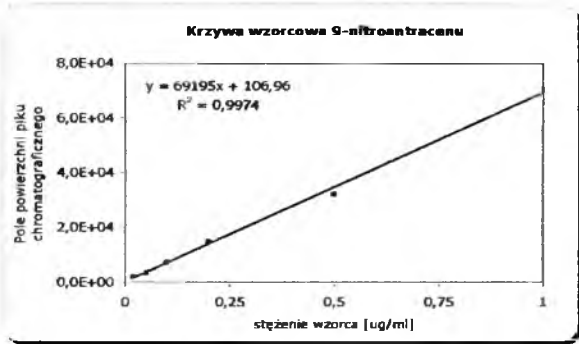
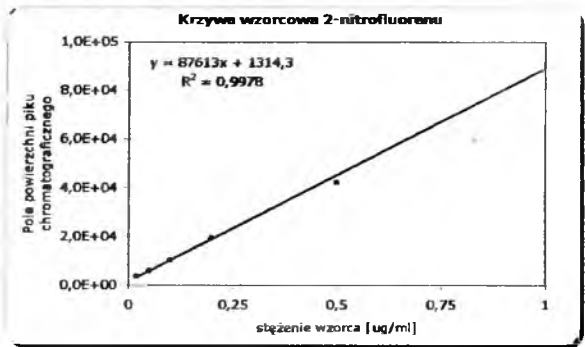
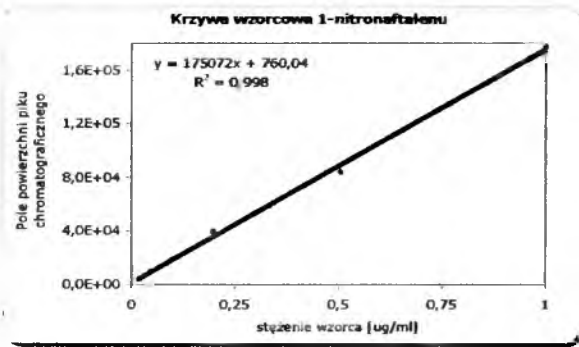
Liniowość charakteryzowana jest wartością współczynnika korelacji obliczanego na podstawie równania [56]:

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum (y_i - \bar{y})^2}} \quad 2)$$

- \bar{x} - średnia stężeń skali wzorców
- \bar{y} - średnia sygnałów analitycznych skali wzorców

Z liniowością bezpośrednio związane jest pojęcie czułości, która określa w jakim stopniu niewielka zmiana stężenia analitu spowoduje zmianę w sygnale urządzenia pomiarowego. Czułość metody jest określona przez wartość współczynnika kierunkowego (*b*) krzywej kalibracyjnej [56] i dla badanej metody analitycznej oznaczania nitrowych pochodnych WWA jest ona przedstawiona w tabeli 11.

Krzywa kalibracyjna opisywanej metodyki analitycznej obejmowała zakres 0,02 – 1,00 µg/ml mononitro-WWA oraz 0,1-1,0 µg/ml dinitro-WWA. Punkty kalibracyjne do krzywej wzorcowej przygotowano poprzez naniesienie mieszanin mono- i dinitrowych pochodnych WWA na sączek według pkt. IV.2.2.c oraz ekstrakcję, frakcjonowanie i oznaczanie związków zgodnie z pkt. IV.5.1., IV.5.2. oraz IV.6. Wykonywano trzy oznaczenia dla każdego stężenia, uzyskane w ten sposób trzy pola powierzchni pików chromatograficznych uśredniono. Równania krzywych kalibracyjnych oraz współczynniki determinacji poszczególnych związków przedstawiono na rysunku 5.



Rysunek 5. Krzywe kalibracyjne i równania regresji oznaczanych nitro-WWA

Ponieważ wartość współczynnika korelacji jest większa od 0,99 można stwierdzić, że opracowana metoda analityczna jest liniowa w zakresie stężeń dla których sporządzono roztwory wzorcowe [56].

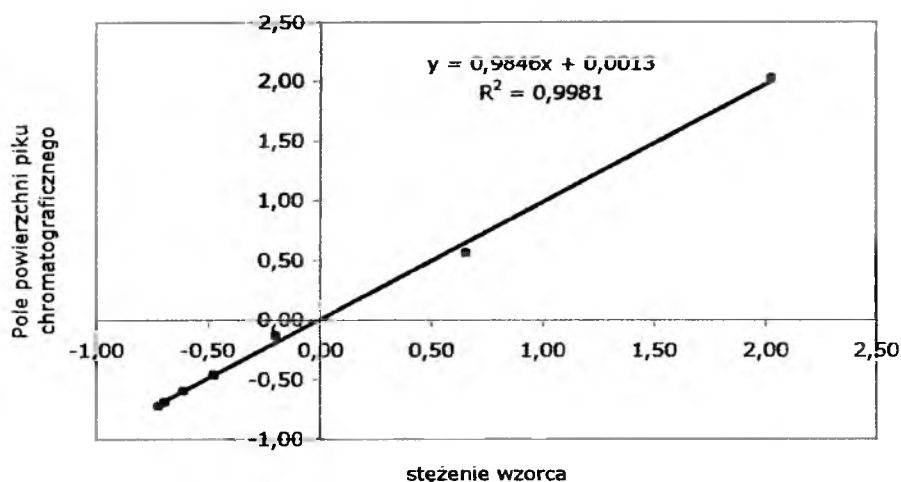
Wartości sygnałów (poła powierzchni pików) będących odpowiedzią na badane stężenie analitu są bardzo wysokie od około 1000 do prawie 180 000 u.j.p. w porównaniu z niskimi wartościami stężeń odkładanych na osi x. W związku z czym równania krzywych wzorcowych mają wysokie parametry regresyjne *a* i *b*. Porównanie rozkładu wartości wielu zmiennych jest możliwe po ich wcześniejszej standaryzacji. Standaryzacja danych powoduje, że otrzymane wyniki są całkowicie niezależne od jednostek pomiaru poszczególnych zmiennych. W praktyce polega ona na odjęciu średniej wartości od każdej danej i podzieleniu otrzymanej wartości przez wartość odchylenia standardowego danej serii wyników (*zależność 3*) [57, 58].

$$\bar{x}_{stand} = \frac{(x - \bar{x})}{s} \quad y_{stand} = \frac{(y - \bar{y})}{s} \quad 3)$$

Standaryzację danych przedstawiono na przykładzie 1-nitronaftalenu, a wyniki zawarto w tabeli 10. Rysunek 6 przedstawia krzywą wzorcową dla tego związku po standaryzacji danych.

Tabela 10. Zestawienie danych przed i po standaryzacji dla 1-nitronaftalenu

Stężenie wzorca [µg/ml] x	Sygnal analityczny wzorca [u.j.p.] y	Stężenie wzorca x_{stand} zgodnie z zależnością 3	Sygnal analityczny wzorca y_{stand} zgodnie z zależnością 3
1	2	3	4
0,02	3724	-0,69	-0,69
0,05	9709	-0,61	-0,59
0,1	18206	-0,47	-0,46
0,2	39506	-0,19	-0,13
0,5	84106	0,64	0,57
1	177745	2,03	2,03
$x_{sr}=0,27$	$y_{sr}=47778,29$		
SD=0,36	SD=64148,49		



Rysunek 6. Krzywa kalibracyjna 1-nitronaftalenu wyrysowana na podstawie danych uzyskanych w wyniku standaryzacji zawartych w tabeli 10 kolumny 3 i 4

W powyższy sposób przeprowadzono standaryzację danych dla pozostałych krzywych kalibracyjnych analizowanych związków. Na podstawie wzorów 4 i 5 obliczono wartości odchyłeń standardowych współczynników kierunkowych. Parametry regresyjne obliczone z danych po standaryzacji przedstawiono w tabeli 11.

$$s_b = \frac{s_{xy}}{\sqrt{n \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2}} \quad 4)$$

$$s_{xy} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - Y_i)^2}{n-2}} \quad 5)$$

gdzie:

- s_b - odchylenie standardowe współczynnika kierunkowego
- s_{xy} - szcztatkowe odchylenie standardowe współczynnika regresji
- n - ilość niezależnych oznaczeń dla roztworów wzorcowych, na podstawie których wyznaczano krzywą kalibracyjną
- Y_i - wartość obliczona na podstawie równania regresji

Tabela 11. Zestawienie parametrów regresyjnych badanych związków po standaryzacji danych

Nazwa związku	Współczynnik kierunkowy krzywej kalibracyjnej b CZUŁOŚĆ	Odchylenie standardowe współczynnika kierunkowego S_b	Współczynnik przesunięcia a	Współczynnik korelacji r
1	2	3	4	5
1-nitronaftalen	0,987	0,007	0,003	0,999
2-nitrofluoren	0,986	0,007	0,004	0,999
9-nitroantracen	0,986	0,009	0,004	0,998
3-nitrofluoranten	0,914	0,019	- 0,254	0,998
1-nitropiren	0,916	0,025	- 0,254	0,999
1,3-dinitropiren	1,008	0,021	0,016	0,998
1,6-dinitropiren	1,007	0,010	0,016	0,998
1,8-dinitropiren	1,008	0,018	0,016	0,999

IV.11.2. Precyzja

Precyzja wyraża stopień zgodności między niezależnymi wynikami analizy otrzymanymi w określonych warunkach laboratoryjnych. Za miarę precyzji przyjmuje się odchylenie standardowe dla danej serii pomiarowej próbek na stałym poziomie stężeń. Precyzja pośrednia służy do określenia długoterminowego odchylenia procesu pomiarowego, do jej obliczenia wykorzystuje się dane uzyskane w danym laboratorium w kilkutygodniowym okresie czasu [56, 59, 60].

Za miarę precyzji, precyzji pośredniej oraz powtarzalności przyjmuje się wartość odchylenia standardowego (6), względnego odchylenia standardowego (7), lub współczynnika zmienności (8) [56].

Odchylenie standardowe [56] jest definiowane jako rozrzut uzyskanych wyników oznaczeń wokół wartości średniej i opisywane jest przez zależność:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad 6)$$

gdzie:

- x_i -wartość wyniku pojedynczego oznaczenia
- \bar{x} -średnia arytmetyczna z uzyskanych wyników
- n -liczba uzyskanych wyników

Względne odchylenie standardowe [56] (*RSD-relative standard deviation*) opisuje zależność:

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \quad 7)$$

Współczynnik zmienności [56] (*CV-coefficient of variation*) jest obliczany według wzoru:

$$CV = RSD \cdot 100\% \quad 8)$$

Precyzja obliczona dla wyników pochodzących z tego samego laboratorium nosi nazwę powtarzalności [60].

Precyzję oznaczeń wyznaczono na podstawie 6 niezależnych oznaczeń dla analitów występujących na trzech poziomach stężeń zakresu pomiarowego. W tym celu przygotowano próbki modelowe zawierające mono- i dinitrowe pochodne WWA o następujących stężeniach: 1; 0,5 oraz 0,2 $\mu\text{g/ml}$. Próbki te poddano ekstrakcji, frakcjonowaniu i odparowaniu zgodnie z pkt. IV.5 oraz oznaczano techniką chromatografii gazowej ze spektrometrią mas wg pkt. IV.6. Wyniki oznaczeń poszczególnych związków w badanych próbkach jak również wartości średnie dla każdej serii, wartości odchyłeń standardowych oraz współczynników zmienności przedstawiają tabele 12-17.

Tabela 12. Stężenia mononitrowych pochodnych WWA [$\mu\text{g/ml}$] w próbkach modelowych o stężeniu wyjściowym wzorca 1 $\mu\text{g/ml}$

Powtórzenie	1-nitro naftalen	2-nitro fluoren	9-nitro antracen	3-nitro fluoranten	1-nitro piren
1	0,68	0,83	0,67	0,63	0,63
2	0,69	0,89	0,69	0,71	0,73
3	0,67	0,72	0,65	0,56	0,58
4	0,67	0,76	0,66	0,62	0,64
5	0,67	0,78	0,64	0,63	0,66
6	0,64	0,69	0,61	0,56	0,59
średnia	0,67	0,78	0,65	0,62	0,64
Odchylenie standardowe	0,017	0,073	0,027	0,056	0,054
CV%	2,50	9,39	4,18	9,00	8,49

Tabela 13. Stężenia mononitrowych pochodnych WWA [$\mu\text{g/ml}$] w próbkach modelowych o stężeniu wyjściowym wzorca 0,5 $\mu\text{g/ml}$

Powtórzenie	1-nitro naftalen	2-nitro fluoren	9-nitro antracen	3-nitro fluoranten	1-nitro piren
1	0,39	0,37	0,38	0,44	0,43
2	0,39	0,39	0,37	0,43	0,42
3	0,38	0,43	0,36	0,41	0,38
4	0,39	0,42	0,37	0,35	0,37
5	0,38	0,41	0,35	0,42	0,43
6	0,43	0,36	0,37	0,38	0,41
średnia	0,39	0,40	0,37	0,41	0,41
Odchylenie standardowe	0,019	0,028	0,010	0,034	0,026
CV%	4,73	7,07	2,82	8,37	6,35

Tabela 14. Stężenia mononitrowych pochodnych WWA [$\mu\text{g/ml}$] w próbkach modelowych o stężeniu wyjściowym wzorca 0,2 $\mu\text{g/ml}$

Powtórzenie	1-nitro naftalen	2-nitro fluoren	9-nitro antracen	3-nitro fluoranten	1-nitro piren
1	0,11	0,17	0,13	0,16	0,15
2	0,12	0,16	0,14	0,16	0,15
3	0,12	0,17	0,16	0,18	0,18
4	0,11	0,16	0,15	0,17	0,16
5	0,11	0,16	0,17	0,18	0,18
6	0,13	0,17	0,15	0,17	0,18
średnia	0,12	0,17	0,15	0,17	0,17
Odchylenie standardowe	0,008	0,005	0,014	0,009	0,015
CV%	7,00	3,32	9,43	5,26	9,03

Tabela 15. Stężenia dinitrowych pochodnych WWA [$\mu\text{g/ml}$] w próbkach modelowych o stężeniu wyjściowym wzorca 1 $\mu\text{g/ml}$

Powtórzenie	1,3-dinitro piren	1,6-dinitro piren	1,8-dinitro piren
1	0,62	0,57	0,65
2	0,6	0,68	0,69
3	0,67	0,66	0,66
4	0,63	0,68	0,63
5	0,64	0,63	0,77
6	0,68	0,61	0,69
średnia	0,64	0,64	0,68
Odchylenie standardowe	0,030	0,044	0,049
CV%	4,74	6,82	7,21

Tabela 16. Stężenia dinitrowych pochodnych WWA [$\mu\text{g/ml}$] w próbkach modelowych o stężeniu wyjściowym wzorca 0,5 $\mu\text{g/ml}$

Powtórzenie	1,3-dinitro piren	1,6-dinitro piren	1,8-dinitro piren
1	0,38	0,33	0,32
2	0,39	0,37	0,36
3	0,41	0,41	0,42
4	0,39	0,39	0,41
5	0,32	0,38	0,36
5	0,41	0,42	0,38
średnia	0,38	0,38	0,38
Odchylenie standardowe	0,033	0,032	0,037
CV%	8,68	8,36	9,80

Tabela 17. Stężenia dinitrowych pochodnych WWA [$\mu\text{g/ml}$] w próbkach modelowych o stężeniu wyjściowym wzorca 0,2 $\mu\text{g/ml}$

Powtórzenie	1,3-dinitro piren	1,6-dinitro piren	1,8-dinitro piren
1	0,15	0,16	0,17
2	0,13	0,14	0,14
3	0,17	0,17	0,16
4	0,11	0,13	0,14
5	0,16	0,17	0,16
5	0,13	0,14	0,11
średnia	0,14	0,15	0,15
Odchylenie standardowe	0,022	0,017	0,022
CV%	15,73	11,36	14,73

Ogólne odchylenie standardowe [56] metodyki analitycznej wyznaczono na podstawie wszystkich serii pomiarowych w oparciu o zależność:

$$s_g = \sqrt{\frac{1}{k} \sum_{i=1}^k s_i^2} \quad 9)$$

gdzie:

k - liczba serii

s_i - odchylenie standardowe danej serii pomiarowej

Wartość precyzji pośredniej przedstawiona jako odchylenie standardowe metodyki analitycznej (s_g), oraz obliczone na jego podstawie względne odchylenie standardowe *RSD* jak również współczynnik zmienności *CV* dla badanych związków mononitrowych pochodnych WWA wynosi odpowiednio:

1-nitro naftalen	2-nitro fluoren	9-nitro antracen	3-nitro fluoranten	1-nitro piren
$x_{\text{sr}}=0,39$	$x_{\text{sr}}=0,45$	$x_{\text{sr}}=0,39$	$x_{\text{sr}}=0,40$	$x_{\text{sr}}=0,40$
$s_g=0,015$	$s_g=0,045$	$s_g=0,019$	$s_g=0,038$	$s_g=0,036$
$RSD=0,04$	$RSD=0,10$	$RSD=0,05$	$RSD=0,10$	$RSD=0,09$
$CV=3,87\%$	$CV=10,14\%$	$CV=4,80\%$	$CV=9,55\%$	$CV=8,85\%$

gdzie x_{sr} średnia arytmetyczna uzyskana ze wszystkich wyników

natomiast w przypadku dinitrowych pochodnych WWA wartości te wynoszą:

1,3-dinitro piren	1,6-dinitro piren	1,8-dinitro piren
$x_{\text{sr}}=0,39$	$x_{\text{sr}}=0,39$	$x_{\text{sr}}=0,40$
$s_g=0,029$	$s_g=0,033$	$s_g=0,038$
$RSD=0,07$	$RSD=0,08$	$RSD=0,09$
$CV=7,47\%$	$CV=8,38\%$	$CV=9,37\%$

gdzie x_{sr} średnia arytmetyczna uzyskana ze wszystkich wyników

IV.11.3. Granica wykrywalności i granica oznaczalności

Pojęcie granicy wykrywalności (*LOD - limit of detection*) oznacza najmniejsze stężenie lub ilość wykrywanego składnika jakie jest możliwe do wykrycia za pomocą danej metody analitycznej. Jest to najmniejsze stężenie możliwe do oznaczenia. Na podstawie granicy wykrywalności można jakościowo stwierdzić obecność danego składnika w analizowanej

próbce. Granica oznaczalności (*LOQ - limit of quantification*) określa najmniejsze stężenie składnika możliwe do ilościowego oznaczenia daną metodą analityczną z założoną dokładnością i precyzją. Wartość granicy wykrywalności jest zwykle 2-3 razy mniejsza od granicy oznaczalności [56, 60, 61].

W celu wyznaczenia granicy oznaczalności analizowanych związków sporządzono z roztworów wzorcowych pośrednich dodatkowo roztwory robocze o następujących stężeniach: 0,015; 0,01; 0,005; 0,001 $\mu\text{g/ml}$ oraz poddano je analizie chromatograficznej. Wyznaczone w ten sposób najmniejsze stężenia możliwe do oznaczenia ilościowego po uwzględnieniu wartości odzysku (tab. 19) oraz przeliczeniu na objętość pobranego powietrza będące granicą oznaczalności dla analizowanych związków zawarte są w tabeli 18. Granicę wykrywalności [56] obliczono zgodnie z zależnością:

$$LOD = \frac{LOQ}{3} \quad 10)$$

Tabela 18. Granica oznaczalności i wykrywalności metody oznaczania nitropochodnych WWA w powietrzu techniką GC/MS

Nazwa związku	Oznaczalność LOQ			Wykrywalność LOQ/3		
	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/m}^3$ przy poborze 150 m^3 powietrza	ng/m^3	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/m}^3$ przy poborze 150 m^3 powietrza	ng/m^3
1-nitronaftalen	0,01	9,26E-05	0,09	0,005	3,09E-05	0,03
2-nitrofluoren	0,01	8,63E-05	0,09	0,004	2,88E-05	0,03
9-nitroantracen	0,01	8,69E-05	0,09	0,004	2,90E-05	0,03
3-nitrofluoranten	0,01	8,41E-05	0,08	0,004	2,80E-05	0,03
1-nitropiren	0,01	8,83E-05	0,09	0,004	2,94E-05	0,03
1,3-dinitropiren	0,07	4,49E-04	0,45	0,02	1,50E-04	0,15
1,6-dinitropiren	0,07	4,57E-04	0,46	0,02	1,52E-04	0,15
1,8-dinitropiren	0,07	4,47E-04	0,45	0,02	1,49E-04	0,15

Ponieważ spełnione są następujące warunki [56]:

$$10 \text{ LOD} > c_{\min} \quad \text{oraz} \quad \text{LOD} < c_{\min} \quad 11)$$

gdzie:

c_{\min} - najmniejsze stężenie analitu w próbkach wzorcowych

granica wykrywalności jest wyznaczona poprawnie.

IV.11.4. Odzysk

Wartość odzysku zbadano poprzez przygotowanie czterech serii pomiarowych (każda w innym zakresie stężeń) dla każdej serii wykonano sześć powtórzeń. Próbki przygotowano w ten sposób, że na sącdek z włókna szklanego naniesiono 2; 0,5; 0,2; oraz 0,1 μg każdego z badanych mono i dinitropochodnych WWA, następnie postępowano zgodnie z punktami IV.5 i IV.6. dotyczącymi przygotowania i analizy próbek. Do odczytania ilości oznaczanych związków wykorzystano krzywą kalibracyjną uzyskaną z analizy roztworów wzorcowych roboczych przygotowanych wg pkt. IV.3.1.3 oraz IV.3.2.3. Wartość odzysku obliczono według wzoru [56]:

$$\%R = \frac{x_{\text{sr}}}{c} \cdot 100\% \quad 12)$$

gdzie:

$\%R$ - odzysk analitu dla danej metodyki analitycznej

x_{sr} - wartość średnia uzyskanych wyników oznaczeń

c - stężenie analitu w próbkach wzorcowych

Wyniki tych obliczeń zawiera tabela 19.

Tabela 19. Wartość odzysku dla poszczególnych nitrowych pochodnych WWA badanej metodyki analitycznej

Nazwa związku	Średnia z 6 analizowanych próbek o stężeniu wyjściowym [$\mu\text{g}/\text{ml}$]				Wartość odzysku %				Średnia wartość odzysku %
	2	0,5	0,2	0,1	2	0,5	0,2	0,1	
1-nitronaftalen	1,4	0,39	0,16	0,06	70	78	80	60	72,0
2-nitrofluoren	1,4	0,42	0,15	0,08	70	84	75	80	77,3
9-nitroantracenen	1,6	0,41	0,17	0,06	80	82	85	60	76,8
3-nitrofluoranten	1,6	0,36	0,17	0,08	80	72	85	80	79,3
1-nitropiren	1,6	0,41	0,16	0,06	80	82	80	60	75,5
1,3-dinitropiren	1,4	0,41	0,17	0,06	70	82	85	60	74,3
1,6-dinitropiren	1,4	0,41	0,16	0,06	70	82	80	60	73,0
1,8-dinitropiren	1,5	0,39	0,17	0,06	75	78	85	60	74,5

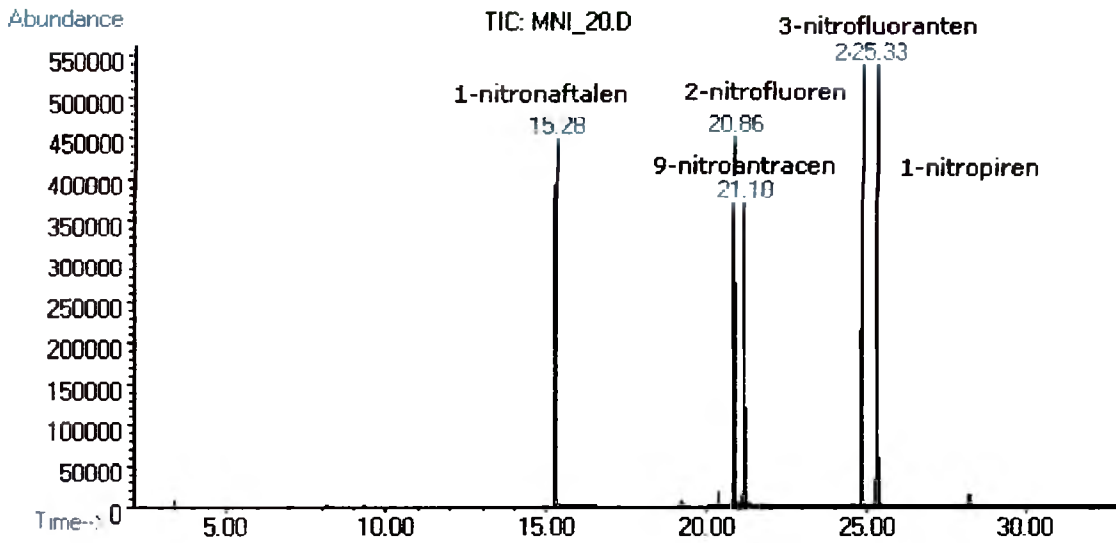
IV.11.5. Selektowność metody

Metoda selektywna pozwala na rozróżnienie i oznaczenie składnika w złożonej mieszaninie bez zakłóceń ze strony innych składników [60].

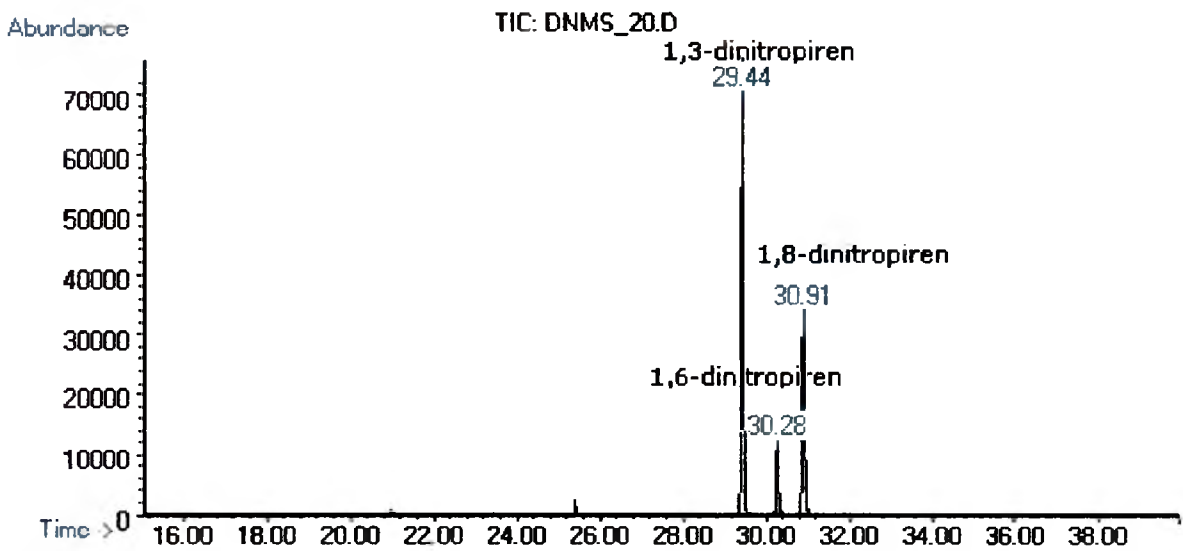
Opracowana metoda analityczna oznaczania nitrowych pochodnych WWA techniką chromatografii gazowej ze spektrometrią mas jest selektywna. Frakcjonowanie mieszaniny nitrowych pochodnych pozwoliło na rozdzielenie mononitrowych pochodnych WWA od dinitrowych pochodnych WWA. Analizując każdą z frakcji (frakcję III zawierającą mononitrowe pochodne WWA oraz frakcję IV zawierającą dinitrowe pochodne WWA) zgodnie z opracowanymi warunkami chromatograficznymi opisanymi w pkt. IV.6. uzyskano zadawalający rozdział badanych mieszanin. Czasy retencji badanych związków są następujące:

Nazwa związku	Czas retencji [minuta]
1-nitronaftalen	15,28
2-nitrofluoren	20,86
9-nitroantracen	21,19
3-nitrofluoranten	24,86
1-nitropiren	25,34
1,3-dinitropiren	29,44
1,6-dinitropiren	30,28
1,8-dinitropiren	30,91

Chromatogramy próbek wzorcowych mono i dinitropochodnych WWA analizowanych opracowaną metodą przedstawiają rysunki 7 i 8.



Rysunek 7. Chromatogram próbki wzorca mononitrowych pochodnych WWA



Rysunek 8. Chromatogram próbki wzorca dinitrowych pochodnych WWA

IV.11.6. Dokładność

Metoda dokładna jest to taka metoda, która daje wyniki bliskie wartości rzeczywistej [61]. Na dokładność metody analitycznej największy wpływ ma wartość błędu systematycznego oraz precyzja metody. Dokładność metody może być oszacowana poprzez porównanie uzyskanej wartości pomiaru z wartością otrzymaną poprzez zastosowanie metodyki odniesienia lub przeprowadzenie analizy certyfikowanego materiału odniesienia z wykorzystaniem ocenianej metodyki analitycznej [56, 62].

Dokładność metody oznaczania nitrowych pochodnych WWA techniką chromatografii gazowej ze spektrometrią mas sprawdzono przeprowadzając analizę certyfikowanego materiału odniesienia.

Certyfikowane materiały odniesienia: SRM 1587 oraz SRM 1975 (SRM-Standard Reference Material) zostały sprowadzone z National Institute of Standards and Technology (NIST, USA).

IV.11.6.1. Dokładność oznaczania techniką GC/MS

Certyfikowany materiał odniesienia SRM 1587 – nitrowe pochodne wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w metanolu zawiera certyfikowane stężenia dla siedmiu nitro-WWA. Wartość certyfikowana w materiale odniesienia została oszacowana na podstawie wyników analiz 6 próbek techniką GC-FID oraz 16 próbek techniką HPLC z detekcją UV. Certyfikat stanowi załącznik 1 do pracy.

W celu przeprowadzenia analizy próbki materiału odniesienia, próbkę podzielono na dwie równe części, odparowano w atmosferze azotu, zalano 1 ml cykloheksanu oraz w celu uzyskania całkowitej rozpuszczalności związków poddano działaniu ultradźwięków w myjce ultradźwiękowej przez 30 sekund. Następnie próbkę tą poddano analizie chromatograficznej GC/MS. Sporządzono krzywą kalibracyjną o zakresie stężeń który będzie obejmował spodziewane stężenia w badanym materiale odniesienia. Z roztworu wzorcowego pośredniego o stężeniu 0,02 mg/ml przygotowano i zanalizowano następujące punkty do krzywej kalibracyjnej: 7,5; 5, 2 oraz 1 $\mu\text{g/ml}$. Średnie stężenie z dwóch analizowanych próbek certyfikowanego materiału odniesienia pomnożone przez dwa oraz wartości certyfikowane zostały przedstawione w tabeli 20.

Tabela 20. Wyniki oznaczeń certyfikowanego materiału odniesienia oraz wartości certyfikowane SRM 1587

Nazwa związku	Wartość certyfikowana dla SRM 1587 μ [$\mu\text{g/ml}$]	Średnia wartość oznaczona \bar{x}_{sr} [$\mu\text{g/ml}$]	Różnica między wartością oczekiwaną a wartością średnią $\mu - \bar{x}_{sr}$	Procent odzysku wartości oczekiwanej $\%R = \frac{\bar{x}_{sr}}{\mu} \cdot 100\%$
2-nitrofluoren	$7,64 \pm 0,31$	$7,30 \pm 0,10$	0,34	96 %
9-nitroantracen	$3,96 \pm 0,09$	$3,84 \pm 0,05$	0,12	97 %
3-nitrofluoranten	$7,30 \pm 0,05$	$6,82 \pm 0,25$	0,48	94 %
1-nitropiren	$7,07 \pm 0,22$	$6,56 \pm 0,18$	0,51	93 %
7-nitrobenzo(a)antracen	$7,32 \pm 0,18$	Nie oznaczano	-	-
6-nitrochryzen	$6,42 \pm 0,09$	Nie oznaczano	-	-

Istotność różnicy pomiędzy wartością uzyskaną, a wartością certyfikowaną sprawdzono poprzez:

IV.11.6.1.1. Porównanie wartości wyniku z wartością odniesienia przy zastosowaniu testu t-Studenta

W tym celu dla poszczególnych związków obliczono parametr t-Studenta [56] zgodnie z zależnością:

$$t = \frac{|\bar{x} - \mu|}{s} \cdot \sqrt{n} \quad 13)$$

gdzie:

- \bar{x} - średnia arytmetyczna z uzyskanych wyników
- μ - wartość odniesienia
- s - odchylenie standardowe wyników uzyskanych
- n - liczba wyników

Uzyskano następujące wyniki

2-nitro fluoren	9-nitro antracen	3-nitro fluoranten	1-nitro piren
t=4,80	t=3,39	t=2,71	t=4,00

Wartość krytyczna rozkładu t-Studenta dla $\alpha=0,05$ i $f=n-1=1$ wynosi (odczytana z tablic rozkładów statystycznych [56]):

$$t_{kr}(0,05; 1)=12,706$$

A zatem spełniona jest zależność: $t < t_{kr}$ dla wszystkich związków i wynik można uznać za zgodny z wartością odniesienia.

IV.11.6.1.2. Porównanie wartości wyniku z wartością odniesienia z uwzględnieniem niepewności

Postępowanie polega na sprawdzeniu czy spełniona jest nierówność 14, jeżeli tak, to wynik uznawany jest za zgodny z wartością odniesienia [56]:

$$|x_i - \mu| < 2\sqrt{u(x_i)^2 + u(\mu)^2} \quad 14)$$

gdzie:

- x_i -wartość wyniku oznaczenia
- $u(x_i)$ -niepewność oznaczenia
- $u(\mu)$ -niepewność wartości odniesienia

Za wartość niepewności pomiaru przyjęto standardową niepewność pomiaru obliczoną jako odchylenie standardowe dla wartości oznaczenia [56, 63], natomiast dla wartości odniesienia przyjęto za miarę niepewności wartość odchylenia standardowego podaną przez producenta materiału odniesienia. Uzyskano następujące wyniki:

	2-nitro fluoren	9-nitro antracen	3-nitro fluoranten	1-nitro piren
$ x_i - \mu $	0,34	0,12	0,48	0,51
$2\sqrt{u(x_i)^2 + u(\mu)^2}$	0,65	0,20	0,51	0,57

Spełniona jest zależność 14 dla wszystkich związków i wynik można uznać za zgodny z wartością odniesienia.

Obydwa sposoby porównania wartości oznaczonej z wartością odniesienia dowodzą, że wyniki te nie różnią się między sobą w sposób istotny statystycznie.

IV.11.6.2. Dokładność metody oznaczania nitro-WWA

W celu sprawdzenia dokładności metody oznaczania nitropochodnych WWA w zakresie przygotowania próbki wykorzystano certyfikowany materiał odniesienia SRM 1975 Diesel Particulate Extract. Materiał ten zawiera ampułki o objętości 1,2 ml dichlorometanowego ekstraktu cząstek spalin Diesla (0,8 g każda) z silnika wózka widłowego napędzanego olejem napędowym. Wartości certyfikowane są średnią z dwóch lub więcej niezależnych metod analitycznych, natomiast wartości referencyjne są wartością średnią z jednej lub dwóch metod analitycznych.

Wartości certyfikowane dla wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w SRM 1975 są otrzymywane poprzez zastosowanie różnych metod rozdzielania chromatograficznego oraz różnych technik detekcji. Próbki są przygotowywane poprzez ekstrakcję 5,7 kg cząstek spalin Diesla chlorkiem metylenu. Ekstrakty są oczyszczane poprzez zastosowanie techniki ekstrakcji do fazy stałej (SPE - solid phase extraction) lub chromatografii cieczowej w normalnym układzie faz. Następnie roztwór jest zatężony do objętości 8 L i rozdzielany na 1,2 ml ampułki. Próbki analizowane są techniką chromatografii cieczowej z detekcją fluorescencyjną lub chromatografii gazowej ze spektrometrią mas z zastosowaniem dwóch kolumn o różnym rozdziale WWA.

Wartości odniesienia dla nitro-WWA w SRM 1975 są uzyskiwane poprzez przeprowadzanie analizy próbek w NIST oraz w dwóch innych laboratoriach z zastosowaniem dodatku wzorca wewnętrznego w postaci: 9-nitroantracenu-d₉; 3-nitrofluorantenu-d₉; 1-nitropirenu-d₉ oraz 6-nitrochryzenu-d₁₁. Frakcję nitro-WWA izoluje się techniką chromatografii cieczowej w normalnym układzie faz, a oznaczanie przeprowadza się z zastosowaniem techniki chromatografii gazowej GC/MS z negatywną jonizacją chemiczną (NICI). Dodatkowo dwa niezależne laboratoria przeprowadzają badania stosując tą sama technikę oznaczania nitro-WWA.

Certyfikat materiału odniesienia SRM 1975 stanowi załącznik 2 do pracy.

Dwa ekstrakty opisanego wyżej materiału odniesienia naniesiono na kolumny frakcjonujące i postępowano według pkt. IV.5. i IV.6., wyniki oznaczeń oraz różnicę między wartością średnią a wartością odniesienia zamieszczono w tabeli 21.

Badany materiał posiadał wartości certyfikowane dla ośmiu związków z grupy wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych, z których wybrano do porównania pięć WWA rutynowo oznaczanych w laboratorium oraz będących składnikami wzorca PM 610.

Certyfikat zawierał wartości odniesienia dla 18 nitro- i dinitropochodnych WWA, porównaniu służyły jedynie 3 mononitro pochodne oraz 3 dinitropochodne WWA, które oznaczano opracowaną metodą analityczną.

Tabela 21. Wyniki oznaczeń certyfikowanego materiału odniesienia oraz wartości referencyjne i certyfikowane WWA i nitro-WWA

Nazwa związku	Wartość certyfikowana dla SRM 1975 μ [$\mu\text{g/ml}$]*	Średnia wartość oznaczona \bar{x}_{sr} [$\mu\text{g/ml}$]	Różnica między wartością oczekiwaną a wartością średnią $\mu - \bar{x}_{sr}$	Procent odzysku wartości oczekiwanej $\%R = \frac{\bar{x}_{sr}}{\mu} \cdot 100\%$
Frakcja II				
Fluoranten	10,8±0,48	8,119±0,284	2,681	75,2
Chryzen	1,56±0,06	1,551±0,111	0,009	99,5
Benzo(a)antracen	0,07±0,012	0,065±0,002	0,005	92,5
Benzo(b)fluoranten	2,56±0,08	2,080±0,230	0,480	81,2
Benzo(k)fluoranten	0,14±0,04	0,138±0,002	0,002	98,3
Frakcja III				
9-nitroantracen	1,088±0,024**	0,807±0,092	0,281	74,2
3-nitrofluoranten	1,176±0,008**	1,145±0,120	0,031	97,4
1-nitropiren	13,12±0,16**	12,145±1,280	0,975	92,6
Frakcja IV				
1,3-dinitropiren	0,48±0,008**	p.o.	-	-
1,6-dinitropiren	1,112±0,032**	p.o.	-	-
1,8-dinitropiren	1,240±0,016**	p.o.	-	-

* Wartości referencyjne i certyfikowane są pierwotnie podane w mg/kg masy frakcji i zostały one przeliczone na jednostkę $\mu\text{g/ml}$

** Wartości referencyjne dla SRM 1975

IV.11.6.2.1. Porównanie wartości wyniku z wartością odniesienia przy zastosowaniu testu t-Studenta

Zgodnie z zależnością 13 obliczono parametr t-Studenta oraz znaleziono wartość krytyczną rozkładu t-Studenta która dla $\alpha=0,05$ i $f=n-1=1$ wynosi: $t_{kr}(0,05; 1)=12,706$.

Wyniki przedstawiono poniżej:

Fluoranten	t=13,344
Chryzen	t=0,109
Benz(a)antracen	t=3,155
Benzo(b)fluoranten	t=2,959
Benzo(k)fluoranten	t=1,834
9-nitroantracen	t=4,321
3-nitrofluoranten	t=0,365
1-nitropiren	t=1,077

Za wyjątkiem fluorantenu dla wszystkich pozostałych związków spełniona jest zależność: $t < t_{kr}$ i wynik można uznać za zgodny z wartością odniesienia.

IV.11.6.2.2. Porównanie wartości wyniku z wartością odniesienia z uwzględnieniem niepewności

W tym celu sprawdzono czy spełniona jest nierówność 14, wyniki przedstawiono poniżej. Za wartość niepewności pomiaru przyjęto standardową niepewność pomiaru obliczoną jako odchylenie standardowe dla wartości oznaczenia [56], natomiast dla wartości odniesienia przyjęto za miarę niepewności wartość odchylenia standardowego podaną przez producenta materiału odniesienia.

	$ x_i - \mu $	$2\sqrt{u(x)^2 + u(\mu)^2}$
Fluoranten	2,681	1,115
Chryzen	0,009	0,252
Benz(a)antracen	0,005	0,024
Benzo(b)fluoranten	0,480	0,490
Benzo(k)fluoranten	0,002	0,080
9-nitroantracen	0,281	0,190
3-nitrofluoranten	0,031	0,240
1-nitropiren	0,975	2,580

Obydwa sposoby porównania wartości oznaczonej z wartością odniesienia dowodzą, że wyniki te dla większości związków nie różnią się między sobą w sposób istotny statystycznie. W przypadku wartości certyfikowanych warunku tego nie spełnia jedynie fluoranten, niezgodność tą można wytłumaczyć faktem, że fluoranten należy do grupy tzw. lotnych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych i straty podczas oznaczania tego związku mogą powstawać na etapach zagęszczania po ekstrakcji i odparowywania do suchej pozostałości po frakcjonowaniu próbki.

W przypadku wartości odniesienia warunków powyższych nie spełnia 9-nitroantracenu oraz izomery dinitropirenu. Dla 9-nitroantarcenu różnica ta nie jest wielka. Większa niezgodność z materiałem odniesienia jest zauważalna w przypadku dinitrowych pochodnych WWA. Wytłumaczeniem tych różnic może być fakt, że związki te występują w bardzo niskich stężeniach, a oznaczalność tych związków w opracowanej metodzie analitycznej jest wyższa w porównaniu do pozostałych nitro-WWA. Dinitro-WWA w materiale odniesienia były oznaczane czulszą techniką chromatografii gazowej – GC/MS NICI- niż prezentowana. Należy również podkreślić, że nie są to wartości certyfikowane ale wartości odniesienia.

IV.12. BADANIE STĘŻEŃ WWA I NITRO-WWA W POWIERZU

IV.12.1. Strategia pobierania próbek

W celu sprawdzenia przydatności opracowanej metody oznaczania nitro-WWA przeprowadzono pomiary stężeń tych zanieczyszczeń w powietrzu atmosferycznym. Badania przeprowadzono w obszarach: miejskim oraz pozamiejskim, w pobliżu tras komunikacyjnych o dużym natężeniu ruchu samochodowego oraz o różnej infrastrukturze budowlanej. Wybrane punkty pomiarowe scharakteryzowano poniżej:

	Obszar miejski	Obszar pozamiejski
Rodzaj infrastruktury budowlanej	Centrum miasta, wysokie budynki w zwartej zabudowie	Niskie domki jednorodzinne otoczone ogródkami
Rodzaj drogi	Ulica w centrum miasta, skrzyżowanie dróg, dwa przystanki autobusowe	Droga krajowa nr 796
Natężenie ruchu samochodowego	ok. 8 tys. samochodów/dobę	ok. 6 tys. samochodów/dobę
Usytuowanie punktów pomiarowych w zależności od odległości od jezdni	<ul style="list-style-type: none"> • 1m 	<ul style="list-style-type: none"> • 1 m • 30 m • 100 m
Liczba pobranych próbek powietrza	<ul style="list-style-type: none"> • 6 próbek 	<ul style="list-style-type: none"> • 10 próbek • 6 próbek • 8 próbek
Okres pobierania próbek	Letni	Letni

Próbki powietrza były pobierane przy pomocy pompy ssącej *Staplex* zgodnie z metodą pobierania próbek opisaną w pkt. IV.4. w części doświadczalnej. Filtry z pobranym pyłem owijano w folię aluminiową w celu zabezpieczenia przed dopływem światła, próbki przechowywano w lodówce do czasu przeprowadzenia analizy. Przygotowanie próbek do analizy chromatograficznej było przeprowadzone zgodnie z procedurą opisaną w pkt. IV.5. w części doświadczalnej. Frakcję II zawierającą WWA oznaczano techniką HPLC wg pkt. IV.6.1., natomiast frakcję III i IV zawierającą mono i dinitro-WWA oznaczano techniką GC/MS wg pkt. IV.6.2.

IV.12.2. Wyniki badań

IV.12.2.1. Wyniki oznaczeń

Stężenia WWA i ich nitrowych pochodnych w powietrzu zostały przedstawione w tabelach 22-27. Na rysunkach 9 i 10 przedstawiono przykładowe chromatogramy frakcji II oraz III ekstraktu pyłu z powietrza pobranego w obszarze miejskim. Sumę wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych podano w celu zobrazowania poziomów stężeń głównych substratów reakcji powstawania nitro-WWA.

Tabela 22. Stężenia wielopierścieniowych węglodorów aromatycznych w powietrzu w obszarze miejskim w odległości 1m od jezdni

Nr próbki	Ace+F	Fen	A	Flu	Piren	B[a]A	Chr	B[b+k]F	B[a]P	D[a,h]A	B[g,h,i]P	I[1,2,3-cd]P	suma WWA*
	Stężenie ng/m ³												
1.	0,61	13,30	1,25	18,14	16,32	18,14	12,70	15,12	10,88	1,21	12,09	1,21	120,96
2.	0,58	12,22	1,74	23,60	21,99	14,21	12,28	11,45	11,96	2,25	11,19	11,32	134,79
3.	0,48	7,05	0,89	14,37	12,32	10,34	9,86	8,90	8,42	1,71	9,24	8,76	92,33
4.	0,68	10,86	1,84	25,82	22,47	20,15	17,76	18,10	17,69	1,30	20,08	1,30	158,06
5.	0,47	5,45	0,99	13,03	6,69	5,14	4,80	15,91	8,84	1,16	5,79	7,57	75,85
6.	0,51	5,42	0,86	17,12	8,63	4,78	5,51	14,82	7,21	0,97	5,83	3,46	75,12

* Suma stężeń poszczególnych WWA
 suma WWA=C₁+C₂+...+C₁₂

Tabela 23. Stężenia wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w powietrzu w obszarze pozamiejskim w odległości 1m od jezdni

Lp.	Ace+F	Fen	A	Flu	Piren	B[a]A	Chr	B(b+k)F	B[a]P	D[a,h]A	B[g,h,i]P	I[1,2,3-cd]P	Suma WWA
	Stężenie ng/m ³												
1.	0,01	0,51	0,22	1,20	0,61	0,46	1,91	1,91	0,93	1,12	0,78	0,25	9,93
2.	0,02	0,57	0,21	1,62	0,79	0,36	1,24	1,23	0,52	0,95	0,25	0,03	7,80
3.	n.w.	0,69	0,28	2,31	1,09	0,40	1,88	1,45	0,74	1,01	0,30	0,22	10,38
4.	0,04	1,14	0,34	2,27	1,13	0,37	1,68	1,11	0,52	0,73	0,13	0,30	9,77
5.	1,05	4,26	0,22	3,38	1,08	0,33	1,53	1,65	1,21	1,36	0,50	0,02	16,58
6.	n.w.	0,85	0,29	1,55	0,99	0,27	1,54	1,17	0,76	0,87	0,35	0,32	8,96
7.	0,01	1,37	0,20	1,68	0,97	0,21	1,38	1,59	0,75	1,02	0,70	0,08	9,94
8.	n.w.	1,09	0,25	1,74	1,01	0,21	1,44	1,52	0,72	1,01	0,19	0,07	9,24
9.	0,02	1,73	0,19	1,81	1,12	0,40	1,96	2,68	1,28	1,73	1,08	0,20	14,20
10.	0,02	1,64	0,23	2,04	1,34	0,49	2,46	2,76	1,31	1,77	0,83	0,03	14,93

Przy drodze

Tabela 24. Stężenia wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w powietrzu w obszarze pozamiejskim w odległości 30 i 100 m od jezdni

Lp.	Acet+F	Fen	A	Flu	Piren	B[a]A	Chr	B(b+k)F	B[a]P	D[a,h]A	B[g,h,i]P	I[1,2,3-od]P	Suma WWA
	Stężenie ng/m ³												
30 m od drogi													
1.	0,01	0,85	0,26	1,54	0,70	0,32	0,90	0,67	0,32	0,42	0,12	0,03	6,15
2.	n.w.	0,69	0,10	1,28	0,55	0,26	0,85	0,64	0,21	0,36	0,15	0,03	5,11
3.	0,03	0,78	0,17	1,90	0,82	0,34	1,28	0,93	0,41	0,57	0,34	n.w.	7,57
4.	0,02	1,09	0,19	1,35	0,84	0,27	1,59	1,67	0,80	1,05	0,53	0,76	10,16
5.	n.w.	1,37	0,44	1,98	0,98	0,41	1,43	1,29	0,50	0,82	0,30	0,24	9,75
6.	0,03	1,52	0,53	1,81	1,13	0,59	0,86	1,19	0,53	0,82	0,38	0,29	9,67
7.	0,01	0,37	0,15	1,60	0,92	0,40	1,97	2,71	1,23	1,63	0,77	0,16	11,93
8.	0,02	0,88	0,19	2,56	1,51	0,64	2,87	4,24	1,92	3,00	1,18	0,29	19,31
9.	0,01	1,05	0,17	1,66	0,71	0,47	1,90	2,08	1,04	1,41	0,88	0,23	11,59
10.	0,04	0,64	0,23	2,17	1,16	0,24	2,30	1,96	1,08	1,31	0,16	0,07	11,36
11.	0,35	1,05	0,24	2,20	0,67	0,18	1,80	1,96	0,85	1,92	0,41	0,27	11,90
12.	0,03	0,55	0,43	2,33	1,54	0,42	2,88	2,40	1,44	1,70	0,38	0,04	14,15
13.	n.w.	0,94	0,18	3,52	2,29	0,59	3,81	5,72	2,71	3,34	1,11	2,01	26,21
14.	0,03	2,56	0,21	4,96	3,16	0,62	4,06	5,74	2,80	3,43	1,10	1,98	30,63
100 m od drogi													

Tabela 25. Stężenia nitrowych pochodnych wielopierscieniowych węglowodorów aromatycznych w powietrzu w obszarze miejskim w odległości 1m od jezdni

Lp.	1-nitro naftalen	2-nitro fluoren	9-nitro antracen	3-nitro fluoranten	1-nitro piren	1,3-dinitro piren	1,6-dinitro piren	1,8-dinitro piren
	Stężenie ng/m ³							
1.	0,12	21,16	4,84	1,21	1,81	0,46	p.o.	p.o.
2.	0,97	16,01	1,80	0,64	0,77	p.o.	p.o.	p.o.
3.	0,55	12,53	1,51	2,81	0,68	p.o.	p.o.	p.o.
4.	0,62	12,7	5,33	4,37	1,43	p.o.	p.o.	p.o.
5.	0,67	4,4	0,81	1,26	0,30	p.o.	p.o.	p.o.
6.	0,79	6,1	0,67	0,79	0,06	p.o.	p.o.	p.o.

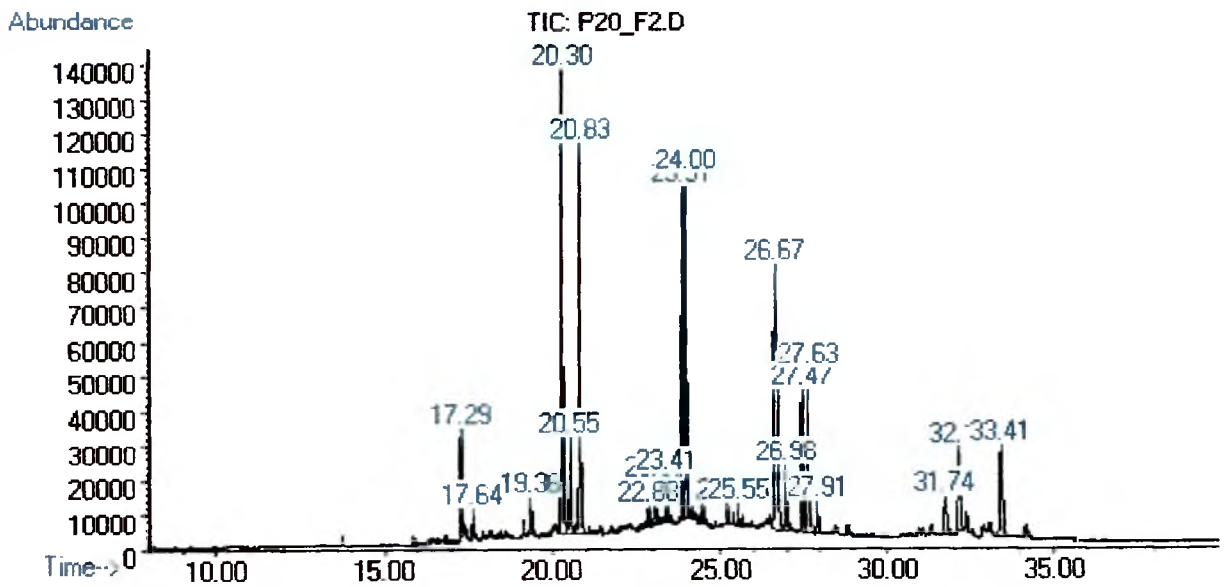
Tabela 26. Stężenia nitrowych pochodnych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w powietrzu w obszarze pozamiejskim w odległości 1 m od jezdni

Lp.	1-nitro naftalen	2-nitro fluoren	9-nitro antracen	3-nitro fluoranten	1-nitro piren	1,3-dinitro piren	1,6-dinitro piren	1,8-dinitro piren
	Stężenie ng/m ³							
1.	0,82	0,46	0,31	0,51	0,05	p.o.	p.o.	p.o.
2.	1,11	0,46	0,26	0,66	p.o.	p.o.	p.o.	p.o.
3.	0,42	0,28	0,05	0,47	p.o.	p.o.	p.o.	p.o.
4.	0,46	0,31	0,10	0,52	0,05	p.o.	p.o.	p.o.
5.	0,42	0,26	0,11	n.w.	n.w.	p.o.	p.o.	p.o.
6.	0,52	0,41	0,29	0,58	0,06	p.o.	p.o.	p.o.
7.	0,40	0,22	0,04	0,45	p.o.	p.o.	p.o.	p.o.
8.	0,43	0,24	n.w.	0,48	n.w.	p.o.	p.o.	p.o.
9.	0,39	0,26	0,09	0,48	p.o.	p.o.	p.o.	p.o.
10.	n.w.	0,26	0,17	0,47	p.o.	p.o.	p.o.	p.o.

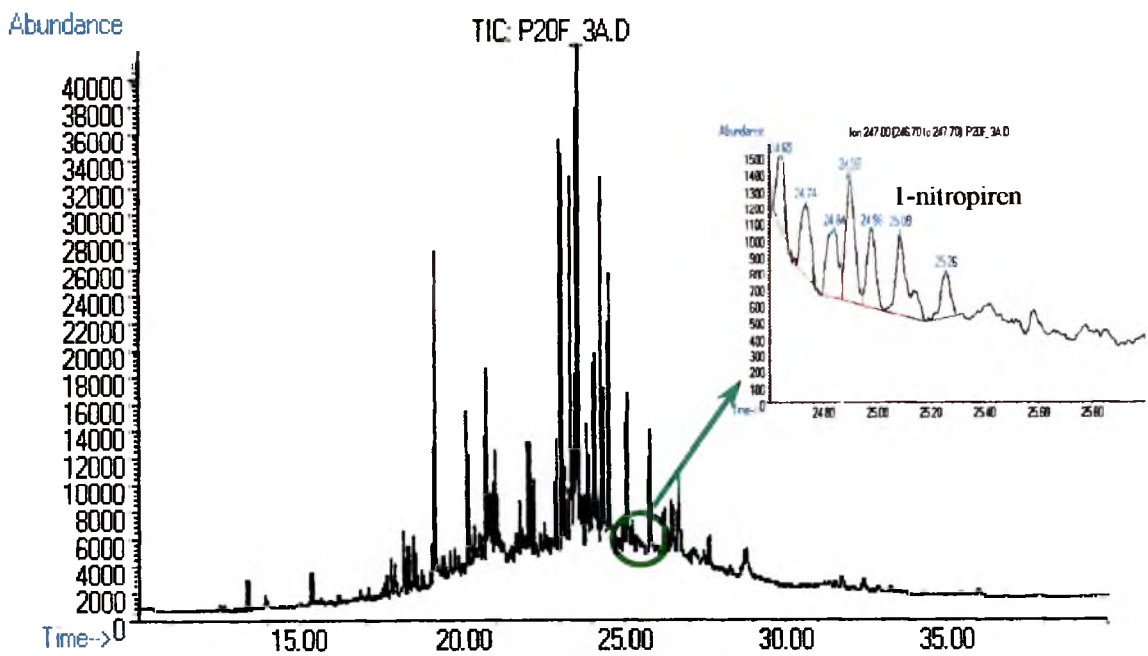
Przy drodze

Tabela 27. Stężenia nitrowych pochodnych wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w powietrzu w obszarze pozamiejskim w odległości 30 i 100 m od jezdni

Lp.	Stężenie ng/m ³							
	1-nitro naftalen	2-nitro fluoren	9-nitro antracen	3-nitro fluoranten	1-nitro piren	1,3-dinitro piren	1,6-dinitro piren	1,8-dinitro piren
30 m od drogi								
1.	0,91	0,46	0,23	0,57	0,06	p.o.	p.o.	p.o.
2.	0,59	0,43	0,22	0,54	p.o.	p.o.	p.o.	p.o.
3.	1,89	0,78	0,22	n.w.	p.o.	p.o.	p.o.	p.o.
4.	0,37	0,28	0,28	0,46	p.o.	p.o.	p.o.	p.o.
5.	0,52	0,33	0,19	0,47	p.o.	p.o.	p.o.	p.o.
6.	n.w.	0,19	n.w.	n.w.	n.w.	p.o.	p.o.	p.o.
100 m od drogi								
7.	0,67	0,39	0,08	0,43	p.o.	p.o.	p.o.	p.o.
8.	0,59	0,47	0,24	0,59	0,06	p.o.	p.o.	p.o.
9.	0,71	0,54	0,65	0,54	n.w.	p.o.	p.o.	p.o.
10.	n.w.	0,39	n.w.	n.w.	n.w.	p.o.	p.o.	p.o.
11.	n.w.	0,25	n.w.	n.w.	n.w.	p.o.	p.o.	p.o.
12.	n.w.	0,25	n.w.	n.w.	n.w.	p.o.	p.o.	p.o.
13.	0,41	0,18	0,23	0,64	0,05	p.o.	p.o.	p.o.
14.	0,47	0,23	0,42	0,66	p.o.	p.o.	p.o.	p.o.



Rysunek 9. Przykładowy chromatogram frakcji II (zawierającej WWA) ekstraktu pyłu z powietrza pobranego w obszarze miejskim

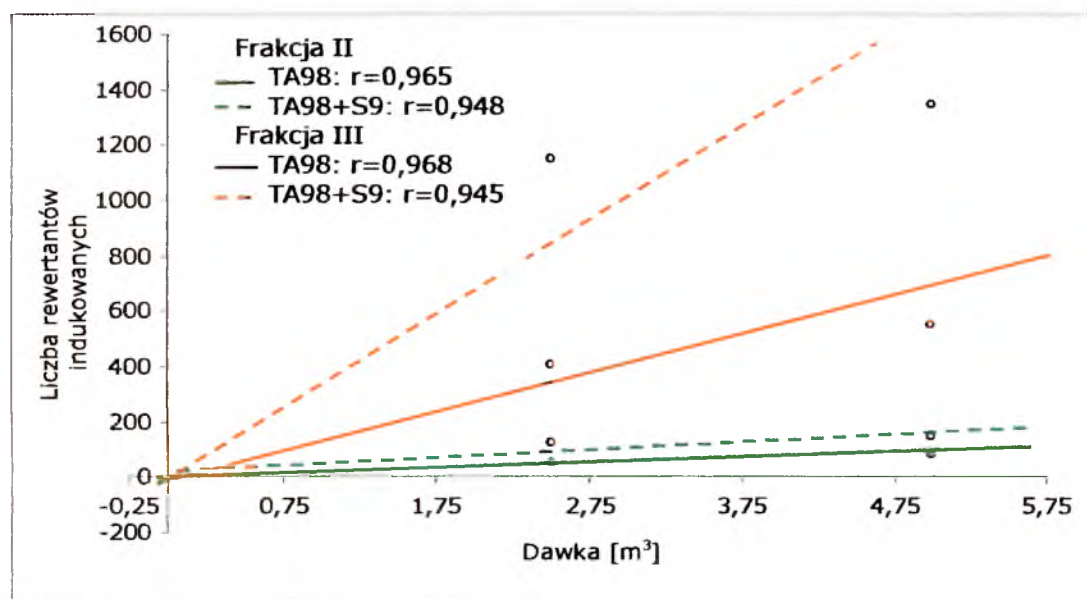


Rysunek 10. Przykładowy chromatogram frakcji III (zawierającej nitro-WWA) ekstraktu pyłu z powietrza pobranego w obszarze miejskim

IV.12.2.2. Efekt mutagenny frakcji II i III

Efekt mutagenny frakcji II i III ekstraktu pyłu zawieszonego pobranego w obszarze miejskim badano przy pomocy szczepu TA98 w dwóch wariantach: bez i z aktywacją metaboliczną zgodnie z procedurą opisaną w pkt. IV.10 w części doświadczalnej. Obliczano liczbę rewertantów indukowanych dla dawki odpowiadającej 1 m³ przefiltrowanego powietrza. Przeprowadzono analizę regresji liniowej metodą najmniejszych kwadratów przy czym dawki ekstraktu dodawane na płytkę potraktowano jako zmienną niezależną, a liczbę rewertantów indukowanych jako zmienną zależną. Liczba rewertantów w odpowiedniej kontroli negatywnej była traktowana jako odpowiedź dla dawki zerowej. Dla każdego wariantu doświadczenia obliczono wartości współczynników regresji liniowej oraz współczynnik korelacji. Wyniki przedstawiono na rysunku 11.

Rysunek 11. Zależność liczby rewertantów szczepu TA98 od dawki frakcji I i II, bez i po aktywacji metabolicznej ($\pm S_9$).



IV.12.3. Omówienie wyników

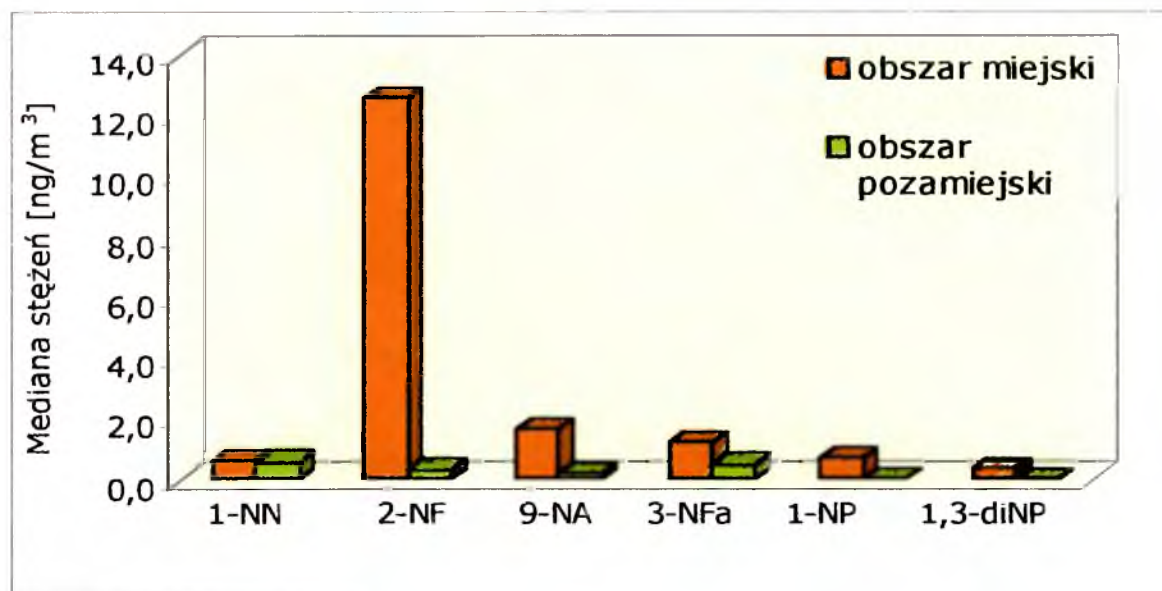
Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono prawie dziesięciokrotnie wyższe stężenia benzo(a)pirenu oraz sumy WWA w obszarze miejskim w porównaniu do stężeń z obszaru poza miastem. Analiza rozkładu stężeń WWA oraz benzo(a)pirenu w zależności od odległości od jezdni wykazała spadek stężeń tych związków w odległości 30 m od jezdni, natomiast najwyższe stężenia odnotowano w odległości 100 m od jezdni.

Rozporządzenie Ministra Środowiska [64], w sprawie wartości odniesienia dla niektórych substancji w powietrzu, określa wartość odniesienia dla benzo(a)pirenu, która uśredniona dla okresu jednej godziny wynosi 12 ng/m^3 , natomiast uśredniona dla okresu roku kalendarzowego 1 ng/m^3 . Na podstawie otrzymanych wyników można szacować, że stężenia benzo(a)pirenu w powietrzu w centrum miasta mogą osiągać wartości wyższe od wyżej wymienionych, natomiast na obszarach pozamiejskich mogą wystąpić stężenia wyższe od średniorocznej wartości odniesienia. Benzo(a)piren jest związkiem dla którego istnieją wystarczające dowody na jego aktywność rakotwórczą u zwierząt oraz aktywność mutagenną w testach krótkoterminowych [65,66].

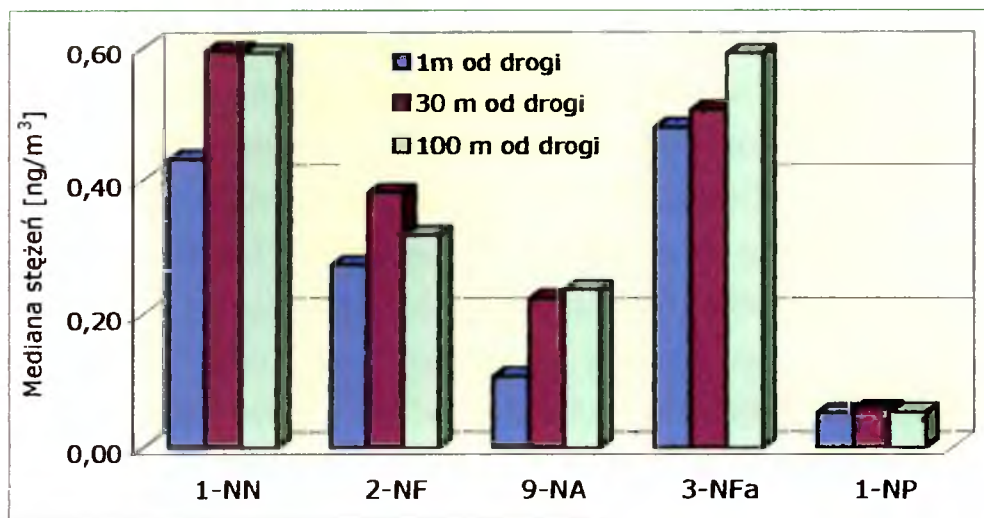
W przypadku nitrowych pochodnych WWA (za wyjątkiem 1-nitronaftalenu) również odnotowano prawie dziesięciokrotnie wyższe stężenia tych związków w obszarze miejskim w porównaniu do stężeń z obszaru pozamiejskiego (rysunek 12). Nie stwierdzono istotnej zależności pomiędzy stężeniem nitro-WWA w zależności od odległości od jezdni co zobrazowano na wykresie 13. Nie ma wartości odniesienia dla tych związków w środowisku. W tabeli 28 zestawiono mediany stężeń oznaczanych nitro-WWA oraz benzo(a)pirenu w zależności od obszaru w którym pobierano próbki.

Tabela 28. Zakresy oraz mediany stężeń nitro-WWA oraz benzo(a)pirenu w powietrzu [ng/m^3]

Nazwa związku/ usytuowanie próbników		1-nitro naftalen	2-nitro fluoren	9-nitro antracen	3-nitro fluoranten	1-nitro piren	1,3-dinitro piren	benzo(a) piren
Obszar miejski								
1m od jezdni	Zakres stężeń	0,12-0,97	4,4-21,16	0,67-5,33	0,64-4,37	0,06-1,81	<0,45-0,46	7,21-17,69
	Mediana	0,64	12,62	1,66	1,23	0,73	0,23	9,86
Obszar pozamiejski								
1m od jezdni	Zakres stężeń	n.w.-1,11	0,22-0,46	n.w.-0,31	n.w.-0,66	n.w.-0,06	<0,45	0,52-1,31
	Mediana	0,43	0,27	0,11	0,48	0,05	<0,45	0,75
30m od jezdni	Zakres stężeń	n.w.-1,89	0,19-0,78	n.w.-0,28	n.w.-0,57	n.w.-0,06	<0,45	0,21-0,80
	Mediana	0,59	0,38	0,22	0,51	0,06	<0,45	0,46
100m od jezdni	Zakres stężeń	n.w.-0,71	0,18-0,54	n.w.-0,65	n.w.-0,66	n.w.-0,06	<0,45	0,85-2,80
	Mediana	0,59	0,32	0,24	0,59	0,05	<0,45	1,34



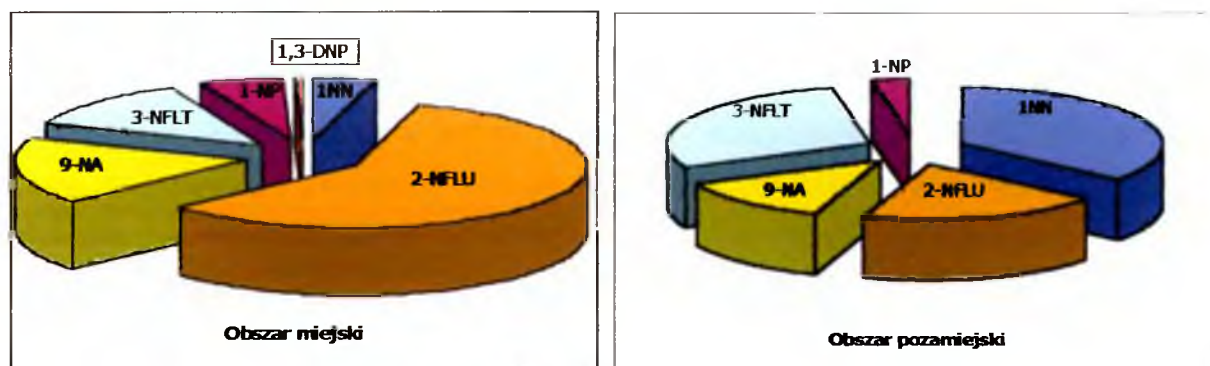
Rysunek 12. Mediany stężeń nitro-WWA w powietrzu w zależności od obszaru w którym prowadzono badania



Rysunek 13. Mediany stężeń nitro-WWA w powietrzu w zależności od odległości od drogi

W obszarze miejskim stwierdzono zdecydowanie wyższe średnie stężenie 2-nitrofluorenu w porównaniu do pozostałych nitro-WWA. Głównym źródłem powstawania 2-nitrofluorenu są spaliny z silnika Diesla. Wysokie stężenia właśnie tego związku w powietrzu atmosferycznym „wzbogaconym” w spaliny z silników Diesla, lub bezpośrednio w spalinach Diesla potwierdzają liczne źródła literaturowe [2, 34, 43, 67]. Wysokie stężenia 2-nitrofluorenu w powietrzu są szczególnie istotne ze względu na fakt, że związek ten należy do grupy 2B (wg IARC) zatem może być rakotwórczy dla ludzi.

W obszarze pozamiejskim stężenia badanych nitro-WWA były na porównywalnym poziomie, jedynie dla 1-nitropirenu odnotowano bardzo niskie stężenia. Udział poszczególnych związków w sumie całkowitej oznaczanych nitro-WWA został zobrazowany na rysunku 14.



Rysunek 14. Udział poszczególnych związków w sumie całkowitej oznaczanych nitro-WWA w zależności od obszaru w którym pobierano próbki

Tabela 29 zawiera zakresy stężeń nitrowych pochodnych WWA w powietrzu atmosferycznym, oznaczanych zgodnie z opracowaną metodą, w zestawieniu z ilościami podawanymi w piśmiennictwie. Należy zaznaczyć, że cytowane z piśmiennictwa stężenia nitro-WWA uzyskano pobierając próbki w różnych obszarach (tereny miejskie, wiejskie, górskie) oraz stosując różne techniki przygotowania i oznaczania próbek. W związku z tym trudne jest przeprowadzenie jakiegokolwiek porównania uzyskanych wyników z wartościami literaturowymi, a prezentowana tabela jedynie potwierdza trafność wyboru nitrowych pochodnych WWA do oznaczania w powietrzu atmosferycznym.

Tabela 29. Zestawienie oznaczonych stężeń nitrowych pochodnych WWA w powietrzu z wartościami podawanymi w piśmiennictwie [1, 2, 4, 5, 15, 41, 42, 47; 49, 67]

L.p	Nazwa związku	Uzyskane wyniki ng/m ³		Dane z piśmiennictwa ng/m ³	
		Obszar miejski	Obszar pozamiejski	W spalinach Diesla	Obszar miejski lub pozamiejski
1.	1-nitronaftalen	0,12-0,97	n.w.-1,89	0,01-0,09	0,006-3,00
2.	9-nitroantracen	0,67-5,33	n.w.-0,65	0,003-6,08	0,02-0,54
3.	2-nitrofluoren	4,4-21,16	0,18-0,78	<0,2-0,27	0,09-3,45
4.	1-nitropiren	0,06-1,81	n.w.-0,66	16,07-39,64	0,02-0,79
5.	3-nitrofluoranten	0,64-4,37	n.w.-0,06	0,07-4,30	0,003-2,29
6.	1,3-dinitropiren	<0,45-0,46	<0,45	0,04-1,15	<0,02
7.	1,6-dinitropiren	<0,46	<0,46	0,09-2,54	<0,008
8.	1,8-dinitropiren	<0,45	<0,45	1,55-3,58	<2

Badanie efektu mutagennego frakcji II i III wykazało, że wszystkie przebadane zależności były bardzo wysokie i statystycznie istotne, jednak liczba rewertantów indukowanych przez frakcję III zawierającą nitro-WWA była zdecydowanie wyższa, zarówno w wariancie bez, jak i z aktywacją metaboliczną niż indukowanych przez frakcję II (zawierającą tylko WWA).

V. PODSUMOWANIE

W prezentowanej pracy przedstawiono opracowaną, alternatywną do już istniejących, metodę oznaczania śladowych ilości nitro-WWA w powietrzu (rzędu ng/m^3) w ich pierwotnej postaci. Wyznaczono parametry pobierania, ekstrakcji, frakcjonowania oraz oznaczania próbki techniką chromatografii gazowej ze spektrometrią mas. Metoda ta nie wymaga długotrwałego, dobowego pobierania próbki, jak również nie jest wymagane posiadanie rozbudowanej i kosztownej aparatury analitycznej. Frakcjonowanie ekstraktu pyłu zawieszonego z powietrza pozwala na oznaczanie innych związków chemicznych współwystępujących w badanym powietrzu.

Przeprowadzono walidację opracowanej metody oznaczania nitro-WWA w powietrzu, wyznaczono następujące parametry walidacyjne metody które w zależności od badanej substancji wynoszą:

- ✓ Liniowość – uzyskano współczynnik korelacji bliski 1
- ✓ Precyzję wyrażoną jako współczynnik zmienności wynoszący 3,87%-10,14%
- ✓ Granicę oznaczalności wynoszącą 0,08-0,46 ng/m^3
- ✓ Granicę wykrywalności wynoszącą 0,03-0,15 ng/m^3
- ✓ Selektywność metody – uzyskano zadawalający rozdział chromatograficzny nitrowych pochodnych WWA w oznaczanej mieszaninie
- ✓ Odzysk – średni dla wszystkich badanych nitro-WWA wynoszący 75%
- ✓ Dokładność poprzez analizę certyfikowanych materiałów odniesienia: SRM 1587 – nitrowe pochodne wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w metanolu oraz SRM 1975 Diesel Particulate Extract. Istotność różnicy pomiędzy wartością otrzymaną oraz wartościami certyfikowanymi sprawdzono testem t-Studenta oraz testem z uwzględnieniem niepewności pomiaru i uzyskano zadawalające wyniki w tym zakresie.

Sprawdzono przydatność opracowanej metody w warunkach pobierania próbek środowiskowych. Pobrano próbki powietrza w dwóch różnych obszarach: miejskim oraz pozamiejskim. Wyniki badań potwierdziły przydatność opracowanej metody analitycznej do oznaczeń stężeń nitro-WWA w powietrzu atmosferycznym zarówno w terenie o znacznym zanieczyszczeniu powietrza – obszar miejski, jak i w obszarze pozamiejskim, gdzie zanieczyszczenie powietrza było dziesięciokrotnie niższe. Tak wysokie stężenia badanych zanieczyszczeń powietrza w centrum miasta mogą być wytłumaczone dużym ruchem samochodowym, obecnością pyłu pochodzącego z emisji wtórnej oraz emisją tych związków z innych źródeł np.: palenisk domowych.

Przeprowadzone badania środowiskowe wykazały stosunkowo wysokie stężenia 2-nitrofluorenu w powietrzu atmosferycznym w centrum miasta. 2-nitrofluoren jest charakterystycznym związkiem powstającym w wyniku reakcji zachodzących w spalinach z silnika Diesla. Z tego wynika, że transport samochodowy stanowi istotne zagrożenie dla zdrowia mieszkańców miast.

Zbadano efekt mutagenny ekstraktu pyłu z powietrza zawieszzonego pobranego w centrum miasta. W badanej próbce stężenie nitrowych pochodnych WWA było dziesięciokrotnie niższe w porównaniu do niepodstawionych WWA. Pomimo to odnotowano wyższą aktywność mutagenną frakcji zawierającej nitro-WWA w porównaniu do frakcji zawierającej WWA.

VI. WNIOSKI

1. Opracowana metoda oznaczania nitro-WWA w powietrzu techniką chromatografii gazowej ze spektrometrią mas jest metodą selektywną i specyficzną dla tej grupy związków.
2. Metoda umożliwia oznaczanie śladowych stężeń nitro-WWA w ich pierwotnej postaci w powietrzu, jak również umożliwia ona oznaczanie związków współwystępujących w powietrzu z tej samej próbki (tj.: WWA i inne związki organiczne).
3. Opracowana metoda analityczna jest dokładna, co zostało potwierdzone analizą certyfikowanych materiałów odniesienia.
4. Oznaczenie stężeń nitro-WWA w próbkach pyłu zawieszonego w powietrzu potwierdziło przydatność opracowanej metody do badań jakości powietrza.
5. Stwierdzono dziesięciokrotnie wyższe stężenia WWA i nitro-WWA w powietrzu w centrum miasta w porównaniu do stężeń poza miastem.
6. Odnotowano relatywnie wysokie stężenia 2-nitrofluorenu w powietrzu w obszarze miejskim w porównaniu do stężeń pozostałych nitro-WWA. Związek ten może być rakotwórczy dla ludzi, a głównym źródłem jego emisji są spaliny z silników Diesla, powinno się zatem monitorować stężenia tego związku w powietrzu.
7. Frakcja ekstraktu pyłu zawieszonego badanej próbki zawierająca nitro-WWA charakteryzowała się znacznie wyższą aktywnością mutagenną w porównaniu do aktywności mutagennej frakcji zawierającej WWA, pomimo że nitro-WWA występowały w dużo niższych stężeniach

VII. PIŚMIENICTWO

1. Atkinson R., Arey J.; Atmospheric chemistry of gas-phase polycyclic aromatic hydrocarbons: formation of atmospheric mutagens; *Environ. Health Perspect.* 102 (4), 117-126, 1994
2. *Selected Nitro- and Nitro-oxy-polycyclic Aromatic Hydrocarbons*; Environmental Health Criteria 229, WHO, Geneva 2003
3. Arey J., Zielińska B., Atkinson R. & Winer A.M.; Polycyclic aromatic hydrocarbons and nitroarene concentrations in ambient air during a wintertime high-NO₂ episode in the Los Angeles basin; *Atmos Environ*, 21, 1437-1444, 1987
4. Bamford H.A., Bezabeh D.Z. et al.; Determination and comparison of nitrated-polycyclic aromatic hydrocarbons measured in air and diesel particulate reference materials; *Chemosphere*, 50, 575-587, 2003
5. Yaffe D., Cohen Y., Arey J., & Grosovsky A.J.; Multimedia analysis of PAHs and nitro-PAH daughter products in the Los Angeles basin; *Risk Analysis*, 21 (2), 275-294, 2001
6. Karty charakterystyki: 1-nitronaftalen, 9-nitroantracen, 2-nitrofluoren, 1-nitropiren, 6-nitrochryzen, 3-nitrofluoranten, 1,3-dinitropiren, 1,6-dinitropiren, 1,8-dinitropiren, Sigma-Aldrich, Data aktualizacji: 2002, zgodnie z 91/155/EEC
7. Praca zbiorowa; Poradnik fizyko-chemiczny, wyd.2, PWN, Warszawa 1974
8. Satoko I., Yoshiharu H., Koji I., Takaaki K., Ken-ichi A.; Mutagenic nitrated benzo(a)pyrene derivatives in the reaction product of benzo(a)pyrene in NO₂-air in the presence of O₃ or under photoirradiation; *Chemosphere*, 41 (11), 1809-1819, 2000
9. Fan Z., Chen D., Birla P. & Kamens R.M.; Modeling of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons formation and decay in the atmosphere; *Atmos Environ*, 29, 1171-1181, 1995
10. Arey J., Zielińska B., Atkinson R., Winer A., Ramdahl T., Pitts Jr.J.; The formation of nitro-PAH from the gas-phase reactions of fluoranten and pyrene with the OH radical in the presence of Nox; *Atmos Environ*, 20, 2339-2345, 1986
11. Morrison R.T., Boyd R.N.; *Chemia organiczna*, T.2, PWN, Warszawa 1998
12. Feilberg A., Nielsen T.; Photodegradation of nitro-PAHs in viscous organic media used as models of organic aerosols; *Environ Sci Technol*, 35, 108-113, 2001
13. Research Note No 94-22 – *Mutagenic activity of air pollutants*, California Environmental Protection Agency, 1994
14. Möller L.; *In vivo* metabolism and genotoxic effects of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons; *Environ. Health Perspect.* 102 (4), 139-146, 1994
15. Castells P., Santos F.J., Galceran M.T.; Development of sequential supercritical fluid extraction method for the analysis of nitrated and oxygenated derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban aerosols; *Journal of Chromatography*, 1010, 141-151, 2003

16. Zielińska B., Samy S.; Analysis of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons; *Anal. Bioanal. Chem.*, 386, 883-890, 2006
17. Černa M., Pochamnova D., Pastorkowa A., Šmid J., Binkova B.; Bacterial mutagenicity of fractionated organic material adsorbed on urban air particles; w *Impact of Air Pollution on Human Health* pod red. Šram R.J., Academia, Praga, 2001
18. Mielżyńska D., Siwińska E., Kapka L., *Efekt mutagenny pyłów zawieszonych jako wskaźnik jakości powietrza*, publikacja sfinansowana przez Narodowy Fundusz Ochrony Środowiska i Gospodarki Wodnej, Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego, Sosnowiec, 2002
19. Strandell M. Zakrisson S., Aisberg T., Westerholm R., Winqvist L., Rannung U.; Chemical analysis and biological testing of polar fraction of ambient air, diesel engine and gasoline engine particulate extracts; *Environ. Health Perspect.* 102 (4), 85-92, 1994
20. Ostby L., Engen S., Melbye A., Eide I.; Mutagenicity testing of organic extracts of Diesel exhaust particles after fractionation and recombination; *Arch. Toxicol.*, 71, 314-319, 1997
21. Eide I., Johnsen H.G.; Mixture design and multivariate analysis in mixture research; *Environ. Health Perspect.* 106 (3), 1373-1376, 1998
22. *IARC Monographs* (updated in January 2006) Complete List of Agents evaluated and their classification
<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>
23. *Report on Carcinogens, Eleventh Edition*; U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program
24. Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 10 sierpnia 2005 r. zmieniające rozporządzenie w sprawie substancji, preparatów, czynników lub procesów technologicznych o działaniu rakotwórczym lub mutagennym w środowisku pracy (Dz. U. Nr 160 poz. 1356)
25. Fu P.P.; Metabolism of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons; *Drug Metab Rev*, 22, 209-268, 1990
26. Scheepers P.T.J., Straetemans M.M.E., Koopman J.P., Bos R.P.; Nitroreduction and formation of hemoglobin adducts in rats with a human intestinal microflora; *Environ. Health Perspect.* 102 (6), 39-41, 1994
27. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*; Vol. 46, Diesel and Gasoline Engine Exhaust and Some Nitroarenes, WHO, 1998
28. Makhniashvili I.; Nitrowe pochodne wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w środowisku; *Bezpieczeństwo pracy*, 3, 2003
29. Jakubowski M., Starek A., Ludwicki J.K., Knappek R., Barański B.; *Słownik terminów stosowanych w toksykologii*; Wydawnictwo "Secesja", Kraków, 1994
30. Talaska G, Underwood P, Maier A, Lewtas J, Rothman N, Jaeger M.; Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), nitro-PAHs and related environmental compounds: biological markers of exposure and effects; *Environ Health Perspect.*, 104 (5), 901-906, 1996

31. Arey J.; A tale of two diesels; *Environ. Health Perspect.*, 112 (8), 812-813, 2004
32. Karam E.I.B., Bruce E.J., Ajit K.R., Upadhyaya P., Partian S.J.; Development of biomarkers to monitor carcinogen exposure; *Research Report No 64*, The Health Effects Institute
33. Zwirner-Baier I., Neumann HG; Polycyclic nitroarenes (nitro-PAHs) as biomarkers of exposure to diesel exhaust; *Mutat Res*, 441(1), 135-144, 1999
34. *Diesel Fuel and Exhaust Emissions*, Environmental Health Criteria 171, WHO, Geneva, 1996
35. Pitts J.N.; Formation and fate of gaseous and particulate mutagens and carcinogens in real and simulated atmospheres; *Environ Health Perspect.*, 47, 115-140, 1983
36. Dušek B., Hajšlova J., Kocourek V.; Determination of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons and their precursors in biotic matrices; *Journal of Chromatography*, 982, 127-143, 2002
37. Bodzek D., Janoszka B., Warzecha L.; The analysis of PAHs nitrogen derivatives in the sewage sludges of upper Silesia, Poland; *Water, Air and Soil Pollution*, 89, 417-427, 1996
38. Lague-Garcia J.L., Lague de Castro M.D.; Comparison of the static, dynamic and static-dynamic pressurised liquid extraction modes for the removal of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons from soil with on-line filtration-preconcentration; *Journal of Chromatography*, 1010, 129-140, 2003
39. Priego-Capote F., Luque-Garcia J.L., Luque de Castro M.D.; Automated fast extraction of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons from soil by focused microwave-assisted Soxhlet extraction prior to gas chromatography-electron-capture detection; *Journal of Chromatography*, 994, 159-167, 2003
40. Siegmunt B., Weiss R., Pfannhauser W.; Sensitive method for determination of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons in the human diet; *Anal Bioanal Chem*, 375, 175-181, 2003
41. Warzecha L.; Nitroarenes in Airborne Particulate Organic Extracts Collected from Upper Silesia – Identification and Quantitative Analysis; *Chem. Anal.*, 38, 303-313, 1993
42. Tyrpień K., Warzecha L., Bodzek D.; Identification of PAHs Nitro Derivatives in Airborne Particulate Matter by TLC Method; *Chem. Anal.*, 39, 389-393, 1994
43. Warzecha L., Stróżyk M.; Application of High Performance Liquid Chromatography with fluorescence detection for determination of nitroarenes, after their reduction to aromatic amines; *Chem. Anal.*, 43, 807-816, 1998
44. Ciganek, Neca, Adamec, Janosek, Machala; A combined chemical and bioassay analysis of traffic emitted PAHs; *Sci. Total. Environ.*; 334-335, 141-148, 2004

45. Ching-Tang Kuo, Hong-Wen Chen; Determination of 1,3-, 1,6-, 1,8-dinitropyrene and 1-nitropyrene in airborne particulate by column liquid chromatography with electrochemical detection; *Journal of Chromatography*, 897, 393-397, 2000
46. Bezabeh D.Z., Bamford H.A., Schantz M.M., Wise S.A.; Determination of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons in diesel particulate-related standard reference materials by using gas chromatography/mass spectrometry with negative ion chemical ionization; *Anal Bioanal Chem*, 375, 381-388, 2003
47. Schauer Ch., Niessner R., Pöschl U.; Analysis of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons by liquid chromatography with fluorescence and mass spectrometry detection: air particulate matter, soot, and reaction product studies; *Anal Bioanal Chem*, 378, 725-736, 2004
48. Mabilia R., Cecinato A., Tomasi Sciano M.C., Vasconcellos P., Carvalho L., Mattos L., Franco A.; Nitro-PAH compounds in the atmosphere of Sao Paulo, Brazil; *Geophysical Research Abstracts*, 5, 2003
49. Lenicek J., Sekyra M., Bednarkova K., Benes I., Sipek F.; Fractionation and chemical analysis of urban air particulate extracts, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 77(4), 269-288, 2000
50. Shanmungam K., Barek J., Zima J.; Polarographic and voltammetric determination of trace amount of 1,3-dinitronaphthalene; *Chem. Anal.*, 49, 765-776, 2004
51. Cvačka J., Barek J., Fogg A.G., Moreira J.C., Zima J.; High-performance liquid chromatography of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons; *Analyst*, 123, 9R-18R, 1998
52. Jinhui X., Lee F.; Analysis of nitrated polynuclear aromatic hydrocarbons; *Chemosphere*, 42 (3), 245-250, 2001
53. *Certificate of Analysis Standard Reference Material 1975 Diesel Particulate Extract*, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, USA, 2000
54. Hoffman E., Charette J., Stroobant V.; *Spektrometria mas*; WNT, Warszawa 1998
55. Mielżyńska D., Siwińska E., Bubak A.; *Genotoksyczność 13 wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych w wybranych systemach in vitro*, IMPiZS, Sosnowiec 1998
56. Konieczka P., Namieśnik J., Zygmunt B., Bulska E. Świtaj-Zawadka A., Naganowska A., Kremer E., Rompa M., *Ocena i kontrola jakości wyników analitycznych*, Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiska, Gdańsk 2004
57. StatSoft (2006). *Elektroniczny Podręcznik Statystyki PL*, Krakow, WEB: <http://www.statsoft.pl/textbook/stathome.html>.
58. Bourg D., *Excel w nauce i technice. Receptury*, Helion O'Reilly, 233-243, 2006
59. PN-EN482, *Powietrze na stanowiskach pracy. Ogólne wymagania dotyczące procedur pomiarów czynników chemicznych*. Warszawa 2002

60. *Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy* pod red.: Pośniak M., Centralny Instytut Ochrony Pracy, 3 (25), 5-15, Warszawa 2000
61. Minczewski J., Marczenko Z., *Chemia analityczna. Analiza Ilościowa*, tom 2, PWN, Warszawa 1978
62. Buhl F., Kania K., Mięka B., *Obliczenia rachunkowe z chemii analitycznej*, Skrypty Uniwersytetu Śląskiego nr 490, 171-180, Katowice 1993
63. Bulska E., Taylor P.D.P; *Wybrane aspekty metrologii chemicznej; w Nowe horyzonty i wyzwania w analityce i monitoringu środowiskowym* pod red. Mamieśnik J., Chrzanowski W., Szpinek P; Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego, Gdańsk 2003
64. Rozporządzenie Ministra Środowiska z dnia 5 grudnia 2002 r. w sprawie wartości odniesienia dla niektórych substancji w powietrzu (Dz.U. nr 1, poz. 12, 2003)
65. *Substancje rakotwórcze w środowisku pracy* pod red. Nowacki Z., T.II, Centrum Informacji Toksykologicznej, Instytut Medycyny Pracy, Łódź 1987
66. *Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*; U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service 1995
67. Mniszek W., Smolik E., Zaciera M.; *Specyfika substancji emitowanych w spalinach z silników Diesla; Ochrona Powietrza i Problemy Odpadów*, **39 (2)**, 37-45, 2005
68. Maron D.M., Ames B.N.; *Revised method for the Salmonella mutagenicity test; Mutation Research*, **113**, 173-215, 1983

ZAŁĄCZNIK 1

Certyfikat materiału odniesienia SRM 1587
Nitrowe pochodne wielopierścieniowych węglowodorów
aromatycznych w metanolu

National Bureau of Standards

Certificate

Standard Reference Material 1587

Nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Methanol

This Standard Reference Material (SRM) consists of four vials, each containing approximately 1 mL of a methanol solution of seven nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons (N-PAH). SRM 1587 is intended primarily for use in calibrating chromatographic instrumentation used for the determination of N-PAH but can also be used to add known amounts of these compounds to methylene chloride extracts.

Certified Concentrations of N-PAH

Certified concentrations of the seven N-PAH in SRM 1587 are given in Table 1. The concentration values are certified in $\mu\text{g/g}$ units but are also reported in $\mu\text{g/mL}$ units for user convenience. The certified values in Table 1 are derived from the concordant results obtained from high-performance liquid chromatography (HPLC) and gas chromatography (GC). These data are given in Table 2. The N-PAH used in the preparation of this SRM were obtained from Midwest Research Institute, Kansas City, MO, where they were synthesized under contract from the Coordinating Research Council, Inc., Atlanta, GA. Compound purities were determined at Midwest Research Institute. Each compound was at least 99 percent pure and, therefore, no correction was made for purity.

NOTICE AND WARNINGS TO USERS

Expiration of Certification: This certification is valid, within the limits certified, for one year from the date of purchase. In the event that the certification should become invalid before then, purchasers will be notified by NBS.

Storage: Sealed ampoules, as received, must be stored in the dark at temperatures between -25 and 0 °C.

Use: Prior to use, samples for analysis should be brought to room temperature, equilibrated for one hour and ultrasonically vibrated for about 30 seconds, to ensure complete solubility of the compounds. Certified values are not applicable for ampoules stored after opening, even if resealed. Aliquots should be withdrawn from the ampoules immediately after opening and processed without delay for the certified values in Table 1 to be valid within the stated uncertainty. However, if this is impossible or impractical, we recommend that after aliquots are removed from the ampoules, they should be transferred to amber containers and not be stored at room temperature for more than 12 hours before use. The toxicity or carcinogenicity/mutagenicity of the N-PAH in this SRM has not been precisely defined; however, this material should be treated as a potential health hazard.

Preparation and analytical determinations for this standard were performed in the Organic Analytical Research Division, Center for Analytical Chemistry, by W.F. Kline, R.M. Parris, R.E. Rebbert, and L.T. Sniegoski.

Consultation on the statistical design of the experimental work was provided by R.C. Paule of the National Measurement Laboratory.

The coordination of the technical measurements leading to certification were performed under the direction of W.F. Kline, S.A. Wise, and W.E. May.

The technical and support aspects involved in the preparation, certification, and issuance of this Standard Reference material were coordinated through the Office of Standard Reference Materials by R. Alvarez.

Gaithersburg, MD 20899
June 25, 1985

Stanley D. Rasberry, Chief
Office of Standard Reference Materials

(over)

Preparation and Analysis

The methanol solution of seven N-PAH was prepared and ampouled in the NBS Toxic Chemicals Handling Facility. Approximately 6.3 L of methanol in a 7-L glass Erlenmeyer flask were purged with argon at a flow rate of approximately 100 mL/min for 1.5 hours. The mass of the methanol was then determined using a top-loading balance. The flask was sealed with a Teflon-covered stopper and covered with black plastic. An electrobalance was used to determine the mass of each N-PAH component added. The gold foil weighing boat containing the N-PAH sample was transferred to the flask containing the methanol. After all seven of the nitro-PAH had been transferred, the headspace in the flask was again filled with argon and the stopper was secured onto the flask. The solution was magnetically stirred for 20 hours in the dark at room temperature. Each 2-mL amber ampoule was purged with argon at a flow rate of approximately 100 mL/min just prior to the addition of approximately one mL of solution to the ampoule which was then flame sealed. The solution was not stirred during the ampouling process. An argon-filled Teflon gas bag was used as a reservoir of argon to fill the headspace of the flask created as the solution was removed during the ampouling process.

Sixteen randomly selected ampoules were analyzed in duplicate by GC on a DB-5 (30 m x 0.25 mm I.D. x 0.25 μ m film) column using helium as a carrier gas together with flame ionization (FID) detection. The column was temperature programmed from 60 to 240 °C at a rate of 30 °C/min and from 240 to 270 °C at a rate of 10 °C/min. Quantification was accomplished using benz[a]anthracene as an internal standard. Two independently prepared calibration solutions were used to establish detector response factors. A representative chromatogram from the GC analyses is shown in figure 1.

Sixteen randomly selected ampoules were analyzed in duplicate by HPLC on a C₁₈ column (Zorbax ODS) using a methanol/water mobile phase with UV detection at 254 nm. Separation of the N-PAH was accomplished using an isocratic mobile phase at 70 percent methanol in water for 10 minutes, followed by a linear gradient to 100 percent methanol in 20 minutes. Column temperature was maintained at 30 °C. Quantification was accomplished using fluorene as an internal standard. Three independently prepared calibration solutions were used to establish detector response factors. A representative chromatogram from the HPLC analyses is shown in figure 2.

In addition to the chromatograms provided in figures 1 and 2, GC and HPLC retention index data are provided to assist the user in identifying the individual N-PAH compounds in this SRM. These data are *not* certified and are provided for information only. GC retention index data are listed in Table 3. HPLC retention indices for the N-PAH on both a monomeric and a polymeric C-18 column and using methanol/water and acetonitrile/water mobile phase are provided in Table 4.

The use of a "trade name" is for identification only, and does not imply endorsement of the product by the National Bureau of Standards.

Table 1
Certified^a and Information Values for SRM 1587

	<u>($\mu\text{g/g}$)</u>	<u>($\mu\text{g/mL}$)^b</u>
2-Nitrofluorene	9.67 ± 0.39^c	7.64 ± 0.31^c
9-Nitroanthracene	5.01 ± 0.11	3.96 ± 0.09
3-Nitrofluoranthene	9.24 ± 0.06	7.30 ± 0.05
1-Nitropyrene	8.95 ± 0.28	7.07 ± 0.22
7-Nitrobenz[a]anthracene	9.27 ± 0.23	7.32 ± 0.18
6-Nitrochrysene	8.13 ± 0.11	6.42 ± 0.09
6-Nitrobenzo[a]pyrene	$(6.1)^d$	$(4.8)^d$

^aThe certified values and associated uncertainties were derived from the weighted combination of liquid and gas chromatographic data as described by Paule and Mandel in "Consensus Values and Weighting Factors," Journal of Research of the National Bureau of Standards, Vol. 87, No. 5, Sept-Oct (1982), pp 377-385.

^bThese values are provided for user convenience and were obtained from the certified concentration in $\mu\text{g/g}$. The uncertainties apply only at 23 °C. This SRM may be used between 19 and 27 °C, but a concentration change of up to 1% will occur because of the change of the density of methanol with temperature.

^cThe listed uncertainties are \pm two standard deviations of the values and include both within- and between-analytical method differences and, where observed, vial-to-vial variability.

^dConcentration data for 6-nitrobenzo[a]pyrene is provided for information only. The analytical data for 6-nitrobenzo[a]pyrene exhibited the largest uncertainty and largest between-bottle variability. Also, the solubility of this compound in the SRM solution appears to be borderline.

Table 2
 Summary of Results by Method Used for Quantification

	----- Concentration ($\mu\text{g/g}$) -----	
	<u>Gas Chromatography</u>	<u>Liquid Chromatography</u>
2-Nitrofluorene	9.51 ± 0.22^a	9.81 ± 0.16^a
9-Nitroanthracene	5.08 ± 0.08	4.96 ± 0.04
3-Nitrofluoranthene	9.30 ± 0.12	9.23 ± 0.06
1-Nitropyrene	9.09 ± 0.14	8.81 ± 0.12
7-Nitrobenz[a]anthracene	9.39 ± 0.14	9.15 ± 0.08
6-Nitrochrysene	8.21 ± 0.16	8.09 ± 0.06
6-Nitrobenzo[a]pyrene	6.09 ± 0.30	6.03 ± 0.16

^aThe listed uncertainties represent \pm two standard deviations of the average values given. The uncertainties also include, where observed, the vial-to-vial variability, but does not include the variability between the two methods.

Table 3

Gas Chromatographic Retention Indices^a

<u>Compound</u>	<u>RI</u>	<u>RI (From Literature)</u>
2-Nitrofluorene	(352.07)	353.06 ^b , 352.17 ^c
9-Nitroanthracene	(356.68)	357.42 ^b , 356.95 ^d
3-Nitrofluoranthene	(413.05)	413.34 ^c
1-Nitropyrene	(421.03)	421.48 ^b , 421.08 ^c
7-Nitrobenz[a]anthracene	(448.96)	
6-Nitrochrysene	(460.47)	
6-Nitrobenzo[a]pyrene	(501.71)	501.71 ^b

^aThe retention index values are not certified and are provided for information only. They were determined using the method described by Lee et al. in *Anal. Chem.* **51**, 768 (1979).

^bD.L. Vassilaros, R.C. Kong, D.W. Later, and M.L. Lee, *J. Chromatogr.* **252**, 1 (1982).

^cP.J. Doherty, R.M. Hoes, A. Robbat, Jr., and C.M. White, *Anal. Chem.* **56**, 2697 (1984).

^dC.M. White, A. Robbat, Jr., and R.M. Hoes, *Chromatogr.* **17**, 605 (1983).

Table 4

Liquid Chromatographic Retention Indices^a

----- Logarithm (RI) -----

<u>Compound</u>	<u>Monomeric C₁₈</u> <u>(Zorbax ODS)</u>		<u>Polymeric C₁₈</u> <u>(Vydac TP 201)</u>	
	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>
2-Nitrofluorene	(2.45)	(2.33)	(2.65)	(2.64)
9-Nitroanthracene	(2.53)	(2.70)	(2.65)	(2.83)
1-Nitropyrene	(3.27)	(3.31)	(3.38)	(3.42)
3-Nitrofluoranthene	(3.35)	(3.31)	(3.47)	(3.48)
7-Nitrobenz[a]anthracene	(3.55)	(3.71)	(3.59)	(3.75)
6-Nitrochrysene	(3.75)	(3.74)	(3.76)	(3.80)
6-Nitrobenzo[a]pyrene	(4.19)	(4.77)	(4.45)	(4.40)

^aThe retention index values are not certified and are provided for information only. They were determined using the procedure described by Wise et al. in *J. Chromatogr. Sci.* **17**, 457 (1981).

^A Mobile phase: 80 percent methanol in water

^B Mobile phase: 75 percent acetonitrile in water

^C Mobile phase: 80 percent methanol in water

^D Mobile phase: 60 percent acetonitrile in water

Figure 1. GC SEPARATION OF SRM 1587 MONO-NITRATED PAH IN METHANOL

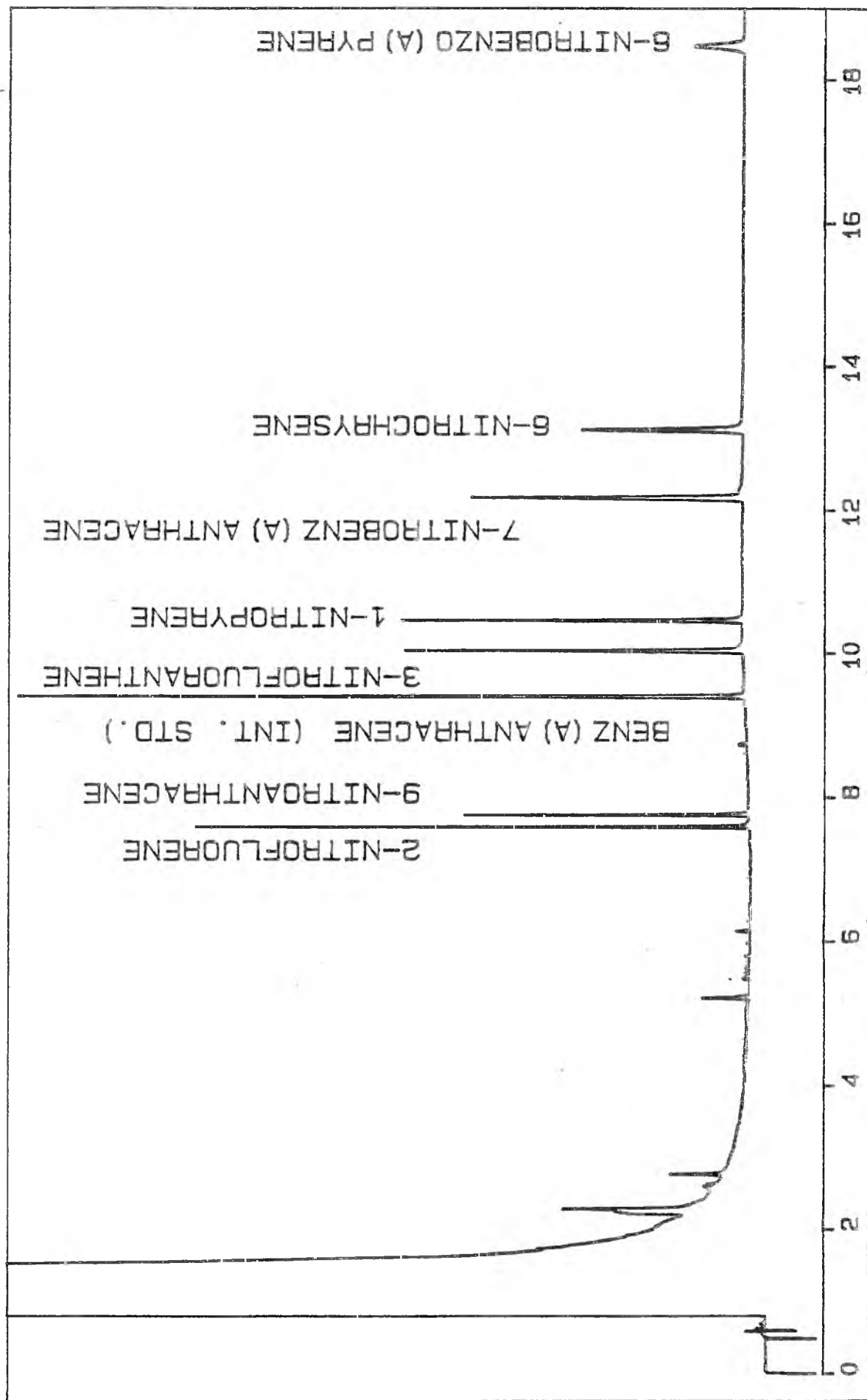
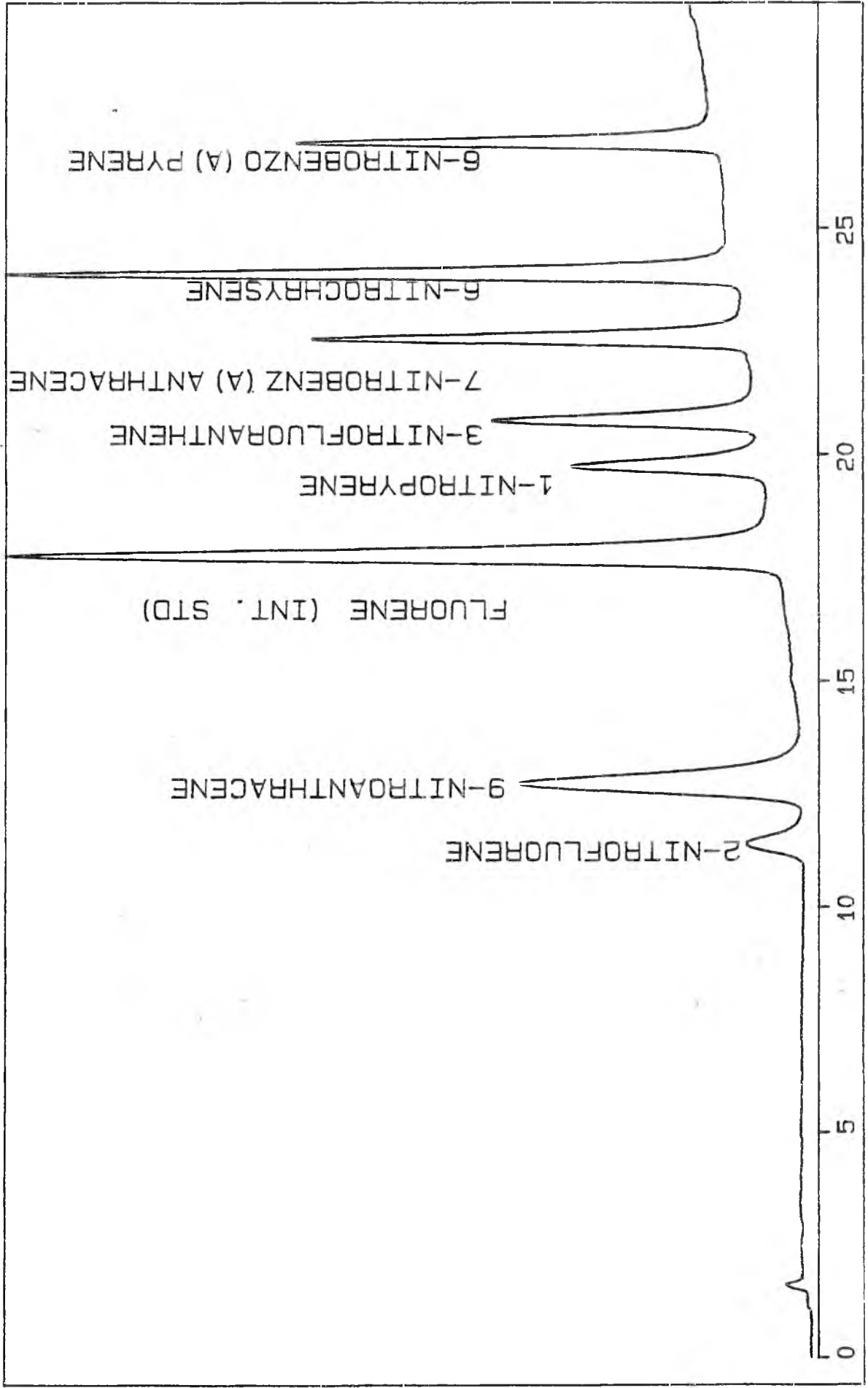


Figure 2. REVERSED-PHASE LC SEPARATION OF SRM 1587 MONO-NITRATED PAH IN METHANOL



ZAŁĄCZNIK 2

Certyfikat materiału odniesienia SRM 1975

Diesel Particulate Extract



National Institute of Standards & Technology

Certificate of Analysis

Standard Reference Material® 1975

Diesel Particulate Extract

This Standard Reference Material (SRM) is intended for use in evaluating analytical methods for the determination of selected polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in diesel particulate extracts and similar matrices. In addition to certified and reference values for selected polycyclic aromatic hydrocarbons, reference values are provided for the concentrations of selected nitro-substituted PAHs, extract residue mass, and mutagenic activity. All of the chemical constituents for which certified and reference values are provided in SRM 1975 were naturally present in the particulate material before extraction. A unit of SRM 1975 consists of four ampoules, each containing approximately 1.2 mL of a dichloromethane extract of diesel particulate matter collected from an industrial diesel-powered forklift.

Diesel particulate matter from the same lot of material that was used to prepare SRM 1975 is also available as SRM 2975, Diesel Particulate Matter (Industrial Forklift) [1].

Certified Concentration Values: Certified values for concentrations, expressed as mass fractions, for eight PAHs are provided in Table 1. A NIST certified value is a value for which NIST has the highest confidence in its accuracy in that all known or suspected sources of bias have been investigated or accounted for by NIST. The certified values for the PAHs are based on the agreement of results obtained at NIST from two or more independent analytical techniques.

Reference Concentration Values: Reference values for concentrations, expressed as mass fractions, are provided for 23 additional PAHs (some in combination) in Table 2. Reference values for concentrations of 18 nitro-substituted and dinitro-substituted PAHs are provided in Table 3. A reference value for the extract residue mass is provided in Table 4. Reference values for mutagenicity in the Salmonella plate-incorporation assay are summarized in Table 5. Reference values are noncertified values that are the best estimate of the true value; however, the values do not meet the NIST criteria for certification and are provided with associated uncertainties that may reflect only measurement precision, may not include all sources of uncertainty, or may reflect a lack of sufficient statistical agreement among multiple analytical methods. Explanations in support of each reference value are given as notes in Tables 2 through 5.

Expiration of Certification: The certification of SRM 1975 is valid until 31 December 2007, within the measurement uncertainties specified, provided the SRM is handled and stored in accordance with the instructions given in this certificate. However, the certification is nullified if the SRM is damaged, contaminated, or modified.

Maintenance of SRM Certification: NIST will monitor this SRM over the period of its certification. If substantive changes occur that affect the certification before the expiration of this certificate, NIST will notify the purchaser. Return of the attached registration card will facilitate notification.

The coordination of the technical measurements leading to the certification of SRM 1975 was under the leadership of S.A. Wise of the NIST Analytical Chemistry Division.

The support aspects involved in the preparation, certification, and issuance of this SRM were coordinated through the NIST Standard Reference Materials Program by B.S. MacDonald.

Willie E. May, Chief
Analytical Chemistry Division

Nancy M. Trahey, Chief
Standard Reference Materials Program

Gaithersburg, MD 20899
Certificate Issue Date: 19 December 2000
See Certificate Revision History on Last Page

SRM 1975

Page 1 of 8

Consultation on the statistical design of the experimental work and evaluation of the data were provided by M.G. Vangel of the NIST Statistical Engineering Division.

The diesel particulate material was provided by M.E. Wright of the Donaldson Company, Inc., Minneapolis, MN. The extract was prepared by M.J. Hays of the NIST Analytical Chemistry Division.

Analytical measurements for the certification of SRM 1975 were performed at NIST by D. Bezabeh, M. Lopez de Alda, R. Deisenhofer, D.L. Poster, and L.C. Sander of the NIST Analytical Chemistry Division. Additional analytical measurements for the nitro-substituted PAHs were provided by M. Nishioka of Battelle, Columbus, OH and C. Chiu of the Analysis and Methods Division, Environment Technology Centre, Environment Canada, Ottawa, Canada. Mutagenicity data were provided by T.J. Hughes, J. Lewtas, and L.D. Claxton of the National Health and Environmental Effects Research Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, NC. The measurements of the extractable residue mass were provided by L. Gratz of Michigan Technological University, Houghton, MI.

NOTICE AND WARNING TO USERS

Storage: SRM 1975 must be stored in its original ampoule at temperatures less than 30 °C away from direct sunlight.

Handling: This material is an extract of naturally occurring diesel particulate material and contains constituents of known and unknown toxicities and mutagenicities. Therefore, appropriate caution and care should be exercised during its handling and use.

Instructions for Use: Samples of the SRM for analysis should be withdrawn from ampoules and used immediately. The certified values are not valid for materials in ampoules that have been stored after opening, even if resealed.

PREPARATION AND ANALYSIS¹

Sample Collection and Preparation: The diesel particulate material was obtained from M.E. Wright of the Donaldson Company, Inc., Minneapolis, MN. The material was collected from a filtering system designed specifically for diesel-powered forklifts [2]. This diesel particulate material was selected based on recommendation by J. Lewtas, U.S. Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, NC. The diesel particulate material was received at NIST in a 55-gal drum. The material was removed from the drum and homogenized in a V-blender for 1 h and then stored in polyethylene bags. A total of 13.7 kg of diesel particulate material was homogenized; a total of 5.65 kg of material was extracted for preparation of SRM 1975 and the remaining diesel particulate material was bottled for distribution as SRM 2975 [1]. Subsamples of approximately 38 g of diesel particulate material were extracted for 24 h with 800 mL of dichloromethane (DCM). Six subsamples were extracted per day for 25 days for a total of 5.6 kg of diesel particulate matter extracted. The extracts from each day were combined and concentrated by evaporation under nitrogen. During the 25 days of extracting the diesel particulate material, the concentrated extract was stored at 40 °C. The final combined extract solution was concentrated to approximately 8 L; this solution was then ampouled with 1.2 mL of extract per ampoule.

Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (Tables 1 & 2): The general approach used for the value assignment of the PAHs in SRM 1975 was similar to that reported for the recent certification of several environmental matrix SRMs [3-6] and consisted of combining results from analyses using different chromatographic separation and detection techniques. This approach consisted of cleanup of the extracts using different solid phase extraction (SPE) or normal-phase liquid chromatography (LC), followed by analysis using the following techniques: (1) reversed-phase liquid chromatography with fluorescence detection (LC-FL) analysis of the total PAH fraction, (2) reversed-phase LC-FL analysis of isomeric PAH fractions isolated by normal-phase LC (i.e., multidimensional LC), (3) gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) analysis of the PAH fraction on two stationary phases of different selectivity, i.e., a 5 % (mole fraction) phenyl-substituted methylpolysiloxane phase and a smectic liquid crystalline stationary phase. The analysis of SRM 1975 has been described in more detail [5].

Two sets of GC/MS results, designated as GC/MS (I) and GC/MS (Sm), were obtained using two columns with different selectivities for the separation of PAHs. For GC/MS (I) analyses, duplicate subsamples approximately

¹ Certain commercial equipment, instrumentation, or materials are identified in this report to adequately specify the experimental procedure. Such identification does not imply recommendation or endorsement by National Institute of Standards and Technology nor does it imply that the materials or equipment identified are necessarily the best available for the purpose.

0.8 g each from nine ampoules of SRM 1975 were analyzed. An internal standard solution (SRM 2269 and SRM 2270) of perdeuterated PAHs was added to the extract subsample, and then the extract was passed through a silica SPE cartridge and eluted with 2 % DCM in hexane. The processed extract was then analyzed by GC/MS using a 0.25 mm i.d. x 30 m fused silica capillary column with a 5 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase (0.25 μm film thickness) (DB-5 MS, J&W Scientific, Folsom, CA). For GC/MS (Sm) analyses, 0.8 g subsamples from six ampoules of SRM 1975 were prepared as described above for GC/MS (I) using an aminopropylsilane SPE cartridge. The processed extract was then analyzed by GC/MS using 0.2 mm i.d. x 25 m (0.15 μm film thickness) smectic liquid crystalline phase (SB-Smectic, Dionex, Lee Scientific Division, Salt Lake City, UT).

Two sets of LC-FL results, designated as LC-FL (Total) and LC-FL (Fraction), were used in the certification process. Subsamples of approximately 0.8 g from each of six ampoules of SRM 1975 were spiked with the perdeuterated internal standards (SRM 2269 and SRM 2270) and processed through two aminopropylsilane SPE cartridges connected in series to obtain the total PAH fraction. A second 0.8 g subsample from each of six ampoules was processed as described above and the total PAH fraction was then fractionated further on a semi-preparative aminopropylsilane column ($\mu\text{Bondapak NH}_2$, 9 mm i.d. x 30 cm, Waters Associates, Milford, MA) to isolate a four to six aromatic ring PAH fraction as described previously [7-9]. The total PAH fraction and the four to six aromatic ring PAH fractions were analyzed using a 5- μm particle-size polymeric octadecylsilane (C_{18}) column (4.6 mm i.d. x 25 cm, Hypersil-PAH, Keystone Scientific, Inc., Bellefonte, PA) with wavelength programmed fluorescence detection [8,9].

Homogeneity Assessment for PAHs: The homogeneity of SRM 1975 was assessed by analyzing duplicate samples of 0.8 g each from nine bottles selected by stratified random sampling. Samples were processed, and analyzed as described above for GC/MS (I). No statistically significant differences among ampoules were observed for the PAHs at the 0.8 g sample amount.

Nitro-Substituted PAHs (Table 3): SRM 1975 was analyzed at NIST and two other laboratories for the determination of nitro-substituted PAHs. At NIST, four samples of SRM 1975 (~0.8 g each) were spiked with the following perdeuterated nitro-PAHs for use as internal standards: 9-nitroanthracene- d_9 , 3-nitrofluoranthene- d_9 , 1-nitropyrene- d_6 , and 6-nitrochrysene- d_{11} . Each sample was divided into two subsamples which were then processed through an aminopropylsilane SPE cartridge using 40 mL of 20 % DCM in hexane. The concentrated eluant was then subjected to normal-phase LC using a semi-preparative amino/cyano phase column with a mobile phase of 20 % DCM in hexane to isolate the nitro-PAH fraction. The nitro-PAH fraction was analyzed by GC with negative chemical ionization mass spectrometry (GC/NCI-MS) using a 0.25 mm i.d. x 30 m fused silica capillary column containing a 5 % diphenyl-substituted dimethylsiloxane phase, 0.25 μm film thickness, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA.

Additional nitro-PAH measurements were provided by Battelle, Columbus, OH and the Analysis and Methods Division of Environment Canada, Ottawa, Canada. For the Battelle measurements, five samples were prepared at each of two concentrations of extractable mass (0.2 and 2.0 mg/mL). Each sample was spiked with the following perdeuterated nitro-PAHs: 1-nitronaphthalene- d_7 , 3-nitrobiphenyl- d_5 , 4-nitrobiphenyl- d_5 , 9-nitroanthracene- d_9 , and 1-nitropyrene- d_6 . Each sample was analyzed by GC/NCI-MS on a 60 m 5% phenyl-substituted methylpolysiloxane column (32 mm i.d., 0.25 μm film thickness). For the Environment Canada measurements, three samples were spiked with the following perdeuterated nitro-PAHs: 2-nitrofluorene- d_8 , 9-nitroanthracene- d_9 , 3-nitrofluoranthene- d_9 , 1-nitropyrene- d_6 , 6-nitrochrysene- d_{11} , and 6-nitrobenzo[*a*]pyrene- d_{11} . Each sample was analyzed by GC on a 30 m 5 % phenyl-substituted methylpolysiloxane column (25 mm i.d., 0.25 μm film thickness) with high resolution mass spectrometry detection using negative chemical ionization (GC/NCI-HRMS).

Extract Residue Mass (Table 4): The concentration of the extract residue mass was determined from triplicate measurements from each of six ampoules of SRM 1975. A 50 μL subsample of SRM 1975 was allowed to evaporate to dryness; after reaching constant mass, the residue mass was determined.

Mutagenicity Assay (Table 5): The values for the mutagenic activity of SRM 1975 were determined within an Environmental Protection Agency (EPA) laboratory using the *Salmonella typhimurium*/mammalian microsome mutagenicity assay [10-12]. The protocol for this study [13] was a modification of the protocol used in a previous 20 laboratory international study [14,15] on three other SRMs; SRM 1650 (a diesel particulate sample), SRM 1649 (an air particulate sample), and SRM 1597 (a coal tar extract). Modifications were made based upon the recommendations from the participants of the international study [16]. This study used tester strains YG1021 [17], YG1026 [17], TA98NR [18] and TA100NR [18] in addition to strains TA98 and TA100 that were used in the previous studies.

Prior to testing, an aliquot of SRM 1975 was solvent-exchanged into dimethylsulfoxide (DMSO) to create a starting concentration of 1.0 mg SRM 1975/mL DMSO (equivalent to 1 µg/µL). Adhering to published guidelines [19], the standard *Salmonella typhimurium* plate incorporation assay [10] was used. Modifications that developed from the recommendations noted above included the following: (1) the base layer agar contained trace amounts of histidine and biotin rather than being incorporated in the overlay agar, (2) the plates were incubated for 72 h, (3) the colony counter was calibrated before each use with both hand-counted plates and a template disk with a known number of dots which simulated colonies, (4) each test round had duplicate plates per dose and 10 arithmetically-spaced doses that were contained within one order of magnitude, and (5) four test rounds were conducted. The GeneTox Manager software [20] was used to record the data and to generate comparative slope values using three different statistical programs [21-23]. Table 5 provides the average slope values and the percent coefficient of variation for these values for the four experiments with each condition. A more thorough presentation of methods, results, and conclusions for the mutagenicity assay of SRM 1975 has been published [13].

Although the EPA laboratory providing the mutagenicity data may not be representative of all laboratories that conduct the Salmonella assay, this laboratory, which was established in 1980, has been involved in a variety of collaborative studies, and is well published in the use of the assay. Results, therefore, can be said to come from a well-established laboratory and are likely to represent "typical" bioassay results for SRM 1975.

Table 1. Certified Concentrations for Selected PAHs in SRM 1975

	Mass Fractions (mg/kg) ^a
Phenanthrene ^{b,c}	8.00 ± 0.20
Fluoranthene ^{b,c}	13.5 ± 0.6
Benz[<i>a</i>]anthracene ^{b,d,e}	0.092 ± 0.015
Chrysene ^{c,d,e}	1.95 ± 0.07
Triphenylene ^{c,d,e}	2.38 ± 0.10
Benzo[<i>b</i>]fluoranthene ^{c,d,e}	3.20 ± 0.10
Benzo[<i>k</i>]fluoranthene ^{c,d}	0.174 ± 0.050
Benzo[<i>e</i>]pyrene ^{b,d}	0.268 ± 0.023

^a Each set of results is expressed as the certified value √ the expanded uncertainty. Each certified value is a mean of the means from two or more analytical methods. For results from two methods, the certified value is the equally weighted mean; for results from three or more methods, the certified value is the mean weighted as described in Paule and Mandel [24]. Each uncertainty, computed according to the CIPM approach as described in the ISO Guide [25], is an expanded uncertainty at the 95 % level of confidence, which includes random sources of uncertainty within each analytical method and among methods, as well as uncertainty due to the variation among the bottles. The expanded uncertainty defines a range of values within which the true value is believed to lie, at a level of confidence of approximately 95 %.

^b GC/MS on 5 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase

^c LC-FL of total PAH fraction

^d GC/MS using a smectic liquid crystalline phase

^e LC-FL of the four to six aromatic ring PAH fraction

The concentrations for selected PAHs in Table 2 are provided as reference values because either the results have not been confirmed by an independent analytical technique as required for certification or the agreement among results from multiple methods was insufficient for certification. Although bias has not been evaluated for the procedures used, the reference values should be useful for comparison with results obtained using similar procedures.

Table 2. Reference Concentrations for Selected PAHs in SRM 1975

	Mass Fractions (mg/kg) ^a
Naphthalene ^b	0.67 ± 0.01
1-Methylnaphthalene ^b	0.39 ± 0.01
2-Methylnaphthalene ^b	0.69 ± 0.02
Biphenyl ^b	0.24 ± 0.01
Fluorene ^b	0.110 ± 0.003
1-Methylphenanthrene ^b	0.50 ± 0.04
2-Methylphenanthrene ^b	1.7 ± 0.1
3-Methylphenanthrene ^b	0.88 ± 0.07
4- and 9-Methylphenanthrene ^b	0.25 ± 0.03
1,2-Dimethylphenanthrene ^b	0.017 ± 0.002
1,6-, 2,5-, and 2,9-Dimethylphenanthrene ^b	0.14 ± 0.01
1,7-Dimethylphenanthrene ^b	0.122 ± 0.008
1,8-Dimethylphenanthrene ^b	0.026 ± 0.003
2,6-Dimethylphenanthrene ^b	0.14 ± 0.01
2,7-Dimethylphenanthrene ^b	0.127 ± 0.008
3,5 and 3,6-Dimethylphenanthrene ^b	0.090 ± 0.009
Benzo[ghi]fluoranthene ^c	4.3 ± 0.1
Pyrene ^{b,d}	0.42 ± 0.13
1-, 3-, and 7-Methylfluoranthene ^b	0.092 ± 0.004
Benzo[c]phenanthrene ^{b,c}	0.51 ± 0.07
Benzo[ghi]perylene ^b	0.038 ± 0.006
Indeno[1,2,3-cd]pyrene ^b	0.12 ± 0.01
Dibenz[a,c]anthracene and Dibenz[a,h]anthracene ^b	0.079 ± 0.013

^a Each set of results is expressed as the reference value ± the expanded uncertainty. Each reference value is the mean of the results from one analytical method or the equally weighted mean of the means of two analytical methods. Each uncertainty, computed according to the CIPM approach as described in the ISO Guide [25], is an expanded uncertainty at the 95 % level of confidence, which includes random sources of uncertainty within each analytical method and between methods. The expanded uncertainty defines a range that contains the best estimate of the true value, at a level of confidence of approximately 95 %.

^b GC/MS on 5 % phenyl-substituted methylpolysiloxane phase

^c GC/MS using a smectic liquid crystalline phase

^d LC-FL of the four to six aromatic ring PAH fraction

The concentrations for selected nitro-substituted PAHs in Table 3 are provided as reference values because the results have not been confirmed by an independent analytical technique as required for certification. Although bias has not been evaluated for the procedures used, the reference values should be useful for comparison with results obtained using similar procedures.

Table 3. Reference Concentrations for Selected Nitro-substituted PAHs in SRM 1975

	Mass Fractions (mg/kg) ^a
1-Nitronaphthalene ^b	0.013 ± 0.003
2-Nitronaphthalene ^b	0.039 ± 0.006
4-Nitrobiphenyl ^b	0.05 ± 0.03
9-Nitroanthracene ^c	1.36 ± 0.03
9-Nitrophenanthrene ^c	0.27 ± 0.01
2-Nitrofluoranthene ^b	0.06 ± 0.03
3-Nitrofluoranthene ^c	1.47 ± 0.01
8-Nitrofluoranthene ^b	0.25 ± 0.03
1-Nitropyrene ^c	16.4 ± 0.2
4-Nitropyrene ^b	0.07 ± 0.01
7-Nitrobenz[<i>a</i>]anthracene ^c	1.62 ± 0.03
6-Nitrochrysene ^c	0.782 ± 0.007
6-Nitrobenzo[<i>a</i>]pyrene ^c	0.641 ± 0.006
1-Nitrobenzo[<i>e</i>]pyrene ^c	0.83 ± 0.05
3-Nitrobenzo[<i>e</i>]pyrene ^c	2.2 ± 0.2
1,3-Dinitropyrene ^c	0.60 ± 0.01
1,6-Dinitropyrene ^c	1.39 ± 0.04
1,8-Dinitropyrene ^c	1.55 ± 0.02

^a Each set of results is expressed as the reference value ± the expanded uncertainty. Each uncertainty, computed according to the CIPM approach as described in the ISO Guide [25], is an expanded uncertainty at the 95 % level of confidence. The expanded uncertainty defines a range that contains the best estimate of the true value, at a level of confidence of approximately 95 %.

^b Reference value is based on measurements made at Battelle.

^c Reference value is based on measurements made at NIST. NIST values were confirmed by measurements at Battelle and/or Environment Canada; confirmation measurements were typically within 25 % of the NIST measurements.

The extract residue mass in Table 4 is provided as a reference value because the result is method specific as defined by the procedure described in the Preparation and Analysis section. Although bias has not been evaluated for the procedure used, the reference value should be useful for comparison with results obtained using a similar procedure.

Table 4. Reference Value for Extract Residue Mass in SRM 1975

Residue Mass	19.3 ± 0.2 mg/mL ^a
--------------	-------------------------------

^a This set of results is expressed as the reference value ± the expanded uncertainty. The reference value for the extract residue mass is the mean value of 18 measurements. Each uncertainty, computed according to the CIPM approach as described in the ISO Guide [25], is an expanded uncertainty at the 95 % level of confidence. The expanded uncertainty defines a range that contains the best estimate of the true value, at a level of confidence of approximately 95 %.

The mutagenicity results in Table 5 are provided as reference values because the results are method specific as defined by the corresponding procedures described in the Preparation and Analysis section. Although bias has not been evaluated for the procedures used, the reference values should be useful for comparison with results obtained using similar procedures.

Table 5. Reference Values for Mutagenicity (revertants/ μg of organic extract) of SRM 1975^a

Strain	Average Without S9 Activation	% CV	Average With S9 Activation	% CV
Results based on Bernstein et al. [21] model slope values				
TA98	462	8.6	125	13.7
TA100	68	16.8	65	15.2
TA98NR	158	37.8	50	48.5
TA100NR	45	6.5	18	18.7
YG1021	612	8.4	226	5.4
YG1026	137	18.5	121	8.7
Results based on Krewski et al. [22] model slope values				
TA98	465	3.7	121	14.5
TA100	111	28.2	65	16.8
TA98NR	181	42.4	44	44.8
TA100NR	46	9.1	18	18.9
YG1021	630	5.0	224	6.5
YG1026	158	17.4	126	8.8
Results based on Stead et al. [23] model slope values				
TA98	587	20.2	147	15.9
TA100	120	23.7	72	15.6
TA98NR	205	42.9	80	58.3
TA100NR	48	11.5	28	16.1
YG1021	672	11.8	257	9.5
YG1026	178	31.5	136	7.8

^a A detailed description of the determination of the mutagenicity values for SRM 1975 is provided in Hughes et al. [13].

REFERENCES

- [1] Certificate of Analysis, SRM 2975 Diesel Particulate Matter (Industrial Forklift), National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg MD, 07 November 2000.
- [2] Wright, M.E., Klein, A.D. Jr., and Stesniak, E.J., "A Diesel Exhaust Filter System for Industrial Diesel Forklifts," SAE Technical Paper Series 911852, Warrendale, PA (1991).
- [3] Wise, S.A., Schantz, M.M., Benner, B.A. Jr., Hays, M.J., and Schiller, S.B., "Certification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in a Marine Sediment Standard Reference Material," *Anal. Chem.* 67, pp 1171-1178, (1995).
- [4] Wise, S.A., Schantz, M.M., Hays, M.J., Koster, B.J., Sharpless, K.S., Sander, L.C., and Schiller, S.B., "Certification of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Mussel Tissue Standard Reference Materials," *Polycyclic Aromat. Compd.* 12, pp 21-26, (1997).
- [5] Poster, D.L., Lopez de Alda, M.J., Schantz, M.M., Sander, L.C., Vangel, M.G., and Wise, S.A., "Certification of a Diesel Particulate Related Standard Reference Material (SRM 1975) for PAHs," *Polycyclic Aromat. Compd.*, 14/15, pp 23-31, (1999).
- [6] Wise, S.A., Sander, L.C., Schantz, M.M., Hays, M.J., and Benner, B.A. Jr., "Recertification of Standard Reference Material (SRM) 1649, Urban Dust, for the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)," *Polycyclic Aromat. Compd.*, 13, pp 419-456, (2000).

- [7] Wise, S.A., Chesler, S.N., Hertz, H.S., Hilpert, L.R., and May, W.E., "Chemically-Bonded Aminosilane Stationary Phase for the High Performance Liquid Chromatographic Separation of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons," *Anal. Chem.* **49**, pp 2306-2310, (1977).
- [8] May, W.E. and Wise, S.A., "Liquid Chromatographic Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Air Particulate Extracts," *Anal. Chem.* **56**, pp 225-232, (1984).
- [9] Wise, S.A., Benner, B.A., Byrd, G.D., Chesler, S.N., Rebbert, R.E., and Schantz, M.M., "Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in a Coal Tar Standard Reference Material," *Anal. Chem.* **60**, pp 887-894, (1988).
- [10] Marion, D. and Ames, B., "Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test," *Mutat. Res.* **113**, pp 73-212, (1983).
- [11] Claxton, L.D., Houk, V.S., Monteith, L.G., Myers, L.E., and Hughes, T.J., "Assessing the Use of Known Mutagens to Calibrate the *Salmonella typhimurium* Mutagenicity Assay: I. Without Exogenous Activation," *Mutat. Res.* **253**, pp 137-147, (1991).
- [12] Claxton, L.D., Houk, V.S., Warner, J.R., Myers, L.E., and Hughes, T.J., "Assessing the Use of Known Mutagens to Calibrate the *Salmonella typhimurium* Mutagenicity Assay: II. With Exogenous Activation," *Mutat. Res.* **253**, pp 149-159, (1991).
- [13] Hughes, T.J., Lewtas, J., and Claxton, L.D., "Development of a Standard Reference Material for Diesel Mutagenicity in the Salmonella Plate Incorporation Assay," *Mutat. Res.* **391**, pp 243-258, (1997).
- [14] Claxton, L.D., Creason, J., Lerous, B., Agurell, E., Bagley, S., Bryant, D.W., Courtois, Y.A., Douglas, G., Clare, C.B., Goto, S., Quillardet, P., Jagannath, D.R., Kataoka, K., Mohn, G., Nielsen, P.A., Ong, T., Pederson, T.C., Shimizu, H., Nylund, L., Tokiwa, H., Vink, G.J., Wang, Y., and Warshawsky, D., "Results of the IPCS Collaborative Study on Complex Mixtures," *Mutat. Res.* **276**, pp 23-32, (1992).
- [15] Lewtas, J., Claxton, L.D., Rosenkranz, H.S., Schuetzle, D., Shelby, M., Matsushita, H., Wurgler, F.E., Zimmerman, F.K., LoFroth, G., May, W.E., Krewski, D., Matsushima, T., Ohinishi, Y., Gopalan, H.N.G., Sarin, R., and Becking, G.C., "Design and Implementation of a Collaborative Study of the Mutagenicity of Complex Mixtures in *Salmonella typhimurium*," *Mutat. Res.* **276**, pp 3-9, (1992).
- [16] Claxton, L.D., Douglas, G., Krewski, D., Lewtas, J., Matsushita, H., and Rosenkranz, H., "Overview, Conclusions, and Recommendations of the IPCS Collaborative Study on Complex Mixtures," *Mutat. Res.* **276**, pp 61-80, (1992).
- [17] Watanabe, M., Ishidate, M., and Nohmi, T., "A Sensitive Method for the Detection of Mutagenic Nitroarenes: Construction of Nitroreductase-overproducing Derivatives of *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100," *Mutat. Res.* **216**, pp 211-220, (1989).
- [18] Rosenkranz, H.S., and Mermelstein, R., "Mutagenicity and Genotoxicity of Nitroarenes: All Nitro-containing Chemicals were not Created Equal," *Mutat. Res.* **114**, pp 217-267, (1983).
- [19] Claxton, L.D., Allen, J., Augletta, A., Mortlesman, Nestman, E., and Zeiger, E., "Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity," *Mutat. Res.* **189**, pp 83-91, (1987).
- [20] Claxton, L.D., Creason, J., Nader, J., Poteat, W., and Orr, J., "GeneTox Manager for Bacterial Mutagenicity Assays: A Personal Computer and Minicomputer System," *Mutat. Res.* **342**, pp 87-94, (1995).
- [21] Bernstein, L., Kaldor, J., McCann, J., and Pike, M., "An Empirical Approach to the Statistical Analysis of Mutagenicity Data from the Salmonella Test," *Mutat. Res.* **97**, pp 267-281, (1982).
- [22] Krewski, D., Leroux, B.G., Bleuer, S.R., and Broekhoven, L.H., "Modeling the Ames Salmonella/Microsome Assay," *Biometrics* **49**, pp 499-510, (1993).
- [23] Stead, A., Hasselblad, V., Creason, J., and Claxton, L.D., "Modeling the Ames Test," *Mutat. Res.* **85**, pp 13-27, (1981).
- [24] Paule, R.C. and Mandel, J., "Consensus Values and Weighting Factors," *J. Research NBS* **87**, pp 377-385, (1982).
- [25] *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*, ISBN 92-67-10188-9, 1st Ed. ISO, Geneva, Switzerland, (1993); see also Taylor, B.N. and Kuyatt, C.E., "Guidelines for Evaluating and Expressing Uncertainty of NIST Measurement Results," NIST Technical Note 1297, U.S. Government Printing Office, Washington DC, (1994); available at <http://physics.nist.gov/Pubs/>.

Certificate Revision History: 19 December 2000 (References corrected in Table 3); 07 November 2000 (Original certificate date).

Users of this SRM should ensure that the certificate in their possession is current. This can be accomplished by contacting the SRM Program at: (301) 975-6776, Fax (301) 926-4751, e-mail srminfo@nist.gov, or via the Internet <http://www.nist.gov/srm>.